



**FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO**

**ESTRATÉGIAS VISANDO A SELEÇÃO DE  
LINHAGENS DE FEIJÃO RESISTENTES AO  
MOFO BRANCO**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO**

**ESTRATÉGIAS VISANDO A SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO  
RESISTENTES AO MOFO BRANCO**

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

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

**LAVRAS - MG**

**2012**

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

Carneiro, Flávia Fernandes.

Estratégias visando a seleção de linhagens de feijão resistentes  
ao mofo branco / Flávia Fernandes Carneiro. – Lavras : UFLA,  
2013.

148 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Seleção recorrente. 3. *Sclerotinia  
sclerotiorum*. 4. Resistência genética. 5. Expressão de gene de  
resistência. 6. Melhoramento de plantas. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

**FLÁVIA FERNANDES CARNEIRO**

**ESTRATÉGIAS VISANDO A SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO  
RESISTENTES AO MOFO BRANCO**

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

APROVADA em 26 de outubro de 2012.

Dr. Magno Antonio Patto Ramalho	UFLA
Dr. José Airton Rodrigues Nunes	UFLA
Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA
Dr. Hudson Teixeira	EPAMIG

  
Dr. João Bosco dos Santos  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2012**

*Aos meus pais, Marta e Flávio.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença incessante em minha vida em todos os momentos...

À Universidade Federal de Lavras, por me proporcionar essa oportunidade de aprimorar meus conhecimentos em Genética e Melhoramento de Plantas e obter o título de Doutora;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa durante o Doutorado Sanduíche no exterior;

Ao professor João Bosco dos Santos; pela valiosa orientação, ensinamentos transmitidos, disponibilidade e carinho durante essa caminhada; Ao Dr. James Kelly e equipe, pelo acolhimento e disponibilidade do laboratório para a condução do trabalho na Michigan State University (MSU) por todo o período do doutorado Sanduíche;

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;

Aos funcionários do Departamento ,pela prazerosa convivência;

Aos membros da banca avaliadora; Magno Antonio Patto Ramalho, José Airton Rodrigues Nunes, Adriano Teodoro Bruzi e Hudson Teixeira, pelas sugestões para o aprimoramento deste trabalho;

Aos amigos; Cristiane Fioravante, Fernando Guedes e Caio César que mesmo distantes estiveram sempre presente nessa trajetória, com valiosos conselhos e com ombro amigo sempre disponível;

A todos os amigos do Núcleo de Estudos de Genética (GEN), especialmente Bebel, Lid, Gui (batateiro), Leandro, Vinícius (Vi), Rafa, Carlão, Paulo Edu, Marcinho e Josiel, pela amizade, motivação, companhia, diversões e experiências dos momentos de convivência;

Aos colegas e amigos do laboratório de genética molecular; Juliana, Filipe, Monik, Igã, Paulo Baiano, Letícia, Paulinho, Danuza, Camila, Dyanna, Chadreque e Luiz que tornaram meus dias de trabalho mais alegres e que sempre estiveram disponíveis para ajudar, participando diretamente na condução desse trabalho;

Ao Lamartine, pela disposição, competência e por tornar as atividades de laboratório mais fáceis e prazerosas;

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;

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

É de suma importância obter linhagens ou cultivares de feijão mesoamericana, resistentes ao mofo branco, adaptadas às condições de cultivo brasileiras e que atendam às exigências do mercado consumidor. Diante do exposto, objetivou-se: 1) Identificar linhagens/cultivares de feijão e isolados de *S. sclerotiorum* mais promissores para uso nos programas de melhoramento visando à resistência ao mofo branco; 2) Estudar a agressividade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e avaliar o tipo resistência genética de linhagens/cultivares de feijão ao mofo branco; 3) Avaliar se os métodos: análise de variância, GGE biplot e análise dialélica são promissores na avaliação da resistência de linhagens de feijão ao mofo branco e na identificação da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum*; 4) Obter linhagens/cultivares de feijão mesoamericana com alto nível de resistência fisiológica ao mofo branco, porte arbustivo e grão tipo carioca, utilizando a seleção recorrente; 5) Se há possibilidade de maiores ganhos com a seleção; 6) Se a seleção recorrente é eficiente na obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco; 7) Identificar variação na expressão de diferentes genes e sua relação com a resistência do feijoeiro ao mofo branco; 8) Verificar o nível de expressão dos genes durante diferentes tempos de inoculação e; 9) Localizar marcadores associados aos genes de resistência ao mofo branco no genoma do feijoeiro. Os métodos: análise de variância, análise de GGE biplot e análise dialélica, possibilitaram identificar linhagens/cultivares pertencentes ao pool gênico mesoamericano com elevado nível de resistência e estável quando inoculadas com diferentes isolados de *S. sclerotiorum*. Há diferença entre a agressividade dos isolados, sendo possível selecionar isolados com alta agressividade, estáveis e mais eficientes na discriminação de linhagens/cultivares. É possível obter linhagens/progênies de feijão mesoamericanas com alto nível de resistência fisiológica ao mofo branco e grão tipo carioca, utilizando a seleção recorrente. Há possibilidade de se obter sucesso com a seleção nas gerações e nos ciclos seguintes. Identificou três genes envolvidos com a resistência ao mofo branco em feijoeiro PGIP2, PGIP3 e PGIP4. Estes estão localizados no grupo de ligação LG2 dentro do QTL WM 2.3 que confere resistência ao mofo branco. Portanto, é possível selecionar marcadores que podem auxiliar na seleção para esses genes que conferem resistência ao mofo branco.

Palavras-chave: Seleção recorrente. *Sclerotinia sclerotiorum*. Resistência genética. Expressão de gene de resistência. Melhoramento de plantas.

## GENERAL ABSTRACT

It is extremely important to obtain Mesoamerican bean lines or cultivars resistant to white mold, adapted to Brazilian cultivating conditions and that attend the demands of the market. Thus, the objective of this study was to: 1) Identify bean lines/cultivars and *S. sclerotiorum* isolates most promising for use in breeding programs aiming at resistance to white mold; 2) Study the aggressiveness of different *S. sclerotiorum* isolates and evaluate the type of bean lines/cultivars genetic resistance to white mold; 3) Evaluate if the methods: analysis of variance, GGE biplot and diallel analysis are promising in assessing the resistance bean strains to white mold and the identification of aggressiveness of *S. sclerotiorum* isolates; 4) Obtain Mesoamerican bean lines/cultivars with high levels of physiological resistance to white mold, shrub size and carioca type grain, using recurrent selection; 5) If there is a possibility of greater gains with selection; 6) If the recurrent selection is efficient in obtaining progenies with high-level resistance to white mold; 7) Identify gene expression variation of different genes and their relationship with white mold resistance; 8) Verify the level of gene expression during different times of inoculation and; 9) Locate markers associated to genes for resistance to white mold in common bean. The methods: analysis of variance, analysis of GGE biplot and diallel analysis allowed the identification of lines/cultivars belonging to the Mesoamerican gene pool with high resistance levels and stable when inoculated with different *S. sclerotiorum* isolates. There is a difference between the aggressiveness of the isolates, with the possibility of selecting isolates with high aggressiveness, stable and more efficient in the discrimination of bean lines/cultivars. It is possible to obtain Mesoamerican bean lines/cultivars with high levels of physiological resistance to white mold and carioca type grain, using recurrent selection. There is the possibility of obtaining successful selection in the following generations and cycles. Three genes involved in the resistance to white mold in dry beans PGIP2, PGIP3 and PGIP4, were identified. These are located on the LG2 linkage group within the QTL 2.3 WM, which confers resistance to white mold. Therefore, it is possible to select markers which may assist in the selection for these genes which confer resistance to white mold.

Keywords: Recurrent selection. *Sclerotinia sclerotiorum*. Genetic resistance. Resistance gene expression. Plant breeding.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Figura 1 (A) Avaliação da resistência de treze linhagens de feijão na safra das águas 2009/2010 a seis isolados de *S. sclerotiorum*. PC1=54% e PC2=20.4%, correspondendo a 74.4% da variação total; (B) Avaliação da resistência de treze linhagens na safra da seca 2010 a seis isolados de *S. sclerotiorum* ..... 69
- Figura 2 Estabilidade das 13 linhagens de feijão na safra das águas 2009/2010 (A) e na safra da seca 2010 (B) a seis isolados do fungo..... 70
- Figura 3 (A) Reação das de treze linhagens na safra das águas 2009/2010 e seca 2010 aos dez isolados de *S. sclerotiorum*; (B) Estabilidade das treze linhagens quando inoculadas com os 10 isolados de *Sclerotiorum* ..... 71
- Figura 4 (A)Agressividade de seis isolados de *S. sclerotiorum* na safra das águas 2009/2010 quando inoculados em treze linhagens de feijão PC1=83% e PC2 = 7.7%; (B) Estabilidade dos seis isolados usados na safra das águas 2009/2010. .... 72
- Figura 5 (A) Agressividade de seis isolados de *S. sclerotiorum* na safra da seca 2010 quando inoculados em treze linhagens de feijão PC1=88.4% e PC2 = 6.2%; (B) Estabilidade dos seis isolados usados na safra da seca 2010. .... 73
- Figura 6 (A) Agressividade dos 10 isolados de *S. Sclerotiorum* quando inoculado nas 13 linhagens/cultivares de feijão; (B) Estabilidade dos dez isolados..... 74

### ARTIGO 3

- FIGURE 1 - Response of the resistance and susceptible genotypes in 1, 2, 4 and 7 days after inoculation. The capital letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between resistant and susceptible. The lowercase letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between times of inoculation..... 146
- FIGURE 2 - Expression of genes: PGIP2, PGIP3, PGIP4 and MtN3 in resistant and susceptible genotypes in different times of evaluation: day 0 (control), day 1, day 2, day 4 and day 7. The capital letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between resistant and susceptible. The lowercase letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between times of inoculation..... 147
- FIGURE 3 - Position of members PGIP of family genes in the linkage group 2 of common bean and the three QTLs: WM2.1, WM2.2 and WM 2.3 conferring resistance to white mold already identify in this LG ..... 148

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

Tabela 1	Características das cultivares/linhagens de feijoeiro utilizadas.....	50
Tabela 2	Isolados de <i>S. sclerotiorum</i> utilizados.....	51
Tabela 3	Resumo das análises de variância individuais da reação de treze cultivares/linhagens ao mofo branco, quando inoculadas com seis isolados nas safras das águas 2009/2010 (S1) e seis isolados na safra de seca (S2).....	55
Tabela 4	Resumo da análise de variância conjunta da reação das cultivares/linhagens de feijão aos isolados do fungo, na safra das águas 2009/2010 e na safra de seca 2010.....	57
Tabela 5	Resumo da análise de variância agrupada da reação das cultivares/linhagens de feijão aos isolados do fungo considerando a safra das águas 2009/2010 e seca 2010.....	58
Tabela 6	Reação de resistência ao mofo branco de treze linhagens de feijão quando inoculadas com seis diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> , reação média das linhagens aos diferentes isolados e da agressividade média dos isolados quando inoculados nas diferentes linhagens, na safra das águas 2009/2010.....	60
Tabela 7	Reação de resistência ao mofo branco de treze linhagens de feijão quando inoculadas com seis diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> , reação média das linhagens aos diferentes isolados e da agressividade média dos isolados quando inoculados nas diferentes linhagens, na safra das secas 2010.....	61

Tabela 8	Análise dialélica para reação das treze linhagens/cultivares, inoculados com 10 isolados de <i>S. sclerotiorum</i> .....	76
Tabela 9	Estimativas da capacidade geral de reação (gi) das linhagens/cultivares de feijão quando inoculados com diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> e da capacidade geral de agressividade (gj) dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> quando inoculados em diferentes linhagens/cultivares .....	77

## **ARTIGO 2**

Tabela 1 -	Linhagens e cultivares utilizadas no inter cruzamento com algumas de suas características .....	110
Tabela 2 -	Esquema de inter cruzamento do dialelo circulante com cada genitor cruzando-se com dois outros, de forma orientada, priorizando-se os não comuns. ....	111
Tabela 3 -	Delineamento experimental utilizado, tamanho da parcela e caracteres avaliados em cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente (C0, CI e CII).....	112
Tabela 4 -	Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para a resistência ao mofo branco. ....	113
Tabela 5 -	Resistência média de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância (LSD) entre as gerações dentro de cada ciclo ..	114
Tabela 6 -	Resistência média de cada dos ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração $S_{0:1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das	

	gerações iniciais e diferença significativa (LSD) entre os ciclos de seleção.....	116
Tabela 7 -	Nota média do tipo de grão de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância (LSD) entre as gerações dentro de cada ciclo.....	117
Tabela 8 -	Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para o tipo de grão.....	119
Tabela 9 -	Média do tipo de grão para cada ciclo de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração $S_{0:1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das gerações iniciais e diferença significativa entre os ciclos de seleção.....	120
Tabela 10 -	Nota média de porte de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância entre as gerações dentro de cada ciclo.....	121
Tabela 11 -	Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para porte.....	122
Tabela 12 -	Média de porte para cada ciclo de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração $S_{0:1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das gerações iniciais e diferença significativa entre os ciclos de seleção.....	123

Tabela 13 - Análise combinada entre os ciclos de seleção agrupada para resistência ao mofo branco, tipo de grãos e porte .....	124
---	-----

**ARTIGO 3**

TABLE 1 – Primers used in qRT-PCR.....	145
--	-----

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>		
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Mofo branco em feijão</b> .....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Entendimento do processo de infecção do patógeno</b> .....	25
<b>2.1.1.1</b>	<b>Resistência à patógenos</b> .....	26
<b>2.1.1.2</b>	<b>Patogenicidade da Sclerotinia</b> .....	27
<b>2.2</b>	<b>Seleção recorrente para resistência ao mofo branco</b> .....	30
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	44
	<b>ARTIGO 1 Resistência de linhagens de feijão comum e agressividade de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....	44
	<b>ARTIGO 2 Seleção recorrente em feijão para resistência ao mofo branco</b> .....	84
	<b>ARTICLE 3 Gene validation and gene expression for resistance to white mold in common bean</b> .....	125

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma das culturas anuais de maior importância social e econômica no Brasil. Nos anos 2010/2011 a área brasileira cultivada foi em torno de 3,89 milhões de hectares, com produção nacional de 3,71 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011). Entre os fatores que afetam a sua sustentabilidade, a ocorrência de patógenos é a que mais se destaca. *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, vem recebendo lugar de destaque entre as doenças do feijoeiro.

