

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO AO MOFO BRANCO E USO DO
RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO

2009

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

Carneiro, Flávia Fernandes.

Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e o uso do retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites / Flávia Fernandes Carneiro. – Lavras : UFLA, 2009.

85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Controle genético . 2. Melhoramento de plantas . 3.
Sclerotinia sclerotiorum. 4. Seleção assistida I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.652946

FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DO FELJOEIRO AO
MOFO BRANCO E USO DO RETROCRUZAMENTO
ASSISTIDO POR MARCADORES MICROSSATÉLITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO AO
MOFO BRANCO E USO RETROCRUZAMENTO
ASSISTIDO POR MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 13 de fevereiro de 2009

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

UFLA

Prof. Dr. Luiz Antônio A. Gomes

UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Flávio e Marta e aos meus queridos irmãos, Vinícius e
Jussara

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por essa vitória.

Aos meus pais, Flávio e Marta e aos meus irmãos, Vinícius e Jussara, pelo apoio, exemplo, motivação, segurança e amor em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar o mestrado e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela valiosa orientação, paciência, confiança, disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos professores Dra. Elaine Aparecida de Souza e Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes, pela participação na banca e pelas valiosas sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular da UFLA, Rafaela, Tháís, Monik, Karla, Igor, Geysa, Paulo, Felipe, Marinei e Márcia, por toda a ajuda e amizade.

Ao Lamartine, pela disposição, competência e por tornar as atividades do laboratório mais fáceis e prazerosas.

A todos os amigos do GEN, especialmente Cristiane, Flávia Mendes e Fernando Guedes, pela prazerosa convivência, amizade, motivação, companhia, alegrias e experiências dos momentos de convivência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todos os ensinamentos e amizade, em especial ao professor Dr. Magno Antônio Patto Ramalho.

Ao meu namorado, Oswaldo Neto, pela amizade, carinho e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelo carinho e ajuda na realização deste trabalho, especialmente Elaine, Léo, Lindolfo e Dona Irondina.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 A cultura do feijão no Brasil	3
2.2 Mofo branco	4
2.3 Métodos de avaliação da resistência ao mofo branco	6
2.4 Controle genético da resistência ao mofo branco	9
2.4.1 Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos	13
2.5 Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento de plantas	15
2.5.1 Marcadores microssatélites (SSR)	18
2.5.2 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)	20
2.5.3 Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares (MAS)	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2 Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Local	37
2.2 Linhagens utilizadas	37
2.3 Obtenção das gerações F ₁ , F ₂ e das progênes F _{2:3}	37
2.4 Avaliação das progênes por meio da inoculação com micélio (<i>Straw test</i> ou teste do canudo)	38

2.5 Análise de variância e estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos.....	39
2.5.1 Obtenção de variâncias entre plantas individuais	39
2.5.2 Obtenção de variâncias entre e dentro de progênies $F_{2:3}$	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Uso de médias e variâncias de plantas individuais	49
3.2 Avaliação das progênies segregantes ($F_{2:3}$).....	56
4 CONCLUSÃO	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO 3 Retrocruzamento assistido por marcadores ssr visando resistência ao mofo branco em feijoeiro	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 Local	67
2.2 Linhagens utilizadas	67
2.3 Retrocruzamento	67
2.4 Extração de DNA	68
2.5 Processo de amplificação de DNA e eletroforese.....	69
2.6 Análise molecular	69
2.7 Análise de dados dos marcadores microssatélites e do SCAR <i>Phs</i>	70
3 Resultados e discussão.....	72
3.1 Seleção de plantas resistentes por meio do SCAR <i>Phs</i>	72
3.2 Recuperação do genoma recorrente	74
4 CONCLUSÃO	81
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

CARNEIRO, Flávia Fernandes. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e o uso do retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

A identificação de fontes de resistência de feijão ao mofo branco e o estudo da sua herança são requerimentos primordiais para o sucesso de programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares resistentes. Assim, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: 1) estudar a natureza e a magnitude dos efeitos genéticos da resistência ao mofo branco e 2) utilizar marcadores microssatélites (SSR) para acelerar o processo de recuperação do genoma do genitor recorrente, bem como selecionar as plantas de retrocruzamentos mais similares ao genitor recorrente que possuem um QTL de resistência ao mofo branco. Para se obter as estimativas de parâmetros genéticos, foram utilizados os genitores resistentes (G122) e suscetível (M20) a F_1 , a F_2 e a 120 progênies $F_{2;3}$. Essas populações foram submetidas à inoculação do micélio, utilizando-se o método do método *Straw test*. Após, aproximadamente, 28 e 38 dias da sementeira e 6 a 8 dias após a inoculação, procedeu-se a avaliação da reação ao mofo branco por meio de uma escala de diagramática de notas de 1 a 9. As avaliações foram realizadas em plantas individuais e em nível de média de progênies. Os resultados obtidos evidenciaram o predomínio de efeito aditivo na expressão do caráter e que apenas um gene de reação ao mofo branco está envolvido no controle da doença, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente. As estimativas da herdabilidade no sentido amplo obtidas indicam que a seleção é mais eficiente com base na média de progênies e inoculações múltiplas. No estudo da seleção assistida por marcadores SSR, foram obtidas 267 plantas F_1RC_1 e 113 plantas F_1RC_2 , a partir do cruzamento entre os genitores G122 (doador) e M20 (recorrente). Foi extraído o DNA de cada uma das plantas obtidas, juntamente com os dois genitores, para serem utilizados nas reações de marcadores microssatélites. Os dados de SSR foram submetidos à análise de similaridade genética (sg_{ij}) entre cada planta e o genitor recorrente, utilizando-se o coeficiente de Sorensen-Dice. Paralelamente, foi estimada a proporção de alelos do genitor recorrente (PR). Os resultados indicaram que os marcadores SSR foram eficientes para identificar indivíduos com grande proporção de recuperação do genoma recorrente nos dois ciclos iniciais de retrocruzamento, permitindo um ganho de até dois ciclos, se comparado com a recuperação esperada no

*Orientador: João Bosco dos Santos (Orientador)

retrocruzamento convencional. Tanto a similaridade genética quanto a proporção de alelos SSR são eficientes para selecionar plantas mais similares ao genitor recorrente. Dentre as 20 plantas mais similares ao genitor recorrente foi possível selecionar quatro plantas F_1RC_1 , portadoras do QTL de resistência ao mofo branco, com média de 88% de alelos SSR do genitor recorrente e duas plantas F_1RC_2 , com média de 91% de alelos SSR do genitor recorrente.

ABSTRACT

CARNEIRO, Flávia Fernandes. **Genetic control of common bean resistance to white mold and backcross assisted by microsatellite markers.** 2009. 84p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding Program)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

The identification of sources of resistance to the white mold in common bean, and the study of its inheritance is primordial for the success of breeding programs aiming at resistant cultivars. The present research had the objectives: 1) to study the nature and the magnitude of genetic effects of resistance to white mold 2) use microsatellite (SSR) markers to accelerate the genome recovery of the recurrent parent, as well as to select plants more similar to that parent with the QTL for white mold resistance. The resistant (G122) and susceptible (M20) lines were crossed and generated the F_1 , F_2 and $F_{2,3}$ progenies. The experiment was set up using two replications in a randomized complete blocks design. The parents and the three generations were inoculated using the mycelium (*Straw test*) of the pathogen. Approximately 28 and 38 days after sowing and six to eight days after the inoculation, the reaction to the white mold was evaluated in each plant using a diagrammatic scale from 1 (no symptoms) to 9 (dead plant). Data were analyzed on the individual plant level and on $F_{2,3}$ progeny mean. Results showed prevalence of additive effects in the trait expression and only one gene was estimated to be involved in disease control, although the character is highly influenced by environment. Wide sense heritability estimate indicates that selection is more efficient based on progeny mean and multiple inoculations. In the backcross (BC) study 267 F_1BC_1 plants and 113 F_1BC_2 plants were used. DNA was extracted from each plant of both backcrosses and from parents to obtain the SSR markers. Genetic similarity (sg_{ij}) between each BC plant and the recurrent parent was estimated using the Sorensen-Dice coefficient. The proportion of the SSR alleles derived from the recurrent parent (PR) was also estimated. Both, genetic similarity and the proportion of SSR alleles were efficient for identifying plants more similar to the recurrent parent, equivalent to BC_3 and BC_4 . Among the 20 plants more similar to the recurrent parent it was possible to select 4 F_1BC_1 plants with the QTL for white mold resistance and an average of 88% of PR and 2 F_1BC_2 plants with 91% of alleles from the recurrent parent.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ocorrência de doenças, de modo geral, contribui para a baixa produtividade, a instabilidade na produção e o alto risco de implantação da cultura do feijão. O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) vem recebendo lugar de destaque entre as doenças do feijoeiro, principalmente em áreas de cultivo sob pivô central, onde, geralmente, são realizados plantios sucessivos de feijão na mesma área e têm-se condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do patógeno.

O controle da doença em áreas ainda não infectadas deve ser realizado pelo emprego de semente de boa qualidade sanitária, pelo controle do tráfego de pessoas e equipamentos provenientes de áreas infectadas e pela inspeção rigorosa da lavoura na fase reprodutiva, para a erradicação imediata de qualquer foco da doença. Em solos infestados, são recomendadas medidas integradas de controle, pois, devido à rapidez de desenvolvimento da doença, em condições de ambientes favoráveis, medidas isoladas têm se mostrado ineficientes. Recomenda-se a utilização de fungicidas e de práticas culturais, tais como rotação de culturas, eliminação de resíduos culturais, redução da irrigação e uso de antagonistas no solo. A medida de controle mais eficiente é a resistência de linhagens ao fitopatógeno, estando esta restrita a alguns genótipos (Kolkman & Kelly, 2002), com potencial de uso nos programas de melhoramento, embora não apresentem possibilidades de utilização direta pelos produtores. É necessária a transferência de alelos de resistência de fontes exóticas e, muitas vezes, não adaptadas, para cultivares elites. Entretanto, devido à dificuldade de avaliação e à natureza parcial da resistência, não se tem obtido sucesso nos programas de melhoramento. No Brasil, há controvérsias sobre o nível de resistência das cultivares (Gonçalves & Santos, 2008). O melhoramento visando aumentar esse nível certamente terá impacto significativo na cadeia produtiva do feijoeiro

comum, pois permitirá o retorno ao sistema produtivo de áreas produtoras de feijão, atualmente impróprias ao seu cultivo, devido à alta incidência dessa doença, bem como contribuirá para reduzir gastos com defensivos, os quais nem sempre são eficientes.

Como as fontes mais conhecidas de resistência não são adaptadas, há a necessidade de se conhecer o controle genético da reação do feijoeiro ao mofo branco, em cruzamento com as linhagens elites. De posse dessa informação, o melhoramento poderá ser mais eficientemente planejado e há a possibilidade de identificar marcadores de DNA para auxiliarem na seleção. Isso porque a avaliação da reação do feijoeiro a patógenos do solo é complexa, além de depender de condições experimentais favoráveis para o desenvolvimento da doença.

O trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: 1) estudar a natureza e a magnitude dos efeitos genéticos da resistência ao mofo branco e 2) utilizar marcadores microssatélites (SSR) para acelerar o processo de recuperação do genoma do genitor recorrente, bem como selecionar aquelas mais similares ao genitor recorrente que possuem um QTL de resistência ao mofo branco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão no Brasil

A cultura do feijão vem sofrendo grandes transformações no seu sistema de cultivo. Na década de 1980, com o advento da irrigação, essa cultura destacou-se como uma nova opção para a safra de inverno (Aidar, 2003 & Ferreira 1996). Hoje, o feijoeiro comum é cultivado em três safras por ano, em todos os estados da Federação, em um expressivo número de estabelecimentos, sob diferentes estratos de propriedade e variados sistemas de produção (Costa & Pinheiro 2005).

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil. Seus grãos constituem uma das principais e mais acessíveis fontes de nutrientes e fibras para os brasileiros, estando presente diariamente na dieta da população urbana e rural. É rico em potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco e magnésio, minerais essenciais ao metabolismo humano. Por essa razão, o país é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa. Merece destaque o estado de Minas Gerais, responsável por cerca de 16% da produção nacional de feijão, o segundo maior do Brasil, com área plantada de, aproximadamente, 424 mil hectares (Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, 2008).

A produtividade de grãos de feijão no país, embora crescente, ainda é pequena. Há vários fatores que contribuem para a redução na produtividade. Miklas (2006) apresenta uma previsão dos principais estresses bióticos que afetam a cultura, dentre eles, a ocorrência de vírus, bactérias, fungos e de determinados tipos de pragas.

Os programas brasileiros para o melhoramento genético do feijoeiro têm dado maior ênfase à obtenção de cultivares do grupo comercial Carioca, pela grande demanda do mercado (Zimmermann & Teixeira, 1996). Essa redução da

base genética e a seleção na ausência da pressão do patógeno levam à obtenção de linhagens com menores níveis de resistência, especialmente no caso do mofo branco que é parcial.

2.2 Mofo branco

O mofo branco é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo um patógeno de importância mundial, com mais de 408 espécies de plantas hospedeiras (Boland & Hall, 1994). No Brasil, a ocorrência de *S. sclerotiorum* foi observada pela primeira vez em 1921, por Saccá, que verificou o fungo sobre *Solanum tuberosum* L., no estado de São Paulo. Nos anos seguintes, o patógeno foi verificado sobre diferentes hospedeiros em outros estados do país. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence à subdivisão Ascomycotina, classe Discomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. Não exibe interação específica “gene-a-gene” com seus hospedeiros, sendo, portanto, um patógeno de difícil controle.

As condições de clima favoráveis para seu desenvolvimento são alta umidade e temperaturas amenas, entre 15° a 20°C. Nessa situação, uma lavoura de feijão pode sofrer, em média, perdas de 30% ou mais, podendo chegar a 100% em períodos chuvosos, quando medidas preventivas não são tomadas (Oliveira, 2005; Rava, 2007). No Brasil, esta doença tem maior importância no sul e no centro-oeste, quando ocorrem baixas temperaturas, principalmente em áreas de cultivo de girassol, cujos resíduos mantêm o inóculo em alta concentração.

Na ausência de hospedeiro suscetível, o fungo pode persistir por um longo período no solo, por meio de estruturas de resistência, de coloração escura, conhecidas como escleródios. Estas estruturas têm formato irregular, de vários milímetros de diâmetro e comprimento. A princípio, apresentam coloração branca e, posteriormente, tornam-se negros e duros. Podem

sobreviver no solo por até 11 anos e são altamente resistentes a substâncias químicas, calor seco até 600 graus Celsius e congelamento (Coley-Smith & Cooke 1971).

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica ou carpogênica. Enquanto, na forma miceliogênica, há a produção de micélio hialino e septado, na forma carpogênica, o escleródio pode produzir um ou mais apotécios. O apotécio libera ascósporos continuamente por 2 a 17 dias, com média de 9 dias. A produção máxima de ascósporos ocorre num intervalo de 2 a 3 dias entre o quarto e nono dia de vida ativa do apotécio. O total de ascósporos produzidos por um apotécio atinge ao redor de dois milhões.

São vários os fatores que influenciam na germinação dos escleródios desse fungo, tais como: os nutrientes do substrato no qual o escleródio é formado, a idade dos escleródios, os fatores ambientais, como umidade, temperatura, luz, pH do solo, aeração, a profundidade na qual o escleródio se encontra no solo e o tipo de solo (Phillips, 1987). O solo não cultivado apresenta características supressivas evidenciadas por retardamento do aparecimento de estipes e formação mais lenta dos apotécios, em relação ao solo cultivado (Costa & Costa, 2006, Brandão et al., 2008).

Os esporos germinados dos escleródios são dispersos pelo vento e/ou pela água. A disseminação do fungo pode também ocorrer pelas próprias estruturas de resistência aderidas aos implementos agrícolas, em restos culturais ou em mistura com as sementes (Rava, 2007).

