



RAFAELA PRISCILA ANTONIO

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLS DE RESISTÊNCIA
AO MOFO BRANCO E DE MECANISMOS
BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA
DE DEFESA EM FEIJOEIRO**

LAVRAS-MG

2011

RAFAELA PRISCILA ANTONIO

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLS DE RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO E
DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE
DEFESA EM FEIJOEIRO**

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

Orientador
Dr. João Bosco dos Santos

**LAVRAS-MG
2011**

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

Antonio, Rafaela Priscila.

Identificação de QTLs de resistência ao mofo branco e de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em feijoeiro / Rafaela Priscila Antonio. – Lavras : UFLA, 2011.

155 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3. Compostos fenólicos. 4. Proteínas relacionadas à patogênese. 5. Marcadores SSR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.65294

RAFAELA PRISCILA ANTONIO

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLS DE RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO E
DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DE
DEFESA EM FEIJOEIRO**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2011.

Dra. Ângela de F. B. Abreu EMBRAPA

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães EMBRAPA

Dr. Flávio H. V. de Medeiros UFLA

Dr. José Airton R. Nunes UFLA

Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

**LAVRAS-MG
2011**

Aos meus pais, Lourdes e Rafael, que sempre acreditaram que seria possível conseguir um futuro melhor.

Ao meu noivo Pedro, que com seu amor, companheirismo e amizade, tornou esta conquista possível.

Aos Meus irmãos, que com todo seu carinho, me deram força para conseguir enfrentar esta batalha.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, para dar mais um passo em minha caminhada.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização do Doutorado, e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco, pela orientação, serenidade, paciência, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende (Departamento de fitopatologia) por dispor do laboratório de Fisiologia do Parasitismo e dos equipamentos para as análises bioquímicas.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos. À doutora Ângela, pelos ensinamentos e boa convivência nas tarefas de campo. Ao Dr. Pedro Martins R. Júnior, pela disponibilidade e valiosas sugestões apresentadas para a melhoria do trabalho.

Aos amigos Jeanne, Fabrício, Leticia, Raoni, Ranoel, Lidiane, Izabela, Paulo, Renata, Jerônimo e Francine, Fernando, Emiliano, Cristovão e Jack, Aricléia, Clara e Marlice por deixar a vida em Lavras muito mais alegre.

Aos amigos do laboratório de Genética molecular da UFLA, Thais, Igor, Karla, Melina, Leticia, Fernanda, Juliana B., Juliana, Gheysa, Paulo, Filipe, Márcia, Dayane e Marynei por toda a ajuda e amizade.

Ao amigo Lamartine, pela disposição, por estar sempre disposto a nos auxiliar e passar seus conhecimentos com toda a competência.

A todos os amigos do GEN e do “feijão”, pelo convívio, amizade e ajuda.

Aos funcionários do departamento de biologia: Heloíza, Zélia, Rafaela, Irondina e Du, pelo carinho e convivência amigável.

Aos meus pais, Lourdes e Rafael e meus irmãos, Rudy, Rosana, Rosy, Fátima e Daniel, pelo apoio incondicional durante todas as etapas na minha vida, e pelo exemplo de vida indispensável para me tornar uma pesquisadora.

Ao meu noivo Pedro, pela presença constante, compreensão irrestrita, carinho, amizade, paciência, enfim, por estar ao meu lado.

A todos que contribuíram para o êxito deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

Os objetivos do trabalho foram identificar e mapear marcadores do tipo microssatélite (SSR) ligados a *Quantitative trait loci* (QTLs) de resistência ao mofo branco e avaliar mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa de genótipos de feijoeiro a esta doença. Para identificação e mapeamento de marcadores, os genitores foram cruzados e posteriormente foi obtida a geração F₂. Das 223 plantas F₂ obtidas foi extraído o DNA para avaliação molecular com *primers* microssatélite polimórficos selecionados nos genitores. Das plantas F₂ foram obtidas também 223 progênies F_{2:3} e F_{2:4} que foram utilizadas para as avaliações fenotípicas na safra do inverno de 2009 e das águas de 2009/2010, respectivamente. Foi utilizado o delineamento látice triplo 15 x 15. Foram detectadas diferenças genéticas significativas (P<0,01) entre as progênies em todas as safras pelo método do “*Straw test*”. As estimativas de herdabilidade foram moderadas, 55,81% e 72,33%, para as progênies F_{2:3} e F_{2:4}, respectivamente. Houve interação safras x progênies (P<0,01). Os dados moleculares e fenotípicos foram utilizados nas análises de regressão. Marcadores foram identificados como potenciais para seleção indireta visando à resistência ao mofo branco, com destaque para BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9 que foram mais estáveis. Foi obtido um mapa molecular parcial com comprimento total de 550,65 cM. O método por intervalo composto identificou quatro QTLs, WM2.1, WM2.2, WM2.3 e WM2.4 que estão localizados entre os marcadores mais estáveis e que obtiveram R² relativamente elevado. O presente trabalho demonstrou que a resistência do feijoeiro ao mofo branco possui herança quantitativa devido pelo menos aos quatro QTLs identificados. Esses resultados evidenciaram também que se o objetivo é obter linhagens para resistência ao mofo branco, pela sua natureza quantitativa, a seleção deve ser realizada nas mesmas condições de cultivo da cultura, para aumentar a chance de sucesso com a seleção. Para avaliação dos mecanismos bioquímicos foram avaliados os genótipos Ex Rico 23, G122, CNFC 9506 e M20 em dois experimentos. No primeiro experimento avaliou-se a reação desses genótipos a *Sclerotinia sclerotiorum* e no segundo avaliou-se a atividade das enzimas de defesa, quantificação de fenóis solúveis totais e lignina em plantas inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum*. A inoculação foi realizada pelo método *Straw test*. Os genótipos G122, CNFC 9506 e Ex Rico 23 apresentaram maior resistência ao mofo branco (P<0,01), diferindo do genótipo suscetível M20. Maior atividade de peroxidases (POX) e fenilalanina amônia-liase (PAL) foi observada nos genótipos Ex Rico 23 e G122 em relação ao genótipo suscetível M20. Maior atividade de polifenoloxidases (PPO) e quitinases (CHI) foi observada nos genótipos Ex Rico 23 e CNFC 506. Nos genótipos CNFC9506,

Ex Rico 23 e G122 foram observadas maior atividade de β -1,3-glucoanases (GLU) e maiores teores de lignina. Não se observou diferença nos teores de fenóis solúveis totais nos quatro genótipos avaliados, com ou sem inoculação com *S. sclerotiorum*. O aumento da atividade das enzimas de defesa pode ser indicativo da associação dessas enzimas com a resistência parcial ao mofo branco em feijoeiro.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phaseolus vulgaris*. Marcadores SSR. Proteínas Relacionadas à Patogênese. Compostos fenólicos.

GENERAL ABSTRACT

The purposes of the study were to identify and to map microsatellite markers (SSR) linked to quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to white mold and evaluate biochemical mechanisms involved in defense response of common bean genotypes to this disease. For identification and mapping of markers, the parents were crossed and subsequently obtained the F₂ generation. From 223 plants obtained in the F₂ generation it was extracted the DNA, for the molecular evaluation with microsatellite polymorphic primers selected on parents. It was obtained 223 progenies F_{2:3} and F_{2:4} (derived from F₂ plants), and they were used for phenotypic evaluations in the winter season of 2009 and rainy season of the 2009/2010, respectively. It was used the triple lattice design 15 x 15. It was detected significant genetic differences of resistance levels (P < 0.01) among the progenies in all seasons, evaluated by the "Straw test". Heritability estimates for progenies F_{2:3} and F_{2:4} were moderate 55.81% and 72.33%, respectively. There was interaction progenies by seasons (P < 0.01). The molecular and phenotypic data were used in the regression analysis. Markers were identified as potential for indirect selection for resistance to white mold, especially BM175, SSR-IAC159, ATA7 and ATA9 which were more stable. Out of the 40 polymorphic primers 29 showed segregation distortion and all were used to establish the linkage groups. It was obtained a partial molecular map with a total length of 550.65 cM. The composite interval mapping analyses identified four QTLs WM2.1, WM2.2, WM2.3 and WM2.4 which were stable and that had relatively high R². This study showed which that reaction of common bean to white mold has quantitative inheritance due to at least the four identified QTLs. These results also showed that if the objective is to obtain lines for resistance to white mold, considering its quantitative nature, the selection must be made under the same conditions, to increase the chance of successful selection. For evaluation of the biochemical mechanisms the genotypes Ex Rico 23, G122, CNFC 9506 and M20 were evaluated in two experiments. In the first experiment, it was evaluated the reaction of these genotypes to white mold and in the second experiment it was evaluated the activity of defense enzymes, and quantification of total soluble phenolics and lignin in plants inoculated and not inoculated with *S. sclerotiorum*. The inoculation was carried out by Straw test. The G122, CNFC 9506 and Ex Rico 23 genotypes showed greater resistance to white mold (P < 0.01), differing from the susceptible genotype M20. Increased activity of peroxidase (POX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was observed in genotypes Ex Rico 23 and G 122 in relation to the susceptible genotype M20. Increased activity of polyphenol oxidase (PPO) and chitinase (CHI) was observed in Ex Rico 23 genotypes and CNFC 9506. The genotypes CNFC 9506, Ex Rico 23 and G122

presented increased activity of β -1, 3-glucanase (GLU) and higher levels of lignin. No difference was observed in total soluble phenolic content in the four genotypes, with or without inoculation with *S. sclerotiorum*. The increased activity of defense enzymes may be indicative of their association of these enzymes with partial resistance to white mold in common bean.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phaseolus vulgaris*. SSR markers. Pathogenesis-Related Proteins. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	13
1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Mofo branco (<i>S. sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary)	16
2.2	Mecanismos de defesa da planta contra patógenos	22
2.3	Avaliação para resistência ao mofo branco por meio da inoculação de micélio (<i>Straw test</i>)	28
2.4	Marcadores moleculares na resistência de plantas	29
2.5	Mapeamento genético e identificação de QTLs	31
2.5.1	Marcadores mais utilizados em mapeamento genético	33
2.5.2	Populações de mapeamento	35
2.5.3	Mapeamento genético	39
2.5.4	Mapeamento de QTLs	43
3	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 2 Identificação de QTLs do feijoeiro de resistência ao mofo branco	67
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1	Local de realização do experimento	72
2.2	Materiais genéticos e obtenção das populações	72
2.3	Avaliação genotípica das plantas F₂	73
2.3.1	Extração do DNA das plantas F₂ e dos genitores	73
2.3.2	Reação com marcadores microssatélites e pré-seleção dos pares de <i>primers</i> para genotipagem da população F₂	74
2.3.3	Teste da alteração das frequências genotípicas na população segregante	75
2.4	Avaliação fenotípica em campo das progênes F_{2:3} e F_{2:4}	76
2.5	Análises estatísticas	78
2.6	Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla	80
2.7	Construção do mapa molecular	81
2.8	Localização de QTLs nos grupos de ligação	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Avaliação fenotípica	84
3.2	Avaliação genotípica	89
3.2.1	Emprego de microssatélites na população segregante	89
3.2.2	Segregação dos marcadores na população segregante	89
3.3	Construção do mapa molecular	93

3.4	Localização de QTLs nos grupos de ligação.....	97
3.5	Identificação de QTLs por meio de regressão linear e múltipla.....	103
4	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS.....	109
	CAPÍTULO 3 Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa do feijoeiro a <i>S. sclerotiorum</i>.....	119
1	INTRODUÇÃO.....	121
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1	Material genético.....	123
2.2	Obtenção do inóculo e inoculação.....	124
2.3	Reação de genótipos de feijoeiro a <i>S. sclerotiorum</i>	125
2.4	Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa.....	126
2.4.1	Preparo de extratos caulinares.....	127
2.4.1.1	Proteínas totais.....	127
2.4.1.2	Peroxidases de guaicol e polifenoloxidasas.....	127
2.4.1.3	Quitinase.....	128
2.4.1.4	β -1,3-glucanase.....	128
2.4.1.5	Fenilalanina amônia-liase.....	129
2.4.2	Preparo de tecidos caulinares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais.....	129
2.4.2.1	Determinação de lignina solúvel.....	130
2.4.2.2	Determinação de fenóis solúveis totais.....	131
2.5	Análise dos dados.....	131
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
3.1	Reação de genótipos de feijoeiro a <i>S. sclerotiorum</i>	132
3.2	Peroxidases e polifenoloxidasas.....	133
3.3	Quitinase e β -1,3-glucanase.....	137
3.4	Fenilalanina amônia-liase.....	140
3.5	Fenóis solúveis totais e lignina.....	142
4	CONCLUSÕES.....	146
	REFERÊNCIAS.....	147

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é uma doença devastadora do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e em regiões de clima temperado pode causar perdas de 30% a 90% (LORENCETTI, 2006; SCHWARTZ et al., 2006). Não tem sido encontrada resistência completa ao mofo branco em feijoeiro, no entanto, tem sido reportada resistência fisiológica parcial em feijões de origem Mesoamericana de grãos pequenos como Ex Rico 23 e de origem Andina como G122 e Jalo (GONÇALVES; SANTOS, 2010; TERÁN; SINGH, 2010).

O melhoramento para resistência ao mofo branco tem sido muito lento devido à baixa herdabilidade, às técnicas complexas de avaliação, à grande influência ambiental e mecanismos de escape da planta que confundem a expressão e detecção de resistência fisiológica em campo (TERÁN; SINGH, 2010). Portanto, o desenvolvimento de métodos confiáveis de avaliação de resistência de feijoeiro ao mofo branco permanece como uma das prioridades no melhoramento dessa espécie.

Assim, o entendimento das relações patógeno-hospedeiro identificando na planta características ambientalmente estáveis bem como a utilização de ferramentas biotecnológicas como marcadores de DNA pode auxiliar de forma indireta na identificação de genótipos superiores (RESENDE et al., 2008).

O melhor entendimento das interações patógeno-hospedeiro tem sido proporcionado pelos avanços da genética, epidemiologia e fisiologia do parasitismo, ficando evidente que esse tipo de relação envolve fatores genéticos de ataque e de defesa presentes no patógeno e no hospedeiro, respectivamente,

sob influência do ambiente (FLOR, 1971). Em muitos casos, como no patossistema mofo branco (*S. sclerotiorum*) - feijoeiro (*P. vulgaris* L.), a resistência é poligênica ou de caráter quantitativo, normalmente envolvendo uma série de genes, com efeitos diferenciados, associados a um pronunciado efeito do ambiente, o que leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro (MARIN et al., 2005).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas frente a estresses causados por patógenos têm sido intensamente estudadas com o objetivo do melhoramento vegetal (CORDEIRO; GROSSI DE SÁ, 1999).

Algumas respostas bioquímicas generalizadas têm sido identificadas e induzidas por vários estímulos e parecem ter um papel essencial contra danos infringidos por patógenos de plantas. A ativação dos genes que codificam enzimas da via de fenilpropanóides, por exemplo, fenilalanina amônia-liase e peroxidase, e o acúmulo de produtos como a lignina ocorre em muitas plantas, em resposta a diversidade ambiental como estímulos da luz, ataque de patógenos e estímulos mecânicos não prejudiciais (HRAZDINA; PARSONS, 1982; DEJAEGHER; BOYER; GASPAR, 1985; HAHLBROOK; SCHEEL, 1989; LORENZINI et al., 1994; SHARMA et al., 1996) caracterizando uma das respostas bioquímicas ao stress mais difundida e conhecida.

O emprego dos marcadores moleculares é outra ferramenta que pode auxiliar na identificação de alelos de interesse e auxiliar na seleção dos mesmos quando a seleção fenotípica é pouco eficiente como ocorre na seleção para resistência ao mofo branco no feijoeiro. Assim, sua contribuição pode ser maior no estudo de caracteres quantitativos, dadas as dificuldades envolvidas no processo de seleção. Desta forma, para que as informações fornecidas pelos marcadores moleculares sejam úteis no processo de seleção, a primeira etapa é a identificação de marcadores associados à QTLs (*Quantitative Trait Loci*) envolvidos no controle do caráter de interesse. Inúmeros QTLs já foram

identificados para vários caracteres, inclusive para resistência ao mofo branco (MIKLAS et al., 2001; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; PARK et al., 2001; KOLKMAN; KELLY, 2003; ENDER; KELLY, 2005; MIKLAS, 2007; SOULE et al., 2011). Embora tenham sido encontrados QTLs de grande efeito e relativamente estáveis em clima temperado, alguns QTLs não se expressam em condições de clima diferentes daqueles onde foram identificados, como por exemplo o QTL identificado pelo *primer Phs*, derivado da linhagem G122, que não se expressa no Sul de Minas Gerais (CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010). Dessa forma há a necessidade de identificação de novos QTLs que se expressem nas condições de cultivo da região, para que os marcadores que os identifiquem possam ser usados para auxiliarem na seleção de genótipos mais resistentes.

Como esse tipo de informação ainda é limitada para a cultura do feijoeiro no Estado de Minas Gerais, o presente trabalho teve por objetivos identificar e mapear marcadores do tipo microsatélite (SSR) ligados a QTLs de resistência ao mofo branco, estáveis nas condições do Estado de Minas Gerais, derivados das linhagens M20 e Ex Rico 23 e também avaliar a atividade das enzimas de defesa envolvidos na resposta de defesa de genótipos de feijoeiro a *S. sclerotiorum*, agente etiológico do mofo branco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mofo branco (*S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary)

O Mofo branco é uma doença de distribuição mundial causada pelo fungo *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary que é um dos mais devastadores e importantes patógenos de plantas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Foi denominado *Peziza sclerotiorum* em 1837 sendo posteriormente chamado de *Sclerotinia sclerotiorum* em 1870, *Sclerotinia libertiana* em 1979 e finalmente foi denominado de *Sclerotinia sclerotiorum* de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (PURDY, 1979; WAKEFIELD, 1924).

Foi descrito pela primeira vez por de Bary em 1884 (PURDY, 1979), contudo, o primeiro registro de ocorrência deste patógeno no Brasil foi realizado em 1921, na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), no Estado de São Paulo. Mais de 60 nomes diferentes são usados para se referir às doenças causadas por este fungo patogênico (PURDY, 1979), sendo mofo branco o mais comum.

Este patógeno tem um gama de hospedeiros que abrange, pelo menos, 408 espécies e 278 gêneros de plantas (BOLAND; HALL, 1994). Representa uma ameaça a culturas dicotiledôneas, como girassol, soja, feijão, amendoim, ervilha, lentilhas e diversos produtos hortícolas, mas também espécies de monocotiledôneas, como cebola e tulipas (BOLAND; HALL, 1994).

S. sclerotiorum (Lib.) de Bary pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia* (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). São patógenos que formam estruturas de resistência conhecidas como escleródios, as quais garantem a sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis (BOLAND; HALL, 1994). Os escleródios sobrevivem no solo até onze anos, porém, este patógeno também pode resistir como micélio ativo em tecido vivo ou morto e são

altamente resistentes a substâncias químicas (ADAMS; AYERS, 1979; KIMATI et al., 2005). São estruturas compostas por uma massa de hifas, de consistência firme podendo medir de 1 a 10 mm e possuem forma irregular (CLARKSON; WHIPPS, 2002; KIMATI et al., 2005). O escleródio é composto por três camadas distintas: uma parede grossa rica em melanina, responsável pela coloração negra dos escleródios, uma parede fina (córtex) e uma medula branca, que nada mais é do que o micélio dormente do fungo. A melanina confere resistência aos escleródios às condições adversas do solo fazendo com que estes permaneçam viáveis por vários anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (ROCHA, 2007).

Para que os escleródios germinem são necessárias condições ambientais favoráveis como temperaturas de 4 - 20°C, alta umidade e estar a uma profundidade do solo de até 5 cm (BARDIN; HUANG, 2001; CLARKSON et al., 2003).

Os escleródios podem germinar de duas formas: pela germinação carpogênica, onde ocorre produção de apotécios (órgãos de reprodução sexuada) dando origem a ascósporos que, quando maduros serão ejetados para o meio ambiente infectando a planta acima da linha do solo; e pela germinação micelogênica que promove a produção de hifas a partir de microporos, presentes nos escleródios, que atacam diretamente os tecidos da planta (BARDIN; HUANG, 2001).

A germinação carpogênica é considerada, por muitos autores, como a principal responsável pelas epidemias em campo (KARL et al., 1997) produzindo um ou vários apotécios que liberam milhares de ascósporos que iniciam a doença na parte aérea da planta. O apotécio possui formato de taça, de coloração branca, amarelo ou marrom, chegando a medir até 130 mm de comprimento (BARDIN; HUANG, 2001).

Como acontece em todas as doenças de plantas, as condições ambientais predominantes, tanto no ar como no solo, exercem enorme influência no processo da doença. Ambos, hospedeiro e patógeno e também a interação entre eles são diretamente afetados pelas condições ambientais predominantes na região de cultivo (ZAMBOLIM et al., 1999). No caso de *S. sclerotiorum*, as condições do solo de alta umidade e temperatura amena são consideradas favoráveis à disseminação do patógeno (SUBBRAO; HUBBARD; SCHULBACH, 1997). Como ascósporos germinam e colonizam tecidos senescentes e mortos, flores senescentes são freqüentemente fontes de novas infecções. Ocasionalmente, podem se originar antes do florescimento, devido ao micélio do solo que fica em contato direto com injúrias em tecidos do caule (LU, 2003).

O processo de desenvolvimento da doença incluiu formação de infecções encharcadas, penetração mecânica da cutícula do hospedeiro com maior freqüência ou pelos estômatos (LUMSDEN; WERGIN, 1980; SOUZA et al., 2007), desenvolvimento de infecção intercelular de hifas abaixo da cutícula e dentro do córtex do hospedeiro, desenvolvimento inter e intracelulares de ramificações de hifas que variam em tamanho e aparência, emergência de hifas através dos estômatos do hospedeiro e formação de escleródios sobre a superfície do hospedeiro (LUMSDEN; WERGIN, 1980).

A infecção ocorre, geralmente, na 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 (BOLAND; HALL, 1994). Rapidamente, as lesões são cobertas por micélio branco de aspecto cotonoso, bem característico da doença. O micélio branco, em alguns pontos, vai escurecendo até atingir coloração preta, formando os escleródios que podem ser produzidos interna ou externamente aos tecidos do hospedeiro. Variam de branco até preto, à medida que atingem a maturação. Os escleródios que são

produzidos internamente no hospedeiro geralmente são maiores, podendo até atingir alguns centímetros de comprimento (CARDOSO, 1994). Quando a lesão circunda a haste, a parte aérea da planta sofre murcha e morte de folhas. Em folhas e pecíolos, os sintomas ocorrem sob alta umidade relativa e são caracterizados por apodrecimento total das folhas, com presença de micélio branco e escleródios. Em frutos, observa-se podridão mole aquosa com produção de micélio branco e escleródios (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

A habilidade que este fungo patogênico tem de infectar e penetrar no tecido do hospedeiro depende do tipo do inóculo, da quantidade de nutrientes disponíveis no escleródio e das condições ambientais (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Para a germinação carpogênica e micelológica dos escleródios de *S. sclerotiorum* são necessários nutrientes exógenos, entretanto, quando existe limitação de nutrientes ocorre apenas a germinação carpogênica (MCDONALD; BOLAND, 2004). De Bary observou que o fungo *S. sclerotiorum* requer nutrientes externos para a infecção ter sucesso (LUMSDEN, 1979; KOLKMAN; KELLY 2000). *S. sclerotiorum* produz várias substâncias degradativas, enzimas líticas, tais como endo e exopectinases, celulasas, hemicelulasas, proteases, pectinases, β -1,3-glucanases, glicosidases, xilanases, cutinases que podem facilitar a colonização do patógeno através de diferentes mecanismos e degradação da parede celular do hospedeiro (ANNIS; GOODWIN, 1997).

A patogenicidade de *S. sclerotiorum* está relacionada também com a produção de ácido oxálico pelo patógeno, pois este composto baixa o pH nos tecidos do hospedeiro, inibindo enzimas responsáveis pelo mecanismo de defesa da planta e aumentando a atividade das enzimas do patógeno responsável pela degradação da parede celular da planta (LUMSDEN, 1979). Mutantes de *S. sclerotiorum*, incapazes de produzir ácido oxálico, não conseguiram produzir

escleródios *in vitro* além de não serem patogênicos em plantas (GODOY et al., 1990; DICKMAN; MITRA, 1992).

O ácido oxálico é produzido em todas as classes desse fungo. Sendo seus principais modos de ação:

a) acúmulo de ácido oxálico que provoca uma diminuição do pH local entre 4 a 5, que é ideal para a degradação da parede celular e potencializa o escape da poligalacturonase (PG) a proteínas inibidoras de enzimas da poligalacturonase (PGIP), além de condições ácidas serem diretamente tóxicas para as plantas (FAVARON; SELLA; D'OVIDIO, 2004);

b) a quelação da parede celular por cálcio que permite as PGs hidrolisar pectinas na lamela média (SMITH; PUNJA; JENKINSI, 1986);

c) supressão da explosão oxidativa (CESSNA et al., 2000);

d) desregulação das células guarda que induzem abertura e então, a inibição do ácido abscísico induzindo o fechamento dos estômatos, resultando em murcha durante a infecção (GUIMARÃES; STOTZ, 2004);

e) inibição da atividade da polifenoloxidase (MAGRO; MARCIANO; DI LENNA, 1984);

f) produção de endopoligalacturonase em pH baixo que provoca um enfraquecimento dos tecidos vegetais que facilitam o crescimento do fungo (ROLLINS; DICKMAN, 2001).

Em relação ao feijoeiro, esta doença geralmente é bastante severa no cultivo de inverno sob irrigação, em especial por pivô central. Em Minas Gerais, onde aproximadamente 35% do feijão colhido é produzido em áreas irrigadas com pivô central durante a safra de outono-inverno o mofo branco ganha grande importância, já que muitas dessas áreas são infestadas com escleródios de *S. sclerotiorum*, que em condições favoráveis como estas, levam frequentemente a perdas significativas de produção (PAULA JÚNIOR et al., 2009). A redução da produtividade é consequência da diminuição do número de sementes por planta,

peso das sementes e número de sementes por vagem além da diminuição da qualidade dos grãos de feijão (KOLKMAN; KELLY, 2000).

Atualmente, não existe nenhum método de controle totalmente eficaz para este patógeno. Um plano de manejo integrado, composto de modificação cultural, controle químico com fungicidas e utilização de cultivares pelo menos parcialmente resistentes é o modo mais indicado para o controle desta doença em feijoeiro. Modificações culturais incluem rotação de cultura com espécies não suscetíveis, diminuição da densidade de plantio, espaçamento mais amplo entre linhas, redução da irrigação durante e após o florescimento, utilização de cultivares de porte ereto e utilização de sementes e máquinas livres de escleródios (TU, 1997). Os fungicidas, apesar de serem uma importante fonte de controle de mofo branco e de terem sido usados em escala comercial, tem um custo elevado e sua aplicação não é possível em todas as safras e regiões (SCHWARTZ et al., 2004).