Entre os fatores que afetam a sua sustentabilidade, a ocorrência de patógenos é a que mais se destaca. *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, vem recebendo lugar de destaque entre as doenças do feijoeiro.

*Sclerotinia sclerotiorum* possui mais de 400 espécies hospedeiras (BOLAND; HALL, 1994), sendo muitas dessas já cultivadas como: o feijão, alface, canola, cenoura, batata, soja, girassol e outras. A epidemia é favorecida em baixa temperatura (18-23 °C) e alta umidade. Nessas condições, o fungo pode causar até 80% de redução na produção e em condições desfavoráveis pode permanecer viável no solo por até 15 anos, por meio de estruturas de resistência chamadas de escleródios (LOBO JÚNIOR; NASSER, 2007).

Dentre as medidas de controle desse patógeno, a obtenção de linhagens/cultivares resistentes é a mais eficaz, pela redução nos custos de produção e diminuição dos danos causados ao ambiente. No entanto, a obtenção de cultivares resistentes têm sido dificultada pela baixa resistência apresentada pelo germoplasma disponível e pela baixa eficiência limitada dos métodos empregados de identificação dessa resistência. Entre os fatores que afetam o sucesso de avaliação de linhagens/cultivares resistentes destaca-se a utilização

de um único isolado do patógeno, que pode não representar a variabilidade existente na população do patógeno nas regiões de cultivo, o que tem contribuído para a baixa correlação entre as diferentes avaliações.

Há escassez de informação acerca da resistência do germoplasma de feijão mesoamericano quanto ao mofo branco. A maioria das linhagens/cultivares com alto nível de resistência a esse patógeno deriva do pool gênico Andino (MIKLAS et al., 1999), um dos dois grandes grupos de origem do feijão (GEPTS et al., 1986). Há também escassez de informações sobre a variabilidade dentro e entre populações de *S. sclerotiorum* nos campos de cultivo de feijoeiro. A avaliação da amplitude na agressividade de populações de *S. sclerotiorum* nos hospedeiros cultivados dentro das regiões de cultivo pode contribuir para aumentar a eficiência nas avaliações e seleção de germoplasma resistentes ao mofo branco presentes em cada uma das regiões de cultivo.

Diante do exposto, a autora objetivou com o presente trabalho: 1) Avaliar o nível de resistência (resistência vertical e horizontal) de linhagens/cultivares a diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e estudar a agressividade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum*; 2) Aumentar a frequência dos alelos de resistência ao mofo branco nas linhagens/cultivares mesoamericanas de feijão, utilizando a seleção recorrente; 3) Determinar a variação na expressão gênica e suas relações com a resistência ao mofo branco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mofo branco em feijão

O mofo branco é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, um patógeno de importância mundial, com mais de 400 espécies de plantas hospedeiras relatadas (BOLAND; HALL, 1994). No Brasil, a ocorrência de *S. sclerotiorum* foi observada pela primeira vez em 1921, por Saccá, que verificou o fungo em *Solanum tuberosum* L. no estado de São Paulo. Nos anos seguintes, o patógeno foi verificado em diferentes hospedeiros em outros estados do país. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) pertence à subdivisão Ascomycotina, Filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae.

As condições de clima favoráveis ao desenvolvimento da doença são alta umidade e temperaturas amenas entre 15 °C e 20 °C. Nesta situação, uma lavoura de feijão afetada pode sofrer, em média, perdas de 30% ou mais, podendo chegar a 100% em períodos chuvosos, se medidas preventivas não foram tomadas (OLIVEIRA, 2005; RAVA, 2007). Nos últimos 15 anos esse patógeno tem sido um agravante em algumas regiões brasileiras, principalmente na safra de outono/inverno sob irrigação por aspersão (CARDOSO, 1994; NAPOLEÃO et al., 2005; OLIVEIRA, 2005).

Na ausência de hospedeiro suscetível, o fungo pode persistir por um longo período no solo, por meio de estruturas de resistência conhecidas como escleródios. Estas estruturas têm formato irregular, de vários milímetros de diâmetro e comprimento, formadas por agrupamento de hifas, possuem um revestimento exterior preto formado por células espessas ricas em contêm melanina. Acredita-se que este revestimento tem função de proteger o escleródio

de condições adversas e de fungos parasitas (BELL; WHEELER, 1986; HENSON; BUTLER; DAY, 1999). A porção interna é constituída por uma matriz fibrilar composta por carboidratos e proteínas (LE TOURNEAU, 1979). A princípio, os escleródios apresentam coloração branca e, posteriormente, tornam-se negros e duros. Podendo sobreviver no solo por até 15 anos e são altamente resistentes a substâncias químicas, calor seco até 600 °C e congelamento (CARDOSO, 1994; LOBO JÚNIOR; NASSER, 2007; OLIVEIRA, 2005).

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica ou carpogênica. Enquanto que na forma miceliogênica há a produção de micélio hialino e septado, que penetra pela cutícula da planta hospedeira utilizando enzimas, mecanismos de força via apressórios ou por meio dos estômatos (LUMSDEN, 1979; LUMSDEN; DOW, 1973), na forma carpogênica, o escleródio pode produzir de um a vários 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. Os ascósporos podem germinar na superfície de um tecido saudável, mas não podem infectar a planta sem a presença de fonte exógena de nutrientes e um filme de água.

Tecidos senescentes, necrosados ou flores geralmente servem como fonte externa de nutrientes para iniciar sua germinação, dando início à infecção micelial da planta hospedeira (ABAWI; GROGAN, 1979; LUMSDEN, 1979; MCLEAN, 1958). Depois da colonização dos tecidos senescentes, o fungo invade tecidos verdes vivos em contato com as flores e coloniza outras partes da planta (HARIKRISHNAN; DEL RIO, 2006). A maioria das doenças causadas por *S. sclerotiorum* se iniciam por meio dos esporos (ABAWI; GROGAN, 1979; STEADMAN, 1979), sendo eles os principais propágulos infectivos desse

patógeno (HARIKRISHNAN; DEL RIO, 2006). Os esporos são dispersos pelo vento e/ou pela água. A disseminação do fungo pode também ocorrer pelos próprios escleródios aderidos aos implementos agrícolas, em restos culturais ou em mistura com as sementes (RAVA, 2007).

São vários os fatores que influenciam na germinação dos escleródios desse fungo: reserva de nutrientes, idade e tamanho dos escleródios, umidade, temperatura, luz, pH e aeração do solo, profundidade na qual o escleródio se encontra no solo e também 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 (BRANDÃO; PRADO; LOBO, 2008; COSTA; COSTA, 2006).

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 (HUINTER; ABAWI; CROISER, 1978). O primeiro sintoma da doença é a ocorrência de murcha da planta. As folhas infectadas geralmente apresentam um aspecto aquoso que se expande rapidamente do pecíolo para o caule ou haste. As hastes de algumas espécies apresentam, inicialmente, lesão marrom escura; já as hastes de outras espécies apresentam lesões aquosas. As lesões geralmente desenvolvem dentro dos tecidos, que depois ficam todos encobertos por micélio branco, cottonoso, daí o nome da doença de mofo branco (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O controle da doença pode ser realizado pela utilização de sementes de boa qualidade fisiológica, sanitária e tratadas com fungicida, plantio direto, redução da densidade de semeadura, aumento do espaçamento entre plantas e entre linhas, eliminação dos restos culturais contaminados, controle da água de irrigação e aplicação foliar de fungicidas (CARDOSO, 1994; VIEIRA et al., 2005). Entretanto, a obtenção de cultivares com resistência é de grande

importância para o controle integrado da doença no Brasil, especialmente considerando que as principais cultivares brasileiras são suscetíveis a esse patógeno.

Há dois mecanismos envolvidos na resistência do feijoeiro ao mofo branco: a resistência fisiológica e os mecanismos de escape das plantas. 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 têm sido identificadas (GONÇALVES; SANTOS, 2010). 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 à imprecisão na avaliação desta reação de resistência (MIKLAS et al., 2004). Os mecanismos de escape estão associados aos caracteres morfológicos como a arquitetura da planta e porosidade do dossel (KOLKMAN; KELLY, 2002), que afetam as condições microclimáticas e podem limitar ou estimular o estabelecimento e desenvolvimento do fungo (KOLKMAN; KELLY, 2003).

Um dos procedimentos mais utilizados para identificar a resistência fisiológica do mofo branco é o método do Straw test ou teste do canudo (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2008). Carneiro et al. (2011) utilizaram este procedimento para o estudo do controle genético dessa resistência, a partir do cruzamento da fonte exótica G122 com uma linhagem elite com grãos tipo carioca, a M20. Constatou-se que o controle genético é principalmente devido ao efeito aditivo, com chances de ganho com a seleção. Esses autores avaliaram também duas populações de retrocruzamentos, com um marcador SCAR desenvolvido para um QTL de resistência que explica cerca de

30% a 40% da variação em condições temperadas, para selecionar as plantas portadoras do marcador e também as mais aparentadas ao genitor recorrente.

Além desse marcador vários outros SCARs associados a QTLs que conferem resistência ao mofo branco já foram desenvolvidos e alguns explicam parcelas significativas da variação fenotípica (ENDER; KELLY, 2005; KOLKMAN; KELLY, 2003; MIKLAS, 2007; MIKLAS et al., 2001). Mais de 20 QTL's que conferem resistência fisiológica ao mofo no feijoeiro, identificados em diferentes trabalhos, foram apresentados por Soule et al. (2011). Estes autores mapearam além dos QTL's já identificados para a resistência ao mofo branco os QTL's associados aos mecanismos de escape da planta à doença do mofo branco, como os relacionados à arquitetura da planta, dossel aberto, comprimento dos internós etc. Em alguns casos os QTL's relacionados com os mecanismos de escape e com a resistência fisiológica estão posicionados no mesmo loco. Os numerosos QTLs, amplamente distribuídos ao longo do genoma, comprovam a complexidade da resistência ao mofo branco em feijoeiro comum.

Melhoristas e geneticistas têm tentado identificar QTLs de efeito maior para serem usados na seleção assistida por marcadores e de separar os efeitos desses QTLs envolvidos com a resistência fisiológica e os envolvidos com os mecanismos de escape da planta (MIKLAS et al., 2013). Porém, estes mesmos autores sugerem que, dada a complexidade da reação da resistência do feijão ao mofo branco pelo confundimento entre a resistência fisiológica com os mecanismos de escape da planta, a seleção deverá ser realizada em campo na presença de alta pressão da doença, uma vez que a seleção baseada unicamente por QTL será dificultada.

Soule et al. (2011) identificaram três QTLs (WM1.1, WM3.1, WM5.3) que conferem resistência fisiológica e que também estão associados aos mecanismos de escape. WM1.1<sup>AG,XC</sup> está associado ao gene *fin* que tem uma

forte influência com o hábito de crescimento, e portanto, está associado a mecanismos de escape da planta como a altura da planta e porosidade do dossel (MIKLAS et al., 2001). Os QTLs WM3.1<sup>AN</sup> e WM5.3<sup>R31</sup> foram detectados somente em campo e também relacionado a altura da planta e o QTL WM3.1 está também relacionado à porosidade do dossel (MIKLAS et al., 2007). Park et al. (2001) identificaram um QTL responsável pela altura da planta que está localizado próximo ao WM5.3 suportando a ideia de que este QTL está associado a mecanismo de escape da planta.

Há controvérsias sobre o nível de resistência de algumas cultivares/linhagens de feijão (GONÇALVES; SANTOS, 2010). Alguns fatores como: método de avaliação utilizado, método de melhoramento utilizado, interação ambiental e diferença de agressividade dos isolados de *S. Sclerotiorum* são responsáveis pela baixa correlação entre as avaliações das linhagens quanto à resistência a esse fitopatógeno. Segundo Terán e Singh (2009), qualquer método de detecção da resistência fisiológica depende da idade da planta durante a avaliação, parte da planta inoculada, agressividade do patógeno, tipo de inóculo e tempo entre a inoculação e a avaliação. Alta variação na agressividade de isolados dentro e entre diferentes campos de coleta pode influenciar na avaliação fenotípica de linhagens/cultivares resistentes a esse patógeno (ABREU, 2011; OTTO-HANSON et al., 2011).

Com a finalidade de reduzir os resultados contraditórios obtidos devido aos diferentes métodos de avaliação, Kull et al. (2003) recomendam padronizar o método de avaliação da resistência ao mofo branco. Otto-Hanson et al. (2011) relataram que também é importante considerar a diferença na agressividade dos isolados nos diferentes campos de avaliação. Considerar a variabilidade existente entre os isolados de *S. sclerotiorum* beneficiará a seleção de linhagens/cultivares resistentes, produzindo resultados consistentes em diferentes locais de avaliação.