O fungo ataca toda a parte aérea da planta, principalmente no início da floração ou após a polinização das flores, as quais servem como fonte básica de nutrientes para iniciar as infecções por esporos (Huintert et al., 1978). O primeiro indício da presença da doença é o aspecto murcho da planta. Nos órgãos infectados são encontradas lesões encharcadas, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco de aspecto cotonoso, cobrindo os tecidos

da planta. Com o progresso da doença, as folhas e os caules infectados tornam-se marrons e permanecem eretos, mesmo com a morte da planta.

Em geral, as formas de prevenção do mofo branco são: utilizar sementes saudáveis, racionalizar o volume de água na lavoura, manter a lâmina d'água uniforme, fugir do período mais frio e promover ou incrementar microrganismos antagônicos no solo, como o *Trichoderma* (Moraes et al., 2008). O uso de fungicidas pode ser necessário quando estas medidas não são suficientes para assegurar o controle e, ainda, influencia no sucesso do controle o espaçamento entre plantas, a densidade de semeadura e o dossel da planta que deve oferecer maior aeração na lavoura (Rava, 2007).

Outro aspecto importante no manejo da doença, principalmente influenciando na eficácia dos fungicidas, é o potencial de inóculo no solo, representado pelo número de escleródios por metro quadrado e também pela capacidade do fungo em disseminar e atacar as plantas, que pode variar entre os isolados. Em solos infestados, com médio ou elevado número de escleródios, são recomendadas medidas integradas de controle, devido à rapidez de desenvolvimento da doença nas condições de ambientes favoráveis, uma vez que as medidas isoladas não têm se mostrado eficientes. Se a lavoura tiver uma camada de palhada espessa, esta vai dificultar a formação e a liberação dos apotécios e esporos do fungo (Oliveira, 2005). No Brasil, não há disponibilidade para os produtores de feijão, cultivar resistente ao mofo branco, medida que seria a mais indicada e econômica para o manejo da doença.

2.3 Métodos de avaliação da resistência ao mofo branco

Há vários métodos propostos para avaliação da resistência ao mofo branco. Alguns melhoristas preferem avaliar a doença no campo. Entretanto, as dificuldades dessa avaliação são a disponibilidade de áreas uniformemente infectadas e as condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (Lehner

et al., 2008). Além disso, quando se avaliam cultivares de porte diferente, as mais arbustivas podem escapar da doença, mesmo sendo suscetíveis (Miklas et al., 2001).

Existem diversas metodologias artificiais de avaliação por meio da inoculação do patógeno (Tolêdo-Souza & Costa, 2003) e também avaliação por método indireto, em que as cultivares/linhagens são avaliadas a partir da reação ao ácido oxálico em solução (Kolkman & Kelly, 2003). Estes autores consideram que o método indireto de avaliação da resistência fisiológica é independente de mecanismos de escapes, como a diferença de agressividade dos isolados e o porte da planta.

De todos os métodos existentes, o *straw test*, ou teste do canudo, é o método mais simples de avaliação da resistência fisiológica dentro do tecido do caule principal e eficiente para auxiliar na identificação, na caracterização e na seleção de genótipos resistentes ao mofo branco, sendo o mais utilizado nos programas de melhoramento (Terán & Singh, 2008). Apresenta a vantagem, além de outras, de ser não destrutivo, o que permite o avanço do programa de melhoramento para a obtenção de progênies resistentes.

O *straw test* foi descrito por Petzoldt & Dickson (1996). Neste teste, as plantas são inoculadas de três a cinco semanas após a semeadura. Os inóculos são crescidos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), adicionado de cloranfenicol, na proporção 1 gota do antibiótico/100ml de meio, à temperatura de $20^{\circ}\text{C}\pm 3$, permitindo um crescimento uniforme. Para seguir um ativo crescimento, é necessário multiplicar o fungo duas vezes e a inoculação deve ser realizada três dias após a segunda multiplicação. Nesse momento, a placa tem crescimento demasiado com aparência de algodão, mas não iniciou a formação de escleródios. Ponteiras eppendorf são usadas para cortar o disco de ágar da placa, de modo que o micélio fique em contato com o ápice cortado da planta. Seis a oito dias após a inoculação são realizadas as avaliações segundo a

seguinte escala descritiva da reação ao mofo branco: 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.

Em trabalho realizado por Miklas et al. (1999) foi obtida alta pontuação de doença em cultivares suscetíveis de feijão comum, como Labrador e Tenderlake, indicando que o *straw test* pode ser utilizado para detectar resistência fisiológica em coleções núcleo. Foi observada forte correlação entre os resultados do *straw test* aplicado em casa de vegetação e entre áreas naturais com infecção de mofo branco (Hall & Phillips, 1997; Hall & Phillips, 1998).

Geralmente, linhagens com conhecida resistência de campo a mofo branco têm, consistentemente, pontuações inferiores a 5, quando avaliadas com o *straw test* (Miklas et al., 1998) e são identificadas como potenciais fontes de resistência fisiológicas. Isso porque pontuação inferior a 5 representa elevados níveis de restrição de desenvolvimento de lesões (Petzoldt & Dickson, 1996).

É provável que o *straw test* mensure apenas 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 resistência a campo. O *straw test* também foi utilizado para detectar um QTL da linhagem G122 localizado no grupo de ligação B7 que exibe grande efeito, explicando de 42% a 64% da variação na reação ao mofo branco, em duas populações de feijão. O QTL do grupo de ligação B7 apresentou menor efeito no campo, 17% e 12% (Miklas, 2006).

Milkas et al. (2001) concluíram que a resistência fisiológica detectada pelo método *straw test* é um componente da resistência no campo, ou seja, tanto a resistência fisiológica quanto mecanismos de escapes das plantas contribuem

para resistência a campo, o que pode superestimar a resistência. A combinação da resistência fisiológica com mecanismos de escape da planta é uma estratégia atual de melhoramento, visando minimizar a perda da produção devido aos danos causados por esse fitopatógeno.

2.4 Controle genético da resistência ao mofo branco

Um dos objetivos mais importantes do melhoramento genético de plantas é o aumento da produtividade agrícola associada à melhoria na qualidade nutricional e na sanidade de grãos, frutos ou quaisquer partes da planta destinada ao consumo. Esses objetivos podem ser alcançados por meio de melhorias nas condições ambientais ou por melhoria no potencial genético de indivíduos ou populações.

Alterando-se as condições ambientais e tecnológicas, é possível aumentar a produtividade e promover vários outros benefícios, pois isso permite que o indivíduo, planta ou animal aproveite de forma mais vantajosa as condições ambientais favoráveis. Os mais diversos ramos de conhecimento contribuem para a melhoria no ambiente, como práticas culturais, controle de pragas e doenças, irrigação, drenagem e adubação, entre outros.

A melhoria no valor genético de plantas e animais também contribui para atingir as metas desejadas. A maioria das espécies apresenta grande diversidade genética, sendo possível selecionar e recombinar formas genéticas mais adaptadas, de melhor qualidade e mais eficientes.

Em muitas situações, o melhoramento genético é o único meio de conseguir aumentos na produtividade e qualidade e tem, em relação às técnicas de natureza ambiental, a vantagem de promover alterações hereditárias, ou seja, de ser possível transmitir as boas características obtidas pelo melhoramento, aos descendentes. Assim, em muitos casos, as vantagens agronômicas podem ser perpetuadas. Por sua vez, o melhoramento ambiental, normalmente, é de alto

custo, algumas vezes não adotado amplamente devido a problemas técnicos, pessoal e financeiro e só proporciona bons resultados se o material genético disponível for melhorado, de forma que possa expressar todo o seu potencial dentro das condições adequadas do ambiente.

Caracteres quantitativos são, em geral, controlados por vários genes e muito influenciados pelo ambiente, exibindo, dessa forma, variação contínua (às vezes descontínuas), ao passo que caracteres qualitativos são de herança monogênica (condicionados por um ou poucos genes) e têm pouca ou nenhuma influência do ambiente (Falconer & Mackay, 1996).

O conhecimento do tipo de ação gênica que predomina, na base genética de um caráter, é um ingrediente importante para uma condução eficiente de um programa de melhoramento. Quando o controle genético é complexo, envolvendo muitos locos, ou então quando a influência de fatores ambientais sobre a expressão do caráter for pronunciada, entende-se ser difícil conhecer com detalhe a natureza da ação gênica subjacente (Vencovsky & Barriga, 1992).

As conclusões que se obtêm em pesquisas sobre o tipo de ação dos genes são dependentes dos materiais genéticos estudados, numa dada espécie. É, pois, temeroso se, a partir de estudos feitos em certos cruzamentos, inferir-se a respeito do controle genético de um dado caráter para a espécie como um todo.

O mecanismo de resistência ao mofo branco está associado a caracteres morfológicos, como a arquitetura das plantas e a porosidade do dossel (Kolkman & Kelly, 2002), que afetam as condições microclimáticas e limitam o estabelecimento e o desenvolvimento do fungo (Kolkman & Kelly, 2003). Além das características morfológicas, há também a resistência parcial no feijoeiro, denominada resistência fisiológica.

A resistência fisiológica de cultivares é a maneira mais eficiente de controle do mofo branco, sendo a resistência completa inexistente no feijoeiro, embora linhagens com certos níveis de resistência parcial tenham sido

identificadas (Gonçalves & Santos, 2008). Poucas são as linhagens comerciais, desenvolvidas por melhoramento tradicional, que possuem resistência parcial ao mofo branco (Miklas, 2006). A dificuldade em se desenvolver linhagens resistentes a este fitopatógeno deve-se ao fato de a resistência parcial ser quantitativa com moderada a baixa herdabilidade e a imprecisão na avaliação (Miklas et al., 2004). Foram feitos alguns estudos quanto à natureza genética da reação ao mofo branco em feijão, como pode ser visto a seguir.

Foram identificados, de forma independente, mais de dez locos de caracteres quantitativos (QTL) que condicionam resistência ao mofo branco, confirmando a complexidade e a natureza quantitativa da reação do feijão comum ao patógeno. Miklas et al. (2001) observaram que o QTL situado no grupo de ligação B7 e localizado próximo ao loco da proteína de semente *Phs* (phaseolina), presente em uma linhagem de feijão andina G122, explicou 38% da variação fenotípica da reação ao mofo branco, quando avaliada pelo método do *straw test* e 26% quando avaliada no campo. Miklas et al. (2003) observaram que o QTL presente na linhagem NY6020-4, que confere resistência ao mofo branco situado no grupo de ligação B8, próximo ao loco que confere resistência a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Miklas, 2006), explicou 35% da variação fenotípica, quando se utilizou o método do *straw test* e 15% no campo. A resistência parcial causada por estes dois QTL, provavelmente, é condicionada pelos mecanismos de resistência fisiológica versus mecanismos de escape da planta, porque eles foram mais expressivos quando avaliados em casa de vegetação pelo método do *straw test*.

Outros QTL derivados de G122, situados no grupo de ligação B1 e de NY6020-4, situado no grupo de ligação B6, tiveram relativamente menor efeito ou não se expressaram quando avaliados pelo método *straw test* em casa de vegetação. Eles se expressaram em condições de campo, o que se deve aos mecanismos de escape da planta, como o porte ereto e o dossel aberto, o que

permite a entrada de ar e luz, mantendo o ambiente seco e desfavorecendo o desenvolvimento do fungo. Além desses, outro mecanismo de escape é o florescimento precoce, pois as flores são fontes de nutrientes para o desenvolvimento do fungo (Miklas, 2007).

Miklas et al. (2001) observaram a extrema importância de mecanismos de escape da planta para reduzir a severidade da doença em campo, pois observaram que a linhagem A55, que possui porte ereto e hábito de crescimento determinado, foi suscetível em casa de vegetação, porém, resistente no campo. Estes mesmos autores também observaram que além do QTL que confere resistência ao mofo branco, outros quatro que conferem resistência a outros tipos de doença estão localizados no mesmo grupo de ligação B7, como os QTLs que conferem resistência a ferrugem do feijoeiro, ao mosaico-dourado-do-feijão, a ferrugem-cinzenta-do-caule causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (Miklas et al., 2006) e resistência ao *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc e Magn) Scrib., agente causal da antracnose (Greffroy, 1997). Em feijão, bem como em outras espécies (Ashfield et al., 1998), os genes de reação aos patógenos ocorrem frequentemente em grupos (Miklas et al., 2001).

Antonio et al. (2008), estudando o controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco por meio indireto, pela reação ao ácido oxálico, constataram que houve predomínio do efeito aditivo e o controle genético foi caracterizado por dominância parcial ($d/a=0,47$). Os resultados obtidos revelaram também que apenas um gene de resistência está envolvido, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente. A herdabilidade no sentido amplo, no âmbito de médias de progênies (0,47), foi superior à obtida em plantas individuais (0,33), indicando que a seleção deve ser mais eficiente com base em avaliações de média de progênies.

O estudo da herança e da variação nos caracteres qualitativos se baseia na análise de gerações, separando os indivíduos em classes e avaliando suas

proporções nos resultados de certos cruzamentos. Entretanto, no estudo da herança de caracteres quantitativos, a informação com base unicamente no indivíduo tem pouco valor, devido ao efeito aleatório do ambiente. Se o efeito do ambiente pode tanto aumentar quanto diminuir a manifestação fenotípica de um caráter, a média de um conjunto de indivíduos será uma medida mais confiável, pois os efeitos do ambiente tendem a se cancelar. Assim, as características devem ser estudadas em âmbito populacional. Outra medida utilizada para definir uma população, além da média, é a variância. Logo, no estudo da herança de caracteres quantitativos, avaliam-se quais frações da média e da variância são herdáveis.

Para se ter sucesso em um programa de melhoramento, é fundamental que se possa identificar, a partir dos valores fenotípicos, os indivíduos de genótipos desejáveis e com a maior concentração de alelos favoráveis.

2.4.1 Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos

As estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos auxiliam os melhoristas no momento de tomar decisões a respeito da escolha do método de melhoramento, do modo de condução e de seleção nas populações segregantes. A obtenção dessas estimativas contribui para que o melhoramento de plantas não seja apenas uma arte, mas sim uma ciência, de modo a permitir aos melhoristas anteverem as possibilidades de sucesso no programa.

Essas estimativas podem ser obtidas utilizando-se componentes de médias e/ou variâncias (Ramalho et al., 1993). O emprego da variância é preferido, uma vez que o uso de médias pode conduzir a conclusões errôneas, pois, neste caso, o que se obtém no final é uma soma algébrica dos efeitos de cada um dos locos individualmente e, se os dominantes estiverem atuando em sentidos opostos nos vários locos, o efeito final é pequeno ou nulo. Isso não acontece quando se usa a variância, dado que os efeitos individuais de cada loco

são elevados ao quadrado, não havendo possibilidade de eles se anularem. A variância permite, ainda, que sejam estimados a herdabilidade e o ganho esperado com a seleção. Por isso, muitas vezes, ela tem sido preferida, embora seja mais difícil de estimação, ou seja, suas estimativas são mais sujeitas a erros experimentais, se comparadas com as estimativas de médias (Vencovsky & BARRIGA, 1992).

Quando se utiliza variância, estima-se, principalmente, a variância genética total, embora, em alguns casos, possa ser obtida a variância genética aditiva (σ^2_A) e de dominância (σ^2_D). É necessário enfatizar que há um número restrito de relatos de estimativas dos componentes genéticos da variância quando a frequência alélica é diferente de 0,5, como ocorre quando se utilizam retrocruzamentos. Neste caso, além da variância genética aditiva e de dominância, a variância genética total contém também a covariância entre os efeitos médios (aditivos) dos alelos e os efeitos de dominância dos homozigotos (D_1), a variância genética dos efeitos de dominância dos homozigotos (D_2) e a depressão por endogamia elevada ao quadrado (H^v) (Souza Júnior, 1989).

Na obtenção das estimativas de parâmetros genéticos são utilizados diferentes procedimentos, tais como o emprego de linhas puras (Ramalho et al., 1979; Ramalho et al., 1982; Pereira Filho et al., 1987), de famílias de populações segregantes da hibridação de dois ou mais genitores (Abreu et al., 1990; Takeda et al., 1991; Collicchio et al., 1997) e os cruzamentos dialélicos analisados por diferentes procedimentos (Otubo et al., 1996; Abreu et al., 1999; Pereira et al., 2007).