Cultivares com resistência fisiológica e mecanismos de escape, como hábito determinado e porte ereto, têm sido desenvolvidas e estão atualmente em uso, haja vista que em muitas plantas, incluindo feijoeiro, a resistência completa não existe (CALLA, et al., 2009). Outra importante ferramenta são os transgênicos que nos últimos anos têm sido desenvolvidos. O desenvolvimento de transgênicos foi possível devido ao conhecimento de que a estratégia comum para a resistência das gramíneas, especialmente plantas C4, está correlacionada com a produção de enzimas que podem catabolizar o ácido oxálico secretado pelo patógeno em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e carbonatos. Existem três classes conhecidas dessas enzimas: oxalato oxidase, oxalato decarboxilase e oxalil-CoA decarboxilase (LU, 2003). Em soja, girassol e amendoim geneticamente modificados, por exemplo, têm sido incorporadas enzimas de degradação de ácido oxálico e oxalato oxidase, apresentando resistência para *S. sclerotiorum* (KESARWANI et al., 2000; DONALDSON et al., 2001; HU et al.,

2003; LIVINGSTONE et al., 2005; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). No entanto, este método pode reduzir o potencial máximo de rendimento da cultura (STEADMAN, 1979). Dificuldades na transformação do feijão e a resistência dos mercados aos cultivos transgênicos têm inibido a produção de feijão transgênico.

Existe pouca diversidade genética para a resistência ao mofo branco no pool genético de *P. vulgaris* e o controle genético para esse caráter têm sido reportado como complexo ou quantitativo com herdabilidade de magnitude de baixa a moderada (KOLKMAN; KELLY 1999, 2002, 2003; MIKLAS et al., 2001; PARK et al., 2001; ANTONIO et al., 2009; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010; 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 (GONÇALVES; SANTOS, 2010).

2.2 Mecanismos de defesa da planta contra patógenos

As plantas estão constantemente expostas a uma ampla variedade de fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores abióticos têm-se variações na temperatura, umidade, pH do solo, entre outros, enquanto os fatores bióticos compreendem insetos, vírus, bactérias e fungos. Patógenos de plantas podem ser divididos em duas grandes categorias: os biotróficos e os necrotróficos. Os biotróficos são patógenos que penetram ou estabelecem um contato com as células do hospedeiro, crescem e se reproduzem, nutrindo-se do tecido vivo do hospedeiro. Por outro lado, os patógenos necrotróficos dependem do tecido

morto do hospedeiro para sua nutrição, crescimento e reprodução. Eles secretam enzimas e toxinas que degradam e matam as células do hospedeiro, tornando os nutrientes viáveis para o seu consumo (GLAZEBROOK, 2005).

Para se defender dos patógenos com estas diferentes estratégias de infecção, os mecanismos de defesa das plantas evoluíram para evitar ou restringir o desenvolvimento destes dentro do hospedeiro. Concomitantemente, alguns patógenos evoluíram com seus hospedeiros de forma a superarem essas barreiras, causando doenças nos mesmos. Entretanto, na maioria das vezes, os mecanismos de defesa das plantas são mais eficientes que os mecanismos de ataque dos patógenos, de forma que, principalmente nos ecossistemas naturais, a resistência é mais freqüente que a suscetibilidade (RESENDE et al., 2008).

A resistência da planta a um determinado patógeno é definida, sob o aspecto genético funcional, como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). De maneira geral, esse processo é altamente dinâmico, coordenado e dependente da existência de um conjunto de mecanismos ou barreiras pré ou pós-formados. A ativação dos genes responsáveis pela indução de sistemas de defesa, no momento, local e magnitude adequados, após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, constitui-se num sistema de múltiplos componentes (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A primeira linha de defesa da planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, penetração e consequente infecção. A forma física da cutícula, o número de estômatos e de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (AGRIOS, 2005). A planta ao ser invadida por um patógeno pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. Após a infecção, pode-se aumentar o

nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (PASCHOLATI; LEITE, 1995; RESENDE et al., 2008).

Dentre as defesas utilizadas pelas plantas está a resposta de hipersensibilidade (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), a indução de compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio e indução PRPs.

A HR ou reação de hipersensibilidade em plantas é considerada como um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos, se caracterizando por ser uma resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno (VERBENE et al., 2000). Dentre as principais características da resposta estão o rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005).

A HR constitui na primeira etapa da resposta de defesa da planta, sendo seguida de outras alterações, quer seja no sítio de infecção ou em toda a planta. Dentre as principais alterações decorrentes da HR está a indução da produção de um grande número de PRPs, destacando-se as peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão de fenilalanina amônia liase (PAL) e deposição de lignina e aumento dos níveis de ácido salicílico (VERBENE et al., 2000).

O termo PRPs, primeiramente utilizado para descrever numerosas proteínas extracelulares que se acumulavam em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (VAN LOON; VAN KAMMEN, 1970), foi redefinido por Van Loon, Geraats, e Linthorst

(2006), e refere-se a proteínas induzidas por patógenos e proteínas homólogas, estendendo-se às enzimas como fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenol oxidase, geralmente presentes constitutivamente e acumulada após o contato com o patógeno ou outro tipo de estresse (FERREIRA et al., 2007). A indução destas proteínas é mediada pela ação de substâncias sinalizadoras que são classificadas em dois tipos, conforme sua origem: eliciadores endógenos, da própria planta; e eliciadores exógenos, do patógeno (CHRISTENSEN et al., 2002).

Muitas PRPs possuem tanto atividade antifúngica como atividade antibacteriana *in vitro* como, por exemplo, quitinases. A degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alterações na sua arquitetura, promovidas por estas enzimas, podem prejudicar o desenvolvimento do microrganismo, impedindo seu crescimento (ZAREIE; MELANSON; MURPHY, 2002). A maioria das PRPs pode apresentar também efeito inseticida, nematocida e antiviral (RESENDE et al., 2008).

As PRPs foram descritas em 79 espécies, incluindo *P. vulgaris*, pertencentes a 16 famílias taxonômicas de plantas, incluindo mono e dicotiledôneas, sugerindo que desempenham um importante papel na resistência (MOHAMED; SEHGAL, 1997). O fato das PRPs apresentarem algumas características físico-químicas e imunológicas comuns permitiu que elas fossem e sejam agrupadas em diferentes grupos, de acordo com a similaridade entre elas.

As PRPs estão classificadas em 17 grupos, variando de PR-1 até PR-17, de acordo com as características de cada proteína, conforme descrito por Christensen et al. (1998).

As funções, modo de ação, bem como marcadores celulares e moleculares da família PR-1, a mais abundante das famílias de PRPs, são ainda desconhecidas (RESENDE et al., 2008). A família PR-2 tem função de β -1,3-

glucanase e a maioria das famílias de PRPs têm função de quitinase, a despeito das PR-3, PR-4, PR-8 e PR11 (DESMOND et al., 2006). As peroxidases da família PR-9 podem contribuir para o enrijecimento e reforço da parede celular das plantas em resposta ao ataque de patógenos (LANGRINI et al., 1987). Por essas características, tem sido frequentemente sugerido que estas famílias têm potencial atividade antifúngica, inibindo o crescimento, a multiplicação e/ou propagação de patógenos e ser responsável pelo estado de SAR (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Membros da família PR-15 e PR-16 são classificados como proteínas oxalato oxidase (OXO) e proteínas do tipo “oxalato-oxidase”, respectivamente induzidas por patógenos. A oxalato oxidase é uma enzima que produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e gás carbônico (CO_2) em plantas, a partir de ácido oxálico (JERKOVIC et al., 2010). Inicialmente, esta enzima foi isolada e caracterizada a partir de cevada (*Hordeum vulgare*) e trigo (*Triticum aestivum*). A oxalato oxidase do trigo, também conhecida como germina, é o membro melhor caracterizado da família. Como a germina está relacionada com a alteração das propriedades da parede celular durante a germinação, acredita-se que essa função também esteja presente na defesa contra patógenos (HU et al., 2003).

As β -1,3-glucanases, mais conhecidas como PR-2, são amplamente distribuídas em plantas superiores e são induzidas durante a resposta de hipersensibilidade de plantas contra patógenos de origem viral, bacterianos ou fúngicos (BUCHER et al., 2001). As β -1,3-glucanases são enzimas líticas capazes de degradar os polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de muitos fungos e tem atividade antifúngica quando analisadas *in vitro* (MAUCH; MAUCH-MANI; BOLLER, 1988).

Diferenças de arranjo no gene *PvPR* (genes de PRPs em *P. vulgaris*) foram detectadas entre genótipos de feijoeiro resistente e suscetível à antracnose (WALTER et al., 1990) indicando polimorfismo entre *PvPR* bem como outros

genes relacionados à resposta de defesa que podem contribuir para a resistência quantitativa. Um marcador mapeado no grupo de ligação B2 por Kolkman e Kelly (2003) está situado próximo a genes relacionados à defesa a várias doenças, tais como o gene PvPR-2 que é relacionado a patogênese em *P. vulgaris* (WALTER et al., 1990).

Estudos recentes demonstram que a super expressão de genes de quitinases em plantas aumenta a resistência a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais da parede celular dos fungos, e pode apresentar atividade antimicrobiana (VAN LOON; GERAATS; LINTHORST, 2006).

Segundo Pascholati e Leite (1995), a enzima peroxidase está diretamente ligada à lignificação dos tecidos, a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos. Depois de oxidados, os fenóis sofrem polimerização para a formação de lignina (STRACK, 1997). A lignificação e seus precursores tóxicos exercem papel importante na resistência em plantas.

A lignina é um polímero complexo depositado na parede celular e responsável pelo enrijecimento da parede e pelo aumento da resistência ao ataque de agentes externos (STRACK, 1997). A lignificação das células estabelece uma barreira mecânica à penetração, tornando a parede celular mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas e aumentando sua resistência à difusão de toxinas (RIDE, 1978).

A produção de ácido salicílico também está associada com a resistência a doenças (CROZIER et al., 2000). O ácido salicílico bloqueia a atividade da enzima catalase, provocando um acúmulo de H_2O_2 , a qual ativa a produção e acúmulo de PRPs e das fitoalexinas. No caso da catalase não ser bloqueada, não é observado o acúmulo de H_2O_2 , verificando-se uma reação compatível. Deste modo, a presença das catalases inibe a reação de hipersensibilidade em função de impedir o acúmulo de H_2O_2 o qual serve como um sinal para a produção e

acúmulo das proteínas relacionadas com a patogênese e das fitoalexinas (RESENDE, 2008).

2.3 Avaliação para resistência ao mofo branco por meio da inoculação de micélio (*Straw test*)

A resistência ao mofo branco é quantitativa e por isso faz-se necessário quantificar a doença para distinguir genótipos (HOFFMAN et al., 2002; LU, 2003). No entanto, não é conhecida qual parte de resistência que resulta da resistência fisiológica e qual parte resulta dos mecanismos de escape (BOLAND; HALL, 1987; NELSON; HELMS; KURAL, 1991; KIM; DIERS, 2000). O escape corresponde a características da planta como porte ereto, copa arbustiva que permite maior aeração da cultura, desfavorecendo o desenvolvimento da doença além de florescimento precoce. Já a resistência fisiológica é definida como a tolerância ao oxalato, bem como a atenuação de outros modos de patogênese. Ideótipos de feijoeiro têm sido propostos para combinar mecanismos morfológicos, fenológicos e resistência fisiológica (KOLKMAN; KELLY, 2002). O prevaletimento de mecanismos de escape no campo cria um desafio para os melhoristas interessados em melhoramento para os componentes fisiológicos de resistência. Para se diferenciar entre resistência fisiológica e escape, diversos métodos de *screening* em casa de vegetação têm sido desenvolvidos para complementar avaliação em campo, sendo o *Straw test* um desses métodos.

O *straw test*, ou teste do canudo, foi descrito por Petzoldt e Dickson (1996). Neste teste, as plantas susceptíveis são descartadas e as remanescentes seguem o desenvolvimento. Algumas plantas morrem depois, mostrando alguma tolerância, mas menos que outras. As plantas resistentes podem produzir uma colheita normal de sementes (PETZOLDT; DICKSON, 1996). Mais tarde este

método foi modificado por Terán et al. (2006) e hoje é um dos métodos mais utilizados na detecção de resistência ao mofo branco (GENCHEV; KIRYAKOV, 2002; GILMORE; MYERS, 2004; GILMORE; MYERS; KEAN, 2002; MIKLAS et al., 1999; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; PARK et al. 2001; SCHWARTZ et al., 2004, 2006; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010).

Em trabalho realizado por Miklas et al. (1999) foi obtida alta severidade de doença em cultivares suscetíveis, como Labrador e Tenderlake, indicando que *Straw test* pode ser utilizado para detectar resistência fisiológica em coleções núcleo. Foi observada forte correlação entre o teste do canudo aplicado em casa de vegetação e entre áreas naturais infectadas com *S. sclerotiorum* (HALL; PHILLIPS, 1998).

É provável que o teste do canudo apenas mensure um único componente (resistência fisiológica de tecidos da haste e entrenós à invasão do patógeno) de um complexo de fatores, incluindo mecanismos para evitar doenças, que contribuem para a resistência de campo.

2.4 Marcadores moleculares na resistência de plantas

Ao longo da evolução, as plantas têm desenvolvido vários mecanismos de defesa para sua proteção contra doenças e parasitas. Um desses mecanismos envolve o reconhecimento específico do patógeno. Entre os eventos celulares que caracterizam este tipo de resistência estão a indução da expressão dos genes de defesa, frequentemente manifestada como uma resposta de hipersensibilidade envolvendo morte celular programada no local da infecção. Esses genes são conhecidos como genes de resistência (R-genes) (DE WIT, 1995).

A introgressão de alelos de resistência em cultivares elites via melhoramento convencional pode levar, dependendo da cultura, muitos anos. Esse processo pode ser consideravelmente acelerado com o uso de marcadores

de DNA. O Uso dessa ferramenta torna possível a triagem molecular de populações segregantes para o fenótipo resistência a doença (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991), o que levaria muito tempo e trabalho intensivo via método tradicional. Experimentos de seqüenciamento e mapeamento genético mostram que genes de reação a patógenos estão geralmente organizados em agrupamentos muito próximos chamados de *clusters* ou blocos gênicos. Os alelos de resistência desses genes possuem regiões similares e essas regiões de consenso indicam que esses genes são parte de um sistema de transdução de sinal. A maioria dos genes de resistência apresenta ainda uma região rica em leucina, que estaria ligada a evolução do gene (GEFFROY et al., 1999).

Para a maior parte das espécies comerciais um grande número de alelos de resistência tem sido isolado e os marcadores moleculares têm conquistado grande importância na seleção assistida, por facilitar a introdução desses alelos de resistência em plantas comerciais. Seu uso para essa finalidade e dessa forma auxiliando no processo de melhoramento, requer a identificação prévia desses marcadores em cultivares de interesse. Há diversos relatos sobre o uso de marcadores de alelos de resistência vertical para resistência à vários patógenos como, por exemplo, mancha-angular (CARVALHO et al., 1998; SARTORATO et al., 1999; FERREIRA et al., 1999), antracnose e ferrugem (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; NIETSCHE et al., 2001). No entanto para mofo branco não há relatos de resistência vertical em feijoeiro, sendo que os poucos relatos existentes são sempre de resistência parcial (MIKLAS et al., 2001). Assim, a identificação de QTLs de resistência é uma forma de utilizar marcadores para auxiliarem na seleção.

Mapeamento de QTLs tem sido conduzido para algumas fontes de resistência parcial incluindo Ex Rico 23 (também conhecido como Bunsi), linhagens derivadas de Ex Rico 23 como ND88-106-04, G122 (origem Andina),

Pompadour PC 50 (origem Andina) e feijão-vagem NY-6020-4 (MIKLAS, 2002).

No campo, resistência fisiológica pode ser confundida com mecanismos de escape da planta resultando na identificação de QTLs para ambos, resistência e escape. Dependendo dos fatores ambientais em uma dada localização através do tempo de estudo, a variação contabilizada por um QTL para um mecanismo de escape pode ser altamente variável. Em alguns casos, QTLs identificados em Ex Rico 23 nos grupos de ligação B2 e B7 foram confirmados em estudos assistidos por marcadores (ENDER; TERPSTRA; KELLY, 2008). No entanto, em outros casos mapas de QTLs para diferentes regiões de B7 na linhagem Ex Rico 23, quando comparada com o Andino G 122 e fontes de PC 50, indicaram diferentes genes subjacentes aos respectivos QTLs.

Uma banda derivada da linhagem Andina G122 que possui 285 pb explicou 38% da variação fenotípica para resistência ao mofo branco, baseado no teste do canudo (*Straw test*) em trabalhos publicados por Miklas et al. (2001) e Miklas (2007). Essa banda é amplificada pelo par de *primers Phs* (*SCAR*), cuja seqüência é: 5' AGCATATTCTAGAGGCCTCC3' e 5'GCTCAGTTCCTCAATCTGTT3'. Esse *primer* amplifica parte do alelo para faseolina T presente em feijoeiro de origem andina (KAMI et al., 1995), como é o caso do G122. O alelo da faseolina T está mapeado no grupo de ligação B7 de *P. vulgaris* (FREYRE et al., 1998).

2.5 Mapeamento genético e identificação de QTLs

A metodologia proposta para mapeamento de locos controladores de características quantitativas ou QTLs baseia-se na hipótese de que, se a segregação de um gene marcador pode ser usada para detectar e estimar o efeito de um poligene ligado e se genes marcadores estiverem espalhados ao longo do

genoma de uma espécie, será possível mapear e caracterizar todos os poligenes que afetam um caráter (SCHUSTER; CRUZ, 2008). O estudo de QTLs associado ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs. A eficiência na detecção de QTLs depende do número de QTLs, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, tipo e tamanho da população segregante, tamanho do genoma, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador, saturação do mapa e eficiência da avaliação fenotípica (YOUNG, 1996; BOREM; CAIXETA, 2006).

O mapeamento de QTLs não se trata apenas de determinar a posição destes no genoma, mas também a quantificação e a caracterização de seus efeitos, como interações alélicas - por exemplo, o grau de dominância - de cada um, e mesmo interações epistáticas e pleiotrópicas (BEARZOTI, 2000). Uma vez que os genótipos desses locos controladores de caracteres quantitativos são desconhecidos, uma alternativa é estimar os efeitos de QTLs fixados em posições intermediárias de marcadores moleculares genotipados que não têm efeito sobre o caráter em estudo, utilizando a informação do mapa desses marcadores.

Os pré-requisitos e os passos para o mapeamento de QTLs são:

- a) delineamento genético ou populações de mapeamento adequado: populações do tipo F_2 , retrocruzamentos, linhagens recombinantes ou RILs (*Recombinant Inbred Lines*), dentre outras;
- b) genotipagem das plantas;
- c) mapa genético;
- d) dados dos caracteres de interesse (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Uma vez que a associação entre as características de interesse e os marcadores seja feita com a análise de QTLs, a seleção assistida por marcadores pode ser feita tendo duas grandes vantagens sobre os métodos tradicionais de

seleção: marcadores não são influenciados pelo ambiente e a detecção é possível em todas as fases de desenvolvimento da planta.

2.5.1 Marcadores mais utilizados em mapeamento genético

A análise correta dos dados moleculares exige o conhecimento de como esses dados são obtidos. Assim conhecer as características dos marcadores moleculares atualmente mais utilizados em mapeamento genético se torna necessário. Por isso, serão listadas a seguir as principais características, vantagens e desvantagens destes marcadores.

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza-se de oligonucleotídeos decâmeros (dez bases) também conhecidos como *primers*. Estes são mais curtos e de seqüência arbitrária, dispensando assim, o conhecimento prévio da seqüência do fragmento de DNA complementar ao *primer* reduzindo seu custo (ANÓLES; BASSAM; GRESSHOFF, 1991; BORÉM; CAIXETA, 2006). Por utilizar primers aleatórios, o RAPD mapeia todo o genoma e o mesmo conjunto de primers pode ser utilizado para diferentes espécies.

Suas limitações incluem sua natureza dominante, que não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos e, conseqüentemente, a obtenção de outras informações relevantes para estudos genéticos e a sua baixa reprodutibilidade de resultados, que geralmente ocorre entre laboratórios, diminuindo a confiabilidade de outros pesquisadores nos marcadores detectados pela técnica (BORÉM; CAIXETA, 2006). Entretanto, marcadores RAPD podem ser utilizados para identificar alelo de efeito principal e posteriormente ser convertido em *SCAR* que é idêntica à PCR. Essa conversão em geral resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido pelo *SCAR* (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são baseados na presença, em genomas eucarióticos, de várias classes de sequências repetidas e uma delas consiste da repetição em tandem de até dez nucleotídeos (LITT; LUTY, 1989). As sequências que flanqueiam essas regiões são conservadas dentro da mesma espécie, permitindo que se construam *primers* que amplifiquem, via PCR, o mesmo loco, em todos os indivíduos da espécie. Para amplificar locos de microsatélites utiliza-se um par de *primers*, cada um com um sítio de anelamento localizado em um dos lados da região repetitiva. O polimorfismo encontrado é do tamanho dos fragmentos e se deve ao número diferente de repetições dos microsatélites (sequências repetidas) (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Cada microsatélite, independente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um loco genético altamente variável e multialélico. Apresentam como vantagens, sua ampla distribuição no genoma eucariótico, seu alto polimorfismo, codominância e reprodutibilidade via PCR. Têm sido utilizados em estudos evolutivos, fingerprinting, teste de paternidade, estudos de genética de populações, proteção de cultivares, avaliação de pureza de sementes, utilização ou conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTLs), análise de pedigree e seleção assistida por marcadores. Marcadores microsatélites também têm sido utilizados na construção de mapas de ligação em diferentes populações de feijoeiro (BEATTIE et al., 2003; BLAIR et al., 2003, 2006; YU et al. 2000).

Apesar de todas essas vantagens, relativamente poucos marcadores microsatélites estão disponíveis para plantas (CHEN et al., 1997). Entretanto, para feijoeiro, felizmente já foram identificadas várias centenas de pares de *primers*.

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é outra técnica que associa a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da

amplificação por PCR, tornando-se uma poderosa ferramenta na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995).

Entre as vantagens do uso de marcadores AFLP, estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. Combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a praticidade e velocidade de detecção do polimorfismo via PCR (VOS et al., 1995; SCHUSTER; CRUZ, 2008).

2.5.2 Populações de mapeamento

Para a construção da população de mapeamento o primeiro passo é a escolha de genitores, de modo à maximizar a probabilidade de encontrar polimorfismo. Também é necessário que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (TANKSLEY, 1993). Desta forma, para a construção de mapa molecular e identificação de QTLs são escolhidas duas linhagens genética e fenotipicamente divergentes em relação aos caracteres de interesse. Nos indivíduos F_1 o desequilíbrio de ligação é máximo e nas populações derivadas a partir desses indivíduos procura-se explorar esse desequilíbrio. As populações segregantes que podem ser utilizadas são: população F_2 , retrocruzamentos (RCs), RILs (*Recombinant Inbred Lines* ou linhagens recombinantes) e duplo-haplóides (TANKSLEY, 1993; LYNCH; WALSH, 1998). Essa etapa é considerada crítica para o sucesso da construção do mapa (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996). Em casos cujo polimorfismo é baixo, podem-se realizar cruzamentos interespecíficos para obter maior número de locos informativos (TANKSLEY et al., 1992), o que é, entretanto, de menor utilidade para o melhoramento, cujo objetivo é utilizar as populações com máxima adaptação.

Após a obtenção da população de interesse, na maioria das vezes, utiliza-se uma população F_2 , os indivíduos da população devem ser tanto “genotipados”, ou seja, submetidos ao processo de construção do mapa genético, quanto “fenotipados”, ou seja, devem ser levados ao campo, em condições ideais de cultivo, para que cada indivíduo seja devidamente avaliado em termos fenotípicos. Esta é uma etapa importante, pois o sucesso do mapeamento dos genes depende em grande parte da eficiência do processo de avaliações fenotípicas (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Como vantagens de sua utilização, podem-se destacar a facilidade e rapidez de sua obtenção. No mapeamento de QTLs estão disponíveis as informações de três genótipos (AA, Aa e aa), o que aumenta a precisão da estimativa dos componentes genéticos (ZAMIR; TADMOR, 1986). Como desvantagem pode-se citar a necessidade de avaliar as características com base em cada indivíduo *per se*. Portanto, a eficiência dessa geração é relativa, restringindo-se mais aos caracteres qualitativos ou, ainda, aos quantitativos tipicamente de alta herdabilidade. Este problema pode ser contornado pela utilização de populações $F_{2,3}$, em que as plantas são genotipadas na geração F_2 e as características fenotipadas são medidas em progênies F_3 , permitindo assim o uso de repetições. Os dados das médias das progênies F_3 são geralmente utilizados como valor fenotípico das plantas F_2 que deram origem a essas progênies (BORÉM; CAIXETA 2006). A obtenção de progênies segregantes provenientes de algumas dezenas de indivíduos é necessária para que se tenha uma amostra representativa de eventos meióticos (SOUZA JÚNIOR, 1993).

Numa próxima etapa, os indivíduos dessa população são avaliados quanto aos caracteres de interesse. Utilizando-se progênies F_2 , diferentes modelos podem ser ajustados de forma a estimar separadamente contribuições de efeitos aditivos e dominantes dos QTLs.

Segundo Coelho (2000), determinados genótipos (indivíduos F_2) são portadores de dois gametas informativos, enquanto em outras populações (retrocruzamento), cada indivíduo carrega somente um gameta informativo, sendo o outro complemento não informativo. Assim, de modo aproximado, um indivíduo F_2 fornece duas vezes mais informações que um indivíduo oriundo de uma geração de retrocruzamento. Esta relação é aproximada porque nem todos os genótipos de F_2 são informativos (PATERSON; TANKSLEY; SORRELLS, 1991; LIU, 1998). O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F_2 e marcadores codominantes (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996). O desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes é atribuído à ligação física entre os locos, e originado do desequilíbrio gamético de ligação decorrente, por sua vez, da redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo (WEIR, 1996; COELHO, 2000).

Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste do Qui-quadrado (χ^2) (BEARZOTI, 2000). Quando este não é verificado diz-se que os locos apresentam Distorção de Segregação, ou simplesmente DS.