A fim de caracterizar os isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil, Gomes et al. (2010) utilizaram 10 locos microssatélites para avaliar a diversidade e estrutura genética de 79 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. Análise baseada na diversidade genética e índice de fixação indicou a presença de variabilidade entre e dentro de populações. Estes dados sugerem que o nível de fluxo gênico intrapopulacional é alto, proporcionando assim a oportunidade de disseminação de alelos raros desse patógeno. Além disso, foi observado que o mofo branco, na cultura de feijão no Cerrado do Brasil, é causado por populações geneticamente diversas de *S. sclerotiorum* e que este patógeno é altamente variável dentro de pequenas áreas geográficas (ABREU, 2011).

A caracterização de isolados permite informar aos melhoristas e patologistas quais as linhagens com alto, moderado ou baixo nível de resistência aos isolados presentes em determinada área ou região (MCCOY; HIGGENS; STEADMAN, 2012). Devido à variabilidade existente entre os isolados, avaliações em múltiplos locais ou com inoculação de diferentes isolados em casa de vegetação deve ser realizada, a fim de melhorar a acurácia na seleção das linhagens resistentes ao mofo branco.

Avaliação da resistência ao mofo branco pode ser melhorada com o conhecimento das características genotípicas e fenotípicas dos isolados. O surto da doença em campo é geralmente esporádico (especialmente quando a doença é iniciada por liberação de ascósporos), portanto, a avaliação de germoplasma em campo é um desafio principalmente na ausência de irrigação e inoculação artificial (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Semelhante a outras espécies hospedeiras de *S. sclerotiorum*, em feijão, a falta de fontes de resistência ao mofo branco reduz o progresso genético na obtenção de linhagens resistentes. Mecanismos de escape como o porte ereto e dossel aberto reduz o microclima favorável ao desenvolvimento do fungo evitando, assim, que o

mesmo colonize as flores e infecte os demais tecidos das plantas. Avaliações em laboratório e em casa de vegetação detectam os mecanismos de resistência fisiológica melhor do que as avaliações em campo porque permitem identificar linhagens ou progênies resistentes separadamente dos mecanismos de escape, que interferem na resistência em campo. Avaliação em diferentes ambientes inclui a variação ambiental e a variabilidade entre isolados de cada local (CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002).

Há diferentes formas de mensurar a agressividade patogênica: eficiência de infecção, período latente, taxa de produção de esporos e tamanho da lesão (PARIUAD et al., 2009). Kull et al. (2004) identificaram diferença na agressividade de isolados em campo de soja em Illinois e destacaram a importância de se examinar a agressividade de *S. sclerotiorum* dentro de campos naturalmente infectados para se explicar os resultados controversos obtidos durante as avaliações de linhagens/cultivares resistentes. A maioria dos estudos de populações relatam que a reprodução da *S. sclerotiorum* é clonal, no entanto, recombinação ocasional, mudanças genéticas e mutação podem ocorrer (CARBONE; ANDERSON; KOHN, 1999). A coexistência de diferentes isolados dentro de um mesmo ambiente tende a prevalecer devido à reprodução clonal do fungo, permitindo assim, que cada um deles se multiplique. A variabilidade entre os isolados, entre e dentro dos campos de avaliação, contribuem para os resultados inconsistentes entre os locais (OTTO-HANSON et al., 2011).

### **2.1.1 Entendimento do processo de infecção do patógeno**

Através da utilização das técnicas de biologia molecular tem sido possível identificar e clonar os genes envolvidos no processo de infecção, tanto os do patógeno como os das plantas. Com estas informações, é possível entender

o processo de doença e o de defesa das plantas. O conhecimento destes mecanismos é muito importante para que os melhoristas possam desenvolver estratégias de melhoramento mais eficientes visando o controle de doenças em plantas.

#### **2.1.1.1 Resistência à patógenos**

Entre as várias medidas para proteção de plantas contra patógenos, o uso da resistência genética é a que apresenta mais vantagens, por exemplo, pela redução do uso de defensivos agrícolas, evitando a poluição do ambiente e, por ser uma tecnologia que não aumenta o custo de produção. A resistência, porém, nem sempre é durável, pois a variabilidade genética apresentada pelos agentes patogênicos pode, muitas vezes, dificultar ou mesmo impedir a sua utilização, pela rápida adaptação do patógeno à resistência presente em cultivares comerciais (MUNDT; LEONARD, 1985). Considera-se a resistência como durável, quando uma cultivar amplamente plantada em ambiente favorável à doença mantém-se resistente a um determinado patógeno por um longo período de tempo (ADUGNA, 2004; CASELA; FERREIRA, 1988). A resistência a patógenos pode ser durável por diversas razões, tais como o sistema de cultivo utilizado, a herança da resistência, a variabilidade na população do patógeno, o ciclo de vida do hospedeiro e do patógeno, o tamanho da população do patógeno, fatores epidemiológicos e a forma de utilização de alelos de resistência. Todos esses fatores podem influenciar na resistência e devem ser levados em consideração pelo melhorista (ADUGNA, 2004; PARLEVLIET, 1993).

O melhoramento beneficia os produtores, porém, o plantio de grandes áreas com apenas uma cultivar resistente por vários anos pode favorecer a ocorrência de epidemias severas, por meio da seleção direcional do patógeno. O

uso de linhagens comuns, muitas vezes suscetíveis, facilita o surgimento de novas raças do patógeno (ADUGNA, 2004; PINK, 2002).

Segundo Vanderplank (1968), a resistência pode ser classificada como vertical, quando ela é específica a uma determinada raça do patógeno, ou horizontal, quando a resistência é durável e presente a todas as raças do patógeno. Enquanto a resistência vertical atrasa o início da epidemia, a horizontal diminui a velocidade da doença após o início da epidemia. Isso acontece porque há redução na quantidade de esporos que conseguem iniciar as lesões, que crescem devagar e demoram mais a produzir outros esporos.

O fato de uma cultivar apresentar resistência vertical não exclui a possibilidade de a resistência horizontal estar presente ou vice-versa (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995). Um estudo de simulação do controle genético envolvendo os dois tipos de resistências foi realizado por Melo e Santos (1999) com o objetivo principal de testar um método que conseguisse, de maneira simples, informar sobre a natureza da resistência (vertical ou horizontal) do hospedeiro e também sobre a agressividade e virulência dos patógenos. Para isto, foi realizada uma simulação contendo 20, 10 e 5 hospedeiros. Foram considerados 10 genes com três tipos de efeitos, principal, médio e pequeno, os quais equivaliam à ocorrência conjunta da RV e RH. A simulação teve como base a severidade da doença esperada com a inoculação de vinte hospedeiros com vinte raças do patógeno. Os autores puderam observar alta correlação entre a capacidade geral de reação e a resistência horizontal, e entre a capacidade geral de agressividade e a patogenicidade das raças. A capacidade específica da interação revelou ser um indicador da resistência vertical do hospedeiro e da virulência do patógeno.

#### **2.1.1.2 Patogenicidade da Sclerotinia**

Patógenos como *S. sclerotiorum* precisam romper a parede celular para infectar e colonizar as plantas. Para isso, enzimas responsáveis por degradar a parede celular da planta hospedeira são produzidas. Dentre essas estão as endopolygalacturonases (PGs), enzimas responsáveis por despolimerizar os componentes das pectinas da lamela média e paredes celulares primárias (ALGHISI; FAVARON, 1995; ANNIS; GOODWIN, 1997). A planta por sua vez ativa seus mecanismos de defesa produzindo proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIP's) que limitam o potencial destrutivo do fungo.

As endopolygalacturonases contribuem para o processo de infecção durante a fase de colonização, promovendo a liberação de oligogalacturonídeos, que são poderosas moléculas sinalizadoras que podem ativar a resposta de defesa da planta, tal como a síntese de proteínas inibidoras de poligalacturonases (OLIVEIRA et al., 2010).

A contribuição das enzimas de degradação da parede celular na patogenicidade e virulência dos fungos foi estudada em vários patossistemas. Endopolygalacturonases estão entre as primeiras enzimas secretadas durante o processo de infecção, causando a desestruturação da parede celular do tecido hospedeiro. O genoma do isolado 1980 de *S. sclerotiorum* codifica cinco endo-PG, quatro das quais são expressas durante a infecção (LI et al., 2004). A importância das polygalacturonases em doenças de plantas tem sido demonstrada para *Botrytis cinerea* (HAVE et al., 1998), *Alternaria citri* (ISSHIKI et al., 2001), *Claviceps purpurea* (OESER et al., 2002) e *S. sclerotiorum* (KASZA et al., 2004; LI et al., 2004). Muitas plantas possuem uma glicoproteína da parede celular, as chamadas proteínas inibidoras da polygalacturonase (PGIPs), que são capazes de inibir as PG's fúngicas. A interação entre plantas e fungos (PGs vs PGIPs), favorece o acúmulo de oligogalacturonídeos, que podem desencadear uma ampla gama de mecanismos

de defesa (LORENZO; OVIDIO; CERVONE, 2001; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

A função direta das PGIPs na defesa das plantas foi demonstrada em plantas transgênicas de tomate e de tabaco que superexpressam as PGIP's, mostrando redução nos sintomas quando infectados por *B. cinerea* (FERRARI et al., 2003; MANFREDINI et al., 2005).

Em *Phaseolus vulgaris*, quatro genes que codificam proteínas apresentam variação na sequência de 3 a 24%. Estes genes são agrupados em dois pares, Pgip1-Pgip2 e Pgip3-Pgip4, provavelmente provenientes de eventos independentes de duplicação de genes (OVIDIO et al., 2004). A fim de comparar a expressão temporal da interação entre os genes sspg e Pgip, foram realizadas transcrição reversa semi-quantitativa, em reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real, com RNA total extraído do caule de feijão inoculado em diferentes tempos com *S. sclerotiorum*. Segundo Oliveira et al. (2010), o gene mais significativamente induzido durante as fases iniciais da infecção foi o sspg1, e o nível de sua transcrição aumentou fortemente em 96 horas após a inoculação, quando as hastes foram completamente invadidas por micélio. O sspg3 está mais envolvido nos estágios iniciais de colonização do hospedeiro do que durante a fase de maceração dos tecidos do hospedeiro; sspg5 foi expresso em um nível elevado 24 horas após a inoculação e as transcrições acumularam-se entre 72 e 96 horas após a inoculação, correspondendo à fase de crescimento invasivo do patógeno e progressão da zona de necrose; a ação do sspg6 foi regular, estável durante a fase final da maceração e sua transcrição atingiu um máximo de 72 horas após a inoculação e, em seguida, diminuiu ligeiramente 96 horas após a inoculação quando os tecidos apresentavam-se macerados.

## **2.2 Seleção recorrente para resistência ao mofo branco**

A seleção recorrente é um método de melhoramento que permite usar vários parentais resistentes ao mofo branco em sucessivos ciclos de inter cruzamento, seleção e avaliação. Permite melhorar um ou mais caracteres ao mesmo tempo quando alelos/QTL dos diferentes caracteres forem encontrados em diferentes genitores, uma vez que o processo é cíclico e dinâmico e visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis (GERALDI, 2005). A fim de se manter a variabilidade genética durante o programa de seleção recorrente, deve-se cruzar um grande número de famílias e/ou indivíduos selecionados, evitando assim a flutuação aleatória da frequência alélica, como a deriva genética (BERNARDO, 2010). Uma das vantagens da seleção recorrente é a quebra de ligação entre blocos gênicos das características desejáveis e indesejáveis, devido ao inter cruzamento repetitivo para obter os próximos ciclos.

Durante o processo de seleção recorrente é possível realizar a seleção gamética, inicialmente proposta para caracteres dominantes e codominantes (SINGH; TERÁN, 2008). Segundo Terán e Singh (2009), esse método foi também eficiente para caracteres quantitativos em autógamas, permitindo a piramidação de QTLs presentes em diferentes genitores envolvidos no processo de inter cruzamento inicial do processo de seleção recorrente.

A maioria dos caracteres de interesse econômico é controlada por vários genes e muito influenciada pelo ambiente. Sendo assim, obter um genótipo com todos os alelos de resistência é impossível. Uma estratégia de acumular o maior número de alelos favoráveis é realizar a seleção recorrente. Isto é, um processo cíclico de melhoramento em que os melhores indivíduos e/ou progênies na

população são selecionados e recombinados para formar um novo ciclo de seleção. De outro modo, a seleção recorrente nada mais é do que um processo contínuo do ciclo de seleção seguido da recombinação (BERNARDO, 2002, 2010).

A obtenção de linhagens com grande proporção de alelos favoráveis é dependente da frequência alélica da população base utilizada, a chance de obter linhagens com média alta para o caráter sob seleção será maior quanto maior for a frequência dos alelos favoráveis na população base. A seleção seguida da recombinação dos melhores indivíduos permite que se incremente a frequência dos alelos favoráveis (RAMALHO et al., 2012).

A condução de um programa de seleção recorrente envolve, normalmente, três etapas distintas: 1) obtenção da população base; 2) avaliação/seleção das progênes em experimentos com repetições; 3) recombinação das melhores progênes/ indivíduos para obtenção de novo ciclo (BERNARDO, 2002).