Poucos trabalhos foram realizados para identificar o controle genético da resistência ao mofo branco, especialmente em feijão. Miklas et al. (2001) observaram que a herdabilidade da resistência do feijoeiro ao mofo branco, quando estimada em casa de vegetação, pelo método do *straw test*, foi mais baixa (0,65) do que quando estimada no campo (0,78). Este fato se deve à

resistência fisiológica, detectada pelo *straw test*, ser um dos componentes da resistência no campo, ou seja, tanto a resistência fisiológica quanto os mecanismos de escape contribuem para a resistência em campo.

Em colza (*Brassica napus* L.), na China, QTLs envolvidos na resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* foram detectados numa população de 128 famílias F_{2:3}. Um total de 13 locos foi identificado e seis QTLs foram detectados. Encontrou-se que três dos seis QTLs foram associados com resistência da folha no estágio de plântula e, coletivamente, representaram 40,7% do total da variação fenotípica, cada uma correspondendo a 23,2%, 16,6% e 13,6%, respectivamente. Os outros três QTLs foram associados à resistência à doença na fase de maturação da planta, explicando 49,0% da variação fenotípica. Foi observada a presença de epistasia, sendo predominante a interação do tipo aditiva x aditiva (Zhao et al., 2004). Em girassol, observou-se que o efeito aditivo contribui significativamente para a redução da lesão aérea (Castaño, 2001). Em outro trabalho, com girassol, foram confirmadas a presença de genes quantitativos no controle do caráter e a ausência de efeitos não aditivos (Baldini et al., 2004).

2.5 Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento de plantas

As descobertas de Darwin e Mendel foram fundamentais para estabelecer as bases científicas para o melhoramento genético de plantas, no início do século XX. A integração recente dos avanços da biotecnologia, a genômica e as aplicações de marcadores moleculares, juntamente com as práticas tradicionais de melhoramento de plantas, foram fundamentais para o melhoramento molecular de plantas, uma ciência interdisciplinar que revolucionou o melhoramento vegetal, no início do século XXI (Moose & Mumm, 2008).

Marcadores de DNA foram primeiramente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 1980 (Soller & Beckmann, 1983). Eles podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição e hibridização entre sequências complementares de DNA, como no caso do “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) ou pela técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR). O grande potencial do uso de marcadores moleculares no melhoramento reside no fato de eles serem praticamente ilimitados em número. Após serem encontrados, são de fácil detecção e se comportam como “caracteres” de herança simples e previsível, não sendo afetado pelo meio ambiente (neutros).

O primeiro tipo de marcador de DNA utilizado no melhoramento de plantas foi o RFLP (Helentjaris et al., 1986). Nessa técnica, o DNA total de um indivíduo é inicialmente isolado e clivado com enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou náilon. Em seguida, fragmentos específicos podem ser detectados pela incubação da membrana com uma sonda previamente marcada (radioativamente ou a frio). Sonda é uma sequência de DNA (normalmente da própria espécie em estudo) que irá, por complementaridade entre as bases nitrogenadas, parear com um ou mais dos fragmentos contidos na membrana. Esta sonda pode ser marcada por radioisótopo ou por fluorescência. A posição na membrana em que a sonda hibridiza pode ser determinada por autorradiografia. O polimorfismo entre diferentes indivíduos decorre de variações nas sequências primárias dos sítios de restrição (SNPs) ou na mudança de suas posições, devido a inserções e/ou deleções (INDELS). As dificuldades inerentes à técnica, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas impedem que o RFLP seja extensivamente utilizado no melhoramento.

O “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) é uma técnica que utiliza a reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Ao contrário do PCR convencional, o RAPD utiliza apenas um *primer* curto (cerca de dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma. Esse marcador apresenta uma desvantagem que limita, até certo ponto, o seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para a ligação do *primer* ao molde torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores “Sequence Characterized Amplified Regions” (SCAR; Paran & Michelmore, 1993). Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois *primers* mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reprodutível. A herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas serão detectadas: presença ou ausência da banda de DNA (Williams et al., 1990).

“Amplified Fragment Length Polymorphisms” (AFLP) é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação desses fragmentos por PCR (Vos et al., 1995). Resumidamente, nessa técnica, o DNA de um indivíduo é clivado com enzimas de restrição e às suas extremidades é ligado o adaptador, os quais servem de sítios de ligação para *primers* numa reação de PCR. Apesar de ser um tipo de marcador bastante útil para a realização de “fingerprinting” de DNA, principalmente quando existem poucas informações disponíveis a respeito do genoma de interesse, o seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado, devido a dificuldades metodológicas inerentes à técnica e ao seu elevado custo, já que é patenteada.

2.5.1 Marcadores microssatélites (SSR)

Marcadores microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) têm sido preferidos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta, inclusive intragênicos (Akkaya et al., 1992). Essas sequências são constituídas de um a seis nucleotídeos, que ocorrem naturalmente no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Devido a erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA, diferentes indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições dentro de um mesmo microssatélite, os quais constituem diferentes alelos.

Para que o microssatélite seja útil como marcador, ele deve ser inicialmente clonado, sequenciado e amplificado, a partir de *primers* que o flanqueiem. Em seguida, os produtos de amplificação são separados por eletroforese e visualizados. Na maioria das vezes, a eletroforese deve ser feita em gel de poliacrilamida ou em gel de agarose de alta resolução (cerca de 3%), devido à pequena diferença de tamanho entre os fragmentos alélicos.

Marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas. Estes marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudo genéticos, principalmente devido à sua reprodutividade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Borém & Caixeta, 2006).

Os microssatélites constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje. Panaud et al. (1996) demonstraram que marcadores de microssatélite em arroz são quase duas vezes mais informativos que RFLP. Há relatos de locos microssatélites com até 26 alelos em soja (Rongwen et al., 1995). Ao analisar 67 acessos de lúpulo (*Humulus*

lupulus L.) com 25 marcadores microssatélite, Stajner et al. (2005) encontraram média de 10,6 alelos por loco, sendo obtidos, para um dos marcadores, 31 alelos.

Esse alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, além de distinguir acessos de germoplasma diretamente relacionados. Essa hipervariabilidade dos microssatélites e, conseqüentemente, a possibilidade de utilizá-los em qualquer população segregante, os torna marcadores ideais para mapeamento genético. A escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética, mas sim visando à população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores de microssatélite têm sido úteis para a integração de mapas genéticos e físicos, além de, simultaneamente, proporcionar aos melhoristas e geneticistas uma eficiente ferramenta para conectar variações fenotípicas e genotípicas. Entretanto, pelo fato de o feijão ter um genoma pequeno, os microssatélites não têm identificados polimorfismo suficiente para o mapeamento dos marcadores, quando se utilizam os genitores selecionados, tipicamente empregados nos programas de melhoramento (Pereira et al., 2007; Cardoso et al., 2008)

A grande limitação dos microssatélites é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de “*primers* universais” (Borém & Caixeta, 2006). Além disso, o desenvolvimento desses marcadores envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo. No entanto, esta desvantagem é compensada pela facilidade e a eficiência do uso destes marcadores pela comunidade. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com a facilidade e a rapidez típica da

PCR. Felizmente, para o feijoeiro, existem centenas de *primers* disponíveis em <http://www.css.msu.edu/bic>.

2.5.2 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transferência de alelos de interesse. Marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica têm sido desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoces. Esta estratégia reduziria o tempo, as fontes e a energia necessárias não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros genéticos na seleção assistida.

Potencialmente, o maior impacto da seleção assistida por marcadores é esperado para características quantitativas. Seleção indireta com base em marcadores deve ser avaliada, considerando-se, simultaneamente, intensidade de seleção, herdabilidade, correlação genética, duração de uma geração de melhoramento (seleção e recombinação) e custo de cada alternativa, caso a caso (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Dentre os efeitos que afetam a eficiência da SAM, a herdabilidade da característica-alvo talvez seja a mais importante, devendo assim, nortear as decisões quanto ao uso da seleção assistida frente aos métodos tradicionais de melhoramento. Lande & Thompson (1990) sugerem que, quando a proporção da variância aditiva explicada pelos marcadores excede a herdabilidade da característica, as vantagens da SAM podem superar aquelas do melhoramento tradicional. A SAM será mais efetiva quando os QTLs forem mapeados, seus efeitos estimados em situações em que a herdabilidade é alta e a seleção for realizada quando a herdabilidade é baixa (Bernado, 2002).

Um grande número de caracteres quantitativos já teve vários QTLs identificados por marcadores. Para a maioria dos caracteres, o número de QTLs é grande, de pequeno efeito e com fortes interações com o ambiente. Neste caso, raramente são utilizados na seleção assistida (Bernardo, 2002; Torga, 2008). Entretanto, alguns caracteres quantitativos possuem QTLs de grande efeito, os quais tendem a ser mais estáveis e, até o momento, são os que mais vêm sendo usados na seleção assistida. Felizmente, no caso do mofo branco no feijoeiro, alguns QTLs de grande efeito foram identificados e têm contribuído para auxiliar na seleção de plantas resistentes, uma vez que a avaliação fenotípica é trabalhosa e pouco eficiente (Miklas, 2006; Carneiro et al., 2008).

2.5.3 Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares (MAS)

O método dos retrocruzamentos é utilizado no melhoramento de plantas quando se deseja introduzir um ou poucos alelos em genótipos elite, completando-os nas características específicas em que são deficientes (Borém & Caixeta, 2006). Este método tem recebido grande atenção nos programas de melhoramento para a incorporação de características introduzidas pelas técnicas de engenharia genética nas cultivares comerciais de plantas autógamas, ou nas linhagens-elite de plantas alógamas.

As características mais utilizadas na introgressão por retrocruzamento são de herança simples ou oligogênicas e, na maioria das vezes, são provenientes de genótipos não-adaptados (Openshaw et al., 1994), mas característica de herança poligênica também tem sido transferida por esse método (Miklas, 2007).

Este método de melhoramento consiste em cruzar um genitor doador (aquele que possui o alelo favorável a ser incorporado) com um genitor recorrente (aquele deficiente do alelo favorável). A F_1 deste cruzamento é novamente cruzada com o genitor recorrente e as progênies são selecionadas

para o alelo de interesse e cruzada sequencialmente com o genitor recorrente, mantendo o alelo favorável introduzido (Borém & Caixeta, 2006). Em média, a cada geração de retrocruzamento, recupera-se metade da constituição genética do genitor recorrente, em relação à geração anterior (Tabela 1).

TABELA 1 Recuperação média teórica do genoma do genitor recorrente, em um programa de retrocruzamento.

Geração	Porcentagem média de recuperação do genoma recorrente
F ₁	50,00
RC ₁ F ₁	75,00
RC ₂ F ₁	87,50
RC ₃ F ₁	93,75
RC ₄ F ₁	96,88
RC ₅ F ₁	98,44
RC ₆ F ₁	99,22

Considerando que o genitor doador é, na maioria das vezes, geneticamente divergente com relação aos genitores recorrentes, são necessários até seis ciclos de retrocruzamento para a recuperação satisfatória do genoma recorrente (Borém & Caixeta, 2006). Estes valores apresentados na Tabela 1 são médios, podendo sofrer desvios significativos em razão do pequeno número de plantas que são selecionadas a cada geração de retrocruzamento e da falta de controle sobre o tamanho da região genômica do parental doador próximo ao alelo-alvo, que é introgridido por arraste genético (Young et al., 1989). Esses desvios tendem a ser contra a recuperação do genoma recorrente, uma vez que a seleção fenotípica sempre é feita para o fenótipo que foi introduzido do genitor doador. Após a última geração de retrocruzamento, as plantas selecionadas serão heterozigotas para a característica introduzida, necessitando-se de mais uma ou duas gerações de autofecundação para que a característica seja fixada.

Considerando a necessidade de mais uma geração para a multiplicação dessas sementes e uma geração de ensaio de VCU, uma cultivar pode levar cerca de 10 gerações para ser convertida pelo método de retrocruzamento (Borém & Caixeta, 2006).

O tempo excessivo gasto para a obtenção das cultivares convertidas e o arraste de alelos que conferem características desfavoráveis são as principais limitações dos programas de retrocruzamento (Benchimol et al., 2005). Em um mercado altamente competitivo, como o agronegócio, após um período de seis anos, as cultivares convertidas perdem a competitividade. Para tanto, a seleção assistida por marcadores moleculares é uma estratégia ideal para reduzir o número de ciclos necessários para recuperar o genoma do genitor recorrente, bem como identificar a presença do alelo alvo quando a seleção direta é difícil, impossível ou quando o caráter é controlado por um alelo recessivo, sendo expresso somente em geração avançada (Frisch et al., 1999a). A eficiência da seleção assistida por marcadores em retrocruzamentos é uma ferramenta de melhoramento que tem sido avaliada considerando a herdabilidade do caráter de interesse e pelo monitoramento da região de interesse do genoma duas a duas (Hospital et al., 1997). Segundo Frisch et al. (1999a), o sucesso da seleção assistida por retrocruzamento depende do cromossomo portador, da posição do loco alvo, da distância que o marcador flanqueia o loco e do número de indivíduos avaliados.

Hospital et al. (1992) investigaram o uso de marcadores para recuperar o genoma do parental recorrente durante um programa de melhoramento de introgressão e observaram que o número reduziu de seis para três gerações. Estes mesmos autores recomendaram o uso de dois ou três marcadores por 100 cM, quando a posição e a densidade no mapa são conhecidas, porque o aumento da densidade resulta em poucos benefícios. Frisch et al. (1999b) observaram, a partir de simulação utilizando 80 marcadores mapeados em milho e seleção

fenotípica, que houve um aumento da população da primeira geração de retrocruzamento para a terceira geração e o número de marcadores reduziu 50%, sem afetar a proporção de recuperação do genoma.

Benchimol et al. (2005), utilizando marcadores microssatélites, em população de retrocruzamento de milho, observaram que a média de recuperação de genótipo do parental recorrente na terceira geração de retrocruzamento era compatível com o esperado no quarto ou no quinto ciclo de retrocruzamento, mostrando a eficiência dos marcadores moleculares na redução do número de ciclos de retrocruzamentos. Em feijão, utilizando marcadores microssatélites, foi possível selecionar plantas com até 86% de similaridade com o genitor recorrente na primeira geração de retrocruzamento (Carneiro et al., 2008).

A escolha entre a seleção assistida ou a convencional é uma decisão difícil em qualquer programa de melhoramento, uma vez que os parâmetros a serem avaliados, muitas vezes, não são facilmente comparáveis. Dentre os critérios a serem considerados estão a relação custo-benefício de cada estratégia e a disponibilidade de recursos técnico-financeiros para a execução delas (Borém & Caixeta, 2006).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.F. B.; RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F. Selection potential for seed yield from intra and inter racial populations in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v.108, n.2, p.121-127, 1999.
- ABREU, A. de F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PEREIRA FILHO, I.A.; Effects genotype x environment interaction on estimations of genetic and phenotypic parameters of common beans. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.13, n.1, p.75-82, mar. 1990.
- AIDAR, H. Cultivo do feijoeiro comum. Sistemas de Produção, **Sistemas de Produção**, Santo Antônio de Goiás, n. 2, jan. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em: 15 out. 2008.
- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139. 1992.
- ANTONIO, R.P.; SANTOS, J.B. dos; SOUZA, T.P.; CARNEIRO, F.F. 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, 2008.
- ASHFIELD, T.; DANZER, J.; HELD, D.; CLAYTON, D.; KEIM, P.; MAROOF, M.; WEBB, D.; INNES, R. Rpg1, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p.1013-1021, 1998.
- BALDINI, M.; VISCHI, M.; TURI, M.; DI BERNARDO, N.; RARANCIUC, S.; ECHEVERRIA, M.; CASTAÑO, F.; VANNOZZI, G.P.; OLIVIERI, A.M. Evaluation of genetic for *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary resistance in a F₂ population from a cross between susceptible and resistant sunflower. **Helia**, Helsinki, v.27, n.40, p.159-170, 2004.
- BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, C.L. de.; SOUZA, A.P. de. Microsatellite-assisted backcross selection in maize. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.4, p.789-797, 2005.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Minnessota: Stema, 2002. 369p.