A Distorção de Segregação foi reportada logo após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, Correns (1902) a descreveu como segregação monogênica aberrante, denominando-a de Distorção de Segregação em que a segregação gamética não ocorreria como previsto por Mendel. Desde então, numerosos casos têm sido relatados (GRANT, 1975; BONIERBALE; PLAISTED; TANKSLEY, 1988; DIWAN et al., 2000; RITSCHER et al., 2004). Estes desvios da proporção mendeliana esperada nos indivíduos, em dada classe genotípica, em populações segregantes, são definidos como distorção da razão de segregação (DS) (LYTTLE, 1991). Ela resulta na falha ou violação de pressupostos da teoria genética convencional e suas análises (LU et al., 2002). A

causa da distorção de segregação observada para marcadores são genes sujeitos a seleção gamética ou zigótica (FRISCH et al., 2004). Estes locos são chamados de locos com segregação distorcida.

Como foi discutido anteriormente, em análise genômica, em especial relacionada ao estudo de mapa de ligação genético, são confeccionadas populações de mapeamento, em que se espera a ocorrência de segregação mendeliana clássica dos marcadores analisados, de forma que a segregação esperada dos marcadores seja conhecida. A presença de marcadores com DS pode ser um inconveniente, devido à construção de mapas de ligação, ser realizada a partir de frequências de recombinação entre locos em populações experimentais ou populações naturais com pedigrees conhecidos. Segundo Liu (1998), os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos.

De acordo com Oliveira et al. (2004), a presença de marcadores com DS localizados entre marcadores com segregação mendeliana esperada, acarreta acréscimo na estimativa da distância entre os marcadores. Desta forma, é recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana, para não comprometer a qualidade do mapa (KAO; ZENG; TEASDALE, 1999). Entretanto, há trabalhos de mapeamento genético em que se utilizaram marcadores com distorção na razão de segregação, e outros apenas indicando-os no grupo de ligação com o nível de probabilidade utilizado no teste de segregação individual, sem saber os efeitos da utilização de tais marcadores (SILVA et al., 2004).

De acordo com Oliveira et al. (2004), deve-se ter cautela no uso de locos que apresentam DS, pois apesar deles poderem mostrar informações genéticas importantes, também podem alterar as distâncias e ordens lineares de outros marcadores no grupo de ligação. No entanto, segundo Xu (2008) a distorção de segregação de marcadores é prejudicial para a detecção de QTLs pouco

informativos com efeito de dominância, mas nem sempre ela é prejudicial para mapeamento de QTLs com efeito aditivo. Sendo que se uma distorção de segregação de um loco é um evento aleatório, em 44% das vezes a DS é benéfica para o mapeamento de QTLs. Se a DS está presente, mas é ignorada em um mapeamento de QTLs, é esperada uma perda de locos informativos, mas a perda é insignificante se o genoma é coberto por marcadores altamente distribuídos (OLIVEIRA et al., 2004).

2.5.3 Mapeamento genético

O mapeamento genético em organismos superiores é possível porque o genoma é organizado e transmitido como unidades lineares denominadas cromossomos. Dessa forma, mapa de ligação é a representação linear da posição dos genes, mesmo que de forma relativa, ou marcadores dentro dos grupos de ligação que compõem o complemento haplóide de uma espécie (BORÉM; CAIXETA, 2006). É uma ferramenta que tem dado resposta a questões de controle genético de caracteres, rearranjo de cromossomos e ligação com caracteres específicos (GEPTS et al. 1993). Estes mapas são essenciais para a localização de QTLs. São também importantes por constituírem uma informação básica, necessária para a realização de estudos mais avançados, como o mapeamento de genes de interesse associados a características qualitativas ou quantitativas, bem como os estudos comparativos de sintenia genômica e genômica comparativa. Permite, ainda, o estabelecimento de programas de melhoramento com maior grau de previsibilidade dos resultados (LI et al., 2006).

Para a construção do mapa genético devem ser estabelecidas tanto a posição dos marcadores como a distância entre eles (LYNCH; WALSH, 1998). Os mapas são construídos com base em análises de segregação dos marcadores

em populações que apresentam desequilíbrio de ligação. Não existe uma relação universal entre distância de mapa e a distância física entre locos (GRIFFITHS et al., 2006). Essa relação dentro de um mesmo cromossomo pode sofrer uma diferença marcante, principalmente próximo aos telômeros e centrômeros. A taxa de recombinação está sob controle genético e alguns genes influenciam essa taxa ao longo de todo o genoma e outros em regiões específicas do cromossomo (GRIFFITHS et al., 2006).

O número necessário de marcadores para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação. Um mapa pode ser considerado satisfatório quando o número de grupos de ligação obtidos pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo e quando todos os marcadores genéticos mapeados estiverem ligados, indicando que todas as regiões do genoma estão representadas (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Para se construir um mapa de ligação, é necessário, como visto anteriormente, uma população segregante. Na maioria das vezes, utiliza-se uma população F_2 originada do cruzamento entre linhagens puras contrastantes. Esta população estará segregando tanto para um conjunto de caracteres morfoagronômicos qualitativos quanto quantitativos, além de ser polimórfica para um número potencialmente ilimitado de marcadores de DNA. Independente do tipo de marcador a ser utilizado uma etapa importante é a seleção de *primers* e, ou, sondas, conforme o tipo de marcador, que sejam polimórficos na população a ser mapeada. Assim, centenas de *primers* são testados nos genitores, dependendo da distância genética entre eles. Para escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado devem ser consideradas as características de cada marcador, com suas vantagens e desvantagens, além de outros fatores, como a disponibilidade de marcadores para a espécie em questão, a infra-estrutura

laboratorial disponível e o treinamento do pessoal envolvido (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Após essa etapa, iniciam-se os procedimentos de mapeamento propriamente dito os indivíduos são então “genotipados”, conforme a categoria de marcadores, disponibilizando para análise um conjunto de marcas segregantes, as quais são submetidas à análise dos padrões de segregação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Resumidamente, as etapas envolvem a detecção de ligação entre os marcadores, a determinação das distâncias genéticas e o ordenamento dos marcadores nos grupos de ligação.

A ligação entre cada par de marcadores é verificada por comparações entre as frequências alélicas observadas e as frequências esperadas sob independência. Sendo esperado no padrão Mendeliano a segregação 1:2:1 para marcas (alelos) correspondentes a alelos codominantes e de 3:1 para os locos correspondentes a alelos dominantes. Para isso, geralmente são utilizados os testes de significância de χ^2 ou a razão de verossimilhança (LR). Segundo Lynch e Walsh (1998), a LR é calculada pela razão da função de verossimilhança, sob a hipótese de que há ligação e sob a hipótese nula de que não há ligação. Esse teste estatístico tem distribuição aproximada de χ^2 . Para facilitar a interpretação desse teste, tem sido utilizada a estatística do LOD score (*Log of the odds*), que consiste em utilizar a estatística da razão de verossimilhança convertida para o logaritmo na base 10.

Por ter como base a análise de segregação de centenas de marcadores a construção de mapas de ligação é computadorizada. Programas como "Mapmaker" (LANDER et al., 1987), "Linkage 1" (SUITER; WENDEL, 1983), "Gmendel" (LIU; KNAPP, 1992), "GQMOL" (CRUZ; SCHUSTER, 2008) foram desenvolvidos e estão disponíveis na internet, para auxiliar na análise genética dos dados visando à construção de mapas genéticos.

Finalmente, as frequências de recombinação são transformadas em distância genética de mapa através de funções de mapeamento, para que haja aditividade entre as distâncias dos marcadores do mapa. Uma unidade de medida de distância de mapa é definida como a distância entre dois locos em que se espera a ocorrência de uma permuta por gameta, por geração (WEIR, 1996). Denominada por Morgan e expressa em centiMorgans (cM), é uma função da fração de recombinação e possui caráter aditivo. Assim, as funções de mapeamento transformam as frequências de recombinação em distâncias aditivas (LYNCH; WALSH, 1998). As principais são as funções de Haldane (HALDADE, 1919), que admite que a ocorrência de permuta se dê na ausência de interferência, seguindo uma distribuição de Poisson, e a função de Kosambi que admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes levando em consideração a interferência sendo, portanto, mais próximo da situação real (KOSAMBI, 1944).

As funções de mapeamento são, em geral, expressas em cM (centiMorgan) que é igual a 0,01 Morgan. Um Morgan equivale à distância entre dois genes ao longo da qual se espera que ocorra uma permuta “*crossing-over*” por gameta por geração (WEIR, 1996).

Uma vez conhecidas as frequências de recombinação entre cada par de marcadores, os grupos de ligação são identificados. Do ponto de vista biológico, grupos de ligação são definidos como grupos de genes (marcadores), cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Programas como Mapmaker (LANDER *et al.*, 1987) e GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2008) permitem a detecção de ligação em um conjunto de centenas de marcadores, como é comum nos experimentos atuais, e o ordenamento dos marcadores dentro dos grupos de ligação. O estabelecimento dos grupos de ligação, usando-se desses programas, é feito pela função de verossimilhança ou LOD score. Dessa forma, dois marcadores são considerados ligados quando a

frequência de recombinação entre eles for inferior a um limite predefinido e/ou o LOD for superior a um limite também predefinido.

De maneira geral, tem sido comumente adotado como critério valores de r_{\max} igual a 30 centimorgans e LOD_{\min} igual a 3. Um LOD superior ou igual a 3, indica que a hipótese alternativa é $10^3 = 1000$ vezes mais verossímil do que a hipótese nula de segregação independente. Uma vez definidos os critérios de r_{\max} e LOD_{\min} , apenas um padrão de agrupamento é obtido, estando o marcador presente em apenas um grupo ou nenhum, no caso de não estar ligado a nenhum outro marcador (CRUZ; SCHUSTER, 2006).

2.5.4 Mapeamento de QTLs

O mapeamento de QTLs consiste em se detectar uma associação entre o fenótipo em questão e o genótipo de marcadores. Marcadores são utilizados para dividir a população de mapeamento em classes genóticas diferentes de acordo com os genótipos do loco marcador. Em seguida, métodos estatísticos são utilizados para determinar se os indivíduos das diferentes classes genóticas diferem significativamente, com respeito à característica avaliada (TANKSLEY, 1993).

Se há diferenças significativas, considera-se que os genes que controlam a característica em questão estão ligados ao loco marcador. Os testes de significância desses parâmetros são, geralmente, feitos pela razão de verossimilhança (LR) ou por LOD score. Os valores de LR ou de LOD são estimados para cada posição do cromossomo e então plotados em Figuras, para facilitar a visualização (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

A associação entre marcador e QTL pode ser avaliada utilizando-se uma, duas ou mais marcas simultaneamente. Diversos métodos de mapeamento de QTLs são conhecidos e estão descritos a seguir:

Segundo Schuster e Cruz (2008), o ideal para o mapeamento de QTL seria que os testes realizados em um determinado intervalo fossem independentes dos efeitos de outros QTLs localizados fora deste intervalo. A utilização de um teste desse tipo foi proposta, independentemente, por Jansen (1993) e Zeng (1994), usando uma combinação, em um único modelo, de técnicas de mapeamento por intervalo com análise de regressão múltipla, no intuito de eliminar as influências de outros QTLs sobre o intervalo considerado, reduzindo a identificação de QTLs inexistentes. Este método foi denominado de mapeamento por intervalo composto (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Atualmente, esse tem sido o método mais utilizado, por permitir um aumento na precisão e no poder de detecção de QTLs, especialmente quando QTLs ligados estão envolvidos. No método de mapeamento por intervalo composto, marcadores, selecionados por regressão, são utilizados como co-fatores, a qual permite selecionar as marcas com efeitos significativos sobre o QTL do intervalo analisado, que estejam associadas à QTL ligados ou não.

A utilização de marcas significativas como co-fatores resolve o problema da detecção de falsos QTL o que contribui para o uso deste método nos estudos de QTL. No entanto, esse método considera um único QTL de cada vez (KAO et al., 1999).

Em se tratando de análise de regressão múltipla, o modelo mais adequado para explicar as variações na variável dependente é aquele que inclui todas as variáveis principais, associadas à variável dependente, sem incluir variáveis redundantes, ou seja, correlacionadas entre si (SCHUSTER; CRUZ, 2008). Por essa razão, são usados os métodos de seleção de variáveis *backward*, *forward* e *stepwise*, para que um modelo seja buscado até que se obtenha aquele em que sejam incluídas todas as variáveis significativas pelo teste de t (BEARZOTI, 2000).

Em estudos de simulação feitos por Ferreira (1995), ficou evidenciado que a análise de regressão múltipla, utilizando-se o processo de seleção de marcadores (*backward*), foi o método mais eficiente para a estimação dos efeitos genotípicos associados aos marcadores e mapeamento dos QTLs.

Uma variação do intervalo composto é o intervalo composto expandido para múltiplos ambientes, que permite estimar a interação QTLs x ambientes. Essa interação ocorre quando há uma expressão diferencial dos QTLs em relação às mudanças ambientais ou quando há ausência de expressão do QTL em alguns dos ambientes avaliados (SANTOS, 2008). A interação QTLs x ambientes tem sido relatada em vários trabalhos para grande número de espécies, principalmente para caracteres quantitativos (MELO; SANTOS; FERREIRA, 2004; TEIXEIRA, 2004; BENTO, 2006; SANTOS, 2008).

3 CONCLUSÕES

Vários marcadores foram identificados como potenciais para seleção indireta, visando à resistência ao mofo branco, com destaque para o BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9, que foram estáveis apesar da significativa interação progênes por ambientes.

Quatro QTLs estáveis, WM2.1, WM2.2, WM2.3 e WM2.4, foram mapeados e estão localizados entre os marcadores que obtiveram R^2 relativamente elevado. Foi confirmada a herança quantitativa da resistência do feijoeiro ao mofo, controlada, pelo menos, pelos quatro QTLs identificados.

Este estudo demonstrou que houve aumento da atividade das enzimas de defesa POX, PPO, CHI, GLU, PAL, e lignina nos genótipos com resistência parcial (Ex Rico 23 e G122) e, em geral, a inoculação com *S. sclerotiorum* induz o aumento da atividade dessas enzimas e dos teores de lignina. Desta forma, estas enzimas podem ser utilizadas para ajudar na seleção de genótipos de feijoeiro resistentes ao mofo branco.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, Aug. 1979.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635 p.

ANNIS, S. L.; GOODWIN P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall degrading enzymes in plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 103, n. 1, p. 1-14, Jan. 1997.

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.

ANOLLÉS, G. C.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio Technology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 553-557, Jan. 1991.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 23, n. 1, p. 88-98, Mar. 2001.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2000. p. 63-223.

BEATTIE, A. D. et al. Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype. **Genome**, Montreal, v. 46, n. 3, p. 411-422, June 2003.

BENTO, D. A. V. **Mapeamento de QTL para produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 2006. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

BLAIR, M. W. et al. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 8, p. 1362-1374, Nov. 2003.

BLAIR, M. W.; IRIARTE, G.; BEEBE, S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1149-1163, Apr. 2006.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, London, 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 cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 1-16, Jan. 2006.

BONIERBALE, M. W.; PLAISTED, R. L.; TANKSLEY, S. D. RFLP maps based on common set of clones reveal modes of chromosomal evolutions in potato and tomato. **Genetics**, Baltimore, v.120, n. 4, p.1095-1103, Dec.1988.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 384 p.

BUCHER, G. L. et al. Local expression of enzymatically active class I b-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, Malden, v. 28, n. 3, p. 361-369, Nov. 2001.

CALLA, B. et al. Gene Expression profiling soybean stem tissue early response to *Sclerotinia sclerotiorum* and in silico mapping in relation to resistance markers. **The Plant Genome**, Madison, v. 2, n. 2, p. 149-166, July 2009.

CARDOSO, J. E. Mofó branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 111-122.

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**, Santiago, v. 12, n. 6, p. 9, Jan. 2010.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, maio/ago. 2002.

CARVALHO, G. A. et al. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 482-485, jan. 1998.

CESSNA, S. G. et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Palo Alto, v. 12, n. 12, p. 2191-2200, Dec. 2000.

CHEN, X. et al. Development of a microsatellite map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 4, p. 553-567, Mar. 1997.

CHRISTENSEN, A. B. et al. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 849-857, July 1998.

CLARKSON, J. P. et al. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, London, v. 107, n. 2, p. 213-222, Feb. 2003.

CLARKSON, J.; WHIPPS, J. Control of sclerotial pathogens in horticulture. **Pesticide Outlook**, London, v. 13, n. 1, p. 97-101, Jan. 2002.

COELHO, A. S. G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 1-36.

COLLARD, B. C. Y. et al. Introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, n. 3, p. 169-196, Apr. 2005.

CORDEIRO, M. C. R.; GROSSI DE SÁ, M. F. Biotecnologia e resistência à patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 10, n. 10, p. 34-39, set./out. 1999.

CORRENS, C. Scheinbare ausnahmen von der Mendel's hen spaltungsregel fur bastarde. **Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 159-172, Jan. 1902.

CROZIER, A. et al. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 850-929.

DEJAEGHER, G.; BOYER, N.; GASPAR, T. Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: Changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 3, n. 2, p. 133-148, June 1985.

DESMOND, O. J. et al. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Palo Alto, v. 67, n. 3/5, p. 171-179, Sept./Oct. 2006.

DE WIT, P. L. G. M. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. **Advances in Botanical Research**, Cingapura, v. 21, n. 1, p. 147-185, Oct. 1995.

DICKMAN, M. B.; MITRA, A. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Palo Alto, v. 41, n. 4, p. 255-263, Oct. 1992.

DIWAN, N. et al. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfafa. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 165-172, July 2000.

DONALDSON, P. A. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-120 secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Palo Alto, v. 59, n. 6, p. 297-307, Dec. 2001.

ENDER, M.; KELLY, J. D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 6, p. 2482-2490, Nov. 2005.

ENDER, M.; TERPSTRA, K.; KELLY, J. D. Marker-assisted selection for white mold resistance in common bean. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 149-157, Feb. 2008.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D'OVIDIO, R. Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonaseinhibiting protein (PGIP), in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Palo Alto, v. 17, n. 2, p. 1402, Feb. 2004.

FERREIRA, C. F. et al. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 247-252, abr. 1999.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação**. 1995. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, R. B. et al. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 677-700, Sept. 2007.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, n. 1, p. 275-296, Sept. 1971.

FREYRE, R. et al. Towards an integrated linkage map of common bean: development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 847-856, Oct. 1998.

FRISCH, M. et al. Duplicate marker loci can result in incorrect locus orders on linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 2, p. 305-316, Jan. 2004.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 9, p. 774-782, Sept. 1999.

GENCHEV, D.; KIRYAKOV, I. Inheritance of resistance to white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) in A195 (*Phaseolus vulgaris* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Bulgaria, v. 8, n. 2/3, p. 181-187, Mar. 2002.

GEPTS, P. et al. Linkage mapping in common bean. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 36, n. 36, p. 24-38, Mar. 1993.

GILMORE, B.; MYERS, J. R. A preliminary molecular marker map for *Phaseolus coccineus*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 47, n. 47, p. 87-88, Mar. 2004.

GILMORE, B.; MYERS, J. R.; KEAN, D. Completion of testing of *Phaseolus coccineus* plant introductions (PIs) for white mold, *Sclerotinia sclerotiorum*, resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 45, n. 45, p. 64-65, Mar. 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 205-227, Sept. 2005.

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**, London, v. 37, n. 3, p. 179-191, Sept. 1990.

GONÇALVES, P. R. C.; SANTOS, J. B. dos. Physiological resistance of common bean cultivars and lines to White mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 53, n. 53, p. 236-237, Mar. 2010.

GRANT, V. **Genetics of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1975. 514 p.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 783 p.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3703-3711, Nov. 2004.

GUPTA, P.K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P.L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 57, n. 4, p. 461-485, Mar. 2005.

HAHLBROOK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylproanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 347-369, Jan. 1989.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, Bangarole, v. 8, n. 4, p. 299-309, Sept. 1919.

HALL, R.; PHILLIPS, L. G. Field evaluation of the straw test for assessing resistance of dry bean to white mold. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 41, n. 41, p. 171-172, Sept. 1998.

HOFFMAN, D. D. et al. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 9, p. 971-980, Sept. 2002.

HRAZDINA, G.; PARSONS, G. F. Induction of avonoid synthesizing enzymes by light in etiolated pea (*Pisum sativum* cv. Mid freezer) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, n. 2, p. 506-510, Aug. 1982.

HU, X. et al. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 1, p. 170-181, Jan. 2003.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 205-211, Sept. 1993.

JERKOVIC, A. et al. Strategic distribution of protective proteins within bran layers of wheat protects the nutrient-rich endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, n. 3, p. 1459-1470, Mar. 2010.

KAMI, J. et al. Identification of presumed ancestral DNA of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **The Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 92, n. 4, p. 1101-1104, Feb. 1995.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 152, n. 3, p. 1023-1216, July 1999.

KARL, A. C.; NASSER, L. C. B.; CAFÉ FILHO, A. C. Mofo branco do feijoeiro, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, em áreas irrigadas nos cerrados. In: ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA, 2., 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1997. p. 18-23.

KESARWANI, M. et al. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes* molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 10, p. 7230-7238, Mar. 2000.

KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 55-61, Jan. 2000.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN-FILHO, A. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 24, p. 600-663.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 539-548, Mar. 2003.

_____. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 693-699, May 2002.

_____. 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. 2000.

_____. Inheritance of resistance to white mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 42, n. 42, p. 47-48, Mar. 1999.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annals of Eugenetics**, London, v. 12, n. 3 p. 172-175, Mar. 1944.

LAGRIMINI, L. M. et al. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 84, n. 21, p. 7542-7546, Nov. 1987.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 185-199, Jan. 1989.

LANDER, E. S. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, London, v.1, n. 2, p. 174-181, Oct. 1987.

LI, J. Z. et al. Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. **Genome**, Montreal, v. 49, n. 5, p. 454-466, May 2006.

LITT, M.; LUTY, L. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 398-401, Mar. 1989.

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

LIU, B. H.; KNAPP, S. J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratio's. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 81, n. 6, p. 407, Dec. 1992.

LIVINGSTONE, D. M. et al. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 4, p. 1354-1362, Apr. 2005.

LORENCETTI, C. et al. Retrocruzamento como uma estratégia de identificar genótipos e desenvolver populações segregantes promissoras em aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 11118-1125, jul./ago. 2006.

LORENZINI, G. et al. The protective effect of rust infection against ozone, sulphur dioxide and paraquat toxicity symptoms in broad bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 263-279, Oct. 1994.

LU, G. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 509-516, Dec. 2003.

LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-896, Aug. 1979.

LUMSDEN, R. D.; WERGIN, W. P. Scanning-electron microscopy of infection of bean by species of *Sclerotinia*. **Mycologia**, New York, v. 72, n. 6, p. 1200-1209, Nov./Dec. 1980.

LYNCH, M.; WALSH, J. B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.

LYTTLE, T. W. Segregation distorters. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 511-557, Jan. 1991.

MAGRO, P.; MARCIANO, P.; DI LENNA, P. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbiology Letters**, Keveling Buismanweg, v. 24, n. 1, p. 9-12, Jan. 1984.

MARIN, A. L. A. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul./ago. 2005.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3-glucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 936-942, Nov. 1988.

MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Forecasting diseases caused by *Sclerotinia* spp. In eastern Canada: fact or fiction? **Canadian Journal of Plant Pathology**, London, v. 26, n. 4, p. 480-488, Dec. 2004.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B. dos; FERREIRA, D. F. QTL mapping for common bean yield in different environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 135-144, June 2004.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MIKLAS, P. N. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 50, n. 50, p. 1-2, Mar. 2007.

_____. DNA markers (SCARs) linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 48, n. 48, p. 1-3, Mar. 2005.

_____. Marker-assisted selection for disease resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 45, n. 45, p. 1-2, Mar. 2002.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; RILEY, R. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 4, p. 564-570, July 2003.

MIKLAS, P. N. et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309-315, Mar. 2001.

_____. Using a subsample of the core collection to identify new sources of resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 569-573, Mar./Apr. 1999.

MOHAMED, F; SEHGAL, O. P. Characteristics of pathogenesis-related proteins induced in *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto following viral infection. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 45, n. 1, p. 49-58, Mar. 1997.

NELSON, B. D., HELMS, T. C.; KURAL, I. Effects of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 71, n. 2, p. 347-352, Apr. 1991.

NIETSCHÉ, S. et al. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, Jan. 2001.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A.V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. 2005. p. 139-153.

OLIVEIRA, R. P. et al. Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 27, n. 3, Sept. 2004.

ORAGUZIE, N. C. et al. **Association Mapping in Plants**. New York: Springer, 2007. 277 p.

PARK, S. O. et al. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1253-1262, Jan. 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo e resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-454.

PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. In: SPARKS, D. L. (Ed). **Advances in Agronomy**. San Diego: Academic Press, 1991. cap. 2, p. 39-89.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Foliar application of calcium chloride and calcium silicate decreases white mold intensity on dry beans. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 171-174, May/June 2009.

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.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, Aug. 1979.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, maio 1994.

RESENDE, M. L. V. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra doenças. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2008. v. 16, p. 133-184.

RIDE, J. P. The role of cell wall interactions in resistance to fungi. **Annals of Applied Biology**, Palo Alto, v. 89, n. 3, p. 302-306, Aug. 1978.

RITSCHER, P. S. et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **Biomed Central Plant Biology**, London, v. 4, n. 9, p. 235-246, May 2004.

ROCHA, R. P. **Manejo da podridão de sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 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, Jan. 2001.

SANTOS, M. F. **Mapeamento de QTLs em testecrosses de milho com diferentes testadores e níveis de acidez do solo**. 2008. 167 p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

SARTORATO, A. et al. SCAR markers linked to angular leaf spot resistance gene in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 42, n. 42, p. 21-22, Mar. 1999.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.

SCHWARTZ, H.F. et al. Inheritance of white mold resistance in *Phaseolus vulgaris* x *P. coccineus* crosses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 9, p. 1167-1170, Sept. 2006.

_____. Inheritance of white mold resistance in the interspecific crosses of pinot cultivars Othello and UI 320 and *Phaseolus coccineus* L. accessions PI433246 and PI439534. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 47, n. 47, p. 249-280, Mar. 2004.

SHARMA, Y. K. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 10, p. 5099-5104, May 1996.

SILVA, L. C. et al. Mapeamento genético: utilização de locos com distorção na razão de segregação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 50., 2004, Santa Catarina. **Anais...** Santa Catarina: SBG. 2004. 1 CD-ROM.

SMITH, V. L.; PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 1, p. 755-759, Aug. 1986.

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, Jan. 2011.

SOUZA JÚNIOR, C. L. Sample size required to detect linkage between a marker and QTL. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, p. 419-430, Feb. 1993.