No processo de seleção recorrente é aconselhável utilizar 10 a 20 genitores para constituição da população base, sendo importante obter uma população base com média alta, genitores bem adaptados e ampla variabilidade genética, genitores que se complementem, condição essa indispensável para o sucesso com a seleção (RAMALHO et al., 2012). Os genitores selecionados devem ser inter cruzados para se obter a população base, um procedimento de inter cruzamento foi proposto por Bearzoti (1997) o qual se usa hibridações direcionadas para se obter híbridos simples nos quais irão constituir a população base. Posteriormente os híbridos simples obtidos na população base devem ser inter cruzados para constituir a população base do primeiro ciclo de seleção. De cada população híbrida são obtidas progênes que são avaliadas para identificação da melhor. As melhores progênes de cada população são recombinadas para obter o ciclo seguinte. O processo é repetido até que todos os

genitores sejam representados em cada população e desse modo cada genitor contribuirá igualmente com o número de alelos.

A seleção para caracteres quantitativos é mais eficiente quando a avaliação se baseia no desempenho das progênies. O número de famílias avaliadas deve variar de 100 a 200, com 20 a 30 famílias selecionadas para formar o próximo ciclo de seleção (HALLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010; HALLAUER; MIRANDA, 1988). A seleção não é muito rigorosa na maioria dos programas de seleção recorrente, com a proporção de famílias selecionadas variando de 10 a 30% (BERNARDO, 2010).

A seleção recorrente é um procedimento dinâmico, pois possibilita a introdução de novos genitores em qualquer um dos ciclos de seleção conduzido (RAMALHO et al., 2012), e isso contribui para aumentar a média e a variabilidade da população. A cada ciclo de seleção recorrente é possível obter linhagens melhoradas. Em um programa de seleção recorrente a etapa de avaliação das progênies é a mais importante. Portanto, os experimentos devem ser bem conduzidos, utilizando delineamento experimental e tamanho de parcela adequados para atenuar o erro experimental e propiciar acurácia seletiva, ou seja, o sucesso da seleção recorrente depende da acurácia na identificação das melhores progênies que serão intercruzadas para se obter o novo ciclo de seleção. No melhoramento visando resistência horizontal a patógenos, o uso de isolados mais agressivos contribuem para a identificação das melhores progênies (YAN; KANG, 2002). As melhores plantas da população base de cada ciclo originarão as progênies  $S_{0:1}$  e o processo de avaliação continuará até a obtenção de linhagens ( $S_{0:6}$ ,  $S_{0:7}$ ).

Lyon et al. (1987) usaram um dialelo parcial, envolvendo 20 linhagens/cultivares da espécie *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus coccineus* para melhorar a resistência ao mofo branco em feijão e observaram um ganho de 31% do primeiro para o segundo ciclo. Terán e Singh (2009) estudaram o efeito da

seleção gamética na introgressão de resistência fisiológica em mofo branco e obtiveram um ganho de 20,5% de resistência ao mofo branco em duas populações de avaliação.

Há duas alternativas para estimar o ganho genético em plantas autógamas. Uma delas é avaliar linhagens obtidas ao final de cada ciclo seletivo em experimentos com repetição e boa precisão (RAMALHO; ABREU; SANTOS, 2005). Outro método é utilizar os dados da própria avaliação das progênes em cada ciclo. Neste caso, devem-se ter duas ou mais testemunhas comuns. Assim procedendo pode-se realizar a análise de variância combinada, utilizando as testemunhas comuns como medida de ajuste experimental. A comparação das médias ajustadas das progênes dos diferentes ciclos possibilita estimar o progresso. Pode-se também utilizar o método dos modelos mistos, em especial, o BLUP para realizar análise sequencial (BRUZI, 2008).

A regressão linear pode ser utilizada para estimar o ganho genético com a seleção recorrente, onde o número de ciclos de seleção é a variável independente (x) e a variável resposta é a variável dependente (y). A magnitude do coeficiente de regressão angular obtido é a estimativa do progresso genético com o ciclo de seleção. Se esse valor for dividido pela média da população original ou pela estimativa do intercepto da equação de regressão linear, tem-se o valor do progresso em porcentagem da média original (RAMALHO et al., 2012).

### **3 CONCLUSÕES**

O mofo branco se destaca entre as doenças mais devastadoras do feijoeiro.

A obtenção de linhagens/cultivares de feijão é o mecanismo de controle mais eficiente.

A seleção recorrente visa aumentar gradativamente a frequência de alelos de resistência proveniente de diferentes genitores.

## REFERÊNCIAS

ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by Sclerotinia species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 899-904, 1979.

ABREU, M. J. de. **Caracterização de isolados do agente causal do mofo branco do feijoeiro**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ADUGNA, A. Alternate approaches in deploying for disease resistance in crop plants. **Asian Journal of Plants Sciences**, Beijing, v. 3, n. 5, p. 618-623, Oct. 2004.

ALGHISI, P.; FAVARON, F. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 101, n. 4, p. 365-375, July 1995.

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

BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas**. 1997. 230 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1997.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia I**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Minnesota: Stemma, 2002. 369 p.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2<sup>nd</sup> ed. Minnesota: Stemma, 2010. 400 p.

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

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, Jan. 2006.

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

BRUZI, A. T. **Aplicações da análise de modelos mistos em programa de seleção recorrente do feijoeiro comum**. 2008. 83 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, Lancaster, v. 53, n. 1, p. 11-21, Feb. 1999.

CARDOSO, J. E. Mofo branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 111-122. (Documentos, 50).

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

CARSON, M. L.; GOODMAN, M. M.; WILLIAMSON, S. M. Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype-environment interaction in gray leaf spot trials. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 10, p. 1089-1093, Oct. 2002.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. Resistência de cultivares de sorgo a *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 7-9, fev. 1988.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, sexto levantamento, março 2011. Brasília, 2011. 39 p.

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**, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 83-87, 2006.

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

FERRARI, S. et al. Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 93-106, Jan. 2003.

GEPTS, P. et al. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, Bronx, v. 40, p. 451- 468, 1986.

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

GOMES, E. V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry Bean Crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 2, p. 94-99, Feb. 2010.

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

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. **Plant Breeding**, New York, v. 6, p. 577-653, 2010.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2<sup>nd</sup> ed. Ames: Iowa State University, 1988. 468 p.

HARIKRISHNAN, R.; DEL RIO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.

HAVE, A. ten et al. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 10, p. 1009-1016, Oct. 1998.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 447-471, 1999.

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**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 633-637, 1978.

ISSHIKI, A. et al. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 6, p. 749-757, June 2001.

KASZA, Z. et al. Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. **Current Microbiology**, New York, v. 48, n. 3, p. 208-213, June 2004.

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 2002.

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

KULL, L. S. et al. Evaluation of three resistance screening methods using six *Sclerotinia sclerotiorum* isolates and three entries of each soybean and dry bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, Dec. 2003.

\_\_\_\_\_. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 4, p. 325-332, Apr. 2004.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 887-890, 1979.

LI, R. et al. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 8, p. 754-765, Aug. 2004.

LOBO JÚNIOR, M.; NASSER, L. C. B. Mofô branco pode limitar o agronegócio da soja, feijão e girassol em áreas infestadas. **Informativo Agromen**, Orlândia, v. 4, n. 20, p. 6-8, 2007.

LORENZO, G. de; OVIDIO, R. d'; CERVONE, F. The role of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 39, p. 313-335, 2001.

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

LUMSDEN, R. D.; DOW, R. L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 708-715, 1973.

MANFREDINI, C. et al. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 2, p. 108-115, 2005.

MCCOY, S.; HIGGENS, B.; STEADMAN, J. R. Use of multi site screening to identify and verify partial resistance to white mold in common bean in 2011. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 55, p. 153-154, 2012.

MCLEAN, D. M. Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v. 42, p. 663, 1958.

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

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

MIKLAS, P. N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 135, n. 1, p. 1-19, Jan. 2013.

\_\_\_\_\_. Inheritance of ICA-Bunsi derived resistance to white mold in a navy × pinto bean cross. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1584-1588, May 2004.

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

\_\_\_\_\_. Registration of partial white mold resistant pinto bean germplasm line USPT-WM-1. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 5, p. 2339-2344, May 2006.

\_\_\_\_\_. 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, Feb. 1999.

MUNDT, C. C.; LEONARD, K. J. Effect of host genotype unit area on epidemic development of crown rust following focal and general inoculations of mixtures of immune and susceptible oat plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 10, p. 1141-1145, Oct. 1985.

NAPOLEÃO, R. et al. Intensidade do mofo branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 374-379, jul./ago. 2005.

OESER, B. et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 36, n. 3, p. 176-186, 2002.

OLIVEIRA, M. B. et al. Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae) infection. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 994-1004, Mar./Apr. 2010.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, maio/jun. 2005. Disponível em: <<http://www.revistadbo.com.br/agrotecnologia>>. Acesso em: 10 abr. 2012.

OTTO-HANSON, L. et al. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 11, p. 1370-1377, Nov. 2011.

OVIDIO, R. d' et al. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 24, p. 2424-2435, 2004.

PARIUAD, B. et al. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 409-424, June 2009.

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

PARLEVLIT, J. E. What is durable resistance, a general outline. In: JACOBS, T. H.; PARLEVLIT, J. E. (Ed.). **Durability of disease resistance**. Netherlands: Academic, 1993. p. 23-39.

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

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

PINK, D. A. C. Strategies using genes for non-durable disease resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 227-236, Mar. 2002.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B. Genetic progress after four cycles of recurrent selection for yield and grain traits in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 144, n. 1/2, p. 23-29, July 2005.

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

RAVA, C. A. **Doenças causadas por fungos do solo**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 out. 2007.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

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

SOULE, M. et al. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 123-139, Jan. 2011.

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

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Gamete selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 271-280, Jan. 2009.

VANDERPLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. London: Academic, 1968. 206 p.

VIEIRA, R. F. et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 770-773, out./dez. 2005.

YAN, W.; KANG, S. M. Biplot analysis of host genotype-by-pathogen strain interactions. In: \_\_\_\_\_. **GGE biplot analysis**: a graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists. Washington: CRC, 2002. p. 102-120.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1 Resistência de linhagens de feijão comum e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

#### RESUMO

Há importância de se identificar linhagens mesoamericanas resistentes ao mofo branco, bem como compreender a variabilidade genética existente entre os isolados de *S. sclerotiorum*. Objetivou-se com este trabalho: 1) Identificar linhagens/cultivares de feijão e isolados de *S. sclerotiorum* mais promissores para uso nos programas de melhoramento visando resistência ao mofo branco; 2) estudar a agressividade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e avaliar o tipo resistência genética de linhagens/cultivares de feijão ao mofo branco; 3) Avaliar se os métodos: análise de variância, GGE biplot e análise dialélica são promissores na avaliação da resistência de linhagens de feijão ao mofo branco e na identificação da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum*. Treze cultivares/linhagens foram inoculadas com dez isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos de diferentes localidades, em duas safras de avaliação: águas 2009/2010 e seca 2010. No total, foram conduzidos 12 experimentos, em blocos casualizados com três repetições, com parcela de quinze plantas por metro, sendo inoculadas as dez plantas mais vigorosas. Cada experimento foi inoculado com um dos isolados. A inoculação foi realizada pelo método do *straw test* e a avaliação foi realizada oito dias após a inoculação por meio de escala diagramática de 1 (planta sem sintoma) a 9 (planta morta). A partir dos três métodos utilizados: análise de variância, análise de GGE biplot e análise dialélica, foi possível identificar linhagens/cultivares pertencentes ao pool gênico mesoamericano com elevado nível de resistência e estável quando inoculadas com diferentes isolados de *S. sclerotiorum*. Houve diferença entre a agressividade dos isolados, sendo possível selecionar isolados com alta agressividade, estáveis e mais eficientes na discriminação de linhagens/cultivares.

Palavras-chave: Resistência horizontal. Mofo branco. Melhoramento genético de plantas.

## ABSTRACT

To identify resistant Mesoamerican lines to white mold is important, as well as understand the genetic variability among the isolates of *S. sclerotiorum*. The aim with this work: 1) To identify beans lines/cultivars and *S. sclerotiorum* isolates the most promising for use in breeding programs for resistance to white mold; 2) Study the aggressiveness of different *S. sclerotiorum* isolates and evaluate the genetic resistance of lines/cultivars of bean to white mold; 3) Evaluate whether the methods: analysis of variance, GGE biplot and diallell analysis are promising in the evaluation of the resistance of bean lines to white mold and the identification of the aggressiveness of *S. sclerotiorum* isolates. Thirteen breeding lines were inoculated with ten isolates of *S. sclerotiorum* from different locations in Brazil during two seasons: 2009/2010 rainy season and 2010 dry season. In total, 12 experiments were conducted in randomized blocks design with three replications. Each experiment was inoculated with isolate. In the field, using the straw test and the evaluation was performed eight days after inoculation. Plant reaction to white mold was scored using a scale from 1 (no symptoms) to 9 (plant dead). From the three methods used: analysis of variance, GGE biplot analysis and diallell analysis, it was possible to identify breeding lines belonging to the Mesoamerican gene pool with high level of resistance and stable when inoculated with different isolates of *S. sclerotiorum*. There was difference between the aggressiveness of isolates, being possible to select that with high aggressiveness, stable and more efficient in the discrimination of genotypes. The three methodologies are promise in assessing the resistance of bean genotypes to white mold and identifying the aggressiveness of isolates of *S. sclerotiorum*.

Key words: Horizontal resistance. White mold. Plant breeding.

## 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças reduz a produtividade, promove instabilidade na produção e aumenta o risco na cultura do feijoeiro. O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, vem recebendo lugar de destaque entre as doenças do feijoeiro, principalmente em áreas de cultivo sob pivô central, nas quais, são realizados plantios sucessivos de feijão na mesma área e têm-se condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do patógeno. Esse fungo pode causar até 80% de redução na produção e pode permanecer viável no solo por até 15 anos, por meio de estruturas de resistência, chamadas de escleródios (Lobo Jr. e Nasser, 2007).