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

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

BRANDÃO, R.S.; PRADO, T.S.; L. LOBO, M. J. Inibição da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos sob integração lavoura-pecuária com *Brachiaria ruziziensis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais...**Campinas: IAC, 2008. p.918-921.

CARDOSO, J.M.K.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATO, A.F.; ZUCCHI, M.I.; BENCHIMOL, L.L. Estimativa da diversidade genética entre cultivares do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores microsatélites. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2008. p. 831-834.

CARNEIRO, F.F.; SANTOS, J.B. dos.; ANTONIO, R.P.; SOUZA, T.P. de. Seleção de plantas de feijão em retrocruzamento, mais semelhantes ao recorrente e resistentes ao mofo branco via marcadores de DNA. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p.190-193.

CASTAÑO, F.; VEAR, F.; LABROUHE, D. T. de. The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* measured by mycelium infections combined with ascospore tests. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 373–380, 2001.

COLLICCHIO, E.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho dos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.3, p.297-304, mar. 1997.

COSTA, G.R., COSTA, J.L.S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.36, n.2, p.83-87, 2006.

COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.65-92. 1971.

COSTA, J.G.C.; PINHEIRO, B. da S. Apresentação. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005. Goiânia. **Anais...** Goiânia Embrapa- CNPAF, 2005. p.3. (Documentos, 182).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa/Cenargem, 1998. 220p.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A.E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, v.39, p.1295-1301. 1999a.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A.E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. **Crop Science**, Madison, v.39, p.967-975, 1999b.

GEFFROY, V. **Dissection génétique de la résistance à *Colltotrichum lindemuthianum*, agent de l'antracnose, chez deux génotypes représentatifs des pools géniques de *Phaseolus vulgaris***. 1997. Thèse (Doctorat)-Institut National Agronomique, Paris-Grignon, France.

GONÇALVES, P.R.C.; SANTOS, J.B. dos. Uso do ácido oxálico na identificação da resistência fisiológica de cultivares/linhagens de feijão ao mofo branco. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2008. p.95-98.

HALL, R.; PHILLIPS, L.G. Resistance of white bean to white mold: field evaluation of straw test. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.40, n.2, p.138–139, 1997.

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**, Fort Collins, v.41, n.2, p.171–172, 1998.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A., NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.72, p.761-769, 1986.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, v.132, p.1199-1210, 1992.

HOSPITAL, F.; MOREU, L.; LACOUUDRE, F.; CHARCOSSET, A.; GALLAIS, A. More on the efficiency of marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**. v.95, p. 1181-1189. 1997.

HUINTER, J.E.; ABAWI, G.S.; CROISER, D.C. 1978. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Report**, v.62, n.7, p.633-637, 1978.

KOLKMAN, J.M.; KELLY, J.D. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v.42, n.3, p.693-699, May/June 2002.

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

LEHNER, M.S.; LIMA, R.C.; PRADO, A.L.; TEIXEIRA, H.; PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F. Controle do mofo-branco do feijoeiro com aplicação de gesso via água de irrigação. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais**. Campinas: IAC, 2008. p.936-938.

MIKLAS, P.N. Potential marker-assisted selection for resistance to white mold in pinto and great northern bean. In: NATIONAL SCLEROTINIA INITIATIVE ANNUAL MEETING, 2006, Minneapolis. **Meeting...** Minneapolis: Agricultural Research Service, 2006. p.5.

MIKLAS, P.N. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, 2007. Disponível em: < <http://www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR%20Markers%202007.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2007.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; HANNAN, R.; DICKSON, M.H. 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.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v.41, n.2, p.309–315, Mar./Apr. 2001.

MIKLAS, P.N.; GRAFTON, K.F.; HAUF, D.C.; KELLY, J.D. Registration of partial white mold resistant pinto bean germplasm line USPT-WM-1. **Crop Science**, Madison, v.46, n.5. p.2339, 2006.

MIKLAS, P.N.; GRAFTON, K.F.; KELLY, J.D.; SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. Registration of four white mold resistant dry bean germplasm lines: I9365-3, I9365-5, I9365-31, and 92BG-7. **Crop Science**, Madison, v.38, n.6, p.1728, Nov./Dec. 1998.

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

MIKLAS, P.N.; HAUF, D. HENSON, R.; GRAFTON, K.F. Inheritance of ICA Bunsí-derived resistance in a navy × pinto bean cross. **Crop Science**. v.44, n.5, n.1584–1588. 2004.

MOOSE, S.P.; MUMM, R.H. Molecular plant breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. **Plant Physiology**, Waterbury, v.147, p.969–977, 2008.

MORAES, E.R. de; TEIXEIRA, I.R.; SOUZA, D.L.M. de. Associação fungicidas-agente biológico (*Trichoderma* sp.) no controle do mofo-branco do feijoeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85., 2008, Campinas. **Anais**. Campinas: IAC, 2008. p.910-913.

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

OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.). **Joint plant breeding symposium on analysis of molecular data**. Corvallis: Oregon State University, 1994.

OTUBO, S.T.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B.; SANTOS, J.B. dos. Genetic control of low temperature tolerance in germination of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.89, n.3, p.313-317, 1996.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S.R. Development of microsatellite markets and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.252, p.597-607, 1996.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics, Berlin**, v.85, p.985-993, 1993.

PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B. dos; ABREU, A. de F.B.; COUTO, K.R. 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, 2007.

PEREIRA FILHO, I.A.; RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, S. Avaliação de progênies de feijão e estimativas de parâmetros genéticos na região do Alto São Francisco em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.987-993, set./out. 1987.

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

PHILIPS, A. J. L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytophylactica**, Ontário, v.19, n.3, p.279-283, 1987.

RAMALHO, M.A.P.; PINTO, C.A.B.P.; SANTA CECÍLIA. F.C.; ANDRADE, C.A.; Avaliação de amostras de cultivares de feijão roxo e seleção de progênies. **Ciência e Prática**, Lavras, v.6, n.1, p.35-43, 1982.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos., SANTA CECÍLIA. F.C.; ANDRADE, C.A.; Seleção de progênies no feijão pintado e estimativa dos parâmetros genéticos e fenotípicos. **Ciência e Prática**, Lavras, v.3, n.1, p.51-57, jan/jun. 1979.

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

- RAVA, C.A. **Doenças causadas por fungos do solo**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 out. 2007.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.
- SOLLER, M.; BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**, v.67, p.25-33, 1983.
- SOUZA JÚNIOR, C.L. de. **Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 134p.
- STAJNER, N.; JAKSE, J.; KOZJAK, P.; JAVORNIK, B. The isolation and characterization of microsatellites in hop (*humulus lupulus* L.). **Plant Science**, v.168, p.213-221, 2005.
- TAKEDA, C.; SANTOS, J.B. dos. RAMALHO, M.A.P. Progeny test for the ESAL-501 x A354 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hybrid at different locations. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, n.3, p.771-779, Sept. 1991.
- TERÁN, H.; SINGH, S.P. Response of dry bean genotypes with different levels of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* to three inoculation methods. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v.51, p.218-219, 2008.
- TOLÊDO-SOUZA, E.D. de; COSTA, J.L. da S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.33, n.2, p.57-63, jul./dez. 2003.
- TORGA, P.P. **Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade e tipo de grãos e informações de QTLs**. 2008. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REJIANS, M.; LEE, T.; HORNEES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n.18, p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G2333. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n.1, p.97-94, Jan. 1998.

ZHAO, J.; PELTIER, A.J.; MENG, J.; OSBORN, T.C.; GRAU, C.R. Evaluation of Sclerotinia stem rot resistance in oilseed Brassica napus using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, n.9, p.1033–1039, Sept. 2004.

ZIMMERMAN, M.J.O.; TEIXEIRA, M.G. Bancos de germoplasma In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERM, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p.65-66.

CAPÍTULO 2

Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco

RESUMO

O uso de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico para auxiliar no controle do mofo branco no feijoeiro. Entretanto, a identificação de fontes de resistência e o estudo da sua herança são requerimentos primordiais para o sucesso de programas de melhoramento, visando à produção de cultivares resistentes. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a natureza e a magnitude dos efeitos genéticos da resistência ao mofo branco. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com duas repetições, tendo cada parcela sido constituída de cinco vasos de 3,5 litros, com duas plantas de feijão. O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Para se obter as estimativas de parâmetros genéticos, foram utilizados os genitores resistente (G122) e suscetível (M20), a F_1 , a F_2 e as 120 progênies $F_{2,3}$. Essas populações foram submetidas à inoculação do micélio (*Straw test*) após, aproximadamente, 28 e 38 dias da sementeira e, 6 a 8 dias após a inoculação, procedeu-se a avaliação da reação ao mofo branco por meio de uma escala diagramática de 1 a 9. As avaliações foram realizadas em plantas individuais e em nível de média de progênies. O modelo aditivo-dominante adotado foi eficiente para explicar os resultados, com R^2 próximos de 100%. Os resultados obtidos evidenciaram o predomínio do efeito aditivo na expressão do caráter e que apenas um gene de reação ao mofo branco está envolvido no controle da doença, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente. As estimativas da herdabilidade no sentido amplo obtidas indicam que a seleção é mais eficiente com base na média de progênies e inoculações múltiplas.

ABSTRACT

The use of resistant cultivar is the most efficient and economical method for helping to control the white mold. However, the identification of resistance to the white mold sources of common bean, and the study of its inheritance is primordial for the success of breeding programs aiming at resistant cultivars. The present research had the objective of studying the nature and magnitude of the genetic effects of resistance to white mold. The resistant (G122) and susceptible (M20) lines were crossed and generated the F_1 , F_2 and $F_{2,3}$ progenies. The experiment was set up using two replications in a randomized complete blocks design. The parents and the three generations were inoculated using the mycelium (*Straw test*) of the pathogen. The inoculations were set up two times close to 28 and 38 days after sowing. Six to eight days after the inoculation, the reaction of the white mold was evaluated in each plant using a diagrammatic scale from 1 (no symptoms) to 9 (dead plant). Data were analyzed on the individual plant level and on $F_{2,3}$ progeny mean. The additive-dominant model was efficient for explaining the data, R^2 close to 100%. Results showed prevalence of additive effects in the trait expression and only one gene was estimated to be involved in the disease control, although the character is highly influenced by the environment. Wide sense heritability estimate indicates that selection is more efficient based on progeny mean and multiple inoculations.

INTRODUÇÃO

Conhecer o tipo de ação gênica que predomina no controle de um caráter, é importante para a condução eficiente de um programa de melhoramento.

Estudos de herança da resistência do feijão ao mofo branco estão restritos a poucos relatos publicados na literatura, cujos resultados têm sido controversos. Segundo Antonio et al. (2008), o caráter é controlado por um gene, entretanto, já foram identificados de forma independente, mais de dez locos de caracteres quantitativos (QTL) que condicionam resistência ao mofo branco (Milkas et al., 2001). As conclusões que se obtêm em pesquisas sobre o tipo de ação dos genes são dependentes dos materiais genéticos estudados, numa dada espécie. É, pois, temeroso, a partir de estudos feitos em certos cruzamentos, inferir a respeito do controle genético de um dado caráter para a espécie como um todo, principalmente quando o controle genético é complexo, envolvendo muitos locos ou, então, quando a influência de fatores ambientais sobre a expressão do caráter for pronunciada, é difícil conhecer com detalhe a natureza da ação gênica subjacente (Vencovsky & Barriga, 1992).

Para se ter sucesso em um programa de melhoramento, é fundamental poder identificar, a partir dos valores fenotípicos, os indivíduos de genótipos desejáveis e com a maior concentração de alelos favoráveis. Como as fontes mais conhecidas de resistência não são adaptadas, há a necessidade de se conhecer o controle genético da reação do feijoeiro ao mofo branco, em cruzamento com linhagens elites. Para se obter essa informação, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a natureza e a magnitude dos efeitos genéticos da resistência do feijoeiro ao mofo branco. Assim, o melhoramento poderá ser mais eficientemente planejado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O município de Lavras situa-se na região sul do estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21°58' de latitude Sul e 42°22' de longitude Oeste.

2.2 Linhagens utilizadas

Foram utilizados dois genitores: a linhagem G122, que possui hábito de crescimento determinado, origem andina, semente grande e bege com pintas vermelhas e é fonte de resistência fisiológica ao mofo branco (Kolkman & Kelly 2003). Porém, possui várias características agronômicas desfavoráveis, além de não ser adaptada às condições de cultivo do estado de Minas Gerais. A linhagem M20 possui grão tipo carioca, hábito de crescimento tipo II, é portadora do alelo Co-4², Co-5 e Co-7 de resistência à antracnose e possui resistência a algumas raças do agente causal da mancha-angular. Porém, é altamente suscetível ao mofo branco.

2.3 Obtenção das gerações F₁, F₂ e das progênies F_{2:3}

Foi realizado o cruzamento entre as linhagens M20 x G122 na casa de vegetação do DBI/UFLA, obtendo-se a geração F₁. Posteriormente, estas sementes foram semeadas no campo, a fim de se obter a geração F₂. A partir de cada planta F₂ obteve-se uma progênie F_{2:3}, totalizando 120 progênies, que foram utilizadas na condução do experimento.

2.4 Avaliação das progênies por meio da inoculação com micélio (*Straw test* ou teste do canudo)

Foram avaliadas 20 plantas da linhagem G122, 20 da M20, 20 da F₁, 60 da F₂ e 120 progênies F_{2,3}, cada uma representada por 20 plantas. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados com duas repetições. Cada parcela foi constituída por cinco vasos plásticos de 3,5 litros, cada vaso contendo duas plantas de feijão. Em cada repetição foi utilizada uma parcela para cada um dos genitores, para a geração F₁ e para cada progênie F_{2,3} e três parcelas para a geração F₂. Os tratos culturais foram semelhantes aos utilizados no cultivo do feijão, acrescido de irrigação, de três em três horas, durante cinco minutos.

Para a inoculação das plantas foi utilizado o método do *straw test*, descrito por Petzoldt & Dickson (1996). Foram coletados escleródios no campo experimental de Ijaci, Minas Gerais, numa área de Pivô Central. Posteriormente, o fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), adicionado de cloranfenicol, na proporção de uma gota do antibiótico/100ml de meio BDA e mantido em BOD, a 20±3°C, por três dias. O inóculo foi multiplicado mais uma vez, a fim de obter maior uniformidade, também em BOD, a 20±3°C, por três dias e fotoperíodo de 12 horas. Três dias após a segunda multiplicação, utilizaram-se ponteiras eppendorf com disco de ágar contendo micélio para inocular plantas com, aproximadamente, 28 e 38 dias de idade, ou seja, cada repetição foi inoculada e avaliada duas vezes, como sugerido por Terán & Singh (2008).

Para a inoculação, fez-se um corte no caule principal da planta e colocou-se a ponteira com o disco de ágar em que o micélio foi crescido. Seis a oito dias após a inoculação procedeu-se a avaliação da reação do feijão ao mofo branco por meio de uma escala de diagramática de 1 a 9, em que: 1 - plantas sem sintomas; 2 - invasão do fungo além do sítio de inoculação; 3 - invasão do fungo

próximo ao primeiro nó; 4 - quando o fungo atinge o primeiro nó; 5 - invasão do fungo além do primeiro nó; 6 - invasão do fungo próximo ao segundo nó; 7 - quando o fungo atinge o segundo nó; 8 - invasão do fungo além do segundo nó e 9 - morte da planta.