SOUZA, T. P. de et al. Modo de infecção do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em folha de feijão. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 10., 2007, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007. CD-ROM.

STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 5, p.729-741, Sept. 1996.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 904-907, Aug. 1979.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. p. 387-416.

SUBBARAO, K. V.; HUBBARD, J. C.; SCHULBACH, K. F. Comparison of lettuce diseases and yield under subsurface drip and furrow irrigation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 877-883, Aug. 1997.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetic**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 205-233, Jan. 1993.

TANKSLEY, S. D. et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1141-1160, Dec. 1992.

TEIXEIRA, F. F. **Mapeamento de QTLs para caracteres do feijoeiro por meio de microssatélites**. 2004. 189 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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, S. P. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. **Plant Breeding**, Malden, v. 129, n. 3, p. 327-333, June 2010.

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.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 65-69, Jan. 1982.

VAN LOON, L. C.; GERAATS, B. P. J.; LINTHORST, H. J. M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Maryland, v. 11, n. 1, p. 184-191, Jan. 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, London, v. 40, n. 2, p. 199-211, Feb. 1970.

VERBENE, M. C. et al. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 7, p. 779-783, July 2000.

VOS, P. R. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

WAKEFIELD, E. N. On the names *Sclerotinia sclerotiorum* Masee, and *S. libertiana* Fuckel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 24, n. 21, p. 254-259, Jan. 1924.

WALTER, M. H. et al. Bean-pathogenesis-related proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 222, n. 2/3, p. 353-360, July 1990.

WEIR, B. **Genetic data analysis**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447 p.

XU, S. QTL Mapping Can Benefit from Segregation Distortion. **Genetics**, Baltimore, v. 180, n. 4, p. 2201-2208, Dec. 2008.

YOUNG, R. A.; KELLY, J. D. RAPD marker flanking the Are gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 1, p. 37-41, Jan. 1996.

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 155-160, Apr. 2006.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficiency and economics. **Plant Breeding**, Malden, v. 119, n. 5, p. 411-416, Dec. 2000.

ZAMBOLIM, L. et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 200/201, p. 114-125, Jan. 1999.

ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. **Botanical Gazette**, New York, v. 147, n. 3, p. 355-358, Mar. 1986.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, Oct. 2002.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 1457-1466, Dec. 1994.

CAPÍTULO 2

Identificação de QTLs do feijoeiro de resistência ao mofo branco

RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram identificar e mapear marcadores do tipo microssatélite (SSR) ligados a *Quantitative trait loci* (QTLs) de resistência ao mofo branco, derivados das linhagens de feijoeiro M20 e Ex Rico 23. Para isso, os genitores foram cruzados e posteriormente foi obtida a geração F₂, da qual foram tomadas 223 plantas. De cada planta F₂ foi extraído o DNA para avaliação molecular com *primers* microssatélites polimórficos selecionados nos genitores. A partir da F₂ foram obtidas 223 progênies F_{2.3} e F_{2.4} utilizadas para as avaliações fenotípicas. As progênies F_{2.3} foram avaliadas na safra do inverno de 2009 e as progênies F_{2.4} na safra das águas de 2009/2010. Foi utilizado o delineamento látice triplo 15 x 15. Entre as progênies foram detectadas diferenças genéticas significativas (P<0,01) em todas as safras pelo método do “*Straw test*”. As estimativas de herdabilidade foram moderadas, 55,81% e 72,33%, para as progênies F_{2.3} e F_{2.4}, respectivamente. Houve interação safras x progênies (P<0,01). Dos 600 pares de primers testados 40 apresentaram polimorfismo. Os dados moleculares e fenotípicos foram utilizados nas análises por ponto, de regressão linear simples e regressão linear múltipla *backward* e por estes métodos marcadores foram identificados como potenciais para seleção indireta visando à resistência ao mofo branco, com destaque para BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9, que foram mais estáveis. Dos 40 primers polimórficos 29 apresentaram distorção de segregação e todos foram utilizados para o estabelecimento dos grupos de ligação. Foi obtido um mapa molecular parcial com comprimento total de 550,65 cM. O mapeamento por intervalo composto identificou quatro QTLs, WM2.1, WM2.2, WM2.3 e WM2.4 que estão localizados entre os marcadores mais estáveis e que obtiveram R² relativamente elevado. O presente trabalho mostrou que resistência do feijoeiro ao mofo branco possui herança quantitativa devido, pelo menos, aos quatro QTLs identificados. A partir dos marcadores estáveis identificados neste estudo, existe a possibilidade de utilização de uma combinação de marcadores associados à resistência ao mofo branco como, por exemplo, BM175 e ATA7 que explicam 18,16% e 26,00%, respectivamente, da variação fenotípica na análise conjunta.

Palavras-chave: *S. sclerotiorum*. *Phaseolus vulgaris*. Marcadores SSR. QTL.

ABSTRACT

The purposes of the study were to identify and mapping microsatellite markers (SSR) linked to *Quantitative trait loci* (QTLs) of common bean for resistance to white mold from crossing M20 and Ex Rico 23 genotypes. From this crossing it was obtained the F₂ generation of which 223 plants were taken. From the 223 plants obtained of the F₂ generation it was extracted the DNA, to the molecular evaluation with microsatellite polymorphic primers selected on parents. It was obtained 223 progenies F_{2:3} and F_{2:4} (derived from F₂ plants), and they were used for phenotypic evaluations in the winter season of 2009 and rainy season of the 2009/2010, respectively. It was used the triple lattice design 15 x 15. Significant genetic differences (P<0.01) were detected among the progenies in all seasons by the "Straw test". Heritability estimates for progenies F_{2:3} and F_{2:4} were moderate 55.81% and 72.33%, respectively. There was interaction progenies by seasons (P<0.01). The molecular and phenotypic data were used in the single-marker, the multiple linear regression and the simple linear regression analysis. Markers were identified as potential for indirect selection for resistance to white mold, especially BM175, SSR-IAC159, ATA7 and ATA9 which were more stable, despite of the significant interaction by environment. Out of the 40 polymorphic primers 29 showed segregation distortion and all were used to establish the linkage group. It was obtained a partial molecular map with a total length of 550.65 cM. Using the composite interval mapping analyses four QTLs, WM2.1, WM2.2, WM2.3 and WM2.4 were identified which were more stable and that had relatively high R². This study showed that the reaction of common bean to white mold has quantitative inheritance at least due to the four QTLs identified. These results also showed that if the objective is to obtain lines for resistance to white mold the selection should be made under the same conditions, to increase the chance of successful selection. From the stable markers identified in this study, there was the possibility of a combination of markers associated with resistance to white mold, for example, BM175 and ATA7 that explain 18.16% and 26.00%, respectively, of the phenotypic variation.

Keywords: *S. sclerotiorum*. *Phaseolus vulgaris*. SSR markers. QTLs.

1 INTRODUÇÃO

Um problema para o melhoramento do feijoeiro visando resistência ao mofo branco, causado por *S. sclerotiorum*, é a dificuldade de avaliação fenotípica, frequentemente associada a erros experimentais de grande magnitude, especialmente quando se usa plantas individuais (KOLKMAN; KELLY, 2002; MIKLAS et al., 2004; ANTONIO et al., 2008).

A combinação de resistência fisiológica com mecanismos de escape pode ser uma boa estratégia para minimizar perdas na produtividade de grãos devida ao mofo branco. Principalmente a resistência fisiológica que é mais eficiente em qualquer ambiente (KOLKMAN; KELLY, 2002). Porém, devido à dificuldade de avaliação e seleção, são escassos os trabalhos nesse sentido. Assim, são necessárias alternativas para melhorar a eficiência da seleção de genótipos resistentes.

Uma das alternativas tem sido a utilização de marcadores moleculares, que permitem selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois, não são afetados pelo ambiente e não mudam durante o ciclo de vida do indivíduo. Além do que, a resistência ao mofo branco está sob controle genético complexo, sendo de difícil manipulação e compreensão (ANTONIO et al., 2008; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010). Esses caracteres são controlados por vários genes e as regiões do genoma onde eles ocorrem podem ser identificadas por marcadores sendo denominadas de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs).

Nos últimos anos mais de 10 QTLs independentes para resistência ao mofo branco foram identificados em feijoeiro (MIKLAS et al., 2001; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; PARK et al., 2001; KOLKMAN; KELLY, 2003; ENDER; KELLY, 2005; MIKLAS, 2007) o que mostra a complexidade e natureza quantitativa da resistência. Estes QTLs foram encontrados em quase

todos os grupos de ligação, exceto nos grupos 9, 10 e 11 do mapa integrado de feijão de Freyre (FREYRE et al., 1998; KELLY et al., 2003; MIKLAS; SINGH, 2007).

Embora tenham sido encontrados QTLs de grande efeito e relativamente estáveis em clima temperado (MIKLAS, 2007), alguns QTLs não se expressam em condições de clima diferentes daqueles onde foram identificados, como por exemplo o QTL identificado pelo *SCAR P_{hs}*, derivado da linhagem G122, que não se expressa no Sul de Minas Gerais (CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010). Dessa forma há a necessidade de identificação de novos QTLs que se expressem nas condições de cultivo da região, para que os marcadores que os identifiquem possam ser usados para auxiliarem na seleção de genótipos mais resistentes.

Dessa forma, no desenvolvimento de cultivares resistentes, podem-se eliminar, pelo menos no início do programa, as dificuldades de inoculação do patógeno e de avaliação fenotípica das plantas por meio da identificação direta de genótipos resistentes.

O feijoeiro-comum é uma espécie com um genoma considerado pequeno, estimado em 637 mpb ou 0,66 pg/1C (ARUMUGANATHAM; EARLE, 1991), o que corresponde a aproximadamente 1.200 cM de distância física por mapeamento (VALLEJOS; SAKYAMA; CHOSE, 1992). Também foi estimado, via cinética de reassociação do DNA, que 60% do genoma do feijoeiro-comum é composto de seqüências de cópias simples (TALBOT et al., 1984). Supõe-se que essas características facilitem a obtenção de marcadores moleculares distribuídos por todos os cromossomos, o que aumentaria a possibilidade de detecção dos QTLs, pois, pode-se conseguir mais facilmente mapas genéticos altamente saturados.

No mapeamento de QTLs a principal dificuldade é o fato de vários fatores genéticos e ambientais afetarem a expressão final do fenótipo. Por isso, um grande número de famílias segregantes deve ser avaliado para aumentar a

chance de identificar maior número de QTLs e com efeitos mais reais (BERNARDO, 2002).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram identificar e mapear marcadores do tipo microssatélite (SSR) ligados a QTLs de resistência ao mofo branco, estáveis nas condições do Estado de Minas Gerais, derivados das linhagens M20 e Ex Rico 23, contrastantes para o caráter.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido na área experimental, os cruzamentos em telado e as análises para mapeamento de QTLs foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, localizada 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 Materiais genéticos e obtenção das populações

As linhagens de feijoeiro M20 e Ex Rico 23 foram os genitores utilizados. A linhagem M20 possui grãos tipo carioca, com hábito de crescimento tipo II, resistência a todas as raças de *Coletrochicum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, que ocorrem no Brasil. Isso porque é portadora da pirâmide Co-4², Co-5 e Co-7, além de possuir também resistência a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) proveniente da fonte Andina Jalo EEP 558, porém, é altamente suscetível ao mofo branco. A linhagem Ex Rico 23 (também conhecida como ICA Bunsí) do grupo gênico mesoamericano é uma conhecida fonte de resistência fisiológica ao mofo branco, além de ter hábito de crescimento indeterminado (tipo II) (SINGH, 1982), arbustivo e que também contribui para o controle da doença. Também possui resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV) e ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger.) (TU; BEVERSDORF, 1982). No entanto, apresenta grãos pequenos e brancos que não tem valor comercial (YU; PARK; POYSA, 1999).

Os genitores foram cruzados sob telado e posteriormente foi obtida a geração F₂, da qual foram tomadas 223 plantas. De cada planta F₂ foi extraído o DNA para avaliação molecular e obtida uma progênie para as avaliações fenotípicas.

2.3 Avaliação genotípica das plantas F₂

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com os procedimentos utilizados por Pereira et al. (2007).

2.3.1 Extração do DNA das plantas F₂ e dos genitores

Foi extraído o DNA a partir de 2g de tecido foliar jovem dos genitores e de cada uma das 223 plantas da geração F₂.

As folhas foram maceradas com 10 ml de tampão de extração (2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1,4M NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidona)) a 65°C em um almofariz. Ao material macerado foi adicionado 30 µl de β-mercaptoetanol, colocado em um tubo falcon de 50 ml que foi incubado por cerca de trinta minutos em banho-maria a 65°C homogeneizando-se a suspensão a cada 10 minutos. Após, foi adicionada uma mistura de clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 em volume igual ao do tampão de extração. Depois de homogeneizado, as fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados, após colocar 30 ml da mistura de 6 álcool 95%: 1 acetato de amônia 7,5M e colocados no freezer por 24 horas. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga e reidratados em tampão TE (1mM TRIS, 0.1mM EDTA). Realizou-se uma segunda extração com clorofórmio-fenol-álcool isoamil

20:20:1 onde a solução foi centrifugada e coletado o sobrenadante, colocando-se em microtubos de 2 ml, acrescentando-se 900 µl 20 álcool 95%: 1 acetato de sódio 3M e mantida no freezer por mais 24 horas.

Novamente a solução foi centrifugada e após a precipitação, o DNA foi reidratado em tampão TE e quantificado, usando-se o fluorímetro HOFFER TKO100. O DNA quantificado foi então diluído em água pura para a concentração de 10ng/µL para ser utilizado nas reações.

2.3.2 Reação com marcadores microssatélites e pré-seleção dos pares de primers para genotipagem da população F₂

Foi realizado preliminarmente, reações com os genitores Ex Rico 23 e M20, para a seleção dos *primers* polimórficos. Foram testados 600 pares de *primers* microssatélite, cujas seqüências estão disponíveis em Bean Improvement cooperative – BIC (2007), Blair et al. (2008) e Cardoso et al. (2008).

Para cada reação foram utilizados 20 ng de DNA, 100 µM de cada um dos dNTPs, 1U de taq DNA polimerase, tampão composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 10µg de BSA, 0,25% de Ficoll 400, 10mM de tartrazine e água pura. O volume final para cada reação foi de 12µl. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, em que foi empregado o seguinte programa: cinco minutos, a 95°C, para desnaturação do DNA; oito ciclos, em que foram usados 20 segundos, à temperatura de 94°C para desnaturação; 20 segundos para anelamento do primer, cujas temperaturas variaram de 46°C a 68°C de acordo com o primer; 1 minuto a 72°C para extensão de DNA; 24 ciclos que diferiram dos primeiros apenas na temperatura de anelamento de 52°C a 65°C e uma extensão final, por quatro minutos, a 72°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical por 2 horas a 120 V em gel de poliacrilamida 6% corado em nitrato de prata e fotografado com câmera digital.

Após a verificação do polimorfismo nos genitores os *primers* considerados polimórficos foram utilizados para genotipar a população F₂ de 223 plantas. Os fragmentos de DNA amplificados por cada par de *primers* foram identificados na progênie como: 0, para a banda proveniente do genitor M20, 1, para a banda proveniente do genitor Ex Rico 23 e 2, quando a progênie possui as bandas dos dois genitores.

2.3.3 Teste da alteração das freqüências genotípicas na população segregante

Para todos os marcadores considerou-se como “A¹” o fragmento de DNA (alelo) proveniente do genitor M20 e “A²” ao alelo proveniente do genitor Ex Rico 23. Em cada loco foi testada a alteração das freqüências alélicas, utilizando o teste χ^2 considerando a freqüência de 0,5 para cada um, por se tratar de uma população F₂ sem seleção.

A segregação dos marcadores foi avaliada aplicando-se o teste estatístico Qui-quadrado (χ^2) (P<0,05 e P<0,01) que permite verificar se as freqüências observadas desviam casualmente ou não das esperadas. As freqüências esperadas para a geração F₂ foram estimadas para cada loco, em função das freqüências alélicas. Isso foi realizado porque em alguns locos as freqüências alélicas desviaram-se do valor esperado de 0,5. A expressão geral é representada por:

$$\chi^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$

Onde:

FO_i é a frequência observada da classe i ;

FE_i é a frequência esperada na ausência de seleção da classe i .

A correção do erro tipo I, ou seja, aceitar uma diferença estatística quando na realidade ela não é verdadeira, foi realizada com o emprego do teste FDR, ou razão de falsas descobertas (BENJAMIN; HOCHBERG, 1995) com o auxílio do programa GQMOL versão 2006.9.1 (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

2.4 Avaliação fenotípica em campo das progênies $F_{2:3}$ e $F_{2:4}$

A partir das plantas F_2 foram obtidas 223 progênies $F_{2:3}$ que posteriormente deram origem a progênies $F_{2:4}$. As 223 progênies e os genitores foram avaliados em duas safras. As progênies $F_{2:3}$ foram avaliadas na safra do inverno de 2009 com semeadura em julho e as progênies $F_{2:4}$ foram avaliadas na safra das águas de 2009/2010 com semeadura em novembro. Foi utilizado o delineamento látice triplo 15 x 15, com parcela constituída de uma linha de um metro com 10 plantas.

O experimento foi conduzido no sistema convencional de plantio e teve densidade de semeadura de 15 sementes por metro (apenas 10 plantas foram avaliadas) e o espaçamento entre linhas foi de 0,5m. Foi utilizada adubação na semeadura com 300kg/ha de 8-28-16 (N, P_2O_5 , K_2O) e realizada também adubação de cobertura 25 dias após a emergência, utilizando 150kg/ha de sulfato de amônio. Com relação à irrigação, no experimento com as progênies $F_{2:3}$ utilizou-se irrigação por aspersão diária por cerca de 30 minutos. Já no experimento com as progênies $F_{2:4}$ a irrigação foi realizada duas vezes por semana, semelhantes aos demais experimentos realizados com a cultura. Foram utilizados tratos culturais comuns à cultura do feijoeiro.

Para avaliar a reação a *S. sclerotiorum* nas 223 progênies nas duas safras, foi utilizado o método do *Straw test* (teste do canudo), descrito por Petzoldt e Dickson (1996) e modificado por Terán et al. (2006). O inóculo foi obtido de escleródios desinfectados de *S. sclerotiorum* retirados de plantas de feijoeiro da área de pivô central em Ijací-MG.

Os escleródios foram desinfectados superficialmente pela imersão consecutiva em etanol a 70 % por 1 minuto, solução de água sanitária a 20 % por 3 minutos e três vezes em água desmineralizada e esterilizada. Posteriormente foram colocados em placas de petri contendo meio de BDA (batata-dextrose-ágar), que foram mantidas em BOD a 23°C por três dias e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, a colônia foi repicada uma vez, para multiplicar o inóculo, também em BOD (23°C e fotoperíodo de 12 horas). Após o terceiro dia no BOD, as placas homogêneas foram utilizadas para inoculação de plantas de feijoeiro, com 28 dias de idade, utilizando-se o método do *Straw test*.

O método consistiu no corte do ápice caulinar, onde foi encaixada uma ponteira de micropipeta, com disco de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum*. Oito dias após a inoculação procedeu-se a avaliação da reação das plantas de feijoeiro a *S. sclerotiorum* por meio da escala diagramática proposta por Singh (2008) de 1 a 9, onde: 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 - morte da planta. Os dados médios das notas por progênie foram utilizados para identificação de QTLs.

2.5 Análises estatísticas

Os dados médios das notas por parcela para as duas populações foram submetidas à análise individual de variância (ANAVA), utilizando-se o programa computacional GENES (CRUZ, 2006), segundo o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + b_{k(j)} + r_j + p_i + e_{ijk},$$

Onde:

Y_{ijk} : observação referente à progênie i no bloco k , dentro da repetição j , sendo: $i = 1, 2, 3, \dots, 225$; $k = 1, 2, \dots, 15$; e $j = 1, 2, 3$;

μ : média geral;

$b_{k(j)}$: efeito aleatório do bloco k , na repetição j , $b_{k(j)} \cap N(0, \sigma_b^2)$, sendo σ_b^2 a variância do efeito de blocos dentro de repetição;

r_j : efeito fixo da repetição j ;

p_i : efeito aleatório da progênie i , $p_i \cap N(0, \sigma_p^2)$, sendo σ_p^2 a variância do efeito de progênies;

e_{ijk} : efeito aleatório do erro experimental, $e_{ijk} \cap N(0, \sigma^2)$.

Para a análise conjunta foi considerado o seguinte modelo:

$$Y_{iu} = \mu + a_u + p_i + (pa)_{iu} + \bar{e}_{iu},$$

Onde:

Y_{iu} : observação referente à progênie i , na safra u , sendo: $i = 1, 2, 3, \dots, 225$; e $u = 1, 2$;

μ : média geral;

a_u : efeito fixo da safra u ;

p_i : efeito aleatório progênie i , $p_i \cap N(0, \sigma_p^2)$, sendo σ_p^2 a variância do efeito de progênies;

pa_{iu} : efeito aleatório da interação entre a progênie i e a safra u ;

\bar{e}_{iu} : efeito aleatório do erro experimental, $\bar{e}_{iu} \cap N(0, \bar{\sigma}_e^2)$.

O esquema das análises de variância individuais e conjunta está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Esquema da análise de variância individual e conjunta

Análises individuais		
Fontes de variação	QM	F
Repetições	Q1	
Bl/rep (aj.)	Q2	
Progênies (aj.)	Q3	Q3/Q4
Erro efetivo	Q4	
Análise conjunta		
Safras (S)	Q5	
Progênie (P)	Q6	Q6/Q8
P x S	Q7	Q7/Q8
Erro efetivo Médio	Q8	

As estimativas de herdabilidade para as análises de variâncias individuais foram obtidos por meio das expressões:

$$h^2 = (Q3 - Q4)/Q3$$

Os estimadores dos limites inferior (LI) e superior (LS) da herdabilidade são os seguintes (KNAPP; STROUP; ROSS, 1985):

$$LI = \{1 - [Q3/Q4]F_{1-\alpha/2; GL \text{ progênies}; GL \text{ erro}}^{-1}\}$$

$$LS = \{1 - [Q3/Q4]F_{\alpha/2; GL \text{ progênies}; GL \text{ erro}}^{-1}\}$$

Onde:

$F_{1-\alpha/2}$ e $F_{\alpha/2}$: valores tabelados da distribuição de F, sendo $\alpha = 0,05$.

As médias das progênies a partir das análises individuais e conjunta foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 1% de probabilidade para separar as progênies quanto à reação a *S. sclerotiorum*. Além disso, histogramas foram confeccionados com auxílio do software SISVAR 4.6. (FERREIRA, 2008), com distribuição dos grupos de progênies, de acordo com as diferentes notas da reação a *S. sclerotiorum* nas duas safras e também na conjunta.

Com o intuito de observar a consistência nas avaliações entre as progênies $F_{2:3}$ e $F_{2:4}$, foi estimada a correlação de Spearman entre as notas médias por progênie nas duas safras.

2.6 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla

A regressão linear simples define uma relação linear entre a variável dependente e uma variável independente. Quando se incorpora, ao invés de uma, várias variáveis independentes, tem-se a regressão linear múltipla. Por conseguinte, a análise de regressão linear múltipla, utilizando os marcadores moleculares e os dados de notas de doença, foi realizada conforme procedimentos utilizados por Torga et al. (2010), que consideraram os marcadores moleculares como variáveis independentes. A identificação foi realizada em duas etapas. Na primeira, foram considerados todos os marcadores segregantes obtidos. Nessa fase, a identificação de ligação entre QTLs e marcadores foi realizada utilizando o programa SAS, versão 9., a partir do procedimento *backward*. Por meio desse procedimento, todos os marcadores foram colocados no modelo inicialmente e o marcador de menor F e que não apresentou significância, foi eliminado. Os marcadores remanescentes foram

então submetidos ao mesmo processo de eliminação até que todos os marcadores do modelo apresentassem F parcial significativo (FERREIRA, 1995). Foram obtidas as estimativas de R^2 (coeficiente de determinação) e $R^2_{aj.}$ (coeficiente de determinação ajustado). O valor do coeficiente de determinação da regressão é a proporção da variação fenotípica da característica, explicada pelo marcador.

Nas análises de regressão foram utilizadas as médias das notas de doença por progênie, em cada safra, e também na conjunta, considerando todas as safras.

2.7 Construção do mapa molecular

O mapa genético foi construído com base nos dados moleculares. O cálculo da frequência de recombinação e das distâncias genéticas entre os diferentes marcadores genéticos, bem como a determinação do posicionamento dos marcadores foram realizados com o auxílio do programa GQMOL, optando-se pela análise para F_2 . Foram utilizados como parâmetros para estabelecimento dos grupos de ligação um valor de limite de detecção (LOD) de 3,0 e uma frequência máxima de recombinação de 40 ($r = 0,40$). As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, em centiMorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944) que leva em consideração a interferência (I).

2.8 Localização de QTLs nos grupos de ligação

A localização dos QTLs nos grupos de ligação foi determinada empregando-se o programa GQMOL, optando-se pela análise para F_2 . Foi utilizado o mapa molecular além de uma planilha, contendo os genótipos dos indivíduos da geração F_2 para os marcadores posicionados no mapa e os dados fenotípicos de reação ao patógeno.

Foi utilizado o método de mapeamento por intervalo composto para detecção dos QTLs que controlam a resistência do feijoeiro ao mofo branco.

O método de mapeamento por intervalo composto proposto por Zeng (1993) tem por finalidade avaliar a existência de ligação entre marcas e QTLs e é baseado em regressão múltipla utilizando alguns marcadores mapeados como co-fatores. Este método isola o efeito do QTL dentro de um dado intervalo de outros QTLs ligados no mesmo grupo de ligação, porém fora do referido intervalo.

O teste estatístico utilizado para verificar se houve associação entre um marcador e um QTL foi a razão de verossimilhança a partir da expressão:

$$LR = 2 \ln \left[\frac{\max L(y)}{\max L_r(y)} \right]$$

Em que:

LR: razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio*);

ln: logaritmo natural;

$L_r(y)$: função de verossimilhança para o modelo restrito (hipótese nula);

$L(y)$: função de verossimilhança para o modelo completo (hipótese alternativa).