A medida de controle mais eficiente é a resistência de linhagens ao fitopatógeno, estando esta restrita a alguns linhagens/cultivares, com potencial de uso nos programas de melhoramento, embora não apresentem possibilidades de utilização direta pelos produtores (Kolkman e Kelly 2002). A resistência completa do feijoeiro ao mofo branco é inexistente, sendo a maioria das fontes de resistência parciais pertencentes à linhagens/cultivares de origem andina ou conjunto gênico secundário, como em *Phaseolus coccineus*. Em geral, essas linhagens/cultivares não são adaptados às condições de cultivo brasileiras, sendo importante identificar fonte de resistência pertencente ao pool gênico mesoamericana e adaptada às condições de cultivo. 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 impróprias devido à alta incidência dessa doença, bem como contribuirá para reduzir gastos com defensivos, os quais nem sempre são eficientes.

Há dois mecanismos envolvidos na resistência do feijoeiro ao mofo branco: a resistência fisiológica e os mecanismos de escape das plantas. A resistência fisiológica de cultivares é a maneira mais eficiente no controle do

mofo branco. A dificuldade de desenvolver linhagens resistentes a este fitopatógeno deve-se ao fato da resistência ser quantitativa com moderada a baixa herdabilidade e à imprecisão na avaliação da reação de resistência (Miklas et al., 2004). Os mecanismos de escape estão associados aos caracteres morfológicos como a arquitetura das plantas e porosidade do dossel (Kolkman e Kelly, 2002), que afetam as condições microclimáticas e podem limitar ou estimular o estabelecimento e desenvolvimento do fungo (Kolkman e Kelly, 2003).

Há controvérsias sobre o nível de resistência de algumas cultivares/linhagens de feijão (Gonçalves e Santos, 2010). A variação na agressividade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* utilizados durante a inoculação pode ser uma das causas dos resultados contraditórios em diferentes avaliações (Kim et al., 1999, Otto-Hanson et al., 2011).

A interação patógenos x hospedeiros permite detectar a variação na agressividade dos isolados de *S. Sclerotiorum*, a reação das linhagens/cultivares de feijoeiro à esse patógeno, bem como compreender o controle genético de ambos: resistência e patogenicidade. Melhoramento visando aumentar o nível de resistência a diversas doenças e pragas tem sido um dos principais objetivos na maioria dos programas de melhoramento, e uma compreensão da interação patógenos x hospedeiros permite ao melhorista escolher quais os genitores são mais eficientes para o melhoramento para resistência, bem como identificar os isolados mais eficientes para avaliações.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho: 1) Identificar linhagens/cultivares de feijão e isolados de *S. sclerotiorum* mais promissores para uso nos programas de melhoramento visando resistência ao mofo branco; 2) estudar a agressividade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e avaliar o tipo resistência genética de linhagens/cultivares de feijão ao mofo branco; 3) Avaliar se os métodos: análise de variância, GGE biplot e análise dialélica são

promissores na avaliação da resistência de linhagens de feijão ao mofo branco e na identificação da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no campo experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, na safra das águas 2009/2010 e safra de seca de 2010, com temperatura mínima de 17°C e máxima de 27°C e precipitação média em torno de 180 mm no período da avaliação. Treze cultivares/linhagens (Tabela 1), que diferem quanto ao nível de resistência ao mofo branco, foram inoculadas com dez isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de diferentes localidades dos estados de Minas Gerais (MG) e de Goiás (GO) (Tabela 2). Os isolados de 1 a 6 foram inoculados na safra das águas 2009/2010 e outros seis isolados inoculados na safra de seca 2010, isolados 4, 5 e 7 a 10 (tabela 2), sendo os isolados 4 e 5 comum nas duas safras. As cultivares/linhagens de número 5 a 13 são adaptadas na região Sul de Minas Gerais. As de número 1 a 4 são progênies derivadas de retrocruzamentos em que o doador da resistência ao mofo branco foi a fonte G122 e o genitor recorrente foi a linhagem M20. A linhagem G122 tem grãos grandes tipo pintado, origem andina, hábito de crescimento tipo II e resistência fisiológica parcial ao mofo branco. A M20 é portadora dos alelos de resistência à antracnose Co-5 e Co-4<sup>2</sup>, resistência parcial à mancha angular, hábito de crescimento tipo II e grãos tipo carioca (Silva et al., 2006).

Foram conduzidos 12 experimentos, seis na safra das águas 2009/2010 e seis na safra de seca 2010 em Lavras, MG. Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados com três repetições e avaliadas 13 cultivares/linhagens em cada. Em cada experimento as linhagens/cultivares de feijoeiro foram inoculados com um dos isolados de *S. sclerotiorum* (Tabela 2). A parcela foi constituída de quinze plantas por metro, sendo inoculadas as dez plantas mais vigorosas. Os tratamentos culturais e as adubações seguiram o recomendado para a cultura do feijão

na região do Sul de Minas Gerais. A irrigação foi realizada por duas horas, duas vezes por semana.

Tabela 1 Características das cultivares/linhagens de feijoeiro utilizadas

Cultivar/linhagem	Tipo/ peso 100 grãos (g)	Hábito de crescimento
1 - RC2-G122-72	Carioca/25	II
2 - RC2-G122-67	Carioca/22	II
3 - RC2-G122-89	Carioca/23	II
4 - RC2-G122-92	Carioca/20	II
5 - BRS – Cometa	Carioca/23	II
6 - VC-16	Carioca/25	III
7 - Majestoso	Carioca/25	III
8 - CNFRJ10564	Pintado/42	I
9 – Talismã	Carioca/22	III
10 - RP-2	Carioca/25	II
11-MA-IV-18-266	Carioca/23	II
12 - ESAL 550	Jalo/45	III
13 - CNFC 9506	Carioca	II

Tabela 2 Isolados de *S. sclerotiorum* utilizados

Isolado	Designação	Procedência
Isolado 1	55-26	Goiânia - GO
Isolado 2	Oratórios 2002	Viçosa – MG
Isolado 3	55-05	Goiânia - GO
Isolado 4	55-31	Goiânia - GO
Isolado 5	UFLA-1	Ijaci – MG
Isolado 6	Elite 37	BambuÍ - MG
Isolado 7	Isolado 34	Paracatu – MG
Isolado 8	Isolado 35	Paracatu – MG
Isolado 9	Isolado 26	Lambari – MG
Isolado 10	UFLA-2	Ijaci – MG

Escleródios desinfestados dos isolados foram colocados 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  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Três dias após, discos de ágar com micélio da cultura foram transferidos para placas com BDA para obtenção de culturas puras por três dias. Após a segunda multiplicação, foram utilizadas ponteiras tipo Eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  com disco de ágar contendo micélio, para inocular plantas com 28 dias de idade.

Para a inoculação, foi cortado o ápice do ramo principal da planta, no qual foi inserida uma ponteira plástica de micropipeta contendo o disco de ágar em que o micélio foi crescido. Oito dias após a inoculação foi realizada a avaliação da reação do feijão ao mofo branco por meio de uma escala diagramática de 1 a 9 (Terán e Singh, 2009), 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 - planta morta.

Os dados da reação média das linhagens de cada parcela foram submetidos à análise de variância individual por isolado, análise conjunta dos isolados de cada safra e à análise de variância agrupada, considerando-se as duas safras. As análises foram realizadas com o auxílio do software SAS® (SAS Institute, 2005), procedimento PROC GLM. O modelo utilizado na análise conjunta de cada safra foi:  $Y_{(ijk)} = \mu + \tau_i + b_{k(i)} + l_j + (il)_{ij} + \epsilon_{ijk}$ , em que:  $\mu$  é uma constante;  $b_{k(i)}$  efeito do bloco k dentro do isolado i;  $\tau_i$  é o efeito do isolado i, sendo  $i = 1, \dots, 6$ ;  $l_j$  é o efeito da linhagem j, sendo  $j = 1, \dots, 13$ ;  $(il)_{ij}$  é o efeito da interação do isolado i com a linhagem j,  $\epsilon_{ijk}$  é o erro experimental médio associado à observação  $Y_{(ijk)}$ .

O modelo utilizado na análise agrupada, considerando as duas safras foi:  $Y_{ijkl} = \mu + s_l + \tau_i + l_j + b_{k(i)} + ls_{lj} + ll_{ij} + \bar{\epsilon}_{ijkl}$ , onde:  $\mu$  é uma constante;  $s_l$  é o efeito da l-ésima safra ou época;  $\tau_i$  é o efeito da j-ésima linhagem;  $b_{k(i)}$  é o efeito do k-ésimo bloco dentro do i-ésimo isolado dentro da l-ésima safra;  $\tau_i$  é o efeito do i-ésimo isolado;  $ls_{lj}$  é o efeito da interação da linhagem j com a safra l;  $ll_{ij}$  é o efeito da interação da linhagem j com o isolado i;  $\bar{\epsilon}_{ijkl}$  é o erro experimental médio associado à observação  $Y_{ijkl}$ . Foram desconsideradas as interações  $sl_{ij}$  (efeito de interação safras x isolados) e  $lsl_{ijl}$  (efeito da interação linhagens x safras x isolados). O teste de Scott-Knott

(1974) foi utilizado para fazer o agrupamento das médias ajustadas das cultivares/linhagens e dos isolados.

A partir das médias fenotípicas ajustadas das cultivares/linhagens por isolados foram realizada a análise pelo procedimento do GGE biplot com intuito de estimar a resistência das cultivares/linhagens avaliadas, a agressividade de cada um dos isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de diferentes locais e a interação linhagens x isolados (Yan e Kang, 2002). Segundo esses autores essa avaliação considera os efeitos genéticos de isolados e de linhagens mais o efeito da interação isolados por linhagens e os analisa por meio dos componentes principais.

Foi também utilizado o método do dialelo proposto por Melo e Santos (1999) para estimar a resistência vertical e horizontal das linhagens/cultivares de feijão e a agressividade dos isolados de *S. sclerotiorum*. Foram utilizadas as médias ajustadas, os graus de liberdade e os quadrados médios dos erros fornecidos pelos resultados, obtidos da análise agrupada, a qual permitiu a obtenção do dialelo parcial e, conseqüentemente, das estimativas da capacidade geral de resistência (CGR), da capacidade geral de agressividade (CGA) e da capacidade específica de interação (CEI), por meio de modificação do modelo IV de griffing (1956) utilizando o programa estatístico R.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio das análises de variância individuais, foi constatado que as linhagens apresentaram comportamento distinto ( $p < 0.10$ ) quando inoculadas com a maioria dos isolados (Tabela 3). Os coeficientes de variação (CV) para a reação das linhagens aos isolados foram, inferior a 21%, o que evidencia boa precisão experimental. As reações médias das linhagens quando inoculadas com os diferentes isolados oscilaram entre 2,15 (isolado 7/S2) a 5,31 (isolado 4/S2), com média geral de 4,18 refletindo o alto potencial de agressividade de alguns isolados e baixo potencial de outros. Os dois isolados comuns em ambas as safras (isolados 4 e 5) apresentaram comportamento semelhante. A reação média das linhagens ao isolado 4 na safra das águas (isolado 4/S1) foi 5,24 e na safra da seca (isolado 4/S2) foram semelhantes, 5,31 e a reação média das linhagens ao isolado 5 na primeira safra (isolado 5/S1) foi 3,87 e na segunda safra (isolado 5/S2) foi de 3,75. Não houve diferença significativa na reação das linhagens quando inoculadas com os isolados 5, 9 e 10 (Tabela 3).

Tabela 3 Resumo das análises de variância individuais da reação de treze cultivares/linhagens ao mofo branco, quando inoculadas com seis isolados nas safras das águas 2009/2010 (S1) e seis isolados na safra de seca (S2)

Isolados	QM	Pr≤F	Médias	CV(%) <sup>1</sup>
Isolado 1/S1	0,41	0.00**	2,45 c	13,8
Isolado 2/S1	2,57	0.00**	4,49 a	15,5
Isolado 3/S1	1,59	0.04*	5,10 a	16,5
Isolado 4/S1	1,97	0.01*	5,24 a	15,6
Isolado 5/S1	0,69	0.14 <sup>NS</sup>	3,87 b	16,8
Isolado 6/S1	0,80	0.03*	3,94 b	14,6
Isolado 4/S2	2,15	0.05*	5,31 a	19,0
Isolado 5/S2	0,75	0.13 <sup>NS</sup>	3,75 b	17,7
Isolado 7/S2	0,06	0.00*	2,15 c	5,29
Isolado 8/S2	0,74	0.07*	4,63 a	13,1
Isolado 9/S2	0,98	0.48 <sup>NS</sup>	4,78 a	20,7
Isolado 10/S2	0,70	0.33 <sup>NS</sup>	4,43 a	17,2

\*\*\*, \* significativo a 1% e a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. <sup>1</sup> Médias seguidas de letras iguais pertencem ao mesmo agrupamento de acordo com o teste Scott Knott, a 10% de probabilidade.

Por meio da análise de variância conjunta dos isolados por safra, pode-se observar, que houve diferença significativa entre as cultivares/linhagens em ambas as safras (Tabela 4), indicando que elas possuem diferentes alelos de resistência. Houve também diferença significativa entre os isolados, comprovando a existência de diferença genética ou diferentes alelos de agressividade dos isolados de *S. sclerotiorum*. Identificar o isolado mais agressivo é importante para estudos de avaliação de fontes de resistência a este fitopatógeno, podendo discriminar melhor os tratamentos (Yan e Kang, 2003). A

avaliação permite também identificar fontes de resistência aos diferentes alelos de agressividade dos isolados.