2.5 Análise de variância e estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos

2.5.1 Obtenção de variâncias entre plantas individuais

As análises com plantas individuais foram realizadas com as populações F_1 , F_2 e os dois genitores (Tabela 1). Adotou-se o delineamento de blocos casualizados com duas repetições. Os dados de notas foram submetidos à análise da variância (Tabela 1), por meio do programa GENES (Cruz, 2006), utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_j + e_{(ij)} + p_{(k)ij}$$

em que:

Y_{ijk} : valor observado na planta k , do tratamento i , no bloco j ;

m : média geral;

t_i : efeito do tratamento i , com i variando 1 a 4;

b_j : efeito do bloco j , com j variando de 1 a 2;

$e_{(ij)}$: erro experimental associado à observação Y_{ijk} ;

$p_{(k)ij}$: efeito da planta k dentro do bloco j que recebeu o tratamento i ;

TABELA 1 Esquema da análise de variância adotada na avaliação do caráter reação do feijoeiro ao mofo branco, em plantas individuais.

FV	GL	QM
Repetição	r-1	Q1
Geração	k-1	Q2
Erro	(r-1)(k-1)	
Populações	Variâncias	
P ₁	gl ₁	$\hat{\sigma}_{P_1}^2$
P ₂	gl ₂	$\hat{\sigma}_{P_2}^2$
F ₁	gl ₃	$\hat{\sigma}_{F_1}^2$
F ₂	gl ₄	$\hat{\sigma}_{F_2}^2$

r e k: número de repetições e tratamentos, respectivamente;

$\hat{\sigma}_{P_1}^2$, $\hat{\sigma}_{P_2}^2$, $\hat{\sigma}_{F_1}^2$ e $\hat{\sigma}_{F_2}^2$: variância fenotípica dentro dos genitores 1 e 2, F₁ e F₂, respectivamente;

gl₁, gl₂, gl₃ e gl₄; graus de liberdade associados aos genitores 1 e 2, F₁ e F₂, respectivamente.

2.5.2 Obtenção de variâncias entre e dentro de progênies F_{2:3}

A partir das variâncias dentro de cada parcela, foi possível estimar a variância média dentro. Devido ao fato de o número de plantas não ser constante dentro de cada parcela, a variância dentro foi estimada pela seguinte expressão (Ramalho et al., 2005):

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{\sum \sigma_{di}^2}{nr}$$

em que:

$\hat{\sigma}_d^2$: variância média dentro de cada progênie;

$\sum \sigma_{di}^2$: somatório das variâncias dentro de cada parcela;

n: número de progênie;

r: número de repetições.

A partir da nota de cada progênie $F_{2:3}$, realizou-se a análise de variância, por época de avaliação (28 e 38 dias), para a estimativa da variância entre média de progênies. Adotou-se um modelo semelhante ao empregado na análise dos genitores F_1 e F_2 . Foi realizada também a análise conjunta, considerando as duas épocas de avaliação, utilizando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijq} = m + t_i + e_q + b_{(q)j} + (te)_{ij} + e_{qij}$$

em que:

Y_{ijq} : é a observação da progênie i no bloco j dentro da época q .

m : média geral

t_i : é o efeito da progênie i ($i = 1, 2, 3, \dots, 120$)

e_q : é o efeito da época q ($q = 1, 2$)

$b_{(q)j}$: é o efeito do bloco j dentro da época q ($j = 1, 2$)

$(te)_{ij}$: é o efeito da interação da progênie i na época q

e_{qij} : é o erro experimental médio

TABELA 2 Esquema de análise de variância conjunta das notas médias de reação ao mofo branco das progênies $F_{2:3}$, aos 28 dias e 38 dias após a semeadura.

FV	GL	QM	E(QM)
Tratamento (T)	119	Q1	$\hat{\sigma}_e^2 + r\hat{\sigma}_{TE}^2 + rk\hat{\sigma}_T^2$
Época de avaliação (E)	1	Q2	$\hat{\sigma}_e^2 + \sum_{q=1}^k \frac{(E_q)^2}{k-1}$
T x E	119	Q3	$\hat{\sigma}_e^2 + r\hat{\sigma}_{TE}^2$
Erro médio	238	Q4	$\hat{\sigma}_e^2$

Estimou-se a correlação do desempenho médio das progênies $F_{2:3}$ nas duas épocas de avaliação ($r_{I,II}$), a partir da seguinte expressão:

$$r_{I,II} = \frac{COV_{XY}}{\sqrt{\sigma_I^2 \sigma_{II}^2}}$$

em que:

COV_{XY} é a covariância das médias das progênies nas épocas de avaliação I e II.

$\hat{\sigma}_I^2$ e $\hat{\sigma}_{II}^2$, são as variâncias entre progênies $F_{2,3}$ nas avaliações I e II, respectivamente.

2.5.3 Estimativas dos componentes de média e de variância

As estimativas dos componentes de média e de variância foram obtidas por meio do método dos quadrados mínimos ponderados (Ramalho et al., 1993).

Para a estimativa dos componentes de média, foram utilizados os dados médios das populações F_1 , F_2 , F_3 e dos dois genitores. Considerou-se o modelo aditivo e dominante sem epistasia, conforme a seguinte equação:

$$\hat{\beta} = (C' NS^{-1}C)^{-1}(C' NS^{-1}Y)$$

em que:

$\hat{\beta}$: vetor dos estimadores, ou seja:

$$\hat{\beta} = \begin{vmatrix} \hat{m} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \end{vmatrix}$$

\hat{m} : estimador da média;

\hat{a} : estimador do desvio dos homozigotos em relação à média;

\hat{d} : estimador do desvio dos heterozigotos em relação à média;

N: matriz associada ao número de plantas avaliadas, dada por:

$$N = \begin{vmatrix} n_1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & n_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & n_3 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & n_4 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & n_5 \end{vmatrix}$$

Sendo n_1, n_2, n_3, n_4 e n_5 o número de plantas das populações P_1, P_2, F_1, F_2 e F_3 , respectivamente.

S: matriz das variâncias associadas às populações, dada por:

$$S = \begin{vmatrix} \hat{\sigma}_{P_1}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \hat{\sigma}_{P_2}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \hat{\sigma}_{F_1}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \hat{\sigma}_{F_2}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \hat{\sigma}_{F_3}^2 \end{vmatrix}$$

Y: vetor dos valores médios observados, dado por:

$$Y = \begin{pmatrix} \overline{P_1} \\ \overline{P_2} \\ \overline{F_1} \\ \overline{F_2} \\ \overline{F_3} \end{pmatrix}$$

C: matriz do modelo na presente situação, corresponde a:

$$C = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & \frac{1}{2} \\ 1 & 0 & \frac{1}{4} \end{pmatrix}$$

Esse sistema de equações foi resolvido utilizando-se o programa MAPGEN (Ferreira & Zambalde, 1997). A avaliação do ajuste do modelo foi realizada a partir do coeficiente de determinação (R^2).

Utilizou-se a equação descrita anteriormente para estimar também os componentes de variância, em que $\hat{\beta}$ é o vetor dos estimadores, $\hat{\sigma}_A^2$ (variância genética aditiva), $\hat{\sigma}_D^2$ (variância genética de dominância), $\hat{\sigma}_e^2$ (variância ambiental entre plantas) e $\hat{\sigma}_b^2$ (variância ambiental entre médias de progênies). Para isso também foi utilizado o programa MAPGEN (Ferreira & Zambalde, 1997).

$$\hat{\beta} = \begin{vmatrix} \hat{\sigma}_A^2 \\ \hat{\sigma}_D^2 \\ \hat{\sigma}_e^2 \\ \hat{\sigma}_b^2 \end{vmatrix}$$

C é a matriz do modelo:

$$C = \begin{vmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & \frac{1}{4} & \frac{1}{16} & \frac{1}{2} \\ \frac{1}{2} & \frac{1}{2} & 1 & 0 \end{vmatrix}$$

N matriz que corresponde aos graus de liberdade associados a cada população:

$$N = \begin{vmatrix} gl_1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & gl_2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & gl_3 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & gl_4 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & gl_5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & gl_6 \end{vmatrix}$$

Para gl_6 , que é o grau de liberdade associado a $\hat{\sigma}_{dF_{2,3}}^2$, foi utilizada a média harmônica, já que o número de plantas por parcela era variável (Ramalho et al., 2005), estimada pela expressão:

$$\bar{k} = \frac{P}{\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} + \dots + \frac{1}{k_p}}$$

Em que:

p: número total de progênie;

k_1, k_2, \dots, k_p é o número de plantas em cada parcela.

O vetor Y corresponde às variâncias observadas dentro de cada tipo de população e é dado por:

$$Y = \begin{pmatrix} \hat{\sigma}_{P1}^2 \\ \hat{\sigma}_{P2}^2 \\ \hat{\sigma}_{F1}^2 \\ \hat{\sigma}_{F2}^2 \\ \hat{\sigma}_{eF2:3}^2 \\ \hat{\sigma}_{dF2:3}^2 \end{pmatrix}$$

Como nos componentes de média, a verificação do ajustamento do modelo foi realizada utilizando-se o coeficiente de determinação (R^2).

Foi estimada a herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2) e no sentido restrito (\hat{h}_r^2) em nível de plantas individuais (Ramalho et al., 1993).

$$\hat{h}_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_A^2 + \hat{\sigma}_D^2}{\hat{\sigma}_A^2 + \hat{\sigma}_D^2 + \hat{\sigma}_e^2} \quad \text{e} \quad \hat{h}_r^2 = \frac{\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_A^2 + \hat{\sigma}_D^2 + \hat{\sigma}_e^2}$$

Foi estimada também a herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2), em nível de média de progênies $F_{2,3}$, de acordo com Ramalho et al. (1993).

$$\hat{h}_a^2 = \frac{Q_1 - Q_2}{Q_1}$$

Q_1 e Q_2 : quadrados médios das progênies $F_{2,3}$ e erro, respectivamente.

As expressões para as estimativas dos intervalos de confiança da herdabilidade estimada, em nível de médias, foram as desenvolvidas por Knapp et al. (1985):

$$\text{Limite inferior: LI} = \left\{ 1 - \frac{1}{\frac{Q_1}{Q_2} F_{1-\frac{\alpha}{2}; GL_{Q_2}; GL_{Q_1}}} \right\}$$

$$\text{Limite superior: LS} = \left\{ 1 - \frac{1}{\frac{Q_1}{Q_2} F_{\frac{\alpha}{2}; GL_{Q_2}; GL_{Q_1}}} \right\}$$

em que :

F: quantil superior a $(1 - \alpha / 2)$ e $\alpha / 2$ da distribuição F ($\alpha = 0,05$);

GL_{Q_1} e GL_{Q_2} : são os graus de liberdade associados a Q_1 e Q_2 .

O número de genes (K) envolvido no controle do caráter foi estimado pela expressão desenvolvida por Wright (1934):

$$k = \frac{(\bar{C}_1 - \bar{C}_2)^2}{8(\hat{\sigma}_{F_2}^2 - \hat{\sigma}_e^2)}$$

em que:

\bar{C}_1 : média do genitor 1;

\bar{C}_2 : média do genitor 2;

$\sigma_{F_2}^2$: variância fenotípica de F_2 ;

σ_E^2 : variância ambiental.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Uso de médias e variâncias de plantas individuais

O resumo da análise de variância, das notas referentes ao caráter resistência do feijoeiro ao mofo branco nas gerações, está apresentado na Tabela 3. O efeito das gerações não foi significativo, porém, houve tendência de diferença entre as médias das populações em ambas as avaliações, sendo $P = 0,11$ na primeira e $P = 0,08$ na segunda avaliação, indicando que há pouca variabilidade entre as gerações.

Para se estudar o controle genético de um caráter qualquer é essencial que os genitores sejam contrastantes, como ocorreram com as notas médias de reação dos genitores ao mofo branco em ambas as avaliações ($P \leq 0,01$). A linhagem G122 obteve, em média, notas 3,00 e 4,61 e a cultivar M20, notas 4,56 e 7,13, nas avaliações I e II, respectivamente (Tabela 4). A maior nota da cultivar M20 confirma a sua suscetibilidade ao mofo branco. Miklas et al. (2001) observaram que a linhagem G122 foi moderadamente resistente, com nota média 5,2 pelo método *straw test*. Antonio et al. (2008), utilizando o método do ácido oxálico, observaram que a linhagem G122 foi também altamente resistente. Essas diferenças entre as médias nas duas avaliações devem-se às diferentes condições ambientais e, principalmente, à idade das plantas. Na primeira avaliação, o desempenho médio das progênies em cada geração foi semelhante ao desempenho médio dos genitores. Em princípio, isso indica que há predominância de efeito aditivo no controle do caráter. Já as médias dessas populações na segunda avaliação indicam a ocorrência de dominância.

A maior média dos genitores na avaliação II, provavelmente, deve-se ao fato de a inoculação ser realizada no período de florescimento. Como relatado, o fungo ataca toda a parte aérea da planta, principalmente no início da floração ou

após a polinização das flores, as quais servem como fonte básica de nutrientes para iniciar as infecções por esporos (Huintner et al., 1978).

Em termos de variância, a qual corresponde aos quadrados médios dentro das gerações (Tabela 3), pode-se observar que o genitor P₁, nas duas épocas de avaliação e a geração F₁, na avaliação I, apresentaram valores próximos ou superiores à variância da geração F₂. Por esse resultado, observa-se a grande influência ambiental sobre o caráter avaliado, pois as variâncias dentro dos genitores e dentro da F₁ são todas ambientais, uma vez que as plantas são geneticamente idênticas. É importante salientar que o P₁ (G122) é um genótipo não adaptado às condições experimentais e as variações no desenvolvimento das plantas devem ter ocasionado maior variação na reação à doença. Dentro da geração F₂, a variação é devido a fatores ambientais e genéticos, portanto, esperava-se que a variação dentro dessa geração fosse maior. A grande influência ambiental sobre o caráter estudado já foi mencionada por Miklas et al. (2006). Depreende-se, assim, a dificuldade da seleção de plantas resistentes em populações segregantes. Assim, o melhorista deve optar pela avaliação de progênies com um maior número de plantas, quando se espera maior ganho com a seleção.

É oportuno comentar que o erro entre as parcelas nas análises de variância foi de magnitude relativamente pequena. Esse fato é comprovado por meio das estimativas do coeficiente de variação (CV), que foram inferiores a 16%. Deve-se considerar que o valor do CV é dependente do caráter avaliado, da média observada do caráter no experimento, do delineamento experimental utilizado e do erro experimental.

TABELA 3 Análise de variância da reação ao mofo branco, nas gerações F₁ e F₂ e dos genitores G122 (P₁) e M20 (P₂), nas duas épocas de avaliação, 28 dias e 38 dias após a semeadura. Lavras, UFLA, 2008.

FV	Avaliação I (28 dias)		Avaliação II (38 dias)	
	GL	QM	GL	QM
Repetição	1	2,94	1	0,002
Gerações	3	0,91 ^{NS}	3	4,04 ^{NS}
Erro	3	0,18	3	0,648
Dentro	101		104	
Dentro de P ₁	18	1,79	16	3,16
Dentro de P ₂	10	0,43	12	1,03
Dentro de F ₁	15	3,30	16	0,95
Dentro de F ₂	58	2,28	60	3,18
Total	108		111	
CV(%)		11,12		15,89
Média		3,85		5,06

As estimativas dos parâmetros genéticos com base nas médias das gerações foram obtidas utilizando-se o modelo reduzido composto pelos parâmetros m , a e d (Tabela 4). É necessário salientar, inicialmente, que o ajustamento dos dados ao modelo aditivo-dominante foi muito bom, R² praticamente 100% e as médias observadas explicam as esperadas (tabela 4).

Nas duas épocas de avaliação, o efeito genético aditivo foi mais importante na determinação do caráter, com magnitude de, aproximadamente, duas vezes maior que os efeitos de dominância, sugerindo sua grande contribuição para a resistência ao mofo branco. Observou-se efeito genético aditivo significativo apenas na primeira avaliação, embora a estimativa da segunda tenha exibido a mesma tendência. No entanto, nota-se que a primeira avaliação foi mais eficiente para o estudo do controle genético. A prevalência de efeito aditivo no controle genético da resistência ao mofo branco é um indicativo de facilidade na identificação de genótipos superiores, com maior concentração de alelos favoráveis; portanto, uma condição favorável ao

melhoramento genético. Este resultado está de acordo com o encontrado por Antonio et al. (2008), que observaram o predomínio do efeito aditivo para a resistência ao ácido oxálico. A predominância do efeito aditivo foi também observada em colza e girassol, no controle do desenvolvimento da lesão na parte aérea provocada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhao et al., 2004). A estimativa do grau médio de dominância foi de 0,41 na primeira e de 0,48 na segunda avaliação. De acordo com Ramalho et al. (1993), esse valor é indicativo de dominância parcial. Salientam-se os valores discordantes de \hat{d} nas duas avaliações. Entretanto, dado o elevado erro experimental associado à estimativa, não se pode tirar nenhuma conclusão sobre ela ou os parâmetros dela derivados. Assim, pode-se afirmar, com mais segurança, a presença do efeito aditivo no controle do caráter.