O teste de significância também foi feito utilizando o LOD score (*likelihood of odds*) a partir da expressão:

$$LOD_{r_i} = \text{Log}_{10} \left[\frac{\max L_r(Y)}{\max L(Y_i)} \right]$$

Os pontos de corte para a característica foram determinados pelo programa GQMOL, via testes de permutação (CHURCHILL; DOERGE, 1994),

sendo utilizadas 1000 permutações, com três repetições, e um nível de significância de 0,05. Os testes de hipótese para presença e mapeamento do QTL foram realizados a cada 1 cM do mapa de ligação. Para facilitar a visualização dos resultados foram obtidas as apresentações gráficas dos grupos de ligação e dos QTLs.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação fenotípica

Os resumos das análises de variância individuais relativos às notas da reação das progênes de feijoeiro a *S. sclerotiorum*, avaliada em duas das safras utilizadas na cultura do feijoeiro e análise conjunta, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os coeficientes de variação foram relativamente baixos: 19,40%, 18,03% e 18,72%, respectivamente, o que indica boa precisão experimental e está próximo ao encontrado por Carneiro (2009) que observou CV de cerca de 16% em experimentos utilizando o *Straw test* e abaixo do encontrado por Souza e Costa (2003) que observou um CV de 42,4% para experimento de inoculação da haste de feijoeiro com *S. sclerotiorum*.

Tabela 2 Resumo das análises de variância individuais da reação de progênes de feijoeiro a *S. sclerotiorum* (escala de notas de 1 a 9), avaliadas nas safras do inverno de 2009 e águas 2009/2010 em Lavras e estimativas da herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), com os respectivos limites inferior (LI) e superior (LS) a 95% de confiança

Fontes de Variação	GL	QM	
		F _{2:3}	F _{2:4}
Repetições	2	48,14	60,26
Bl./Rep. (Aj.)	42	3,80	3,38
Progênes (Aj.)	224	1,38**	1,81**
Erro Efetivo	406	0,61	0,50
Média		4,33	4,3954
ER (%) ¹		42,30	47,00
CV (%)		19,40	18,03
h_a^2 (%)		55,81	72,33
(L _I ² - L _S ²)		(44,10 - 64,79)	(64,99 - 77,95)

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F; ¹ Eficiência relativa do látice

Nota-se ainda a elevada eficiência do látice nas duas safras indicando a utilidade do delineamento na avaliação das progênies. É importante salientar que tal eficiência não resulta de falhas na inoculação porque esta foi realizada em todas as 10 plantas da parcela e a incidência da doença (porcentagem de plantas doentes) foi de quase 100%.

As diferenças genéticas significativas ($P < 0,01$) (Tabela 2) entre as progênies em todas as safras indicam a possibilidade de sucesso com a seleção para essa característica e também a possibilidade de identificação de QTLs.

As estimativas de herdabilidade, com base nos dados de cada safra (Tabela 2), assumiram valores intermediários 55,81% e 72,33%, para as progênies $F_{2:3}$ e $F_{2:4}$, respectivamente. A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos mais importantes para o trabalho do melhorista, uma vez que ele representa o quanto da variação fenotípica pode ser perpetuada via seleção, ou seja, a proporção da variação genética presente na variação fenotípica total. A herdabilidade expressa então a confiança do valor fenotípico como um indicador do valor reprodutivo (BERNARDO, 2002). Como os limites inferiores e superiores das herdabilidades foram positivos (Tabela 2), tem-se maior confiança nessas estimativas como indicadores de sucesso com a seleção.

Park et al. (2001) encontraram, em seus trabalhos, estimativas de herdabilidade relativamente baixas de 24% e 23% em duas avaliações com “*Straw test*” em feijoeiro sendo consideradas baixas. Miklas, Delorme e Riley (2003) obtiveram estimativas de herdabilidade de 73% e 62% para resistência fisiológica ao mofo branco em feijoeiro pelo método do “*Straw test*” em casa de vegetação e no campo, respectivamente, sendo consideradas moderadamente altas. Valores semelhantes foram encontrados por Miklas et al. (2001) que encontraram em duas avaliações com “*Straw test*” valores de 75% e 76%. Estes

últimos resultados foram similares ao presente estudo, que foi realizado em condições da cultura, uma situação mais próxima da realidade.

A análise conjunta foi realizada, considerando-se as análises por safra e está apresentada na Tabela 3. Pode-se observar que a fonte de variação progênes foi altamente significativa ($P < 0,01$).

A interação safras x progênes também foi significativa ($P < 0,01$), indicando que o comportamento das progênes foi não coincidente nas safras avaliadas. Essa situação pode ter ocorrido devido à sensibilidade dos genótipos as variações ambientais para o caráter, principalmente as variações devido à irrigação, porque no experimento com as progênes $F_{2:3}$ utilizou-se irrigação por aspersão diária por cerca de 30 minutos. Já no experimento com as progênes $F_{2:4}$ a irrigação foi realizada duas vezes por semana.

Tabela 3 Resumo da análise de variância conjunta para reação de progênes de feijoeiro a *S. sclerotiorum* nas duas safras

Fonte de Variação	GL	QM
Safras	1	1,35
Progênes	224	2,31**
Safras*Progênes	224	0,89**
Erro Efetivo médio	812	0,56
Média		4,36
CV (%)		18,72
Correlação (r)		0,52**

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

Na maioria dos trabalhos apresentados na literatura, visando avaliar a eficiência da seleção precoce, o parâmetro utilizado é a estimativa da correlação entre o desempenho das famílias, na geração i e $i + x$, em que x pode assumir o valor 1, 2 ou 3, ou, às vezes, até um número maior de gerações. Pelos resultados

apresentados na tabela 3, verifica-se que a correlação (r) entre progênies $F_{2.3}$ e $F_{2.4}$ foi média e positiva ($r = 0,52^{**}$). Esta estimativa pode também indicar que a interação progênies x ambientes foi do tipo simples e as progênies avaliadas exibiram padrão semelhante de resistência durante as avaliações.

O Método do *Straw test* foi eficiente em causar doença na quase totalidade das plantas e em detectar diferenças genéticas entre progênies do cruzamento M20 x Ex Rico 23 em resposta ao patógeno *S. sclerotiorum* (Tabela 2 e 3). Diversas técnicas de reação do feijoeiro a *S. sclerotiorum* em laboratório, em casa de vegetação ou *in vitro* são conhecidas e utilizadas (DICKSON et al., 1982; HUNTER et al., 1982; MIKLAS; GRAFTON; NELSON, 1992; MIKLAS et al., 1992; KOLKMAN; KELLY, 2000). Entretanto, estas técnicas apresentam algumas limitações, tais como falta de uniformidade, falta de precisão, falta de repetibilidade e nem sempre reflete as reações em condições de campo (PARK et al., 2001).

Os dois genitores diferiram quanto à expressão do caráter de acordo com o teste de Scott e Knott. A linhagem M20 recebeu, em média nas duas avaliações, nota 6,99 e a linhagem Ex Rico 23 recebeu, em media nas duas avaliações, nota 2,59.

Os histogramas de frequência das progênies $F_{2.3}$ e $F_{2.4}$ e também da conjunta para a reação das progênies de feijoeiro a *S. sclerotiorum*, estão apresentados no Figura 1. Foi observada uma variação contínua sugerindo a existência de vários genes controlando a expressão dessas características. Este resultado é consistente com trabalhos anteriores com feijoeiro em reação a *S. sclerotiorum* (MIKLAS; GRAFTON, 1992; DICKSON et al., 1982; ROBERTS; DICKSON; HUNTER, 1982; FULLER; COYNE; STEADMAN, 1984; PARK ET AL., 2001).

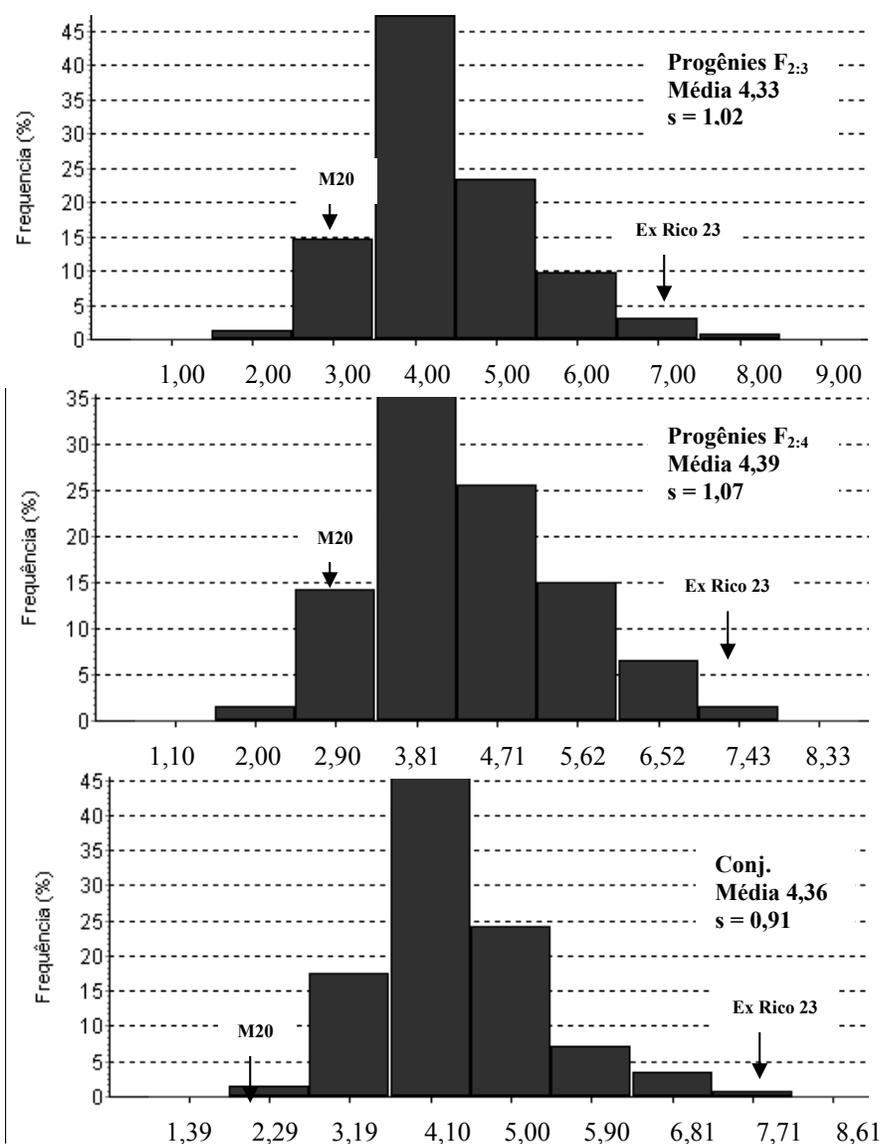


Figura 1 Distribuição de frequência da reação de progênies de feijoeiro a *S. sclerotiorum*

Na primeira avaliação (F_{2:3}) 15,87% das progênies apresentaram notas 2 a 3, 80,12% das progênies apresentaram notas de 4 a 6 e 4,01% das progênies apresentaram notas de 7 a 8. Na segunda avaliação (F_{2:4}) 15,87% das progênies

apresentaram notas variando de 2 a 2,90, 76,13% das progênies apresentaram notas variando de 3,81 a 5,62 e 8,00% das progênies apresentaram notas variando de 6,52 a 7,43 (Figura 1).

3.2 Avaliação genotípica

3.2.1 Emprego de microssatélites na população segregante

Dos 600 pares de *primers* microssatélites testados na pré-seleção dos genitores, 40 foram polimórficos. Essa baixa taxa de polimorfismo já era esperada, já que o feijoeiro é uma espécie na qual, naturalmente, não se encontra grande polimorfismo, mesmo quando são utilizados genitores muito contrastantes (FALEIRO et al., 2003; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; TEIXEIRA et al., 2005; BLAIR; IRIART; BEEBE, 2006; PEREIRA et al., 2007).

De 26 *primers* que se conhece a posição nos cromossomos, os fragmentos foram mapeados em dez dos onze cromossomos do feijoeiro, para os outros 14 *primers* não se conhece a posição no genoma, ou estas ainda não foram publicadas.

3.2.2 Segregação dos marcadores na população segregante

Os valores das freqüências genotípicas foram submetidos ao teste χ^2 para verificar se houve segregação distorcida em relação à esperada e para controlar a taxa da falsa descoberta (*False Discovery Rate* ou FDR), foi aplicado o método de Benjamim e Hochberg (1995). Foi obtido um nível crítico para o critério FDR de 0,66%. Vinte e nove dos 40 marcadores apresentaram valores

abaixo do nível crítico especificado, ou seja, 29 marcadores apresentaram segregação distorcida (Tabela 4).

Tabela 4 Teste χ^2 para as frequências genotípicas, probabilidade FDR (%) e frequências alélicas da geração F₂ do cruzamento entre as linhagens M20 e Ex Rico 23

Primer	Distorção de Segregação					Frequência Alélica	
	Frequência Genotípica					f(A ¹)	f(A ²)
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	χ^2	FDR (%)		
PV59	82	53	88	61,31**	0,0*	0,49	0,51
PVBR31	98	81	44	11,62**	0,0*	0,62	0,38
BMd12	149	58	16	8,28**	0,0*	0,80	0,20
BPV-GAAT0010	139	47	37	48,62**	0,0*	0,73	0,27
PVBR93	56	111	56	0,00 ^{ns}	99,78 ^{ns}	0,50	0,50
BM175	85	82	56	14,15**	0,001*	0,57	0,44
PVBR107	93	78	52	16,98**	0,0*	0,59	0,41
PVM03	99	78	46	14,91**	0,0*	0,62	0,38
SSR-IAC159	79	78	66	19,81**	0,002*	0,53	0,47
SSR-IAC158	55	116	52	0,37 ^{ns}	80,09 ^{ns}	0,51	0,49
BM141	35	41	147	57,60**	0,0*	0,25	0,75
PVESTBR_17	35	95	93	1,66 ^{ns}	0,0*	0,37	0,63
BM201	85	85	53	10,95**	0,002*	0,57	0,43
PV67	120	70	33	15,02**	0,0*	0,70	0,30
AJ416401A	63	82	78	15,22**	0,015*	0,47	0,53
PV-gaat001	61	92	70	6,72**	2,30 ^{ns}	0,48	0,52
PV131	20	107	96	1,64 ^{ns}	0,0*	0,33	0,67
BM143	27	126	70	6,73**	0,004*	0,40	0,60
PVATA145 TC527	54	112	57	0,00 ^{ns}	95,83 ^{ns}	0,49	0,51
PVM02 TC116	37	53	133	38,69**	0,0*	0,28	0,72
PVESTBR175	82	92	49	5,46*	0,025*	0,57	0,43
PVESTBR42	85	77	61	20,25**	0,0*	0,55	0,45
SSR-IAC141	53	109	61	0,10 ^{ns}	70,96 ^{ns}	0,48	0,52
SSR-IAC148	75	123	25	5,82*	0,0*	0,61	0,39
SSR-IAC150	51	123	49	2,38 ^{ns}	30,00 ^{ns}	0,50	0,50
SSR-IAC181	56	73	94	23,66**	0,0*	0,41	0,59

“Tabela 4, continua”

Primer	Distorção de segregação					Frequência alélica	
	Frequência Genotípica					f(A ¹)	f(A ²)
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	χ^2	FDR (%)		
BM140	41	121	61	1,97 ^{ns}	7,40 ^{ns}	0,46	0,54
PVESTBR273	39	86	98	6,49*	0,0*	0,37	0,63
ATA7	76	104	43	0,48 ^{ns}	0,46*	0,57	0,43
ATA145	40	116	67	0,70 ^{ns}	3,17 ^{ns}	0,44	0,56
ATA108	20	138	65	18,78**	0,0*	0,40	0,60
ATA138	60	104	59	1,01 ^{ns}	60,11 ^{ns}	0,50	0,50
ATA10	22	72	129	5,79*	0,0*	0,26	0,74
ATA6	136	50	37	43,47**	0,0*	0,72	0,28
ATA289	20	46	157	25,38**	0,0*	0,19	0,81
ATA248	55	127	41	4,59*	4,81 ^{ns}	0,53	0,47
PV25	79	60	84	47,52**	0,0*	0,49	0,51
ATA16	76	95	52	4,25*	0,66 ^{ns}	0,55	0,45
ATA9	90	64	69	39,50**	0,0*	0,55	0,45
ATA150	48	66	109	28,93**	0,0*	0,36	0,64

A¹A¹ homozigoto semelhante ao genitor M20; A¹A² heterozigoto com alelos do genitor M20 e Ex Rico 23; A²A² homozigoto semelhante ao genitor Ex Rico 23. χ^2 das frequências genotípicas, onde *,** significativo a 5% e 1% e ^{ns}= não significativo; Critério FDR, em que: *Valor abaixo do nível crítico especificado a 1%, para segregação esperada de 1:2:1; ^{ns}= não significativo (marcadores que não apresentaram distorções)

Distorções de segregação têm sido descritas para a grande maioria dos mapas genéticos publicados. Em plantas, a distorção na razão de segregação de marcadores pode ser atribuída a uma série de causas genéticas e fisiológicas como seleção pré ou pós-zigótica de combinações alélicas podendo ser manifestada pela transmissão diferencial de alelos tanto de linhagens germinativas macho, como de fêmea (GRANT, 1975; LAVERY; JAMES, 1987; YANAGIHARA et al., 1995), incluindo competição de tubo polínico (MANGELSDORF; JONES, 1926; LEVIN; BERUDE, 1972; LIEDL; ANDERSON, 1993), fertilização preferencial (SCHWEMMLE, 1968; GADISH; ZAMIR, 1986) e eliminação seletiva de zigotos (GADISH; ZAMIR,

1986; ZAMIR; TADMOR, 1986), além de erros de genotipagem que podem causar desvios das proporções esperadas.

No presente estudo, não foi possível identificar qual a possível causa da distorção de segregação. O que foi possível constatar é que na maioria dos casos a classe genotípica dos heterozigotos esteve presente em menor número (Tabela 4). Segundo Xu et al. (1997) a presença de classes de genótipos homozigóticos ou heterozigóticos em excesso é forte indicação de distorção de segregação por meio de fatores gametofíticos.

Mohan et al. (1997) e Collard et al. (2005) recomendam a utilização de um grande número de plantas dentro da população (de 50 a 250 indivíduos) e de indivíduos contrastantes, utilizados como genitores na formação dessas populações, para características de interesse, além de possuírem uma distância genética suficiente para a identificação de marcadores polimórficos.

Vale salientar que a população utilizada nesse trabalho é derivada de 223 plantas F_2 , um tamanho mais do que suficiente para evitar a distorção de segregação por acaso. Além do mais, os genitores são bastante contrastantes já que a linhagem M20 é adaptada e a linhagem Ex Rico 23 não é adaptada as condições do estado de Minas Gerais.

As frequências alélicas observadas na população estão também descritas na Tabela 4. Como a população é derivada de dois genitores, cada genitor contribui com a mesma frequência alélica. Assim, na ausência de seleção, migração e mutação espera-se que a frequência de cada alelo do marcador seja 0,5. Para sete locos houve maior proporção de alelos do genitor M20 enquanto que para oito locos houve maior proporção de alelos do genitor Ex Rico 23. Para os demais locos (25) as frequências alélicas praticamente não se alteraram.

Essa alteração nas frequências alélicas, que alteram as proporções gaméticas, pode ser a causa da distorção de segregação em alguns dos marcadores analisados. Este tipo de distorção ocorre antes da fertilização e pode

alterar as proporções genótípicas pela restrição das combinações realizáveis das proporções genótípicas (VOGL; XU, 2000). Estas alterações nas frequências alélicas podem ter sido devidas a seleção natural em campo e não alterações nas proporções mendelianas.

Também segundo Xu (2008), se os marcadores apresentam distorção de segregação eles podem estar associados a genes para viabilidade onde ocorre seleção gamética ou zigótica. Isso pode ser observado no *primer* BMd12 onde ocorre uma grande proporção de alelos do genitor M20 (Tabela 4) que é mais adaptado as condições do Sul de Minas Gerais.

Alguns *primers*, como por exemplo, o *primer* BM141 apresentou maior proporção de alelos do genitor Ex Rico 23, indicando que esse genitor apesar de não adaptado, possui regiões genômicas que foram mantidas pela seleção natural na região.

Os locos onde os genótipos não sofreram desvio de segregação foram: PVBR93, SSR-IAC158, PV-gaat001, PVATA145 TC527, SSR-IAC141, SSR-IAC150, BM140, ATA145, ATA138, ATA248 e ATA16.

3.3 Construção do mapa molecular

Os dados genotípicos foram submetidos ao programa QQMOL para confirmação de ligação, ordenamento e posicionamento dos marcadores, permitindo posteriormente determinar mais precisamente o posicionamento de possíveis QTLs. As posições dos marcadores foram calculadas usando a função de mapeamento de Kosambi. Os 40 marcadores polimórficos com e sem distorção de segregação foram utilizados para o estabelecimento dos grupos de ligação, usando um LOD score mínimo de 3 e uma função de recombinação máxima de 40. Os marcadores microssatélites foram mapeados em 5 grupos de ligação (Figura 2). No entanto, 10 marcadores não puderam ser mapeados com

os parâmetros de mapeamento adotados e certamente grandes partes do genoma não foram cobertas por esse mapa. Um comprimento total de 550,65 cM foi obtido e os grupos variaram de 28,17 cM (com 3 marcadores) a 188,59 cM (com 9 marcadores).

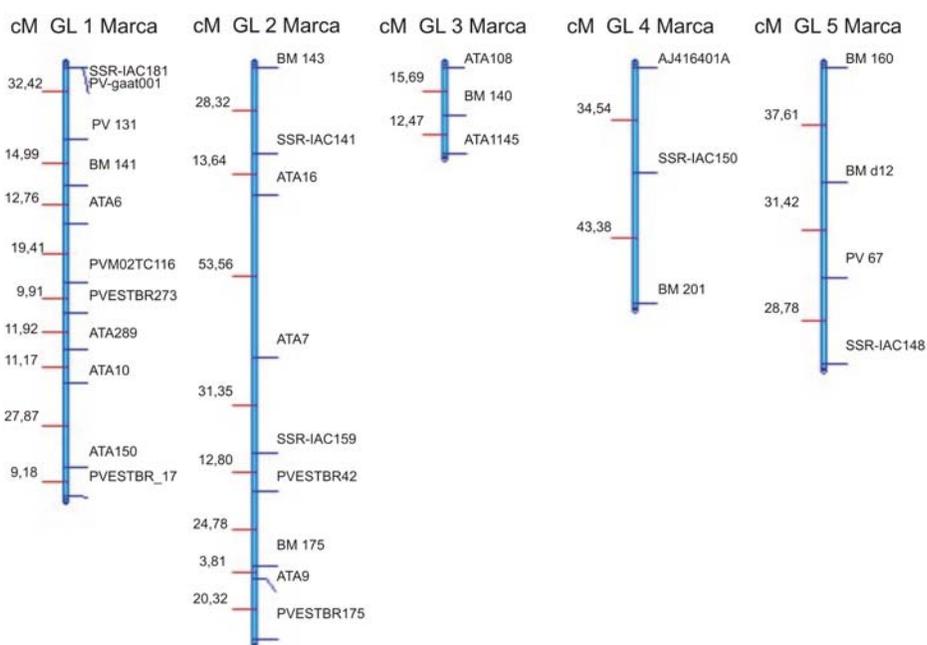


Figura 2 Mapa de ligação para a população M20 x Ex Rico 23. Marcadores SSR são mostrados ao lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado ao lado esquerdo em cM de acordo com a função de Kosambi

As posições dos marcadores foram checadas conferindo-se o posicionamento em seus mapas de origem em relação a outras marcas presentes nesses mapas, no entanto, a maior parte dos marcadores polimórficos utilizados nesse estudo não tem ainda sua localização conhecida não sendo possível, desta forma, sua comparação com outros mapas.

Apesar disto, o grupo de ligação 2 que reúne o maior número de marcadores que explicam a maior parte da variação fenotípica parece ser a junção de dois grupos de ligação, B2 e B5, do mapa integrado de Freyre et al. (1998), pois os marcadores BM143, ATA7 e ATA16 e os marcadores BM175 e PVESTBR175 que estão localizados no grupo de ligação 2 deste estudo pertencem respectivamente aos grupos de ligação B2 e B5, do mapa integrado de Freyre et al. (1998). A ligação detectada desses dois grupos de marcadores pode ser devida aos desvios de segregação observados, especialmente o do loco BM143 e dos dois locos do grupo B5.

Os outros grupos de ligação não puderam ser associados a nenhum grupo de ligação específico do mapa consenso de feijoeiro (FREYRE et al., 1998). Isso se deve, sobretudo, a baixa saturação do mapa do presente estudo devido à utilização de poucos marcadores polimórficos que podem influenciar tendenciosamente as taxas de recombinação, mudando o posicionamento dos locos.

O comprimento total obtido com base nessa população (550,65 cM) é consideravelmente menor que a encontrada em outros mapas genéticos já construídos devido ao número reduzido de marcadores. Vallejos, Sakiyama e Chase (1992), Nodari et al. (1993) e Miklas et al. (1998) construíram mapas de feijoeiro comum com comprimento total de 960, 827 e 924 cM, respectivamente. No entanto, é maior do que o encontrado por Faleiro et al. (2003) que mapearam 43 locos e cobriram uma distância total de 247,8 cM.

O mapa genético do presente estudo também é menor do que o valor de 1226 cM estabelecido por Freyre et al. (1998) para o mapa integrado do feijoeiro. As diferenças observadas das distâncias entre locos em relação ao mapa integrado de Freyre e outras populações-referências mapeadas eram esperadas também, dada a diversidade das populações mapeadas.

No grupo de ligação 1, o espaçamento médio entre os marcadores foi de 15,82 cM, sendo o maior intervalo de 27,87 cM e o menor de 8,52 cM, com cobertura estimada de 158,59 cM. Este grupo de ligação possui o maior número de marcadores mapeados 11 no total. Já no grupo de ligação 2, o espaçamento médio entre os marcadores foi de 23,57 cM, sendo o maior intervalo de 53,56 cM e o menor de 3,81 cM, com cobertura estimada de 188,59 cM. Também é o grupo de ligação que possui o maior número de marcadores que explicam a maior porcentagem de variação fenotípica para resistência de feijoeiro ao mofo branco identificados no item 3.2.3. O menor espaçamento foi observado entre os marcadores BM 175 e ATA 9 (3,81 cM) que obtiveram R^2 alto de 16,71% e 15,11% respectivamente, pela análise de regressão linear simples. No grupo de ligação 3, o espaçamento médio entre os marcadores foi de 14,09 cM, sendo o maior intervalo de 15,7 cM e o menor de 12,47 cM, com cobertura estimada de 28,17 cM. Este grupo de ligação junto com o grupo de ligação 4 foram os que apresentaram menor número de marcadores, apenas três. Este possui espaçamento médio entre os marcadores de 38,97 cM, sendo o maior intervalo de 43,38 cM e o menor de 34,55 cM, com cobertura estimada de 77,93 cM. No grupo de ligação 5, o espaçamento médio entre os marcadores foi de 32,59 cM, sendo o maior intervalo de 37,55 cM e o menor de 28,79 cM, com cobertura estimada de 97,77 cM.