O efeito da interação isolados por linhagens foi significativo apenas na safra das águas 2009/2010, além de ter sido de menor magnitude especialmente em relação ao efeito de isolados. Portanto, os resultados sugerem que a resistência do feijão ao mofo branco é do tipo horizontal de acordo com Parlevliet (1981). Segundo esse autor a resistência horizontal caracteriza-se desde a ausência de interação patógenos por hospedeiros até a ocorrência de interação de pequena magnitude devido às variações nos níveis de agressividade das raças e de resistência dos hospedeiros.

Adicionalmente, o fato da *S. sclerotiorum* infectar mais de 400 espécies de plantas (Boland e Hall, 1994) é também um dos fatores que indicam que a resistência deve ser horizontal. Isto é, esse patógeno é menos evoluído em comparação com outros que já estabeleceram interação patógeno-hospedeiro mais específica, como interação gene-a-gene (Robison, 1996). Vale lembrar que a resistência horizontal é controlada por alguns genes de maior efeito e os genes modificadores (Parlevliet, 1981). Aliado ao fato de vários QTL's já terem sido identificados como regiões genômicas que conferem resistência ao mofo branco (Miklas et al., 2001a; Kolkman e Kelly, 2003; Ender e Kelly, 2005; Miklas, 2007), todos esses fatores indicam que a resistência ao mofo branco deve ser horizontal.

Tabela 4 Resumo da análise de variância conjunta da reação das cultivares/linhagens de feijão aos isolados do fungo, na safra das águas 2009/2010 e na safra de seca 2010

FV	Safra das águas 2009/2010			Safra de seca 2010	
	GL	QM	Pr ≤ F	QM	Pr ≤ F
Isolados (I)	5	40,61	<,0001	48,55	<,0001
Blocos/Isolados	12	1,68	<,0001	1,20	0,0195
Linhagens (L)	12	3,35	<,0001	1,92	0,0002
I x L	60	0,94	0,0003	0,69	0,1738
Erro	144	0,46		0,57	
		CV(%) = 16,1		CV(%) = 18	
		Média = 4,18		Média = 4,17	

Por meio da análise de variância agrupada, considerando as duas safras, pode-se observar diferença altamente significativa entre as linhagens, isolados, interação isolados x linhagens (Tabela 5). Pode-se inferir que o êxito na classificação das linhagens quanto à reação aos diferentes isolados e a detecção de interações foi dependente do isolado utilizado e da época de inoculação. Kull et al. (2003) relataram que a classificação das linhagens foi influenciada pelo isolado utilizado, pela técnica de inoculação e pelo tipo de análise estatística utilizados.

A partir da interação significativa safras x linhagens, pode-se inferir que a classificação das linhagens não foi coincidente durante as safras de avaliação, isso pode ser confirmado a partir das médias das linhagens apresentadas nas tabelas 6 e 7, sendo que na safra das águas (safra 1), a linhagem 13 foi a mais resistente e a linhagem 11 a mais suscetível, já na safra de seca (safra 2) a linhagem 8 foi a mais resistente e a 9 a mais suscetível. Entretanto, essa interação não deve ser de grande magnitude, uma vez que a correlação entre a

reação média das linhagens aos diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, nas duas safras, foi relativamente alta (64%). A resposta diferente entre safras pode resultar da sensibilidade do método de avaliação às ligeiras mudanças nas condições ambientais. Confirma que o controle genético da patogenicidade é também controlado por vários genes. Isso indica que as médias tanto do hospedeiro quanto do patógeno são os melhores indicativos para a escolha dos promissores para o melhoramento visando resistência. Em contrapartida, Pascual et al. (2010) inoculando 11 acessos de feijão com quatro isolados de *S. sclerotiorum*, não revelaram diferenças significativas para os efeitos principais de genótipo, isolado, safra e/ou a interação linhagens x isolados.

Tabela 5 Resumo da análise de variância agrupada da reação das cultivares/linhagens de feijão aos isolados do fungo considerando a safra das águas 2009/2010 e seca 2010

FV	GL	QM	Pr ≤ F
Safras (S)	1	0,02	0,8391
Linhagens (L)	12	3,63	0,0001
Isolados (I)	9	49,49	0,0001
Bloco/S/I	25	1,40	0,0001
I x L	108	0,83	0,0010
S x L	12	1,22	0,0065
Erro	300	0,52	

CV = 17,1%

Média = 4,18

A reação média de cada linhagem representa o seu efeito médio quando inoculada com os isolados. Dessa forma, as linhagens que apresentaram maior nível de resistência fisiológica ao mofo branco foram a 8 (3.74 e 3.62), 12 (3.81

e 3.75), 3 ( 3.79 e 3.86), e 13 (3.55 e 4.13) (Tabelas 6 e 7), ou seja, as linhagens que apresentaram os menores valores na reação média aos isolados utilizados. Em contrapartida, as linhagens que apresentaram o menor nível de resistência foram a 11 (4.90 e 4.26), 1 (4.77 e 4.44), 5 (4.50 e 4.56) e 9 (4.34 e 4.78), maiores notas médias de reação das linhagens quando inoculadas com os diferentes isolados (Tabela 6 e 7). Merece destaque a linhagem 3 derivada de retrocruzamento para a resistência ao mofo branco e que agrega também resistência a antracnose (alelo Co4<sup>2</sup>). Adicionalmente, as linhagens ESAL 550 (12) e CNFRJ 10564 (8), de origem andina, confirmam a sua resistência.

O efeito médio de um dado isolado representa a sua agressividade média quando inoculado em todas as linhagens. Dentre os isolados, o 3 (5.10) e 4 (5.24) na safra 1 (safra das águas 2009/2010) e 4 (5.31) e 9 (4.77) na safra 2 (safra de seca 2010), foram os mais agressivos quando inoculados em um grupo de treze linhagens de feijão. Sendo os isolados 1 (2.45) da safra 1 e o isolado 7 (2.15) da safra 2 os isolados menos agressivos (Tabela 6 e 7). Pode-se inferir, a partir da reação média das linhagens, quando inoculadas com os dois isolados comuns 4 e 5, que a classificação dos isolados foi coincidente nas duas safras de avaliação, sendo o isolado 4 mais agressivo que o isolado 5. Vale destacar os isolados 3 e 4, derivados de Goiânia, como os mais agressivos.

Tabela 6 Reação de resistência ao mofo branco de treze linhagens de feijão quando inoculadas com seis diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, reação média das linhagens aos diferentes isolados e da agressividade média dos isolados quando inoculados nas diferentes linhagens, na safra das águas 2009/2010

Linhagens	Isolados						Reação
	ISO1	ISO2	ISO3	ISO4	ISO5	ISO6	resistência <sup>1</sup>
1 - RC2-G122-72	2.42	5.75	5.19	6.24	4.83	4.20	4.77 a
2 - RC2-G122-67	2.25	4.52	5.61	5.62	4.13	2.87	4.17 b
3 - RC2-G122-89	2.42	4.38	4.67	4.00	3.35	3.93	3.79 b
4 - RC2-G122-92	2.14	4.95	5.54	5.44	3.64	3.60	4.22 b
5 - BRS - Cometa	2.51	5.14	5.29	5.71	4.23	4.13	4.50 a
6 - VC-16	2.14	3.62	5.21	5.38	3.65	3.73	3.96 b
7 - Majestoso	2.53	3.05	4.71	5.05	4.32	3.98	3.94 b
8 - CNFRJ10564	3.44	3.62	4.00	3.81	3.45	4.13	3.74 b
9 - Talismã	2.46	4.47	5.87	4.95	4.41	3.87	4.34 a
10 - RP-2	2.04	5.48	5.75	6.14	4.02	4.67	4.68 a
11-MA-IV-18-266	2.42	5.95	6.25	6.37	3.53	4.87	4.90 a
12 - ESAL 550	2.89	3.57	4.13	4.95	3.37	3.93	3.81 b
13 - CNFC 9506	2.21	3.81	4.09	4.48	3.39	3.33	3.55 b
Agressividade							
média	2.45 c	4.49 b	5.10 a	5.24 a	3.87 b	3.94 b	...

<sup>1</sup> Teste de agrupamento de médias pelo método do teste Scott Knott (1974), a 10% de probabilidade.

Tabela 7 Reação de resistência ao mofo branco de treze linhagens de feijão quando inoculadas com seis diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, reação média das linhagens aos diferentes isolados e da agressividade média dos isolados quando inoculados nas diferentes linhagens, na safra das secas 2010

Linhagens	Isolados						Reação resistência <sup>1</sup>
	ISO4	ISO5	ISO7	ISO8	ISO9	ISO10	
1 - RC2-G122-72	5.38	3.54	2.21	4.67	5.55	5.26	4.44 a
2 - RC2-G122-67	5.47	3.93	2.14	4.95	4.98	4.14	4.27 a
3 - RC2-G122-89	5.52	3.28	2.05	4.32	4.20	3.80	3.86 b
4 - RC2-G122-92	5.96	3.56	2.11	4.36	5.26	4.32	4.26 a
5 - BRS - Cometa	5.40	4.56	2.10	5.74	5.02	4.54	4.56 a
6 - VC-16	5.69	4.03	2.05	4.21	5.22	4.06	4.21 b
7 - Majestoso	4.85	3.68	2.24	4.32	3.90	4.35	3.89 b
8 - CNFRJ10564	4.23	3.41	2.12	4.15	4.04	3.75	3.62 b
9 - Talismã	7.00	4.91	2.15	5.32	4.26	5.05	4.78 a
10 - RP-2	5.71	3.51	2.07	4.72	4.64	4.73	4.23 a
11-MA-IV-18-266	5.23	3.21	2.00	4.97	5.67	4.47	4.26 a
12 - ESAL 550	3.43	3.77	2.58	4.21	4.52	4.02	3.75 b
13 - CNFC 9506	5.22	3.38	2.08	4.24	4.79	5.04	4.13 a
Agressividade							
média	5.31 a	3.75 c	2.15 d	4.63 b	4.77 b	4.43 b	...

<sup>1</sup> Teste de agrupamento de médias pelo método do teste Scott Knott (1974), a 10% de probabilidade.

## 4 GGE BILOT

Para facilitar a visualização da interação das linhagens de feijão quando inoculadas com os diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, o nível de resistência das linhagens e da agressividade dos isolados, utilizou-se o método do GGE biplot (Yan et al., 2000). Para se obter um biplot bidimensional, apenas dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram utilizados, enquanto os demais foram considerados como resíduos.

### 4.1 Classificação das linhagens/cultivares quanto à resistência ao mofo branco

Na análise gráfica por meio do GGE biplot, as linhas que ligam a origem às coordenadas das linhagens referem-se aos vetores das respectivas linhagens. Vetores de maior comprimento indicam que as linhagens apresentam maior magnitude de resistência a um ou mais isolados, enquanto que vetores de menor comprimento (próximo à origem) podem ou não indicar que as linhagens apresentam baixa magnitude de resistência ao mofo branco, dependendo de quanto da variação contida na matriz original é explicada pelo biplot (Yan e Tinker, 2005). A reação ao mofo branco é realizada mediante a um escala diagramática de nota de 1 (plantas sem sintomas) a 9 (planta morta), portanto as plantas com o maior nível de resistência são aquelas que possuem o menor valor de PC1. Desse modo, pode-se inferir, a partir da figura 1A, que as linhagens CNFRJ10564 (8), ESAL 550 (12), CNFC 9506 (13), RC2-G122-89 (3) e Majestoso (7) foram as mais resistentes aos seis isolados de *S. sclerotiorum* da primeira safra, essas linhagens classificadas com maior nível de resistência pertenceram a dois grupos: 8, 12 e 3; 13 e 7 o que significa que eles possuem

grupos diferentes de alelos de resistência. Já as linhagens 1, 5, 10 e 11 e as linhagens 2, 4, 6 e 9 (figura 1 A), apresentam padrão de resistência semelhante e provavelmente possuem menor número de alelos de resistência a esse patógeno. No total, as linhagens foram agrupadas em quatro grupos quando inoculadas com os seis isolados na primeira safra de avaliação. O grupo de linhagens 11, 10, 1 e 5 foram as mais suscetíveis, esse resultado foi semelhante ao observado na Tabela 6, indicando que os efeitos da reação das linhagens aos isolados foram bem representados no biplot, pois os valores dos dois componentes principais explicaram 74.4% da variação (PC1=54% e PC2 =20.4%).

A partir dos dados da safra de seca/2010, a análise gráfica por meio do GGE biplot, permitiu inferir que as linhagens 12, 8, 7 e 3 foram as mais resistentes aos seis isolados de *S. sclerotiorum* e que as linhagens 2, 5 e 9 foram as mais suscetíveis. Esse resultado foi coerente ao observado na Tabela 7, indicando que os efeitos da reação das linhagens aos isolados foram bem representados no biplot (figura 1B), sendo PC1 (43.4%) e PC2 (22.9%) responsáveis por 66.3% da variação total deve-se aos dois primeiros componentes principais. O grupo mais resistente e o mais suscetível foram coincidentes com os resultados da figura 1A, confirmando a composição de resistência dos mesmos.