Deve ser levado em consideração que o emprego dos componentes de média possui alguns pontos negativos, dentre eles, o de que os efeitos, tanto aditivos (\hat{a}) quanto os de dominância (\hat{d}), podem se anular. Assim, em determinados genótipos envolvendo vários alelos, alguns podem assumir valores positivos e outros negativos. Com isso, o valor médio de \hat{a} poderá ser muito pequeno, igual a zero ou até mesmo negativo. O valor médio de \hat{d} corresponde à soma algébrica dos efeitos de todos os locos heterozigóticos. Da mesma forma, o valor de \hat{d} também poderá ser pequeno ou, até mesmo, igual a zero, mesmo quando cada um dos genes, individualmente, mostre dominância completa. Isso ocorre, simplesmente, porque, havendo dominância em direções opostas, os seus efeitos são mutuamente cancelados (Ramalho et al., 1993). É importante salientar que o valor negativo para \hat{a} deve-se ao fato de as menores notas referirem-se aos genótipos resistentes. Assim, o valor de \hat{a} é a contribuição aditiva do alelo para resistência ao mofo branco.

TABELA 4 Estimativas dos componentes de média e do grau médio de dominância da reação do feijoeiro ao mofo branco, obtidas do cruzamento G122 x M20, a partir dos dados de plantas individuais, avaliação aos 28 (I) e aos 38 dias (II) após a semeadura, respectivamente. Lavras, UFLA, 2008.

Componentes de médias				
Avaliação I (28 dias)				
	Estimativa	Erro padrão	Prob.> T	
\hat{m}	3,76	0,12	0,0010	
\hat{a}	-0,79	0,19	0,0556	
\hat{d}	0,32	0,46	0,5599	
d/a	-0,41			
χ^2	2,74		0,2540	
R^2 (%)	99,98%			
Avaliação II (38 dias)				
	Estimativa	Erro padrão	Prob.> T	
\hat{m}	4,90	0,2958	0,0036	
\hat{a}	-1,65	0,8416	0,1879	
\hat{d}	-0,79	1,0282	0,5213	
d/a	0,48			
χ^2	26,76		0,0000	
R^2 (%)	99,88			
Médias				
Populações	Avaliação I (28 dias)		Avaliação II (38 dias)	
	Observada	Esperada	Observada	Esperada
G122	3,00	2,97	4,61	3,24
M20	4,56	4,54	7,13	6,56
F ₁	3,67	4,08	4,59	4,12
F ₂	4,18	3,92	3,90	4,50
F ₃	3,83	3,84	4,69	4,70

Pelas deficiências comentadas a respeito dos componentes de média e pela complexidade das informações, torna-se necessário proceder ao estudo combinado dos componentes de médias e variância, o que proporciona

conhecimentos mais detalhados do fenômeno estudado (Cruz et al., 2004). Todavia, os componentes de variância apresentam a desvantagem de os erros associados às estimativas serem muito maiores do que os erros associados às estimativas dos componentes de média. Isso ocorre porque a variância é o somatório dos desvios em relação à média elevada ao quadrado; assim, os erros também são elevados ao quadrado. Mas, apresenta a vantagem de permitir estimar a herdabilidade no sentido amplo e restrito e o ganho com a seleção (Ramalho et al., 1993).

As estimativas dos componentes de variância estão apresentadas na Tabela 5. O modelo proposto constitui-se da variância aditiva ($\hat{\sigma}_A^2$), da variância de dominância ($\hat{\sigma}_D^2$) e da variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$). É necessário salientar que os dados se ajustaram ao modelo considerado. Tal fato foi evidenciado pelos valores do R^2 de 93,57%, na avaliação I e 92,63%, na avaliação II, apesar da significância do χ^2 . Dessa forma, pode-se considerar que a variação da resistência ao mofo branco foi explicada pela variância dos efeitos aditivos, dominantes e ambientais.

Pode-se observar que os limites da variância de dominância (\pm erro padrão), na avaliação I, abrangeram valores negativos, indicando que os mesmos devem assumir valores iguais a zero. Porém, na avaliação II, há indicativo da variância de dominância, sendo a variância aditiva predominante em ambas as avaliações. Verificou-se, por meio da variância ambiental, que o ambiente exerce considerável influência na expressão da resistência ao mofo branco, 1,9546 na primeira e 1,7451 na segunda avaliação, correspondendo a 54,37% e a 55,92% da variação total, respectivamente, realçando a observação anterior.

Na avaliação I, foi estimada apenas a herdabilidade no sentido restrito ($h_r^2=33\%$), porque a variância de dominância foi assumida igual a zero. Na avaliação II, as estimativas de herdabilidade no sentido amplo e restrito foram de

44% e 31%, respectivamente, sendo a herdabilidade no sentido amplo um pouco maior, o que evidencia que o efeito de dominância é menos pronunciado do que o efeito aditivo na expressão do caráter. Estas herdabilidades, embora de baixa magnitude, são suficientes para sugerir que a resistência pode ser efetivamente selecionada pelo método do *straw test*.

TABELA 5 Estimativas dos componentes de variância da reação do feijoeiro ao mofo branco, obtidas do cruzamento G122 x M20, a partir dos dados de plantas individuais, em duas épocas de avaliação, 28 dias e 38 dias após a semeadura. Lavras, UFLA, 2008.

Avaliação I (28 dias)					
Componentes de variâncias					
Parâmetros	Estimativas	Erro	LI ¹	LS ²	Prob.> T
$\hat{\sigma}_A^2$	0,9685	0,4636	0,8077	1,1830	0,172
$\hat{\sigma}_D^2$	-0,6715	1,5092	-0,5242	-0,8914	0,699
$\hat{\sigma}_e^2$	1,9546	0,7832	1,3396	3,1189	0,130
χ^2	8,00				0,018
R^2 (%)	93,57%				
Avaliação II (38 dias)					
Componentes de variâncias					
Parâmetros	Estimativas	Erro	LI ¹	LS ²	Prob.> T
$\hat{\sigma}_A^2$	0,9781	1,3536	0,7472	1,3359	0,540
$\hat{\sigma}_D^2$	0,3977	0,2997	0,3215	0,5048	0,316
$\hat{\sigma}_e^2$	1,7451	0,7525	1,200	2,7684	0,146
χ^2	9,39				0,0091
R^2 (%)	92,63%				

LI/1: limite inferior; LS/2: limite superior; $\hat{\sigma}_A^2$: variância genética dos efeitos aditivos; $\hat{\sigma}_D^2$: variância genética dos efeitos de dominância; $\hat{\sigma}_e^2$: variância ambiental.

Observou-se que apenas um gene de reação ao mofo branco está envolvido no controle da doença. No entanto, segundo Ramalho et al. (1993), a determinação precisa do número de genes é muito difícil de ser obtida, principalmente em função do efeito do ambiente na manifestação do caráter, como no presente estudo. Por essa razão, o que se procura é uma estimativa aproximada desse número. A identificação de um QTL de efeito relativamente grande (em torno de 37%), detectado por Miklas et al. (2001), está de acordo com essa estimativa. No entanto, sabe-se que o controle genético ao mofo branco, em campo, é quantitativo e muito influenciado pelo ambiente (Castaño et al., 1993), além da influência de outros fatores que contribuem para a resistência, principalmente o porte arbustivo (Miklas et al., 2003). Por essa razão que o método considerado mais eficiente para o estudo do controle genético e seleção para resistência ao patógeno, é por meio da inoculação de micélio (Terán e Singh, 2008).

3.2 Avaliação das progênies segregantes (F_{2:3})

Os resultados da avaliação fenotípica das notas médias dada para resistência ao mofo branco, das progênies F_{2:3}, foram submetidos à análise de variância individual e conjunta (Tabelas 6 e 7, respectivamente).

Nas análises individuais constatou-se efeito significativo de progênies ($P \leq 0,01$), indicando que as linhagens genitoras das gerações segregantes são contrastantes para resistência à doença.

A herdabilidade no sentido amplo foi de 39%, com intervalo de confiança de 13,05% e 57,77%, na avaliação I e 47%, com intervalo de confiança de 24,36% e 63,26%, na avaliação II. Como os limites inferiores e superiores das herdabilidades foram positivos, tem-se maior confiança nessas estimativas como indicadoras de sucesso com a seleção. Devido ao valor ligeiramente superior da herdabilidade na segunda avaliação, depreende-se que a

seleção será mais eficiente quando a inoculação for realizada aos 38 dias após a semeadura. Os valores da herdabilidade (h^2) de média de progênies foram semelhantes ao valor da herdabilidade no indivíduo. Em princípio, esse resultado indica que a seleção é igualmente eficiente tanto para plantas individuais quanto para médias, quanto se utiliza o método do *straw test*. Entretanto, as diferenças altamente significativas entre médias de progênies $F_{2,3}$ e as estimativas mais confiáveis da h^2 indicam que a seleção será mais eficiente com base na média de progênies.

Miklas et al. (2001) observaram que a herdabilidade da resistência ao mofo branco, quando estimada em casa de vegetação, pelo método do *straw test*, foi mais baixa (0,65) do que quando estimada no campo (0,78). Este fato deve-se ao fato de a resistência fisiológica detectada pelo *straw test* ser um componente da resistência no campo, ou seja, tanto a resistência fisiológica quanto os mecanismos de escape contribuem para a resistência em campo. Este mesmo autor observou que a linhagem de feijão A55 de porte ereto, hábito de crescimento determinado foi suscetível ao mofo branco, quando avaliada em casa de vegetação, porém, foi resistente em condições de campo, realçando a importância de mecanismos de escape da planta para reduzir a severidade da doença em campo. A maioria dos mecanismos de escape da planta ao mofo branco possui alta herdabilidade e é fácil de ser avaliada em campo. Por isso, associar a resistência fisiológica com mecanismos morfológicos de escape da planta ao mofo branco é estratégia de melhoramento viável para assegurar níveis adequados de resistência ao mofo branco (Miklas et al., 2003, Miklas et al., 2004).

Devido à ocorrência de muitas variações nas estimativas da herdabilidade para a resistência ao mofo branco, acredita-se que isto se deve à influência do genótipo parental, do método de avaliação utilizado e da interação

genótipos x ambientes. Por essa razão, foi realizada a análise de variância conjunta (Tabela 7).

TABELA 6 Análise de variância de progênes $F_{2,3}$ de notas médias de parcelas nas duas épocas de avaliação, 28 dias e 38 dias após a semeadura. Lavras, UFLA, 2008.

FV	GL	QM	
		Avaliação I (28 dias)	Avaliação II (38 dias)
Repetição	1	327,49	75,2
Progênie	119	4,67**	3,87**
Erro	119	2,83	2,04
Dentro		1,36	1,32
CV(%)		22,79%	14,53%
Média		3,77	4,69
Estimativas de parâmetros			
Var. fenotípica		2,33	1,93
Var. ambiental		1,41	1,02
Var. genotípica		0,92	0,91
Herdabilidade amplo		0,39 (0,13 e 0,58)	0,47 (0,24 e 0,63)

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

Verificou-se efeito significativo de época de realização do experimento decorrente de alterações nas médias das progênes $F_{2,3}$, sendo a maior média geral na avaliação II. Houve diferença significativa entre as progênes $F_{2,3}$. Foi verificado efeito não significativo para a interação progênes x épocas de avaliação. Assim, depreende-se que o comportamento das progênes $F_{2,3}$ foi coincidente nas diferentes épocas de avaliação.

Para melhor elucidar a não ocorrência de interação, foi estimada a correlação fenotípica, genética e ambiental do desempenho médio das progênes dentro de cada época de avaliação. Vale salientar que, muito embora a interação envolvendo progênes x épocas de avaliação tenha sido não significativa, as estimativas da correlação genética e fenotípica foram relativamente baixas, 0,23

e 0,45 ($P \leq 0,01$), respectivamente e a correlação ambiental (0,60) foi de magnitude superior, salientando o acentuado efeito não genético. Provavelmente, um dos fatores que contribuíram com o grande efeito ambiental foi o período de florescimento durante a segunda inoculação. Nesse período, as plantas gastam muita energia. Assim, plantas classificadas como resistentes em estágios iniciais posteriormente desenvolvem sintomas da doença.

A herdabilidade no sentido amplo, estimada a partir da análise conjunta, foi de 53,5%, com intervalo de confiança de 33,3% e 67,6%, magnitude superior aos valores das estimativas das análises individuais. Depreende-se que a realização de inoculações múltiplas será mais eficiente e proporcionará maiores ganhos. Segundo Terán & Singh (2008), avaliações múltiplas são recomendadas a fim de se melhorar precisão experimental e permitir detectar diferenças nas populações quanto à reação ao mofo branco.

TABELA 7 Análise conjunta das progênes $F_{2,3}$ de notas médias, considerando a avaliação aos 28 dias e 38 dias após a semeadura. Lavras, UFLA, 2008.

FV	GL	QM
Época (E)	1	149,77**
Progênes (P)	119	1,85**
E x P	119	0,86 ^{NS}
Erro	238	2,435
CV(%)		15,05%
Média		4,37
Herdabilidade amplo		0,53 (0,33 e 0,67)

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

4 CONCLUSÃO

O controle genético foi caracterizado, predominantemente, por efeito aditivo. Pelo menos um gene de resistência está envolvido, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente.

O método do *straw test* foi eficiente para estudar o controle genético da reação de feijoeiro ao mofo branco.

As estimativas das herdabilidades no sentido amplo obtidas indicam que a seleção é mais eficiente com base na média de progênes e com inoculações múltiplas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, R.P.; SANTOS, J. B. dos.; SOUZA, T.P.; CARNEIRO, F. F. 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, 2008.
- CASTAÑO, F.; VEAR, F.; TOURVIEILLE, D. Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. **Euphytica**, Dordrecht, v. 68, n. 1-2, p. 85-98, 1993.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES - Análise e processamento de dados baseado em modelos biométricos e em estatística experimental**. Viçosa: UFV, 2006.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2004. v. 1.
- FERREIRA, D. F.; ZAMBALDE, A. L. Simplificação de algumas técnicas especiais da experimentação agropecuária no MAPGEN e softwares correlatos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFORMÁTICA, 1997, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Informática, 1997. p. 285-291.
- HUINTER, J.E.; ABAWI, G.S.; CROISER, D.C. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Report**, St. Paul, v.62, n.7, p.633-637, 1978.
- 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, 1985.
- KOLKMAN, J.M.; KELLY. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 539-548, Mar./Apr. 2003.
- MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; JOHNSON, W. C.; GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309–315, Mar./Apr. 2001.

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

MIKLAS, P.N., K.F. GRAFTON, D.C. HAUF, AND J.D. KELLY. Registration of partial white mold resistant pinto bean germplasm line USPT-WM-1. **Crop Science**, Madison, v.46, n.5, p.23-39. 2006.

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

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

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 326 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Goiânia: UFG, 1993. p. 29-75.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Response of dry bean genotypes with different levels of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* to three inoculation methods. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.51, p. 218-219, 2008.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

WRIGHT, S. The results of crosses between inbred strains of Guinea pigs, differing in number of digits. **Genetics**, Baltimore, v. 19, p. 537-551, 1934

ZHAO, J.; PELTIER, A. J.; MENG, J.; OSBORN, T. C.; GRAU, C. R. Evaluation of *Sclerotinia* stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 9, p. 1033–1039, Sept. 2004.