A baixa saturação do mapa não permitiu a redução do intervalo médio entre os marcadores e permitiu que houvesse lacunas de até 53,56 cM entre os marcadores. Desta forma, a adição de novos marcadores moleculares nas regiões que apresentaram grandes distâncias no mapa genético aumentará o poder do mapeamento de QTL nestas regiões, tanto aumentando o número de QTLs mapeados, quanto aumentando os valores de R^2 .

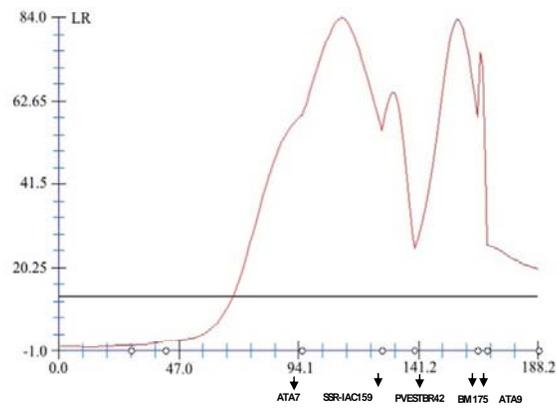
3.4 Localização de QTLs nos grupos de ligação

O valor mínimo de LR para considerar válidos os QTLs associados à resistência ao mofo branco foi estimado em 27,72 e LOD score de 4,0 pela média de três repetições de 1000 permutações. Não foram identificados valores de LR e LOD iguais ou superiores aos valores críticos especificados na análise de mapeamento por intervalo composto nos grupos de ligação 1, 3, 4 e 5 indicando, portanto, a inexistência de QTLs (Figura 3).

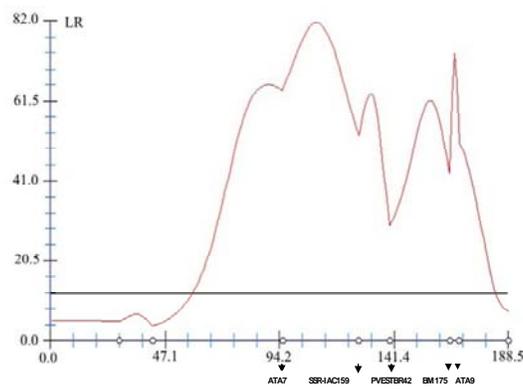
No entanto, QTLs foram significativamente identificados no grupo de ligação 2 (Tabela 5 e Figura 3). Para apresentação gráfica dos QTLs mapeados e seus níveis de significância, foram agrupadas a característica com QTL mapeados em um mesmo grupo de ligação e considerando valores de LR.

Os QTLs identificados no grupo 2 foram consistentemente identificados como quatro picos e apresentaram valores de LOD significativos (Figura 3).

A



B



C

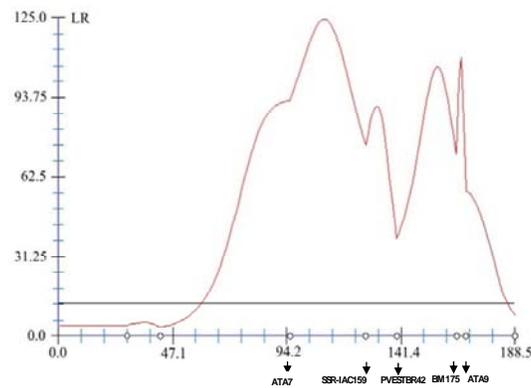


Figura 3 Mapeamento por intervalo composto de QTLs para resistência ao mofo branco em feijoeiro, pelo método de mapeamento por intervalo composto nas populações $F_{2:3}$ (A), $F_{2:4}$ (B) e conjunta (C), respectivamente, para o grupo de ligação 2 (distâncias em cM). A linha cortando as Figuras representa o valor limite de LR para significância a 1%. Os círculos indicam as posições dos marcadores posicionados no cromossomo

A inclusão de co-fatores não excluiu nenhum dos quatro QTLs sendo os melhores resultados obtidos quando foram incluídos como co-fatores no modelo de regressão o marcadores BM143 e PVESTBR175 que são co-fatores ligados, mas sem associação com QTLs. Com estes co-fatores foram obtidos valores de LR relativamente alto (Tabela 5).

Tabela 5 QTLs detectados para a característica resistência ao mofo branco em feijoeiro, pelo método de mapeamento por intervalo composto no grupo de ligação 2

Safra	QTL	Intervalo ^a	Dist. ^b	R ²	LOD ^c	a ^d	d ^e	gmd ^f
F _{2:3}	WM2.1	ATA7/SSR-IAC159	27,80	27,64	18,16	-0,35	-0,54	1,55
	WM2.2	SSR-IAC159/PVESTBR42	12,52	22,84	14,08	-0,34	-0,24	0,70
	WM2.3	PVESTBR42/BM175	22,93	27,67	18,15	-0,37	-0,45	1,24
	WM2.4	BM175/ATA9	3,80	25,54	16,31	-0,31	-0,37	1,24
F _{2:4}	WM2.1	ATA7/SSR-IAC159	27,80	26,76	17,72	-0,46	-0,57	1,25
	WM2.2	SSR-IAC159/PVESTBR42	12,52	22,42	13,77	-0,48	-0,05	0,11
	WM2.3	PVESTBR42/BM175	22,93	22,11	13,41	-0,44	-0,39	0,89
	WM2.4	BM175/ATA9	3,80	25,01	15,99	-0,42	-0,40	0,96
Conj.	WM2.1	ATA7/SSR-IAC159	27,80	35,91	27,04	-0,41	-0,57	1,39
	WM2.2	SSR-IAC159/PVESTBR42	12,52	32,61	22,88	-0,43	-0,52	1,21
	WM2.3	PVESTBR42/BM175	22,93	32,73	23,02	-0,40	-0,43	1,06
	WM2.4	BM175/ATA9	3,80	33,18	23,73	-0,26	-0,26	0,97

^aMarcadores adjacentes ao QTL; ^bDistancia entre os dois marcadores adjacentes ao QTL; ^cLR máximo observado; ^dLOD score máximo observado; ^{e,f}Efeitos aditivo (a) e de dominância (d); ^gAção gênica, calculada por d/a e interpretada, de acordo com Edwards et al. (1987), como d/a < 0,55, ação aditiva (a) ou de dominância parcial; 0,55 < d/a < 1,25, dominante (d) e d/a > 1,25, ação sobredominante (SD)

Entretanto, sabe-se que se deve ter cautela em assumir que a ligação: marcador – QTL irá permanecer entre diferentes *backgrounds* genéticos, tipos de população ou ambientes (FRANCIA et al., 2005; COLLARD et al., 2005). Além do mais, a saturação de marcadores nessa região é necessária para a confirmação da existência desses QTLs.

Mapeamento por intervalo composto é, atualmente, um dos métodos mais precisos e com maior poder de detecção de QTLs. O presente trabalho mostrou que a resistência do feijoeiro ao mofo branco possui herança quantitativa. Vários trabalhos têm mostrado que um grande número de locos controla essa característica em diferentes espécies (KOLKMAN; KELLY 1999, 2002, 2003; MIKLAS et al., 2001; PARK et al., 2001; MARIN et al., 2005; ANTONIO et al., 2009; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010).

Esses QTLs serão identificados baseados nas recentes regras de nomenclatura para QTLs (MIKLAS; PORCH, 2010) como WM2.1, WM2.2, WM2.3 E WM2.4 onde a sigla WM é derivada do inglês *white mold* (mofo branco), assim, WM2.1 é o primeiro QTL para resistência ao mofo branco localizado no grupo de ligação 2 (Tabela 5). Esses QTLs foram coincidentes nas duas safras e também na conjunta e obtiveram R² relativamente elevado.

Um QTL de resistência ao mofo branco foi identificado no grupo de ligação B7 por Miklas et al. (2001). O loco *Phs* para proteína em sementes de feijão Andino, localizado no grupo de ligação B7, foi associado à resistência ao mofo branco explicando 36% da variação fenotípica para resistência fisiológica numa população derivada da linhagem G122 de origem Andina determinada pelo *Straw test*. Este mesmo QTL não se expressou em trabalhos realizados no Sul de Minas Gerais (CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010) o que justificaria a necessidade de se identificar novos QTLs que se expressam nas condições de cultivo da região. É importante lembrar que no presente estudo esse QTL não está presente, porque foram utilizados somente genitores mesoamericanos.

Bernardo (2002) relatou que 72% dos QTLs mapeados em diversos estudos para caracteres quantitativos, como produção de grãos, explicaram menos de 10% da variação fenotípica.

Apesar de algumas diferenças com relação às populações e efeitos do ambiente, em alguns trabalhos com QTLs, o grupo de ligação B5 foi identificado como um importante grupo de ligação para a resistência a diversas doenças (KELLY et al., 2003; MUTLU; MIKLAS; COYNEZ, 2006). Além de outros fatores de resistência previamente mapeados como o gene lipoxigenase - Lox-1, necessário ao desenvolvimento de plantas de feijão sob estresse hídrico (PORTA et al., 1999).

Um QTL de efeito maior para incidência da doença no grupo de ligação B2 foi localizado perto de vários genes importantes na resposta de defesa da planta contra doenças (KELLY et al., 2003). Sugerindo que a resistência fisiológica a estas doenças está associada a uma resposta de defesa generalizada do hospedeiro (SCHNEIDER; GRAFTON; KELLY, 2001; KELLY; VALLEJO, 2005). Em feijoeiro, diversos genes de resposta de defesa a doenças estão co-localizados com QTLs de resistência, sugerindo uma relação funcional entre o QTL e os genes de defesa. O QTL identificado por Kolkman e Kelly (2003) foi localizado próximo a regiões do genoma associadas à arquitetura da planta e a genes de resposta de defesa geral, como *PvPR-2* que é relacionado a patogênese em *P. vulgaris* onde aciona um complexo de mecanismos que é desencadeado pelo ataque de patógenos (WALTER et al., 1990), uma proteína inibidora de poligalacturonase a *Pgip* (TOUBART et al., 1992; DE LORENZO et al., 2002) e ao alelo *ChS* da enzima chalcona sintetase (RYDER et al., 1987; MOHR et al., 1998). Nota-se que os dois grupos de ligação, 2 e 5, onde foram identificados vários QTLs ou genes para resistência à doença do feijoeiro, corresponde ao grupo de ligação 2, identificado do presente estudo, onde também foram identificados os QTLs para resistência ao mofo branco.

Os efeitos fenotípicos, aditivos e/ou dominantes, desses quatro QTLs foram estimados pela análise de variância através do método de mapeamento por intervalo composto (Tabela 5). O efeito aditivo refere-se ao efeito da substituição dos alelos do genitor M 20 pelos alelos do genitor Ex Rico 23. Os efeitos aditivos negativos para os QTLs relacionados à característica indicam que os alelos provenientes da linhagem parental Ex Rico 23 influenciam essa característica, diminuindo a doença.

Os efeitos de dominância negativos observados indicaram que os indivíduos heterozigotos obtiveram uma menor média para essas características do que a média dos homozigotos e contribuem para maior resistência. Além disso, um QTL apresentou um possível efeito de heterose (WM2.1). Esta sobredominância, pode ser uma pseudo-dominância causada pelo conjunto de QTLs dominantes muito ligados, consequência do alto desequilíbrio de ligação (STUBER et al., 1992).

Com relação ao efeito do ambiente, as associações QTL-característica detectadas nas duas safras indicam que o efeito ambiental foi insignificante na detecção e nas estimativas dos efeitos dos QTLs indicando que estes QTLs foram estáveis. Em geral as características quantitativas apresentam muitos QTLs segregando, cada um com pequenos efeitos individuais (BERNARDO, 2002). O resultado é que os efeitos das regiões individuais não são facilmente identificados e múltiplas regiões genômicas devem ser manipuladas ao mesmo tempo para se ter um impacto significativo. Por esta razão, réplicas dos experimentos em campo são necessárias para caracterizar acuradamente os efeitos dos QTLs e para avaliar sua estabilidade nos diferentes ambientes. Desta forma, marcadores mais estáveis podem ser localizados e utilizados na Seleção Assistida por Marcadores.

3.5 Identificação de QTLs por meio de regressão linear simples e múltipla

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos para os marcadores foram relativamente baixos nas duas populações (Tabela 6), variando de 2,04% para o marcador ATA10 a 20,81% para o marcador ATA7.

Tabela 6 Resumo das análises de regressão linear simples, considerando apenas os marcadores significativos separadamente, para resistência do feijoeiro ao mofo branco, grupos de ligação e estimativa dos coeficientes de determinação (R^2) e de determinação ajustado ($R^2_{aj.}$), em cada safra e na conjunta

Safra	Marcador	GL	Pr>F	R^2 (%)	$R^2_{aj.}$ (%)
F _{2:3}	BM175	B5	0,0001	16,71	16,34
	SSR-IAC159	Desc.	0,0001	14,26	13,87
	BM201	B7	0,0105	2,90	2,47
	PVESTBR175	B5	0,0060	3,33	2,90
	PVESTBR42	Desc.	0,0013	4,57	4,14
	ATA7	B2	0,0001	20,36	20,00
	ATA9	B9	0,0001	9,27	8,87
F _{2:4}	PVBR93	B5	0,0199	2,40	1,97
	BM175	B5	0,0001	12,61	12,22
	SSR-IAC159	Desc.	0,0001	11,20	10,80
	PVESTBR175	B5	0,0064	3,28	2,85
	PVESTBR273	Desc.	0,0098	2,95	2,52
	ATA7	B2	0,0001	20,81	20,46
	ATA6	B11	0,0038	3,69	3,26
Conjunta	ATA9	B9	0,0001	14,46	14,08
	PVBR93	B5	0,0120	2,79	2,36
	BM175	B5	0,0001	18,16	17,80
	SSR-IAC159	Desc.	0,0001	15,92	15,55
	BM201	B7	0,0274	2,16	1,72
	PVESTBR175	B5	0,0021	4,17	3,74
	PVESTBR42	Desc.	0,0041	3,64	3,20
	PVESTBR273	Desc.	0,0270	2,17	1,73
	ATA7	B2	0,0001	26,00	25,67
ATA6	B11	0,0313	2,06	1,62	
ATA9	B9	0,0001	15,11	14,72	

Na $F_{2,3}$ os marcadores que mais explicaram a característica foram BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9 com R^2 de 16,71%, 14,26%, 20,36% e 9,27%, respectivamente. Na $F_{2,4}$ os marcadores que mais explicaram foram BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9 com R^2 de 12,61%, 11,20%, 20,81% e 14,46%. Com relação a análise conjunta, os marcadores mais explicativos foram BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9 com R^2 18,16%, 15,92%, 26,00% e 15,11%, respectivamente. Portanto, os marcadores mais explicativos se mantiveram constantes nas duas avaliações o que comprova sua estabilidade já que como houve interação genótipos x safras poderia ocorrer a situação de um marcador não se expressar da mesma forma nas duas safras. Nota-se que alguns QTLs importantes concentram-se nos grupos de ligação 2, 5 e 9, além de outros de efeito equivalente ocorrem em grupos ainda não identificados.

Quando os marcadores foram avaliados utilizando a regressão múltipla de *Backward* (Tabela 7), pôde-se observar que alguns locos selecionados pela regressão linear simples também foram selecionados pelo método de *Backward*, outros marcadores que haviam sido selecionados pela regressão linear simples não foram selecionados pelo método de *Backward*, isso ocorreu porque este método elimina os marcadores considerados redundantes (DRAPPER; SMITH, 1998).

Tabela 7 Resumo das análises de regressão linear múltipla com seleção de modelo pelo método “backward” para resistência do feijoeiro ao mofo branco e estimativas dos coeficientes de determinação (R^2) e determinação ajustado ($R^2_{aj.}$), em cada safra e na conjunta

Safras	Marcador	F	Pr>F	R^2 (%)	Raj. ² (%)
$F_{2,3}$	BM175 + SSR-IAC159 + BM201 + ATA7 + PV25	23,44	0,0001	34,86	33,37
$F_{2,4}$	PVBR93 + SSR-IAC159 + ATA7 + ATA6 + ATA248 + ATA9	20,28	0,0001	35,82	34,06
Conj.	PVBR93 + BM175 + SSR- IAC159 + BM201 + ATA7 + ATA9	27,37	0,0001	42,96	41,15

Além disso, houve acréscimo de marcadores não identificados na regressão linear simples, pois, na regressão linear múltipla com a eliminação dos redundantes, novos marcadores, quando avaliados em grupo se mostraram explicativos. Desta forma, os marcadores que mais explicaram a variação para resistência ao mofo branco em $F_{2:3}$ foram BM175, SSR-IAC159, BM201, ATA7 e PV25 com R^2 de 34,86%. Na $F_{2:4}$ o R^2 foi de 35,82% para os marcadores PVBR93, SSR-IAC159, ATA7, ATA6, ATA248 e ATA9. Na conjunta, PVBR93, BM175, SSR-IAC159, BM201, ATA7 e ATA9 que explicam uma parcela considerável da variação fenotípica observada de 42,96%.

Alguns marcadores ligados a QTLs de resistência ao mofo branco têm sido identificados na literatura para utilização na seleção assistida por marcadores. Um QTL de efeito maior foi identificado por Kolkman e Kelly (2003) próximo aos marcadores (RAPD) BC20.₁₈₀₀ e O15.₁₈₀₀ localizados no grupo de ligação B2 com R^2 de 11,6% e 12,3%, respectivamente para resistência fisiológica ao mofo branco em uma população derivada da linhagem Ex Rico 23. Neste mesmo trabalho, dois outros marcadores aggtt85 e acctt130 (AFLP) contribuíram com 16,8% e 15,8%, respectivamente, da variação fenotípica para incidência de doença. Ender e Kelly (2005) identificaram QTLs para resistência ao mofo branco nos grupos de ligação 2, 5, 7 e 8 próximo aos marcadores O_{15.1800} e O_{12.1600} (RAPD) e aos marcadores EactMcat85, EaacMctt223 e EagaMctg190 (AFLP), no campo com R^2 de 9%, 10%, 11%, 15% e 9% respectivamente em campo em uma população de Ex Rico 23 e a linhagem Raven.

Como os QTLs identificados na literatura foram identificados por outros marcadores, não dá para relacioná-los aos identificados no presente estudo. Isto só seria possível com um estudo de sintenia genômica. Desta forma, se apenas algumas regiões genômicas são potencialmente envolvidas com a característica, então mais estudos devem ajudar a elucidar com certeza a contribuição de cada

uma dessas regiões para a resposta a doença. Considerando a interação QTLs por ambientes, a avaliação na região e nas condições praticadas na cultura, os tornam mais promissores para auxiliarem na seleção.

Como os marcadores podem auxiliar na seleção, todos os identificados, com base nos diferentes procedimentos de análise, devem ser usados na seleção assistida. O emprego desses marcadores deve ser feito na fase inicial de avaliação da população segregante para auxiliar na seleção das progênies que reunirem o maior número de QTLs promissores.

Os QTLs identificados pelo mapeamento por intervalo composto (tabela 5) também estão localizados entre os marcadores identificados pela regressão linear simples e regressão múltipla *backward* que obtiveram R^2 relativamente elevado explicando uma parcela da variação fenotípica observada (Tabela 6 e 7). Dos marcadores significativos em todas as avaliações se conhece a localização de nove marcadores, destes apenas três, os marcadores ATA7, BM175 e ATA9 que estão nos grupos de ligação B2, B5 e B9, respectivamente, se mostraram constantes em todas as avaliações e apresentaram R^2 relativamente elevado tanto nas análises de regressão linear simples e múltipla.

Um dos objetivos do presente estudo foi identificar QTLs associados à resistência ao mofo branco que pudessem ser utilizados na seleção indireta para essa característica. Desta forma, a partir dos marcadores estáveis identificados neste estudo, existe a possibilidade de utilização de uma combinação de marcadores associados à resistência ao mofo branco como, por exemplo, BM175 e ATA7 que explicam 18,16% e 26,00%, respectivamente, da variação fenotípica na análise conjunta do presente estudo, com marcadores utilizados por outros autores para Ex Rico 23 como BC20.₁₈₀₀ e O15.₁₈₀₀ com R^2 de 11,6% e 12,3% (KOLKMAN; KELLY, 2003). Também há a possibilidade de combinar a resistência proveniente de diferentes QTLs de genótipos diferentes em um único

genótipo podendo desta forma exibir níveis mais elevados de resistência do que os genótipos individuais sozinhos.

A interação QTLs por ambientes pode ser verificada nas análises de regressão individuais (Tabela 6) quando se verificou que cerca de 55% dos QTLs foram estáveis. Na análise de regressão múltipla apenas 35% dos QTLs foram estáveis (Tabela 7). Em todas as safras os marcadores que mais explicaram a variação fenotípica se mantiveram constantes quando considerados separadamente. Na análise de regressão múltipla alguns marcadores não se repetiram nas duas safras devido ao fato de que quando os marcadores estão em locos próximos à análise de *backward* elimina aqueles considerados redundantes. Nesse estudo, quatro marcadores explicaram a maior parte da variação e foram constantes em todas as safras, dessa forma, pode se concluir que a resistência ao mofo branco é incompleta.

4 CONCLUSÕES

Vários marcadores foram identificados como potenciais para seleção indireta, visando à resistência ao mofo branco, com destaque para o BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9, que foram estáveis apesar da significativa interação progênies por ambientes.

Quatro QTLs estáveis, WM2.1, WM2.2, WM2.3 e WM2.4, foram mapeados e estão localizados entre os marcadores que obtiveram R^2 relativamente elevado. Foi confirmada a herança quantitativa da resistência do feijoeiro ao mofo, controlada, pelo menos, pelos quatro QTLs identificados.

REFERÊNCIAS

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.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, Tucson, v. 9, n. 3, p. 208-218, Sept. 1991.

BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE - BIC. **Genetics**: bean SSR primers. Michigan, 2007. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic>>. Acesso em: 10 jun. 2009.

BENJAMIN, Y.; HOCHEBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerfull approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, n. 2, p. 289-300, May 1995.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma Press, 2002. 368 p.

BLAIR, M. W. et al. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 1, p. 91-103, June 2008.

BLAIR, M. W.; IRIARTE, G; BEEBE, S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1149-1163, Oct. 2006.

CARDOSO, J. M. K. et al. Estimativa da diversidade genética entre cultivares do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 85., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2008. p. 831-834.

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 P_{hs}* marker for resistance to white mold in common bean. **Electronic Journal of Biotechnology**, Santiago, v. 12, n. 6, p. 9, Jan. 2010.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Baltimore, v. 138, n. 4, p. 963-971, Dec. 1994.

COLLARD, B. C. Y. et al. Introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, n. 3, p. 169-196, Apr. 2005.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.

DE LORENZO, G. et al. Structure-function and molecular studies on fungal polygalacturonase and their inhibitors PGIPs. In: LEONG, S. A. et al. (Ed.). **Biology of plant microbe interactions**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. v. 3, p. 46-51.

DICKSON, M. H. et al. Selection for resistance in *Phaseolus vulgaris* L. to white mold disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 2, p. 231-234, Mar. 1982.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. ed. New York: John Wiley, 1998. 736 p.

ENDER, M.; KELLY, J. D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 6, p. 2482-2490, Nov. 2005.

FALEIRO, F. G. et al. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 59-66, jan./fev. 2003.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, jul./dez. 2008.

_____. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação**. 1995. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

FRANCIA, E. et al. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Palo Alto, v. 82, n. 1, p. 317-342, Sept. 2005.

FREYRE, R. et al. Towards an integrated linkage map of common bean e development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 847-856, Oct. 1998.

FULLER, P. A.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R. Inheritance of resistance to white mold disease in a diallel cross of dry beans. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 4, p. 929-933, Sept./Oct. 1984.

GADISH, I.; ZAMIR, D. Differential zygotic abortion in an interspecific *Lycopersicum* cross. **Genome**, Montreal, v. 28, n. 1, p. 156-159, Feb. 1986.

GRANT, V. **Genetics of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1975. 514 p.

HUNTER, J. E. et al. Evaluation of plant introductions of *Phaseolus* spp. for resistance to white mold. **Plant Disease**, Palo Alto, v. 66, n. 3, p. 320-322, Apr. 1982.

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 Resistance**, v. 82, n. 2/3, p. 135-154, Apr. 2003.

KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. QTL analysis of multigenic disease resistance in plant breeding. In: TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. New York: Springer, 2005. p. 21-48.

KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 1, p. 192-194, Jan./Feb. 1985.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 539-548, Mar. 2003.

_____. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 693-699, May 2002.

_____. 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. 2000.

_____. Inheritance of resistance to white mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 42, n. 42, p. 47-48, Mar. 1999.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annual of Eugenetics**, London, v. 12, n. 3 p. 172-175, Mar. 1944.

LAVERY, P.; JAMES, S. H. Complex hybridity in *Isotoma petraea* VI. Distorted segregation gametic lethal systems and population divergence. **Heredity**, Sheffield, v. 58, n. 3, p. 401-408, Jun. 1987.

LEVIN, D. A.; BERUBE, D. E. Phlox and Colias: the efficiency of a pollination system. **Evolution**, New York, v. 26, n. 2, p. 242-250, Feb. 1972.

LIEDL, B.; ANDERSON, N. O. Reproductive barriers: identification, uses and circumvention. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 11, n. 1, p.11-154, Jan. 1993.

MANGELSDORF, P. C.; JONES, D. F. The expression of Mendelian factors in the gametophyte of maize. **Genetics**, Baltimore, v. 11, n. 5, p. 423-455, Sept. 1926.

MARIN, A. L. A. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul./ago. 2005.

MIKLAS, P. N. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 50, n. 50, p. 1-2, Mar. 2007.

MIKLAS, P. N. et al. Inheritance of ICA Bunsu-Derived Resistance to White Mold in a Navy x Pinto Bean Cross. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1584-1588, Sept. 2004.

_____. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309-315, Mar. 2001.

MIKLAS, P. N. et al. A RAPD map of disease resistance traits in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 41, n. 41, p. 93-94, Mar. 1998.

_____. Use of pathogen filtrates to differentiate physiological resistance of dry bean to white mold disease. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 2, p. 310-312, Mar./Apr. 1992.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; RILEY, R. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 4, p. 564-570, July 2003.

MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F. Inheritance of partial resistance to white mold in inbred populations of dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 4, p. 943-948, July/Aug. 1992.

MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; NELSON, B. D. Screening for partial physiological resistance to white mold in dry bean using excised stems. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 2, p. 321-327, Mar. 1992.

MIKLAS, P. N.; PORCH, T. Guidelines for common bean QTL nomenclature. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 53, n. 53, p. 202-204, Mar. 2010.