Algumas das linhagens pertenceram a diferentes grupos nas duas safras de avaliação quando inoculadas com isolados diferentes, isso se deve ao efeito da interação safras x linhagens e da interação isolados x linhagens, indicando que as linhagens/cultivares apresentam expressão diferencial de acordo com a safra e/ou grupos de isolados. No entanto, as progênies caracterizadas como as mais resistentes tiveram reação similar em ambas as safras, quando inoculadas com os diferentes isolados. Isso é indicativo de que a interação é do tipo simples, ou seja, embora houvesse a presença da interação, essa não alterou de forma

expressiva a classificação das linhagens quando inoculadas com os diferentes isolados nas duas safras de avaliação e confirma a resistência do tipo horizontal.

Considerando a reação das treze linhagens aos dez isolados inoculados nas duas safras, confirmou-se o maior nível de resistência das linhagens divididas em dois grupos: 12 e 7; 8, 3 e 13, com destaque para as linhagens 8 e 12 e dois grupos de linhagens suscetíveis 1, 2, 5 e 9; 4, 6, 10 e 11 (figura 3A). Os efeitos da reação das linhagens aos isolados foram parcialmente representados no biplot (figura 3A), com PC1 responsáveis por 43,1% e PC2 por 15,2% da variação total.

É interessante salientar que as cultivares 8(CNFRJ10564) e 12 (ESAL 550) são de origem andina e são as que apresentaram maior nível de resistência aos isolados em ambas as safras de avaliação, comprovando o maior nível de resistência no pool gênico andino. Poucas cultivares com altos níveis de resistência fisiológica ao mofo branco foram descritas em feijoeiro (Pascal et al., 2010).

O GGE biplot também permite inferir sobre a contribuição de cada linhagem com a interação isolados x linhagens, ou seja, inferir sobre a estabilidade da reação de cada linhagem quando inoculada com diferentes isolados. Para isso, foi representado no biplot um ponto (círculo) definindo como o isolado médio (média das coordenadas dos isolados para o PC1 e PC2) (figura 2A e 2B). A reta que passa pela origem do biplot e o marcador do isolado médio é denominada de eixo do isolado médio (EIM) dos respectivos isolados (Yan et al., 2001). A reta que é perpendicular ao EIM e que passa pela origem do biplot é denominada de ordenada do isolado médio (OIM). A projeção dos vetores das linhagens sobre a EIM mede a resistência média e a projeção dos vetores das linhagens sobre a OIM mede a contribuição dessas linhagens para a interação linhagens x isolados. Dessa forma, pode-se observar que as linhagens que mais contribuíram com a interação foram: as linhagens 8, 12 e 2 na primeira

safra de avaliação (figura 2A) e as linhagens 12, 11, 7 e 8 na segunda safra de avaliação (figura 2B). Vale frisar que, embora as duas linhagens 12 e 8 apresentassem o maior nível de resistência em ambas às safras, elas são muito instáveis quando inoculadas com diferentes isolados de *S. sclerotiorum*.

Os isolados situados próximo ao círculo, definindo como o isolado médio na EIM são os mais eficientes para discriminar as linhagens/cultivares quanto a resistência ao mofo branco, assim os isolados 4, 3 e 2 da primeira safra (figura 2A) e os isolados 10, 4 e 8 (figura 2B) da segunda safra são os mais recomendados na discriminação das linhagens/cultivares de feijão quanto a resistência ao mofo branco. Porém, na análise de variância individual por isolados (tabela 3) as linhagens não foram significativamente diferentes quando inoculadas com o isolado 10, portanto, cuidado deve ser tomado quando na seleção de isolados eficientes para discriminar as linhagens/cultivares.

#### **4.2 Agressividade dos isolados**

Quando o objetivo é avaliar a agressividade dos isolados, deve-se levar em consideração o comprimento dos vetores dos respectivos isolados em relação ao primeiro componente principal (PC1). Vetores de maior comprimento indicam que o isolado possui alta agressividade quando inoculado em uma ou mais linhagens. Os isolados 4, 3 e 2 foram os isolados mais agressivos quando inoculados no grupo das 13 linhagens/cultivares na safra 1 (figura 4), sendo os três isolados pertencentes a diferentes níveis de agressividade, uma vez que estão contidos em diferentes polígonos do biplot, ou seja, esses três isolados possuem diferentes alelos de agressividade. Dentre os isolados da segunda safra, o isolado 4, pertencente a um grupo, e os isolados 8, 9 e 10 pertencente a outro grupo, são os mais agressivos quando inoculados nas treze linhagens de feijão (figura 5).

Os isolados que mais contribuíram com a interação foram: os isolados 6, 2, 5 e 4 na primeira safra (figura 4) e os isolados 4 e 9 da segunda safra (figura 5). Dentre os isolados mais instáveis estão os mais agressivos como o isolado 4 e 2 da primeira safra e o 4 e o 9 da segunda, contribuindo com a interação isolados x linhagens observada na análise agrupada (tabela 5). A fim de discriminar melhor as linhagens/cultivares sem alteração na sua classificação recomenda-se utilizar um isolado com alto nível de agressividade, porém estável, como por exemplo, o isolado 3 na safra 1, que tem nível de agressividade similar ao do isolado 4 e alta estabilidade (figura 4).

Os dez isolados de *S. Sclerotiorum* inoculado em 13 linhagens/cultivares de feijão nas duas safras de avaliação foram agrupados em três grupos de acordo com a similaridade do nível de agressividade (figura 6). Sendo dois grupos de isolados com maior nível de agressividade: grupo A - 4/S1, 9, 2 e 6 e grupo B - 4/S2, 3, 1, 10, 8, 5/S1 e 5/S2 com valor similar de PC1, porém diferentes alelos de agressividade. No entanto, o isolado 4 usado em ambas as safras pertenceram a grupos de agressividade diferente, isso explica a presença da interação significativa entre isolados x linhagens, por esse motivo recomenda-se avaliar a interação entre isolados x linhagens em mais de uma safra, uma vez que essa interação é dependente da safra de avaliação, como mencionado por Yan e Kang (2002). Contudo, o isolado 5, também avaliado em ambas as safras, apresentou valor de PC1 e PC2 similar nas duas avaliações. Isso se deve a alta estabilidade do isolado 5 quando inoculado nas 13 linhagens (figura 6). Como mencionado anteriormente, é importante considerar não apenas a agressividade dos isolados, mas também a sua estabilidade para a avaliação das linhagens/cultivares. Portanto, entre os 10 isolados avaliados o mais recomendado é o isolado 3, pois este possui alto nível de agressividade e alta estabilidade (figura 6B).

Os isolados 8 e 10 possuem os mesmos alelos de agressividade uma vez que se encontram próximos no biplot, apesar de originarem-se de diferentes

locais de Minas Gerais (figura 6). Já os isolados 7 e 8, apesar de derivados de mesma região são geneticamente diferentes. Alguns autores (Abreu, 2011; Gomes et al., 2011) relataram a existência de grande variabilidade entre e dentro de populações de *S. sclerotiorum* em pequenas áreas geográficas. Diante de toda essa variabilidade existente nas populações desse patógeno, a busca de linhagens/cultivares resistente se torna cada vez mais desafiante, sendo importante avaliar a resistência das linhagens/cultivares à vários isolados do patógeno, a fim de selecionar linhagens/cultivares que possuem alelos de resistência aos isolados presentes naquela determinada região.

As linhagens/cultivares mais eficientes para discriminar os isolados da safra 1 são: a 10, 11, 6, 3 e 7 (figura 4); na safra 2 as linhagens: 13 e 2 (figura 5); e quando todos os dez isolados são plotados juntos as linhagens 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 13 (figura 6) foram eficientes para discriminar as linhagens/cultivares, isso pode ser afirmado devido ao fato dessas linhagens estarem próximas ao círculo, que corresponde ao efeito médio de linhagens (média das coordenadas das linhagens para o PC1 e PC2).

As informações obtidas sobre a agressividade dos isolados são mais fidedignas comparadas à reação das linhagens aos diferentes isolados avaliados, uma vez que, o biplot das reação das linhagens explicaram de 58.3% a 74.4% da variação total foram explicadas pelos PC1 e PC2 (figura 3 e 2A), já para a agressividade o biplot explicou de 88.2% a 94.6% (figura 6 e 5) da variação total desse caráter, indicando que os dois primeiros componentes principais explicaram uma parcela significativa da variação deste caráter. Trabalhos na literatura ressaltam que para as interpretações serem feitas corretamente é necessário que a variação presente na matriz de dados esteja bem representada no biplot, especialmente nos primeiros componentes principais que retêm a maior parte da variação ( Yan et al., 2007; Yan et al., 2009). No entanto, embora os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) não explicaram a

totalidade da variação para a reação das linhagens, os resultados concluídos a partir do biplot foram similares aos obtidos nas análises de variância mencionada anteriormente.

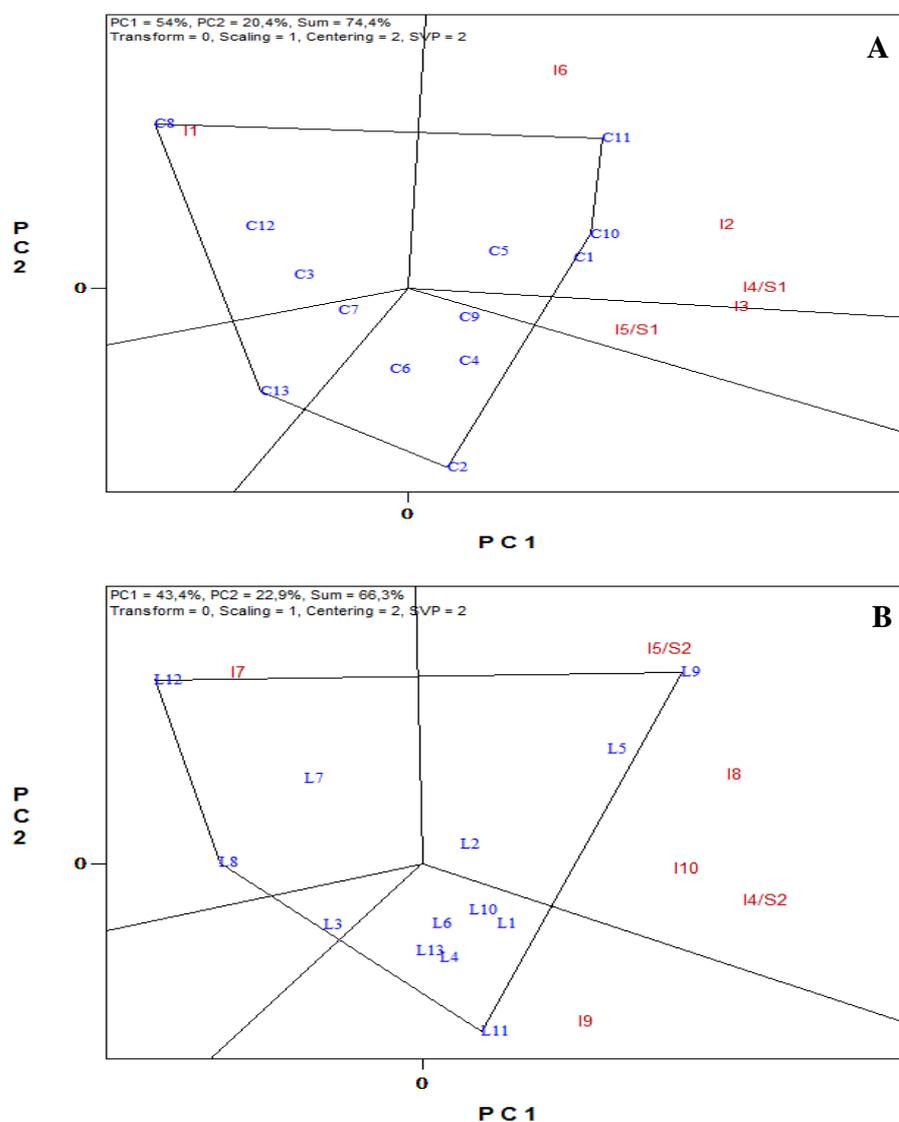


Figura 1 (A) Avaliação da resistência de treze linhagens de feijão na safra das águas 2009/2010 a seis isolados de *S. sclerotiorum*. PC1=54% e PC2=20.4%, correspondendo a 74.4% da variação total; (B) Avaliação da resistência de treze linhagens na safra da seca 2010 a seis isolados de *S. sclerotiorum*

Nota: PC1=43.4% e PC2=22.9%, correspondendo a 66.3% da variação total.