CAPÍTULO 3

Retrocruzamento assistido por marcadores SSR visando resistência ao mofo branco em feijoeiro

RESUMO

O trabalho teve como objetivo utilizar marcadores microssatélites (SSR) para acelerar o processo de recuperação do genoma do genitor recorrente, bem como selecionar as plantas de retrocruzamento mais similares ao genitor recorrente que possuem um QTL de resistência ao mofo branco. Foi realizado o cruzamento entre as duas linhagens genitoras, G122 como doador e M20 como recorrente. A F_1 deste cruzamento foi retrocruzada com o genitor recorrente (M20), obtendo-se 267 plantas da primeira geração de retrocruzamento (F_1RC_1). Parte das sementes deste retrocruzamento foi guardada e parte foi novamente cruzada com o genitor recorrente, obtendo-se 113 plantas da segunda geração de retrocruzamento (F_1RC_2). Foi extraído o DNA de cada uma das plantas de retrocruzamento obtidas, juntamente com os dois genitores, para serem utilizados nas reações de marcadores microssatélites. Os dados de SSR foram submetidos à análise de similaridade genética (sg_{ij}), entre cada planta e o genitor recorrente, utilizando-se o coeficiente de Sorensen-Dice. Paralelamente, foi estimada a proporção de alelos do genitor recorrente (PR). Os resultados indicaram que os marcadores SSR foram eficientes na identificação de indivíduos com maior proporção de recuperação do genoma recorrente nos dois ciclos iniciais de retrocruzamento, permitindo um ganho de até dois ciclos, se comparada com a recuperação esperada no retrocruzamento convencional. Tanto a similaridade genética quanto a proporção de alelos SSR são eficientes para selecionar plantas mais similares ao genitor recorrente. Dentre as 20 plantas com maior proporção de recuperação do genoma, foi possível selecionar quatro plantas F_1RC_1 , portadoras do QTL de resistência ao mofo branco com média de 88% de alelos do genitor recorrente e duas plantas F_1RC_2 , portadoras do QTL de resistência ao mofo branco, com média de 91% de alelos do genitor recorrente.

ABSTRACT

This research had the objective of using microsatellite (SSR) markers to accelerate genome recovery from the recurrent parent, as well as to select plants most similar to that parent with the QTL for white mold resistance. The donor parent (G122) and the recurrent parent (M20) were crossed, and the F_1 was backcrossed (BC) to the recurrent parent (M20) obtaining 267 F_1BC_1 plants. Part of seeds from this backcross was maintained and part was backcrossed again to the recurrent parent, obtaining 113 F_1BC_2 plants. DNA was extracted from each plant of both backcrosses and from two parents, to obtain the SSR markers. Genetic similarity (sg_{ij}) between each BC plant and the recurrent parent was estimated using the Sorensen-Dice coefficient. The proportion of the SSR alleles derived from the recurrent parent (PR) was also estimated. Both, genetic similarity and the proportion of SSR alleles were efficient to identify plants most similar to the recurrent parent equivalent to BC_3 and BC_4 . Besides it was select plants with the QTL for white mold resistance and an average of 88% of PR in BC_1 and 91% of PR in BC_2 .

1 INTRODUÇÃO

O método do retrocruzamento tem por objetivo a introgressão de um ou mais alelos favoráveis de um genitor doador e a subsequente recuperação do genoma do genitor recorrente. O processo, geralmente, é utilizado para corrigir genótipos-elites, nas características em que são deficientes, por meio do cruzamento com genótipos portadores do fenótipo que se deseja introduzir. Uma das limitações do método é o longo tempo necessário para se completar o processo, fazendo com que o genótipo-elite utilizado como genitor recorrente muitas vezes se torne obsoleto, ao final do programa de retrocruzamento. Os marcadores moleculares apresentam-se como uma ferramenta importante para aumentar a eficiência desse processo, uma vez que possibilitam a identificação de indivíduos com maior proporção do genoma recorrente, além de auxiliar na seleção das plantas portadoras do alelo marcador desejável (Openshaw et al., 1994; Berloo, 1999; Hospital, 2001; Bouchez et al., 2002).

Dentre os tipos de marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites (SSR) apresentam-se como os mais adequados para a utilização nos programas de melhoramento, devido às suas características de codominância, multialelismo e possibilidade de automação (Beckman & Soller, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores microssatélites (SSR) para acelerar o processo de recuperação do genoma do genitor recorrente, bem como selecionar as plantas de retrocruzamento mais similares ao genitor recorrente que possuem um QTL de resistência ao mofo branco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os retrocruzamentos foram realizados na casa de vegetação e as análises moleculares no Laboratório de Genética Molecular, ambos no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Linhagens utilizadas

Foram utilizados dois genitores: a linhagem G122, que possui hábito de crescimento determinado, origem andina, semente grande e bege com pintas vermelhas e é fonte de resistência fisiológica ao mofo branco (Kolkman & Kelly 2003), porém, possui várias características agrônômicas desfavoráveis, além de não serem adaptadas às condições de cultivo do estado de Minas Gerais. Também, a linhagem M20, que possui grão tipo carioca, hábito de crescimento tipo II, portadora do alelo *Co-4²*, *Co-5* e *Co-7* de resistência à antracnose e possui resistência a algumas raças do agente causal da mancha-angular, porém, é altamente suscetível ao mofo branco.

2.3 Retrocruzamento

Foi realizado o cruzamento entre as duas linhagens genitoras, G122 e M20. A F_1 deste cruzamento foi retrocruzada com o genitor recorrente (M20), obtendo-se a primeira geração de retrocruzamento F_1RC_1 . Parte da semente deste retrocruzamento foi guardada e parte foi novamente retrocruzada com o genitor recorrente, obtendo-se a segunda geração de retrocruzamento, F_1RC_2 . Posteriormente, as sementes destas gerações foram semeadas no campo experimental do Departamento de Biologia da UFLA, obtendo-se 267 plantas F_1RC_1 e 113 F_1RC_2 .

2.4 Extração de DNA

De cada uma das plantas F_1RC_1 e F_1RC_2 obtidas e também dos dois genitores, foi extraído o DNA, de acordo com o procedimento usado por Pereira et al. (2007).

Foram utilizadas amostras de cerca de 2 gramas de folhas jovens de cada planta, trituradas com 10 ml de tampão de extração e 20 μ l de β -mercaptoetanol, em um almofariz com nitrogênio líquido. O tampão de extração é constituído de 2% de CTAB, 100mM de TRIS (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O material triturado foi incubado por 30 minutos em tubos de centrifuga e colocados em banho-maria, a 65°C. Após o banho-maria, os ácidos nucleicos foram extraídos com 10 ml da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1). Durante o banho-maria, os tubos foram agitados levemente e, depois de centrifugados para separar a fase orgânica da aquosa, foi coletado o sobrenadante, que contém os ácidos nucleicos. Estes foram precipitados pela adição de 30 ml da mistura de etanol 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e mantidos em um freezer, a -20°C, por uma noite. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrifuga Eppendorf, centrifugados e secos. Em seguida, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1mM de TRIS e 0,1mM de EDTA). Foi realizada a segunda extração com clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e os ácidos nucleicos do sobrenadante foram precipitados pela adição de, pelo menos, três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M: etanol 95% (1:20). Os ácidos nucleicos precipitados foram reidratados em tampão TE. Uma terceira extração foi realizada com clorofórmio-álcool-isoamil, com igual volume de TE. Coletou-se o sobrenadante e o DNA foi precipitado (durante uma noite no freezer) com álcool acetato de sódio até completar o tubo (1,5 μ l). Centrifugou-se por 10 minutos, a 10.000 rpm e os ácidos nucleicos foram reidratados com tampão de TE. Aliquotas de DNA obtidas de cada linhagem foram quantificadas

em gel de agarose 1%, ao lado de um padrão de concentração de DNA, construído a partir de DNA de fago λ , nas concentrações de 100, 200 e 300 ng/ μ l. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras e dos padrões, a concentração de cada amostra foi estimada e, posteriormente, diluída para a concentração de 10ng/ μ l, utilizado nas reações.

2.5 Processo de amplificação de DNA e eletroforese

Cada reação foi preparada em um volume de 12 μ l, misturando-se os seguintes reagentes com as respectivas concentrações (Pereira et al., 2007): 20ng de DNA genômico, 100 μ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase, 2,25 μ l do par de *primer*, 2,00 μ M de tampão de reação (50mM tris pH 8,3; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM de KCl; 10 μ g de BSA; 0,25% de ficol 400; 10mM de tartrazine) e água bidestilada até totalizar 12 μ l. As amplificações foram realizadas em tubos de 0,2 ml em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, por meio do seguinte programa: uma etapa de 2 minutos, a 94°C, para a desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos, sendo cada um de 15 segundos para desnaturação a 94°C; 30 segundos para anelamento do *primer* em temperatura variável de 55°C a 60°C e 30 segundos para extensão a 72°C. Por fim, uma etapa de 2 minutos, a 72°C, para extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 3%, em tampão TBE (0,045 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA), a 80V, por três horas e meia. Posteriormente, foram corados com brometo de etídio, na concentração de 0,5 μ l/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados em câmera digital Kodak.

2.6 Análise molecular

Primeiramente, verificou-se a existência de polimorfismo entre os genitores, realizando reações de reação de polimerase em cadeia (PCR) com,

aproximadamente, 480 pares de *primers* amplificadores de regiões microssatélites (SSR) de *Phaseolus vulgaris*, cujas sequências estão disponíveis em <http://www.css.msu.edu/bic>.

2.7 Análise de dados dos marcadores microssatélites e do SCAR *Phs*

As plantas resultantes dos retrocruzamentos foram avaliadas quanto à resistência ao mofo branco, por meio do SCAR *Phs* desenvolvido especificamente para esse tipo de resistência (Miklas, 2005). Essas plantas também foram molecularmente avaliadas junto aos genitores, quanto à similaridade genética em relação ao genitor recorrente, por meio de marcadores microssatélites (SSR) polimórficos.

A identificação dos fragmentos de DNA amplificados por marcadores microssatélites e separados por meio da eletroforese em gel de agarose a 3% foi efetuada realizando-se uma análise visual, gerando uma matriz com base em dados binários em que os indivíduos segregantes foram genotipados quanto à presença de um determinado alelo amplificado (0) e ausência deste mesmo alelo (1). Nas gerações de retrocruzamentos, espera-se um padrão de bandas homocigoto igual ao genótipo recorrente e heterocigoto derivado de um alelo do parental recorrente e o outro do parental doador, sendo esta última a banda polimórfica (Figura 1).

Os dados de SSR foram submetidos à análise de similaridade genética utilizando-se o programa NTSYS – pc 2.1 (Rohlf, 2000). As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}), entre cada planta e o genitor recorrente foram efetuadas pelo coeficiente de Sorensen-Dice, por meio da expressão $sg_{ij} = 2a/(2a + b + c)$, sendo a ausência de bandas nos genótipos i e j ; b ausência de banda em apenas no indivíduo i e c apenas no indivíduo j . No presente estudo, a banda polimórfica, por ser aquela derivada do doador, foi considerada como zero (0), devido ao fato de plantas mais semelhantes ao parental recorrente

serem aquelas que possuem o genótipo homozigoto. Portanto, nas estimativas de similaridade genética (sg_{ij}), entre cada planta do RC com o genitor recorrente, utilizou-se a como sendo ausência de bandas nos genótipos i e j , o contrário do critério adotado em outros estudos de similaridade.

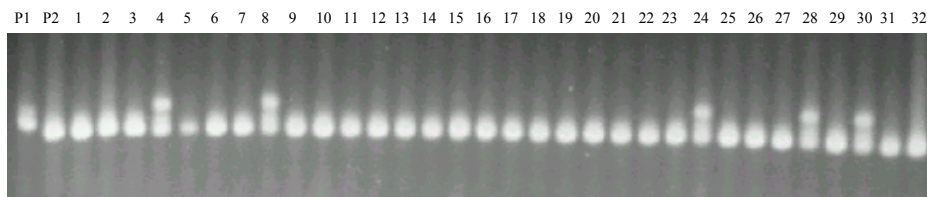


FIGURA 1 Amostra de padrão de bandas dos genitores G122 (P_1), M20 (P_2) e das plantas F_1RC_2 de 1 a 32, sendo as plantas 4, 8 24 28 e 30 heterozigotas e as demais homozigotas.

Paralelamente, a proporção de alelos do genitor recorrente (PR) foi estimada segundo a metodologia de Benchimol et al. (2005), por meio da expressão $PR = B+0,5H/(B+H)$, em que B é o número de plantas com o alelo do recorrente e H é o número de plantas com o genótipo heterozigoto.

Estimaram-se a correlação entre a sg_{ij} e a PR correspondente, tanto para o RC_1 quanto para o RC_2 .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de plantas resistentes por meio do SCAR *Phs*

Procedeu-se a avaliação das plantas dos dois retrocruzamentos, F₁RC₁ e F₁RC₂, por meio do SCAR *Phs*, a fim de identificar aquelas que possuem o QTL que confere resistência ao mofo branco. A banda amplificada pelo par de *primers Phs* (SCAR) é derivada do genitor resistente G122 e possui cerca de 285 pb, cuja sequências são: 5'AGCATATTCTAGAGGCCTCC3' e 5'GCTCAGTTCCTCAATCTGTT3'. Esse *primer* amplifica parte do alelo para faseolina T presente em feijão 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). Embora, atualmente, se tenha pouco sucesso com a seleção assistida em caracteres quantitativos, há relatos de que o QTL *Phs*, identificado por Miklas (2005), possui grande efeito para explicar a variação fenotípica (Miklas et al., 2001; Miklas, 2007). Miklas et al. (2001) observaram que o QTL *Phs* explicou 38% da variação fenotípica da reação ao mofo branco, quando avaliada pelo método do *straw test* e 26% quando avaliada no campo. Em outro trabalho, avaliando duas populações de feijão, este mesmo QTL explicou 42% a 64% da variação fenotípica da resistência ao mofo branco, quando avaliada pelo método *straw test* e apresentou menor efeito no campo, 17% e 12% (Miklas, 2006a).

Outra razão para se utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares para a resistência ao mofo branco deve-se à dificuldade de avaliação fenotípica, principalmente em campo, onde há dificuldade de obter inoculação uniforme do patógeno, além da avaliação da resistência a este fitopatógeno no campo ser afetada por mecanismos de escapes da planta, como por exemplo, o porte ereto que, juntamente com a resistência fisiológica, superestima a resistência (Miklas et al., 2001). A combinação da resistência

fisiológica com mecanismos de escape da planta é uma estratégia atual de melhoramento, visando minimizar a perda da produção devido aos danos causados por esse fitopatógeno.

Dentre as 267 plantas F_1RC_1 , 128 apresentaram a banda amplificada pelo SCAR *Phs* e 139 não apresentaram a banda e, provavelmente, não possuem o QTL. Como se esperava, aproximadamente metade das plantas possuía o SCAR que confere resistência ao mofo branco e a outra metade não o possuía, sendo suscetível, ou seja, segregação de 1:1 ($\chi^2=0,453$, $P=0,501$) (figura 2).

Dentre as 113 plantas F_1RC_2 , 22 apresentaram a banda amplificada pelo SCAR *Phs* e 91 não apresentaram a banda e, provavelmente, não possuem o QTL. O resultado também foi de acordo com o esperado: 25% das plantas possuíam o QTL e 75% não possuíam, segregando 3:1 ($\chi^2=1,84$, $P=0,175$) (figura 3).

Como o alelo da faseolina T parece ser responsável por parte da resistência fisiológica ao mofo branco e o marcador está dentro do mesmo, espera-se 100% de eficiência na seleção do QTL (Miklas, 2005).