MIKLAS, P. N.; SINGH, S. P. Common bean. In: KOLE, C. (Ed.). **Genome mapping and molecular breeding in plants**. Berlin: Springer, 2007. p. 1-31.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 87-103, Apr. 1997.

MOHR, U. et al. Plant defense genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mos seae*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 138, n. 3, p. 589-598, Mar. 1998.

MUTLU, N.; MIKLAS, P. M.; COYNE, D. P. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 127-135, Feb. 2006.

NODARI, R. O. et al. Towards an integrated linkage map of common bean development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 513-520, Dec. 1993.

PARK, S. O. et al. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1253-1262, July 2001.

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

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.

PORTA, H. et al. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 850-858, Aug. 1999.

ROBERTS, M. E.; DICKSON, M. H.; HUNTER, J. E. Heritability of white mold resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 25, n. 25, p. 104, Mar. 1982.

RYDER, T. B. et al. Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 210, n. 2, p. 219-233, Dec. 1987.

SCHNEIDER, K. A.; GRAFTON, K. F.; KELLY, J. D. QTL analysis of resistance to Fusarium root rot in bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 535-542, Mar. 2001.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.

SCHWEMMLE, J. Selective fertilization in *Oenothera*. In: CASPARI, E. W. (Ed.). **Advances in genetics**. Hardbound: Academic Press, 1968. p. 225-324.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Mar. 1974.

SINGH, S. P. White mold. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 51, n. 51, p. 6, Mar. 2008.

_____. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 25, n. 25, p. 92-95, Mar. 1982.

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.

STUBER, C. W. et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Baltimore, v.132, n. 3, p. 823-839, Nov. 1992.

TALBOT, D. R. et al. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 198, n. 1, p. 42-49, Dec. 1984.

TEIXEIRA, F. F. et al. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 272-278, Sept. 2005.

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, Mar. 2006.

TORGA, P. P. et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grão e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, jan. 2010.

TOUBART, P. et al. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. **The Plant Journal**, Malden, v. 2, n. 3, p. 367-373, May 1992

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.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 65-69, Jan. 1982.

VALLEJOS, C. E.; SAKIYAMA, N. S.; CHASE, C. D. A molecular marker based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 3, p. 733-740, July 1992.

VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, Baltimore, v. 155, n. 3, p. 1439-1447, July 2000.

WALTER, M. H. et al. Bean-pathogenesis-related proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR, proteins including pollen allergens. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 222, n. 2/3, p. 353-360, July 1990.

XU, S. QTL Mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, Baltimore, v. 180, n. 4, p. 2201-2208, Dec. 2008.

XU, Y. et al. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, double haploids, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 253, n. 5, p. 535-545, May 1997.

YANAGIHARA, S. et al. Molecular analysis of the inheritance of the S-5 locus, conferring wide compatibility in Indica/Japonica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 2, p. 182-188, July 1995.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, Montreal, v. 42, n. 1, p. 27-34, Feb. 1999.

ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. **Botanical Gazette**, New York, v. 147, n. 3, p. 355-358, Mar. 1986.

ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 90, n. 23, p. 10972-10976, Dec. 1993.

CAPÍTULO 3

Mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa do feijoeiro a *S. sclerotiorum*

RESUMO

O objetivo do trabalho foi investigar a reação de quatro genótipos de feijoeiro a *Sclerotinia sclerotiorum* em casa de vegetação, e avaliar a atividade das enzimas de defesa peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PPO), quitinases (CHI), β -1,3-glucanases (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL) e dos teores de fenóis solúveis totais e de lignina nesses genótipos. Foram avaliados os genótipos Ex Rico 23, G122, CNFC9506 e M20 em dois experimentos. No primeiro experimento avaliou-se a reação desses genótipos a *S. sclerotiorum* e no segundo avaliou-se a atividade das enzimas de defesa, quantificação de fenóis solúveis totais e lignina em plantas inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum*. A inoculação foi realizada pelo método *Straw test* aos 28 dias após a emergência das plantas. Os genótipos G122, CNFC9506 e Ex Rico 23 apresentaram maior resistência ao mofo branco ($P < 0,01$), diferindo do genótipo suscetível M20. Maior atividade de POX e PAL foram observadas nos genótipos Ex Rico 23 e G122 em relação ao genótipo suscetível M20. Maior atividade de PPO e CHI foi observada nos genótipos Ex Rico 23 e CNFC9506. Nos genótipos CNFC9506, Ex Rico 23 e G122 foram observadas maior atividade de GLU e maiores teores de lignina. Não se observaram diferenças nos teores de fenóis solúveis totais nos quatro genótipos avaliados, com ou sem inoculação com *S. sclerotiorum*. Este estudo demonstrou que houve aumento da atividade das enzimas de defesa POX, PPO, CHI, GLU, PAL, e lignina nos genótipos com resistência parcial (Ex Rico 23 e G122) e, em geral, a inoculação com *S. sclerotiorum* induz o aumento da atividade dessas enzimas e dos teores de lignina. Desta forma, estas enzimas podem ser utilizadas para ajudar na seleção de genótipos de feijoeiro resistentes ao mofo branco.

Palavras-chave: Proteínas Relacionadas à Patogênese. Compostos fenólicos. *Phaseolus vulgaris*. Mofo branco. Resistência.

ABSTRACT

The objective this study was to investigate the reaction of four common bean genotypes to *S. sclerotiorum* in greenhouse, and to determine the changes in the activity of defense enzymes peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), chitinase (CHI), β -1, 3-glucanase (GLU), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and in the concentrations of total soluble phenolics and lignin in those genotypes. The genotypes Ex Rico 23, G122, CNFC9506 and M20 were evaluated in two experiments. In the first experiment, it was evaluated the reaction of these genotypes to *S. sclerotiorum* and in the second experiment it was evaluated the activity of defense enzymes, and quantification of total soluble phenolics and lignin in plants inoculated and not inoculated with *S. sclerotiorum*. The inoculation was carried out by the Straw test 28 days after plant emergence. The G122, CNFC9506 and Ex Rico 23 Genotypes showed greater resistance to white mold ($P < 0.01$), differing from the susceptible genotype M20. Increased activity of POX and PAL was observed in genotypes Ex Rico 23 and G122 in relation to the susceptible genotype M20. Increased activity of PPO and CHI was observed in Ex Rico 23 genotypes and CNFC9506. The genotypes CNFC9506, Ex Rico 23 and G122 presented increased activity of GLU and higher levels of lignin. No difference was observed in total soluble phenolic content in the four genotypes, with or without inoculation with *S. sclerotiorum*. This study demonstrated that increased activity of defense enzymes POX, PPO, CHI, GLU, PAL, and lignin in genotypes with partial resistance (Ex Rico 23 and G122) and, in general, the inoculation with *S. sclerotiorum* induced increased activity of these enzymes and lignin. Thus, these enzymes can be used for helping screening common bean genotypes resistant to white mold.

Keywords: Pathogenesis-related proteins. Phenolic compounds. *Phaseolus vulgaris*. White mold. Resistance.

1 INTRODUÇÃO

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma importante causa de perdas na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O controle dessa doença é dificultado, pois o patógeno sobrevive no solo por vários anos na forma de escleródios e possui uma ampla gama de hospedeiros, mais de 400 espécies incluindo plantas cultivadas e daninhas (BOLAND; HALL, 1994). Práticas culturais, como a rotação de culturas com gramíneas e controle da irrigação, aplicação de fungicidas, controle biológico e plantio de cultivares resistentes podem reduzir severidade da doença (DUNCAN, 2003).

A patogenicidade de *S. sclerotiorum* está relacionada também com a produção de ácido oxálico pelo patógeno, pois este composto causa a redução do pH nos tecidos do hospedeiro, inibindo enzimas responsáveis pelo mecanismo de defesa e aumentando a atividade das enzimas do patógeno responsáveis pela degradação da parede celular da planta (LUMSDEN, 1979). Esse patógeno produz várias substâncias degradativas, enzimas líticas, tais como endo e exopectinases, celulasas, hemicelulasas, proteases, pectinases, glicosidases e xilanasas que pode facilitar a colonização do hospedeiro através desses diferentes mecanismos de degradação da parede celular, além de cutinases que degradam a cutina um polímero cuticular das plantas (ANNIS; GOODWIN, 1997).

Em contrapartida plantas resistentes podem produzir diversos mecanismos de resposta de defesa. A resistência de plantas ao ataque de patógenos pode ser entendida como a capacidade que elas desenvolveram de impedir, restringir ou retardar a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais. Para se defenderem de doenças, as plantas estão equipadas com as defesas pré-formadas ou constitutivas, que são

aquelas naturalmente presentes na planta, funcionando como barreiras físicas e químicas. As defesas pós-formadas ou induzidas, ausentes ou de pouca expressividade em plantas saudáveis, são aquelas que se tornam evidentes somente após a invasão do patógeno ou quando a planta é injuriada (PASCOLATI; LEITE, 1995). Nestes casos, além da resposta hipersensitiva, que se caracteriza pelo rápido e localizado colapso do tecido vegetal em volta do local da infecção, há a formação de tiloses, papilas, halos, lignificação, fitoalexinas, o aumento na concentração ou síntese de várias proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), dentre as quais algumas enzimas como as β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Tais eventos e reações podem determinar o sucesso da resistência da planta contra o ataque do fitopatógeno, evitando, assim, o estabelecimento da doença (STINTZI et al., 1993).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo investigar a reação de quatro genótipos de feijoeiro a *S. sclerotiorum*, e avaliar a atividade das proteínas de defesa, peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis solúveis totais e de lignina que podem determinar resistência nesses genótipos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizados quatro genótipos de feijoeiro: Ex Rico 23, G122, M20 e CNFC9506. A linhagem Ex Rico 23 (também conhecida como ICA Bunsi) do grupo gênico mesoamericano é uma conhecida fonte de resistência fisiológica ao mofo branco, tem hábito de crescimento indeterminado (tipo II) (SINGH, 1982), arbustivo, e porte ereto, que também contribui para a redução da doença. Também possui resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger.) (TU; BEVERSDORF, 1982). No entanto, apresenta grãos pequenos e brancos que não tem valor comercial (YU; PARK; POYSA, 1999).

A linhagem G122 possui hábito de crescimento determinado (tipo I) (SINGH, 1982), porte ereto, tem origem Andina, sementes grandes, tipo rajada de fundo bege e rajas vinho. A linhagem G122 tem exibido resistência de campo ao mofo branco (STEADMAN et al., 1999). Essa resistência de campo provavelmente resulta da resistência fisiológica (MIKLAS et al., 2001). Além da resistência ao mofo branco, a linhagem G122, coletada na Índia como PI 163120, é também conhecida como 'Jatu Rong', exibe tolerância ao calor (com temperaturas máximas de 35°C e mínimas de 17°C em condições de campo) (SHONNARD; GEPTS, 1994). Infelizmente essa linhagem possui várias características agrônômicas desfavoráveis, além de não ser adaptado às condições de cultivo do Estado de Minas Gerais.

A linhagem M20 possui grãos tipo carioca, com hábito de crescimento tipo II, resistência a todas as raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, que ocorrem no Brasil, porque é portadora da pirâmide *Co-4²*, *Co-5* e *Co-7*, além de possuir também resistência a mancha angular

(*Pseudocercospora griseola*) proveniente da fonte Andina Jalo EEP 558 e alta produtividade, porém, é altamente suscetível ao mofo branco.

A linhagem CNFC9506 é resistente a antracnose e ao crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), tem porte ereto e hábito de crescimento determinado (tipo I), grãos tipo carioca e alta produtividade. Sendo desconhecida sua resistência ou suscetibilidade ao mofo branco, no entanto, é altamente sensível a reação ao ácido oxálico (GONÇALVES; SANTOS, 2010).

2.2 Obtenção do inóculo e inoculação

O inóculo foi obtido de escleródios de *S. sclerotiorum* desinfestados, retirados de plantas de feijoeiro de área de pivô central em Ijací-MG. Os escleródios foram desinfestados superficialmente pela imersão consecutiva em etanol a 70 % por 1 minuto, solução de água sanitária a 20 % por 3 minutos e três vezes em água desmineralizada e esterilizada. Posteriormente foram colocados em placas de petri contendo meio de BDA (batata-dextrose-ágar), que foram incubadas em BOD a 23°C por três dias e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, a colônia foi repicada uma vez em meio BDA, para multiplicação do inóculo, e incubadas a 23°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o terceiro dia de incubação, as placas com crescimento micelial homogêneo foram utilizadas para inoculação.

Para avaliar a reação a *S. sclerotiorum*, foi utilizado o método do *Straw test* (teste do canudo), descrito por Petzoldt e Dickson (1996) e modificado por Terán et al. (2006). O método consistiu no corte do ápice caulinar, onde foi encaixada uma ponteira de micropipeta, com disco de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum*. A inoculação ocorreu quando as plantas estavam com aproximadamente 28 dias de idade.

2.3 Reação de genótipos de feijoeiro a *S. sclerotiorum*

O experimento foi realizado com o intuito de avaliar a reação do feijoeiro a *S. sclerotiorum* nos genótipos Ex Rico 23 e G122, M20 e a CNFC9506 em casa de vegetação.

Cinco sementes de feijoeiro, dos respectivos genótipos, foram semeadas em vasos plásticos de 3,5 litros, contendo terra:areia:esterco bovino (3:1:1) e cobertos com substrato Plantmax[®]. As plantas foram irrigadas por microaspersão e os tratos culturais foram semelhantes aos utilizados no cultivo convencional do feijoeiro. Após a emergência, cada vaso foi mantido com três plantas de feijão. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições e quinze plantas por parcela, portanto representada por cinco vasos.

Aos 28 dias de idade as plantas de feijoeiro foram inoculadas pelo método do *Straw test*, como descrito anteriormente. Sete dias após a inoculação procedeu-se a avaliação da reação das plantas de feijoeiro a *S. sclerotiorum* por meio da escala diagramática proposta por Singh (2008) que apresenta notas variando de 1 a 9, onde: 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 - morte da planta. Os dados médios das notas por parcela foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott a 1% de probabilidade, com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 2006).

2.4 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

O segundo experimento teve por objetivo a caracterização de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa nos genótipos de feijoeiro Ex Rico 23, G122, M20 e CNFC9506.

A obtenção das plantas de feijoeiro e a inoculação foram realizadas como descrito anteriormente. Os tratamentos constituíram dos quatro genótipos de feijoeiro, com e sem inoculação com *S. sclerotiorum*, totalizando oito tratamentos. As plantas não inoculadas sofreram o mesmo processo da inoculação, entretanto foram utilizadas ponteiras apenas com o meio BDA e sem o micélio de *S. sclerotiorum*.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições e três plantas por parcela por tempo de coleta.

O material para análise constituiu-se de todo o caule das três plantas da parcela. Os tempos de coleta das amostras caulinares, para análise das enzimas de defesa peroxidases, polifenoloxidasas, quitinasas, β -1,3-glucanases e fenilalanina amônia-liase foram realizadas às 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após a inoculação (HAI). Para a análise dos fenóis solúveis totais foram coletadas amostras às 4, 24, 72 e 168 HAI e a análise de lignina foi realizada ao final do experimento, às 168 HAI.

Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, a -80°C , até o preparo do material para as análises bioquímicas. Foram utilizados três blocos em triplicata para todas as análises bioquímicas.

2.4.1 Preparo de extratos caulinares

Os tecidos vegetais caulinares de cada tratamento em cada tempo de coleta para cada genótipo foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 1g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou o tampão acetato de sódio 50mM pH 5,2 (6mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 12.000g. por 15 minutos (0-4°C) e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática.

2.4.1.1 Proteínas totais

A concentração de proteína solúvel total foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) conforme ensaio de Bradford (1976).

2.4.1.2 Peroxidases de guaiacol e polifenoloxidasas

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7) foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático, ajustado para 2mL de solução contendo 900µL de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 500µL de guaiacol 20mM e 500µL peróxido de hidrogênio 60mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 480nm (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹.

A atividade de polifenoloxidasas (PPO; EC 1.10.3.2) foi determinada pela adição de 50µl do extrato enzimático ajustado para 3 mL de uma solução

contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e catecol a 25 mM. Após 10 min a 30°C, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (GAUILLARD; FORGET; NICOLAS, 1993). Uma atividade de PPO foi expressa pela variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹.

2.4.1.3 Quitinase

A atividade de quitinase (CHI; EC 3.2.1.14) foi determinada pela adição de 100µL do extrato enzimático ajustado para 320µL de uma solução com acetato de sódio 50mM pH 5,2 e 70µL de CM-Chitin-RBV (2mg mL⁻¹; um substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350µL por cavidade. Após incubação a 35°C, por 80 minutos, as amostras foram acidificadas com 50µL de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas (1.450g por 10 minutos), a 4°C. Uma alíquota de 200µL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 492nm, em um leitor EIA-compatível (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD_{520nm} por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹.

2.4.1.4 β-1,3-glucanase

A atividade da β-1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6) foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL⁻¹ Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β-1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação, a 35°C, de 80 minutos. As amostras foram submetidas à leitura fotométrica em filtro de 600 nm de um leitor EIA (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade GLU foi expressa

pela variação de 1 OD₆₀₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹.

2.4.1.5 Fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC: 4.3.1.5) foi medida de acordo com Mori, Sakurai e Sakuta (2002). Uma mistura de reação foi preparada adicionando 100 µL de tampão 100mM Tris-HCl (pH 8,8) e 50 µL de 40 mM de fenilalanina com 50 µL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min a 37 °C e a atividade da enzima foi paralizada com a adição de 50 µL HCl 6N. A fenilalanina foi adicionada aos controles após a incubação e adição do HCl. A mistura de ensaio foi centrifugada a 1450 g por 15 min a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante (180 µL) foi medida em 280 nm e a quantidade de ácido trans-cinâmico formado foi avaliada em comparação com uma curva padrão (0,01–0,10 mg de ácido trans-cinâmico mL⁻¹). Os valores foram expressos como unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto.

2.4.2 Preparo de tecidos caulinares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais

Os tecidos vegetais caulinares de todos os tratamentos com e sem inoculação referentes ao tempo de coleta de 168 HAI foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 16 horas.

2.4.2.1 Determinação de lignina solúvel

As amostras coletadas e liofilizadas por ocasião da última coleta, 168 horas após a inoculação, uma alíquota de 30mg foi transferida para micro tubo de 2mL, homogeneizada com 1,5mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente, para a despigmentação do tecido. A suspensão foi centrifugada, a 12.000g, por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para lavar o material, ao resíduo sólido foi adicionado 1,5mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco em estufa a 65°C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2N (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os microtubos, para hidratar o resíduo e estes foram colocados em banho-maria em fervura por 4 horas.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água destilada e novamente centrifugado, a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5M e mantido em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2mL de NaOH 0,5M.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em μg de lignina solúvel por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

2.4.2.2 Determinação de fenóis solúveis totais

Uma alíquota de 30mg das amostras liofilizadas que foram coletadas às 4, 24, 72 e 168 horas após a inoculação, foram colocadas em micro tubo de 2mL, homogeneizada com 1,5mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 horas em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos e, alíquotas de 150 μL do sobrenadante (extrato metanólico) foram misturadas a 150 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N, por 5 minutos, homogeneizadas com 150 μL de Na_2CO_3 1M, por 10 minutos e diluídas com 1 mL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorbância desta reação foram determinados, a 725nm, em espectrofotômetro e calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente μg de catecol por miligrama de massa seca (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

2.5 Análise dos dados

Os dados médios das notas por parcela foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott a 1%% de probabilidade assim como os teores de lignina e de fenóis solúveis totais, com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 2006). Para melhor visualização dos resultados das análises ao longo do tempo, plotou-se a curva de progresso da atividade das enzimas comparando-se os genótipos Ex Rico 23, G122 e CPNC9506 com a fonte de conhecida de suscetibilidade M20.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reação de genótipos de feijoeiro a *S. sclerotiorum*

As diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos (Gáfico 1) indicam que as linhagens diferem geneticamente quanto à reação do feijoeiro a *S. sclerotiorum*. Indicam também a possibilidade de sucesso com a seleção para essa característica.

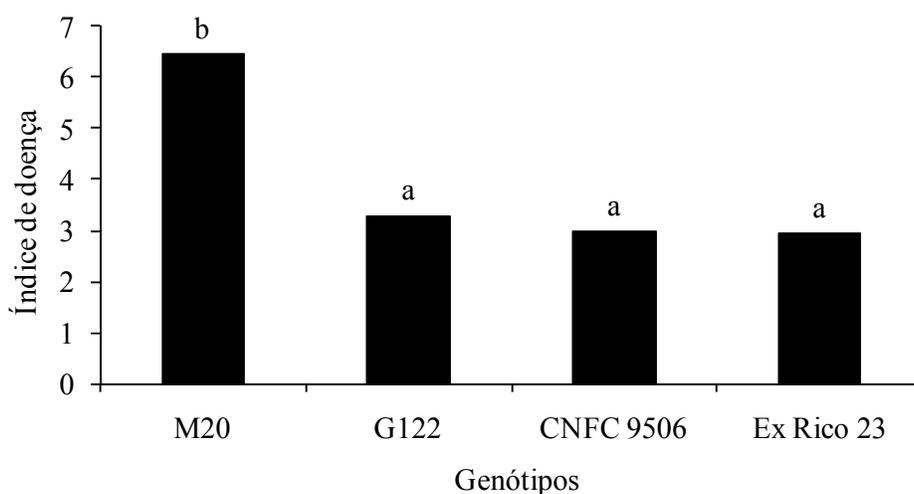


Figura 1 Valores médios das notas de reação à de *S. sclerotiorum* em quatro genótipos de feijoeiro. Médias com mesma letra não diferem pelo teste de Scott Knott ($P < 0,01$)

Observou-se uma clara separação em grupos resistente e suscetível de acordo com o teste de Scott e Knott (Figura 1). O genótipo M20 recebeu em média nota 6,43 muito próxima a nota recebida no Capítulo 2 deste trabalho e indicando sua suscetibilidade ao mofo branco. O genótipo Ex Rico 23 recebeu em média nota 2,93. A linhagem Ex Rico 23 é uma conhecida fonte de

resistência sendo utilizada em diversos trabalhos que visam passar essa resistência para populações provenientes de linhagens com características agronômicas favoráveis (STEADMAN; POWERS; HIGGINS, 1997; STEADMAN et al., 2005; MCCOY; STEADMAN, 2009). O genótipo G122 recebeu em média nota 3,27. A resistência fisiológica ao mofo branco tem sido detectada por *Straw test* com moderada herdabilidade e com correlação com resistência no campo. Como visto anteriormente no Capítulo 2, um QTL de efeito maior explicando 36% da variação fenotípica para resistência fisiológica foi detectada pelo *Straw test* na linhagem G122 indicando que esse genótipo é fonte de resistência para os melhoristas de feijoeiro. O genótipo CNFC9506 recebeu em média nota 2,97, bem próximas as fontes de resistência Ex Rico 23 e G122 podendo indicar que este genótipo possa ser uma possível fonte de resistência ao mofo branco, entretanto Gonçalves e Santos (2010) observaram que este genótipo apresentou alta suscetibilidade ao ácido oxálico. Diante disso, é necessário que outros trabalhos sejam realizados para a confirmação da reação deste genótipo a *S. sclerotiorum*.

3.2 Peroxidases e polifenoloxidasas

O genótipo Ex Rico 23, tanto para plantas inoculadas como para não inoculadas, apresentou maior atividade das peroxidases (Figura 2A). Observou-se nesse genótipo inoculado com *S. sclerotiorum* aumento da atividade dessa enzima, variando de 34 a 82% no decorrer dos tempos de coleta, em relação ao genótipo suscetível M20 também inoculado. O genótipo G122 seguido de inoculação apresentou atividade de peroxidases também superior ao genótipo suscetível M20 inoculado, com pico de atividade 24 horas após inoculação, 46% maior do que o M20 inoculado. Nas plantas G122 sem inoculação observou-se maior atividade dessa enzima a partir das 12 HAI em relação ao M20 também

sem inoculação (Figura 2B). A atividade da peroxidases no genótipo CNFC 9506 não apresentou aumento significativo em relação ao genótipo suscetível M20 (Figura 2C).

Não foi observada diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas com relação à atividade da polifenoloxidase (Gáfico 2D, E e F). O mesmo foi observado para os genótipos quando comparadas com o genótipo suscetível. Exceto pelo genótipo Ex Rico 23 que apresentou um pico de atividade 12 HAI e CNFC9506 as 72 e 168 HAI (Figura 2D e 2F).

As peroxidases em plantas participam de diversos processos fisiológicos, como adaptação a estresses bióticos e abióticos. A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta ao estresse provocado por ataque de patógenos dentre eles a formação de lignina e suberina e sob estresse abiótico a proteção celular é realizada com ajustes oxidativos (ANTEROLA; LEWIS, 2002; CAVALCANTI et al., 2004). Além disso, peroxidases, usando H_2O_2 como oxidante, catalisa monolignóis para formar radicais fenoxi que espontaneamente formam polímeros de lignina (BARCELÓ et al., 2002; PASSARDI et al., 2005). A biossíntese destes compostos secundários depende da constituição genética da planta, que determina a formação das enzimas de especialização correspondentes (CAMPOS, 2004). Por estes motivos, as peroxidases são frequentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para os estudos da resistência em plantas (RASMUSSEN; DUNFORD; WELINDER, 1995; BOUDET, 1998; PASSARDI et al., 2005).

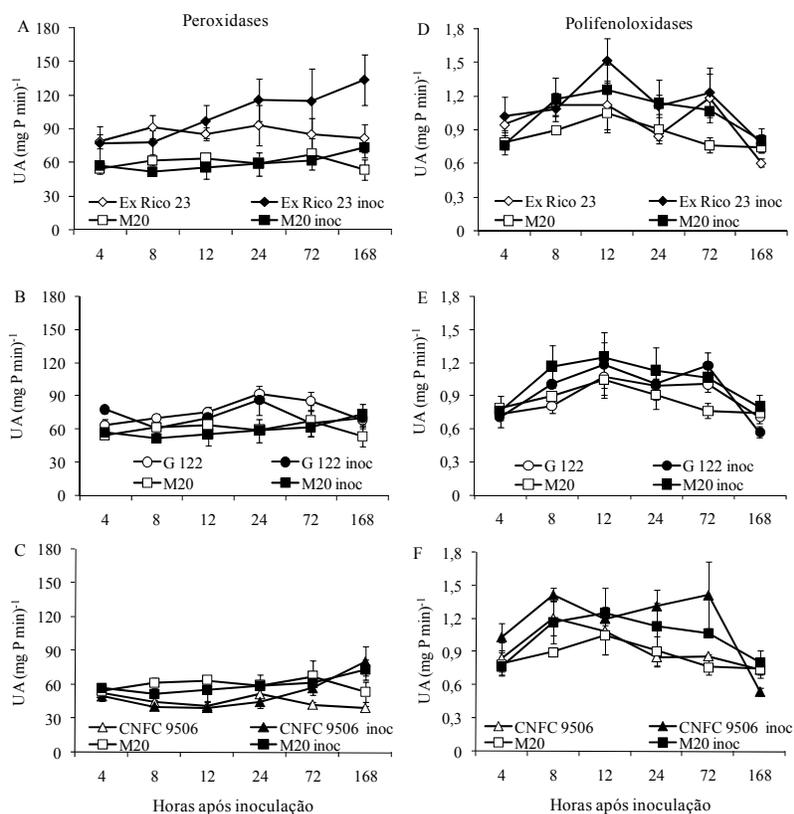


Figura 2 Atividade relativa de peroxidases de guaiacol (A, B e C) e polifenoloxidasas (D, E e F) em caule de genótipos de feijoeiro (Ex Rico 23, G122, CNFC9506) comparadas com o genótipo suscetível M20) inoculados e não inoculados com *S. sclerotiorum* (inoc) nos tempos de 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após inoculação. Barras representam erro padrão da média

Como as plantas não inoculadas sofreram um fermento, idêntico ao das plantas inoculadas, em alguns tempos de coleta observou-se uma alta atividade de peroxidases, às vezes, semelhante àquela onde há a presença do fungo em um mesmo genótipo. Marriott, Been e Perkins (1978) constataram aumentos na atividade das peroxidases, associados com fermentos em vegetais. Birecka e Garraway (1978) também observaram aumentos na atividade das peroxidases

em ferimentos ou tecidos infectados, perceptíveis 24 horas após o ferimento e continuando por muitos dias. Alguns trabalhos descrevem que o aumento na atividade de peroxidases é parte da fase geral de ativação do metabolismo, que sintetiza *de novo* esta enzima (KANAZAWA; SHICHI; URITANI, 1965; FLEURIET; DELOIRE, 1982).

A polifenoloxidase é liberada dos tilacóides após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos a quinonas, as quais são muito mais tóxicas aos microrganismos do que o próprio fenol original podendo contribuir na resistência (CARDOSO; GARRAWAY, 1977). Essa enzima também tem sido associada à lignificação das paredes celulares, sendo um fator de proteção das plantas contra outros organismos devido à reatividade de quinonas produzidas a partir de catálise de compostos fenólicos (MAYER; STAPLES, 2002).

Agrios (2005) e Orober et al. (1999) constataram que geralmente ocorre maior atividade da polifenoloxidase nos tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas saudas. Em feijoeiro, Campos et al. (2004), estudando resistência à antracnose em quatro cultivares inoculadas com o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* observaram, após três dias, grande incremento na atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase nas cultivares mais resistentes, correlacionando estas enzimas com uma resposta sistêmica da planta à infecção pelo patógeno.

A resistência local e a sistêmica têm sido associada ao aumento da peroxidases e polifenoloxidases e fenilalanina amônia-liase, resultando no reforço das paredes celulares por lignina e como depósitos de polímeros fenólicos em uma segunda camada (ANTEROLA; LEWIS, 2002).

3.3 Quitinase e β -1,3-glucanase

Em geral, observou-se maior atividade de quitinases em plantas inoculadas do que não inoculadas (Figura 3A, B e C).

As 4 HAI a atividade de quitinases estava mais alta nos genótipos CNFC9506, 60%, e Ex Rico 23 4 e 72 HAI com atividade, 37 e 6% maior que no genótipo suscetível M20 inoculado (Figura 3A e C).

Para a atividade das β -1,3-glucanases também foi observada, na maioria dos tempos de coleta, atividade superior nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas em cada genótipo de feijoeiro (Figura 3D, E e F). O genótipo CNFC9506 apresentou maior atividade desta enzima, em todas as épocas de coleta chegando, às 72 HAI, a um aumento de 72% em relação ao genótipo suscetível M20 inoculado. Também aos 72 HAI o genótipo Ex Rico 23 inoculado, apresentou pico de atividade desta enzima 131% superior ao suscetível M20 inoculado (Figura 3E e 3F). A atividade desta enzima no G122 inoculado apresentou maior atividade nas coletas às 8 e 12 HAI, com aumentos de 38 e 46% em relação ao genótipo suscetível inoculado (Figura 3 D, E e F).

A maior atividade da quitinase e da β -1,3-glucanase no genótipo CNFC9506, com relação ao genótipo suscetível, após a reação ao fungo, pode ter ocorrido em razão da rapidez de acúmulo das enzimas nessa cultivar que mostrou alta atividade às 4 HAI, sendo este acúmulo mais rápido até do que os genótipos considerados resistentes.

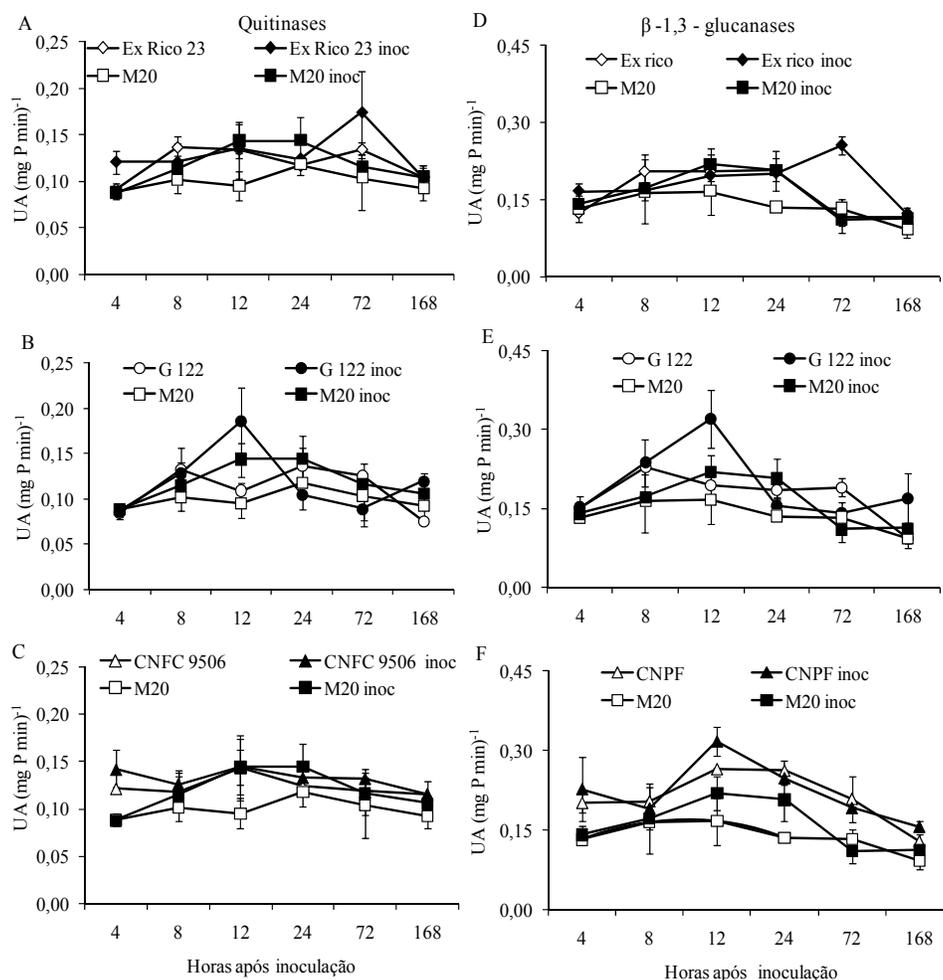


Figura 3 Atividade relativa de quitinase (A, B e C) e β -1,3-glucanase (D, E e F) em caule de genótipos de feijoeiro (Ex Rico 23, G122, CNFC9506 comparadas com o genótipo suscetível M20) inoculados e não inoculados com *S. scletorium* (inoc) nos tempos de 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após inoculação. Barras representam erro padrão da média

Este fato pode ser indicativo de sua resistência ao mofo branco, o que não aconteceu no genótipo M20, considerada suscetível. A explicação para esse fato, de acordo com Karban e Kuc (1999), é que o aumento da atividade das enzimas relacionadas à patogenicidade depende do desencadeamento rápido da

síntese “de novo”, ativada por eliciadores provenientes das reações de defesa da planta contra o fungo. Lawrence et al. (2000) também verificaram que genótipos de tomate resistentes à *Alternaria solani* apresentaram um acúmulo mais rápido de isoenzimas de quitinases e β -1,3-glucanases do que os genótipos suscetíveis.

As quitinases são membros da família de proteínas-PR, algumas das quais têm um papel importante na defesa de plantas por degradar a quitina das paredes de células fúngicas. Notáveis são as quitinases da classe I, que se acumulam a níveis elevados em vacúolos em resposta a ferimentos e infecções causadas por patógenos (MAXIMOVA et al., 2006). As β -1,3-glucanases são frequentemente associadas à resistência contra infecções fúngicas de forma isolada (LUSSO; KUC, 1996), no entanto, na maioria das vezes elas atuam em combinação com quitinases.

As quitinases e as β -1,3-glucanases apresentam ação direta contra patógenos, degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento do patógeno na planta. Neste processo, polímeros de N-acetilglucosamina e β -1,3-glucana, provenientes da parede celular de fungos ou bactérias degradadas por estas enzimas, podem funcionar como eliciadores e ativar outros mecanismos de defesa como as fitoalexinas (OKINAKA et al., 1995).

Melender et al. (2006) afirmam que quando é combinado um transgênico de glucanase com quitinase se observa que estes podem atuar sinergicamente contra a infecção fúngica. Um exemplo é a da combinação da quitinase de classe II e β -1,3-glucanase de cevada que foram expressas individualmente em fumo, o aumento da proteção à *Rhizoctonia solani* foi demonstrada para ambos os genes e este efeito foi significativamente reforçado quando os dois genes foram combinados (JACH et al., 1995).

3.4 Fenilalanina amônia-liase

A partir de 72 HAI foi observado aumento significativo da fenilalanina amônia-liase em plantas do genótipo Ex Rico 23, inoculadas, em relação às plantas do genótipo suscetível M20 também inoculadas (Figura 4). As 4 e 12 HAI observou-se um pequeno aumento na atividade desta enzima de 19 e 17%, respectivamente em relação ao genótipo M20 inoculado. E as 72 e 168HAI foram observadas maiores atividades desta enzima sendo superior ao genótipo M20 inoculado em 28 e 42%, respectivamente. Em plantas de Ex Rico 23 não inoculadas também se observou maior atividade desta enzima em relação ao genótipo M20 sem inoculação em todas as épocas de avaliação, entretanto esta atividade foi menor do que a avaliação com a presença do fungo (Figura 4A).

A atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas do genótipo resistente ao mofo branco G122 foi maior de 4 a 72 HAI em relação ao genótipo suscetível M20, com e sem inoculação com *S. sclerotiorum*. Essa atividade em plantas G122 inoculadas foram 48, 31, 56, 29 e 44% superiores a atividade em plantas do genótipo M20 inoculado, para os tempos de 4, 8, 12, 24 e 72 HAI (Figura 4B).

Para o genótipo CNFC9506, tanto para plantas inoculadas como para plantas não inoculadas, não foi observado aumento significativo da atividade da fenilalanina amônia-liase em relação ao genótipo suscetível M20 inoculado e sem inoculação, em nenhuma época de avaliação, exceto as 168 HAI (Figura 4C).

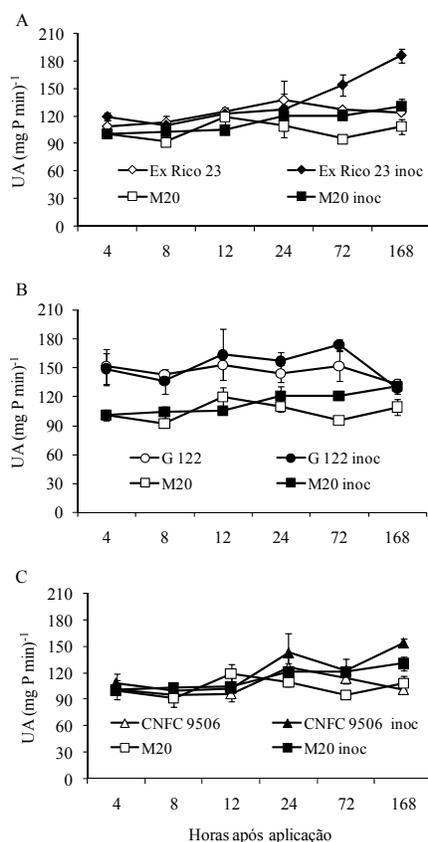


Figura 4 Atividade relativa de fenilalanina amônia-liase (A, B e C) em caule de genótipos de feijoeiro (Ex Rico 23, G122, CNFC9506 comparadas com o genótipo suscetível M20) inoculados e não inoculados com *S. sclerotiorum* (inoc) nos tempos de 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após inoculação. Barras representam erro padrão da média

Fenilalanina amônia-liase é uma enzima chave do metabolismo vegetal, catalisando a primeira reação na biossíntese de L-fenilalanina a partir de uma grande variedade de produtos naturais que possuem o esqueleto fenilpropanóide. Esta enzima pode ser estimulada por vários fatores, inclusive por infecção de patógenos, conduzindo a síntese de compostos do grupo das ligninas, compostos fenólicos ligados à parede e fitoalexinas derivadas de fenilpropanóides (SARMA; SREELAKSHMI; SHARMA, 1998). Segundo Lozovaya et al.

(2004), em estudos de resposta bioquímica em raízes de genótipos resistentes e suscetíveis de soja inoculados com *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp., o aumento da atividade fenilalanina amônia-liase precursora desses compostos de defesa, foi associada a resistência parcial dessa cultura ao patógeno. A classe mais abundante de compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. Esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (TAIZ; ZEIGER, 2004).

3.5 Fenóis solúveis totais e lignina

Para os teores de fenóis solúveis totais, não se observou diferenças significativas entre genótipos ou entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *S. sclerotiorum*, indicando que nem a lesão provocada pela inoculação sem o fungo nem a inoculação com o fungo teve qualquer efeito na deposição de compostos fenólicos nos genótipos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 Teores de fenóis solúveis totais em quatro genótipos de feijoeiro inoculados e não inoculados com *S. sclerotiorum*

Tratamentos	Fenóis solúveis totais - $\mu\text{g (mg MS)}^{-1}$			
	Horas após inoculação			
	4	24	72	168
Ex Rico	1,17 a	1,21 a	1,13 a	1,50 a
Ex Rico 23 inoc	1,26 a	1,12 a	1,17 a	1,93 a
G122	1,16 a	1,32 a	1,10 a	1,15 a
G122 inoc	1,23 a	1,19 a	1,13 a	1,43 a
CNFC9506	1,31 a	1,26 a	1,26 a	1,35 a
CNFC9506 inoc	1,28 a	1,35 a	1,28 a	1,41 a
M20	1,25 a	1,07 a	1,09 a	1,15 a
M20 inoc	1,20 a	1,07 a	1,06 a	1,14 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$); $\mu\text{g (mg MS)}^{-1}$ = equivalente a micrograma de catecol por miligrama de massa seca; inoc: inoculação com *S. sclerotiorum*

Com relação aos teores de lignina, os genótipos Ex Rico 23 que é a fonte de resistência fisiológica e o genótipo CNFC9506 proporcionaram maiores teores de lignina em relação aos demais tratamentos (Figura 5). O genótipo G122 também apresentou teor de lignina superior ao genótipo suscetível M20. Não foi observado efeito significativo da inoculação para os teores lignina nos genótipos avaliados.

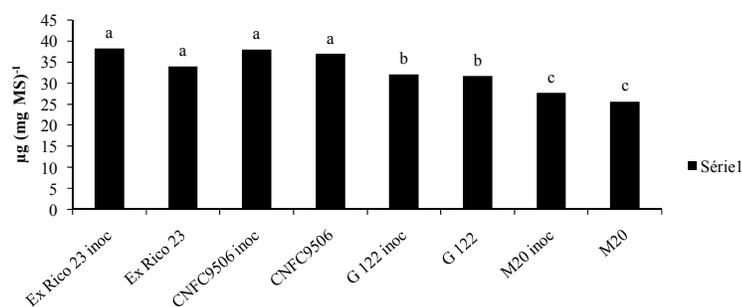


Figura 5 Teores de lignina solúvel em ácido tioglicólico - ($\mu\text{g mg MS}^{-1}$) (micrograma de lignina por miligrama de massa seca) em quatro genótipos de feijoeiro inoculados e não inoculados com *S. sclerotiorum* (inoc) às 168 horas após inoculação. Médias com mesma letra não diferem pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$)

Segundo Macheix, Fleuriet e Quessada (1986) há uma distinção entre cultivares e estádios de desenvolvimento das plantas no acúmulo de compostos fenólicos e a resposta aos ferimentos. A ativação do metabolismo de fenóis após uma infecção, segundo esses autores, pode levar mais ou menos tempo, dependendo da formação de moléculas mais simples e de sua integração com estruturas químicas mais complexas, semelhantes a ligninas. Este fenômeno, de acordo com Bell (1981), pode ser interpretado como parte da indução de resistência de uma planta.

Em leguminosas, a lignina é confinada no xilema vascular e nos tecidos traqueais e fornece rigidez e resistência sendo, portanto, uma barreira eficaz à penetração mecânica de fungos e restringe a difusão de enzimas e toxinas do fungo para o hospedeiro e de água e nutrientes do hospedeiro para o fungo (RIDE, 1983). Com poucas interações genótipos x ambientes relatadas, o teor de lignina é considerada a característica mensurável da parede celular mais estável entre ambientes (BUXTON; CASLER, 1993; FONSECA et al., 1999; CASLER, 2001).

A relação entre lignificação e resistência às doenças tem sido demonstrada em uma série de experimentos. Plantas resistentes acumulam lignina mais rapidamente e/ou exibem maior deposição de lignina, em comparação com plantas suscetíveis (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; WALTER, 1992). Além disso, o uso de inibidores químicos específicos de lignificação levou à inibição da reação de hipersensibilidade em plantas de trigo infectadas por *Puccinia graminis* Pers. f.sp. *secalis* Eriks & Henn (agente causal da ferrugem) fazendo com que as plantas resistentes se tornassem suscetíveis ao ataque do patógeno (MOERSCHBACHER et al., 1988).

Segundo Wilson (1994) e Casler (2001) a produção de cultivares de feijoeiro com altos teores de lignina pode aumentar a resistência a pragas e patógenos além de aumentar o desempenho agrônomico pelo fortalecimento da haste. A lignina também reduz o progresso de fungos, proporcionando uma barreira à penetração mecânica, alterando os componentes da parede celular para produzir um substrato incompatível para as enzimas fúngicas (RIDE, 1983). Além disso, *S. sclerotiorum* produz numerosas enzimas que degradam os componentes da parede celular de plantas (LUMSDEN, 1969; LUMSDEN, 1979; HEGEDUS; RIMMER, 2005).

Deve-se salientar que os quatro genótipos, embora bem caracterizados quanto a diferenças na susceptibilidade ao mofo branco, são uma pequena

amostra do feijoeiro cultivado e podem não representa pool genético do feijoeiro. Desta forma, uma ampla avaliação do germoplasma de feijoeiro para correlação da concentração de lignina em caule e reação a *S. sclerotiorum* é necessário antes do conceito de que maior concentração de lignina na haste pode ser uma forma preditiva de resistência parcial ao mofo branco.

Apesar disso, segundo Silva et al. (2010) a possibilidade de seleção de genótipos resistentes, por meio de descritores bioquímicos, abre perspectiva para auxiliar nos processos de seleção em programas de melhoramento de plantas já que em trabalhos convencionais de melhoramento de plantas, geralmente, todo procedimento é baseado em descritores fenotípicos, obtidos por meio de inoculação de plantas com o patógeno. Apresentando ainda a vantagem de redução de custo e de tempo na identificação de acessos resistentes.

4 CONCLUSÕES

Os genótipos G122, CNFC 9506 e Ex Rico 23 apresentaram maior resistência ao mofo branco, diferindo do genótipo suscetível M20.

Este estudo demonstrou que houve aumento da atividade das enzimas de defesa POX, PPO, CHI, GLU, PAL, e lignina nos genótipos com resistência parcial (Ex Rico 23 e G122) e, em geral, a inoculação com *S. sclerotiorum* induz o aumento da atividade dessas enzimas e dos teores de lignina. Desta forma, estas enzimas podem ser utilizadas para ajudar na seleção de genótipos de feijoeiro resistentes ao mofo branco.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. 922 p.

ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall degrading enzymes in plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 103, n. 1, p. 1-14, Jan. 1997.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/ mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.

BARCELÓ, A. R. et al. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v. 40, n. 4, 325-332, Apr. 2002.

BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, Rockville, v. 32, n. 1, p. 21-81, Sept. 1981.

BIRECKA, H.; GARRAWAY, M.O. Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis*: effects of cycloheximide. **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, n. 4, p. 561-566, Apr. 1978.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, London, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.

BOUDET, A. M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v. 3, n. 2, p. 67-71, Feb. 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, Jan./Feb. 1976.

BUXTON, D. R.; CASLER, M. D. Environmental and genetic factors affecting cell wall composition and digestibility. In: JUNG, H. G. et al (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, 1993. p. 201-246.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, set. 2004.

CARDOSO, C. O. N.; GARRAWAY, M.O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Snyd & Hans. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 103-116, Jan./Mar. 1977.

CASLER, M. D. Breeding forage crops for increased nutritional value. In: SPARKS, D. L. (Ed). **Advances in agronomy**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 300-310.

CAVALCANTI, F. R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in saltstressed cowpea leaves. **New Phytologist**, Lancaster, v. 163, n. 3, 563-571, Sept. 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285p.

DOSTER, M. A; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

DUNCAN, R. **Evaluation of host tolerance, biological, chemical, and cultural control of *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower.** 2003. 168 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Manitoba, Manitoba, 2003.

FLEURIET, A. J. J.; DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrization des fruits de tomate blessés. **Journal of Phytopathology**, Palo Alto, v. 107, n. 3, p. 259-268, Mar. 1982.

FONSECA, C. E. L. et al. Associations among foragequality traits, vigor, and disease resistance in alfalfa. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1271-1276, Sept. 1999.

GAUILLARD, F.; FORGET, F. R.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, London, v. 215, n. 1, p. 59-65, Nov. 1993.

GONÇALVES, P. R. C.; SANTOS, J. B. dos. Physiological resistance of common bean cultivars and lines to White mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 53, n. 53, p. 236-237, Mar. 2010.

HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not be” a pathogen? **Microbiology Letters**, Keverling Buismanweg, v. 251, n. 1, p. 177-184, Oct. 2005.

JACH, G. et al. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, Malden, v. 8, n. 1, p. 97-109, July 1995.

KANAZAWA, Y.; SHICHI, H.; URITANI, I. Biosynthesis of peroxidases in sliced or black rot-infected sweet potato roots. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 29, n. 9, p. 840-847, Sept. 1965.

KARBAN, R.; KUC, J. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS Press, 1999. p. 1-16.

LAWRENCE, C. B. et al. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 5, p. 211-220, Nov. 2000.

LOZOVAYA, V. V. et al. Biochemical response of soybean roots to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* infection. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 819-826, May 2004.

LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-896, Aug. 1979.

_____. *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulose. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, n. 6, p. 653-657, Apr. 1969.

LUSSO, M.; KUC, J. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for b-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 4, p. 267-283, Oct. 1996.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; QUESSADA, M. P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p. 267-286.

MARRIOTT, J.; BEEN, B. O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 44, n. 1, p. 38-42, Sept. 1978.

MAXIMOVA, S. N. et al. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Coletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 4, p. 740-749, Sept. 2006.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 6, p. 551-565, Nov. 2002.

MELANDER, M. et al. Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and b-1,3-glucanase genes in a double-gene construct. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 942-952, Sept. 2006.

MCCOY, S.; STEADMAN, J. R. Use of Multi Site Screening to Identify Partial Resistance to White Mold in Common Bean in 2008. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 52, n. 52, p. 86-87, Mar. 2009.

MIKLAS, P. N. et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309-315, Mar. 2001.

MOERSCHBACHER, B. M. et al. Lignin biosynthesis enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, n. 1, p. 33-46, July 1988.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. E. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, London, v. 160, n. 2, p. 355-360, Jan. 2001.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, n. 1, p. 369-389, Sept. 1992.

OKINAKA, Y. et al. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [beta]-1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 839-845, Nov. 1995.

OROBER, M. et al. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by foliar phosphate application. In: INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN SYMPOSIUM, 12., 1999, Thuringia. **Anais...** Thuringia: IRS, 1999. p. 339-348.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-454.

PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 24, n. 5, p. 255-265, May 2005.

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.

RASMUSSEN, C. B.; DUNFORD, H. B.; WELINDER, K. G. Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol. **Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 4022-4029, Dec. 1995.

RIDE, J. P. Cell walls and other structural barriers in defence. In: CALLOW, J. A. (Ed.). **Biochemical plant pathology**. London: John Wiley. 1983. p. 215-235.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, London, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SHONNARD, G. C.; GEPTS, P. Genetics of Heat Tolerance during Reproductive Development in Common Bean. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 5, p. 1168-1175, Sept./Oct. 1994.

SILVA, F. A. C. et al. Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta à inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 114-118, mar./abr. 2010.

SINGH, S. P. White mold. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 51, n. 51, p. 6, Mar. 2008.

_____. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 25, n. 25, p. 92-95, Mar. 1982.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

STEADMAN, J. R. Bean white mold nursery in 1998. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 42, n. 42, p. 49-50, Mar. 1999.

STEADMAN, J. R. et al. Identification of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean at multiple locations in 2004. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 48, n. 48, p. 124-125, Mar. 2005.

STEADMAN, J. R.; POWERS, K.; HIGGINS, B. Screening common bean for white mold resistance using detached leaves. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 40, n. 40, p. 140-14, Mar. 1997.

STINTZI, A. et al. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, London, v. 75, n. 8, p. 687-706, Aug. 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 470 p.

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, Mar. 2006.

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.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 65-69, Jan. 1982.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Varsóvia, v. 13, n. 1, p. 43-50, Mar. 1991.

VAN LOON, L. C., VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Palo Alto, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

WALTER, M. H. Regulation of lignification in defense. In: BOLLER, T.; MEINS, F. (Ed.). **Plant gene research-genes inseollin volved in plant defense**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 327-352.

WILSON, J. R. REVIEW: Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 173-182, June 1994.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, July 1990.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus and Vigna*). **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 27-34, Feb. 1999.