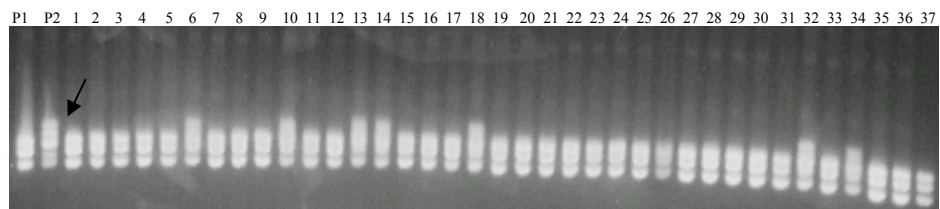


FIGURA 2 Amostra da análise de eletroforese dos produtos de amplificação das primeiras plantas F_1RC_1 com o SCAR *Phs*. A seta indica o marcador do genitor resistente G122 (P_2). As canaletas correspondem, em ordem crescente, a: M20 genitor recorrente (P_1), G122 genitor doador (P_1) e das plantas F_1RC_1 de 1 a 37.

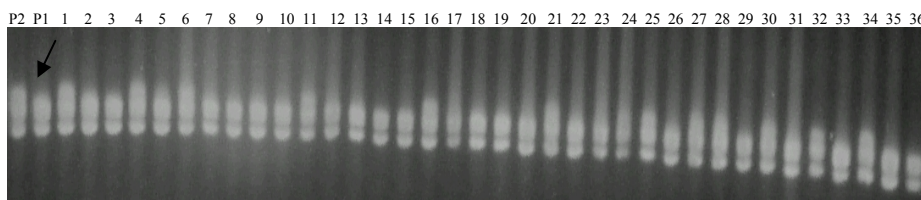


FIGURA 3 Amostra da análise de eletroforese dos produtos de amplificação das primeiras plantas F_1RC_2 com o SCAR *Phs*. A seta indica o marcador do genitor resistente G122 (P_2). As canaletas correspondem em ordem crescente a: G122 genitor doador (P_2), M20 genitor recorrente (P_1) e das plantas F_1RC_2 de 1 a 36.

3.2 Recuperação do genoma recorrente

Dos 480 *primers* testados nos genitores, quanto à existência de polimorfismo, apenas 25 *primers*, 5,2% (Tabela 1), foram polimórficos e utilizados nas plantas F_1RC_1 . Nas plantas F_1RC_2 , foram utilizados 23 *primers*, ou 4,79% (Tabela 1). O menor número de *primers* no segundo retrocruzamento se deve à recuperação do genoma do genitor recorrente, ou seja, dois dos *primers* utilizados na geração F_1RC_1 não foram polimórficos entre as plantas F_1RC_2 . O polimorfismo revelado pelos marcadores moleculares foi relativamente baixo e pode ser devido ao processo de domesticação e redução da variabilidade genética da espécie, que ocorre, principalmente, entre genótipos originários de um mesmo centro de domesticação (Benchimol et al., 2007). Em estudo realizado por estes autores, o DNA de 20 acessos de feijoeiro, entre andinos e meso-americanos, foram amplificados por 123 marcadores microssatélites e observado baixo índice de polimorfismo dos locos, conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) médio de 0,45.

O PIC é comumente usado em genética como uma medida de polimorfismo de um marcador genético, em análise de ligação. O reduzido polimorfismo encontrado em genótipos de feijão por marcadores SSR tem sido relatado em diversos trabalhos (Cardoso et al.; 2008; Carneiro et al.; 2008;

Torga, 2008). Beebe et al. (2001), em um estudo de diversidade genética de genótipos de feijoeiro comum representativos do pool gênico andino, com base em marcadores dominantes do tipo AFLP, encontraram uma base genética estreita entre os genótipos analisados e concluíram que estes genótipos, provavelmente, derivam de populações silvestres comuns e que as variações morfológicas presentes se devem ao processo seletivo imposto pelo homem, não estando, atualmente, os marcadores moleculares eficientes em captar esse tipo de variação.

TABELA 1 *Primers* SSR utilizados, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (TA) e geração de retrocruzamento (GR).

SSRs	SEQUENCIA 5'---3'	TA	GR
BMd-19	GCCAACCACATTCTTCCCTAC GGAAGCGAGGCAGTTATCTTT	60°C	1, 2
BMd-36	CATAACATCGAAGCCTCACAGT ACGTGCGTACGAATACTCAGTC	60°C	1, 2
BMd-41	CAGTAAATATTGGCGTGGATGA TGAAAGTGCAGAGTGGTGGA	60°C	1, 2
BM210	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG CCCTCATCCTCCATTCTTATCG	60°C	1, 2
BM-114	AGCCTGGTGAAATGCTCATAG CATGCTTGTTGCCTAACTTCTT	60°-58°C	1, 2
BM-152	AAGAGGAGGTTCGAAACCTTAAATCG CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	60°-58°C	1, 2
BM156	CTTGTTCCACCTCCCATCATACG TGCTTGCACTTAGCCAGAATC	60°-58°C	1, 2
BM157	ACTTAACAAGGAATAGCCACACA CTTAATTGTTTCCAATATCAACCTG	60°-58°C	1, 2
BM164	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAGGCCGATACTCC	60°-58°C	1, 2
BM175	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT CCACTCTTAGCATCAACTGGA	60°-58°C	1, 2
BM143	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	55°-55°C	1, 2

...continua...

...TABELA 1 Cont...

X57022	AAGGATGGGTTCCGTGCTTC CACGGTACACGAAACCATGCTATC	60°-58°C	1, 2
U18349	CTGAAGCCCGAATCTTGCGA CGCGAGAGGTGAACGAAAGC	55°-55°C	1, 2
GATS91	GAGTGC GGAAGCGAGTAGAG TCCGTGTCCCTCTGTCTGTG	60°-58°C	1, 2
BM172	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT GCAATACCGCCATGAGAGAT	60°-58°C	1
BMd-11	GCTCAACATTCCAGAGGCTAA TCAAACCTACATAAATAAAAACAAAACA	60°C	1
BM197	TGGACTGGTTCGATACGAAGC CCCAGAAGATTGAGAACCAC	60°-58°C	1, 2
M75856	CAATCCTCTCTCTCTCATTCCCAATC GACCTTGAAGTCGGTGTCTGTTT	60°-58°C	1, 2
BM200	TGGTGGTTGTTATGGGAGAAG ATTTGTCTCTGTCTATTCTTCCAC	60°-58°C	1, 2
BM201	TGGTGCTACAGACTTGATGG TGTCACCTCTCTCTCCAAT	60°-58°C	1, 2
BM139	TTAGCAATACCGCCATGAGAG ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	55°-55°C	1, 2
BM98	GCATCACA AAGGACTGAGAGC CCCAAGCAAAGAGTCGATTT	60°-58°C	1, 2
BMd-45	GGTTGGGAAGCCTCATAACAG ATCTTCGACCCACCTTGCT	60°C	1, 2
BM202	ATGCGAAAGAGGAACAATCG CCTTTACCCACACGCCTTC	60°-58°C	1, 2
BM149	CGATGGATGGATGGTTGCAG GGGCCGACAAGTTACATCAAATTC	55°-55°C	1, 2

¹ corresponde as plantas F₁RC₁, ² corresponde as plantas F₁RC₂.

Os marcadores identificados como polimórficos nos genitores foram genotipados nas plantas das duas gerações de retrocruzamento (RC). A partir dos dados genotipados, foram geradas as matrizes de similaridade genética, a fim de estimar a similaridade entre os genótipos de RC e o genitor recorrente, identificando os mais próximos geneticamente do genoma recorrente (M20).

Quando genotipadas com 25 pares de *primers* SSR, as 267 plantas F₁RC₁ obtiveram média de recuperação do genoma recorrente de 74±8%, pelo método

de Benchimol et al. (2005), em concordância com a média esperada na geração F₁RC₁, 75% ($\chi^2=0,533$, $p=0,465$) e 63±14%, pelo coeficiente de Dice, não sendo a média observada de acordo com o resultado esperado ($\chi^2=7,68$, $p=0,006$). Porém, houve correlação alta e positiva (98,86%) entre os dois métodos de estimativa da similaridade. Selecionando-se as oito plantas F₁RC₁ com maior proporção de recuperação do genoma do recorrente: 222, 227, 14, 19, 159, 218, 253, 237 (Tabela 2), a média obtida foi de 93% pelos dois métodos utilizados, o que corresponde à proporção da recuperação do genoma esperada no terceiro ciclo de retrocruzamento, que é 93,75% ($\chi^2=0,096$, $p=0,757$). Depreende-se que os 25 pares de *primers*, distribuídos em 9 dos 11 cromossomos do feijão, foram eficientes para amostrar o genoma da espécie e permitiram estimar o parentesco das plantas RC₁ com o genitor recorrente e selecionar os mais aparentados, equivalentes à redução de até dois ciclos de RC.

As 113 plantas F₁RC₂ foram genotipadas com 23 dos 25 pares de *primers* SSR utilizados para genotipar as plantas F₁RC₁ (Tabela 1). A média de recuperação do genoma recorrente de 83±7,3%, pelo método de Benchimol et al. (2005), foi resultado coerente com a média esperada na geração F₁RC₂, de 87,5% ($\chi^2=1,85$, $p=0,174$) e 80±11,4%, pelo coeficiente de Dice, estando a média observada próxima à média esperada ($\chi^2=5,14$, $p=0,023$). Porém, houve alta correlação entre ambos os métodos de avaliação (99,05%), semelhante ao observado em RC₁. Pode-se observar, pelos dados das Tabelas 2 e 3, que as progênies mais semelhantes ao recorrente são as mesmas nos dois métodos de avaliação. Portanto, tanto a similaridade genética quanto a proporção de alelos SSR são eficientes para selecionar plantas mais similares ao genitor recorrente. Provavelmente, o que contribuiu para reduzir a média, em ambos os retrocruzamentos, pelo coeficiente de Dice, foram os indivíduos com menor proporção de recuperação do genoma recorrente, sendo 7,69% no primeiro e 35,71% no segundo ciclo de retrocruzamento.

TABELA 2 Proporção de alelos SSR do recorrente (PR) e similaridade genética (sg_{ij}) das 20 plantas F_1RC_1 mais similares ao genitor recorrente (M20).

Plantas	PR	sg_{ij}
24	0,86	0,84
105	0,86	0,84
255	0,86	0,84
257	0,86	0,84
67	0,87	0,85
57	0,88	0,86
260	0,88	0,86
47	0,90	0,88
16	0,90	0,89
18	0,90	0,89
70	0,90	0,89
200	0,90	0,89
222	0,90	0,89
227	0,92	0,91
14	0,92	0,91
19	0,92	0,91
159	0,94	0,94
218	0,94	0,94
253	0,94	0,94
237	0,96	0,96
Média	0,90	0,89

Selecionando-se as cinco plantas com maior proporção de recuperação do genoma do recorrente: 31, 51, 48, 94 e 87 (Tabela 3), as médias obtidas foram de 95,20% (PR) e 94,8% (sg_{ij}), o que corresponde à proporção da recuperação do genoma esperada no quarto ciclo de retrocruzamento, que é de 96,87% ($\chi^2=0,92$, $p=0,33$ e $\chi^2=1,41$, $p=0,23$, respectivamente). Certamente, haveria maior proporção do genoma do recorrente se tivesse realizado a seleção assistida por marcador SSR na geração F_1RC_1 e se somente aquelas plantas F_1RC_1 mais similares ao recorrente tivessem sido utilizadas para se obter o segundo retrocruzamento.

Considerando o custo e o trabalho na obtenção dessas informações, depreende-se que é compensador selecionar plantas com maior proporção de alelos do recorrente apenas em RC₁, pois nesta geração já foi suficiente selecionar plantas altamente semelhantes ao genitor recorrente.

TABELA 3 Proporção de alelos SSR do recorrente (PR) e similaridade genética (sg_{ij}) das 20 plantas F₁RC₂ mais similares ao genitor recorrente (M20), utilizando as duas metodologias.

Plantas	PR	sg _{ij}
32	0,91	0,90
40	0,91	0,90
47	0,91	0,90
50	0,91	0,90
58	0,91	0,90
65	0,91	0,90
79	0,91	0,90
88	0,91	0,90
96	0,91	0,90
101	0,91	0,90
80	0,93	0,93
84	0,93	0,93
5	0,93	0,93
43	0,93	0,93
70	0,93	0,93
87	0,93	0,93
94	0,93	0,93
48	0,96	0,95
51	0,96	0,95
31	0,98	0,98
Média	0,93	0,92

Dentre as 20 plantas F₁RC₁ mais similares ao recorrente (Tabela 1), 16, 260, 57 e 255 possuem o SCAR *Phs* e média de 88% de alelos do recorrente, equivalente a 87,5% da média esperada em RC₂ ($\chi^2=0,023$, $p=0,879$). Dentre as 20 plantas F₁RC₂ mais similares ao recorrente (Tabela 3) a 32 e a 101 possuem o

SCAR *Phs* e 91% de alelos do recorrente. Depreende-se que a utilização dessas plantas para constituir o próximo ciclo de retrocruzamento contribuirá para acelerar o processo de recuperação do genótipo do genitor recorrente e portadoras do QTL de resistência ao mofo branco.

4 CONCLUSÃO

Os marcadores SSR foram eficientes na identificação de indivíduos com maior proporção de recuperação do genoma recorrente nas gerações iniciais de retrocruzamento, havendo ganho de até dois ciclos, se comparado com aquele esperado no retrocruzamento convencional.

Foi possível selecionar plantas com grande proporção de alelos do genitor recorrente e portadoras do QTL de resistência ao mofo branco.

Tanto a similaridade genética quanto a proporção de alelos SSR são eficientes para selecionar plantas mais similares ao genitor recorrente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, New York, v. 8, n. 10, p. 930-932, 1990.

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

BENCHIMOL, L.L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATTO A.F.; FORMIGHIERI E.F.; GOUVÊA, L.R.; SOUZA, A.P. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources Crop Evolution**, Netherlands, v.54, n.8, p.1747–1762, 2007.

BENCHIMOL, L. L.; SOUZA, C. L. de.; SOUZA, A. P. de.; Microsatellite-assisted backcross selection in maize. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n.4. p. 789-797, 2005.

BERLOO, R. van. GGT: software for the display of graphical genotypes. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 2, p. 328-329, 1999.

BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Markerassisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics**, Baltimore, n. 162, p. 1945-1959, 2002.

CARDOSO, J. M. K.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; BENCHIMOL, L. L. Estimativa da diversidade genética entre cultivares do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores microssatélites. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85, 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2008. p.831-834.

CARNEIRO, F. F.; SANTOS, J. B. dos.; ANTONIO, R. P.; SOUZA, T. P. de. Seleção de plantas de feijão em retrocruzamento, mais semelhantes ao recorrente e resistentes ao mofo branco via marcadores de DNA. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 85, 2008, Campinas. **Anais**. Lavras: UFLA, 2008. p.190-193.

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

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

HOSPITAL, F. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. **Genetics**, Baltimore, v. 158, n. 3, p. 1363-1379, 2001.

KAMI, J.; VELASQUEZ, V.B.; DEBOUCK, D. G.; GEPTS, P. Identification of presumed ancestral DNA of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 92, n. 4, p. 1101–1104, Feb. 1995.

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

MIKLAS, P. N. DNA markers (SCARS) linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, USA, 2005. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic/Genetics.cfm>>. Acessado em: 30 nov. 2007.

MIKLAS, P. N. Potential marker-assisted selection for resistance to white mold in pinto and great northern bean. In: NATIONAL SCLEROTINIA INITIATIVE ANNUAL MEETING, 2006, Minneapolis. **Meeting...** Minneapolis: Agricultural Research Service, 2006. p. 5.

MIKLAS, P. N. SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing: USA, 2007. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR%20Markers%202007.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2007.

MIKLAS, P. N. DNA markers (SCARS) linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, USA, 2005. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic/Genetics.cfm>>. Acesso em: 30 nov. 2008.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; JOHNSON, W. C.; GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309–315, Mar./Apr. 2001.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.). **Joint plant breeding symposium on analysis of molecular data**. Corvallis: Oregon State University, 1994.
PEREIRA, H.S.; J.B. dos SANTOS; A. de F.B. ABREU; K.R. COUTO. 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, 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software: Setauket, Nova York. 2000.
ROHLF, 2000.

TORGA, P. P. **Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade e tipo de grãos e informações de QTLs**. 2008. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.