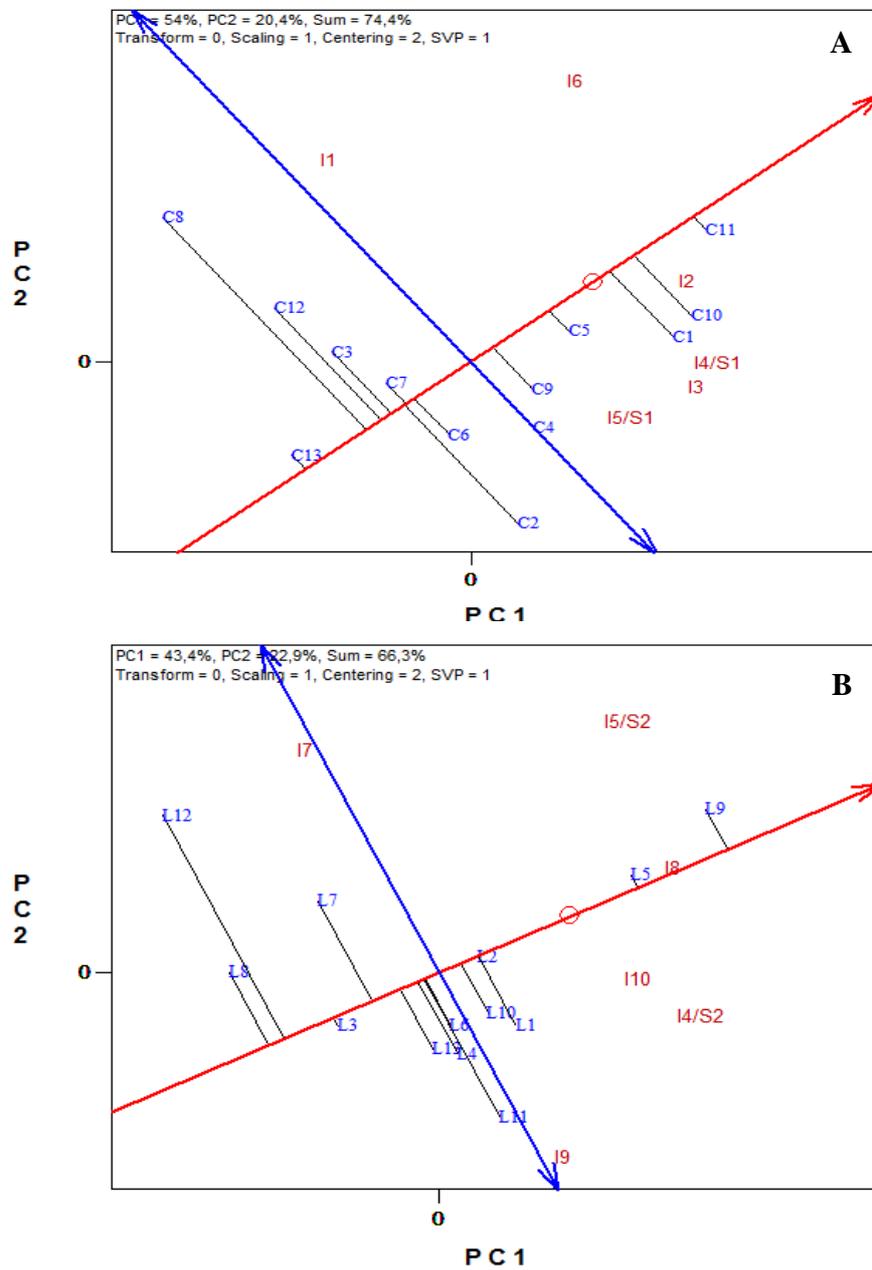


Figura 2 Estabilidade das 13 linhagens de feijão na safra das águas 2009/2010 (A) e na safra da seca 2010 (B) a seis isolados do fungo

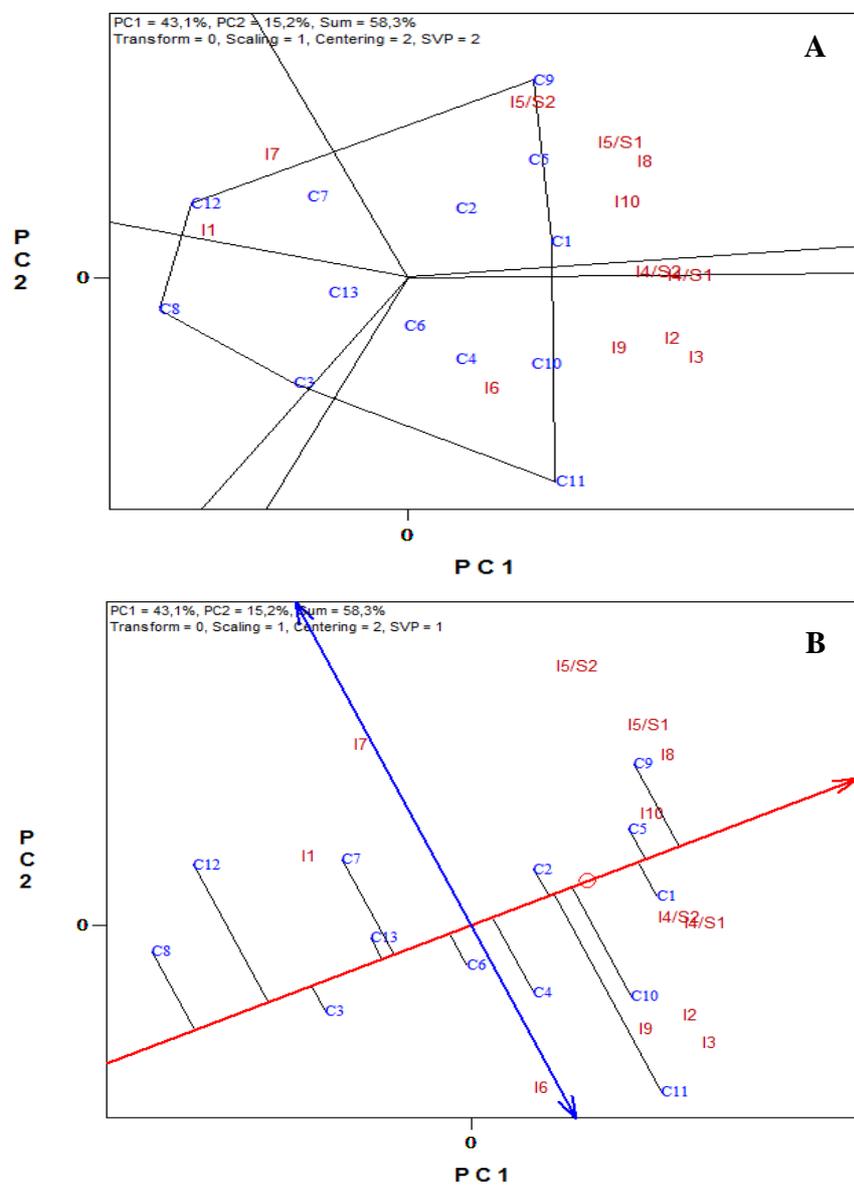


Figura 3 (A) Reação das de treze linhagens na safra das águas 2009/2010 e seca 2010 aos dez isolados de *S. sclerotiorum*; (B ) Estabilidade das treze linhagens quando inoculadas com os 10 isolados de *S. Sclerotiorum*

Nota: PC1=43.1% e PC2=15.3%; correspondendo a 58.3% da variação total.

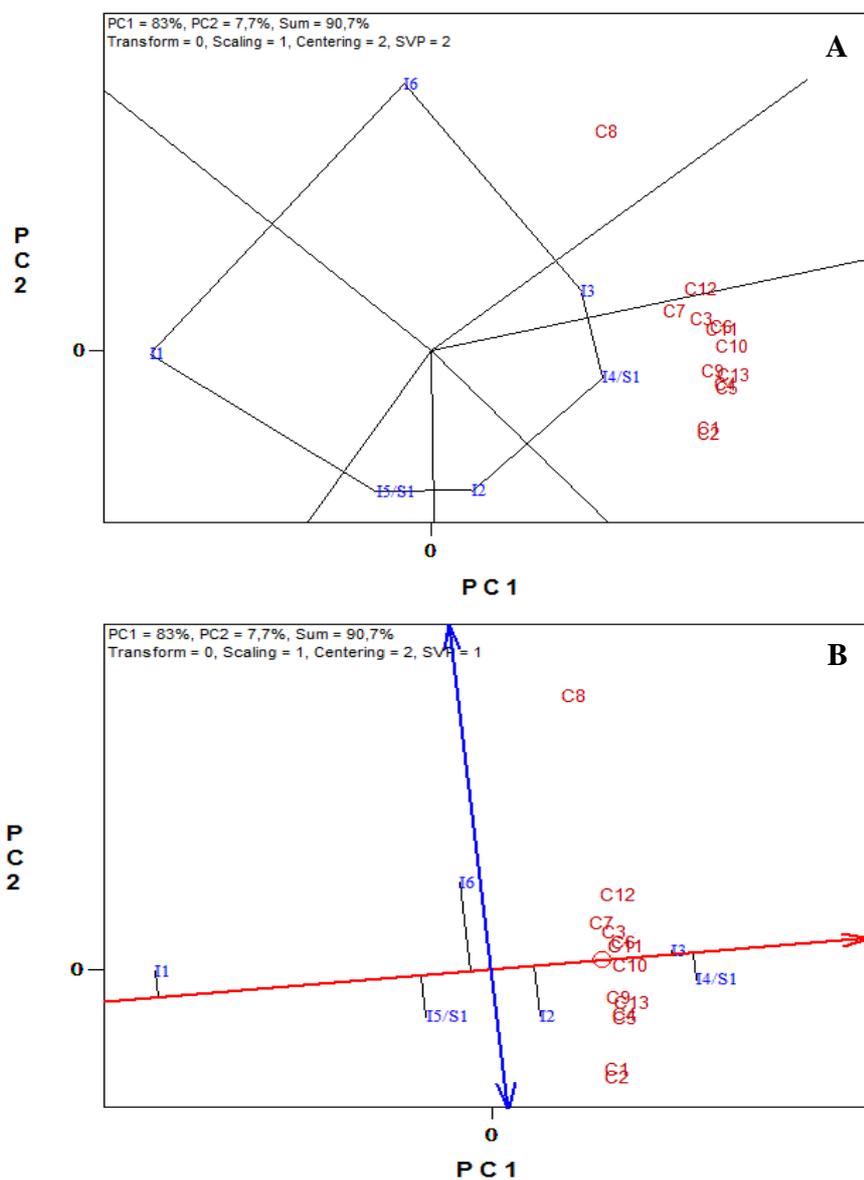


Figura 4 (A) Agressividade de seis isolados de *S. sclerotiorum* na safra das águas 2009/2010 quando inoculados em treze linhagens de feijão PC1=83% e PC2 = 7.7%; (B) Estabilidade dos seis isolados usados na safra das águas 2009/2010

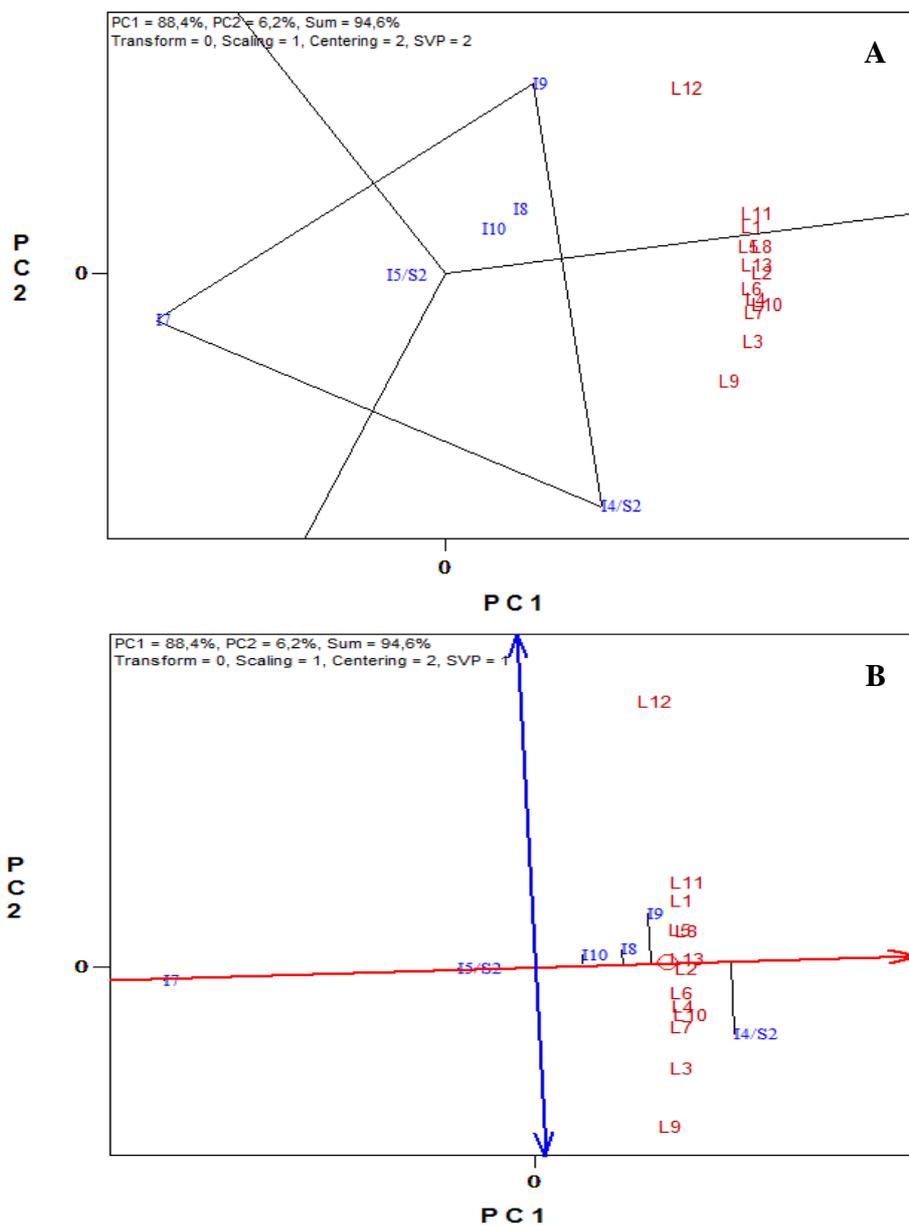


Figura 5 (A) Agressividade de seis isolados de *S. sclerotiorum* na safra da seca 2010 quando inoculados em treze linhagens de feijão PC1=88.4% e PC2 = 6.2%; (B) Estabilidade dos seis isolados usados na safra da seca 2010

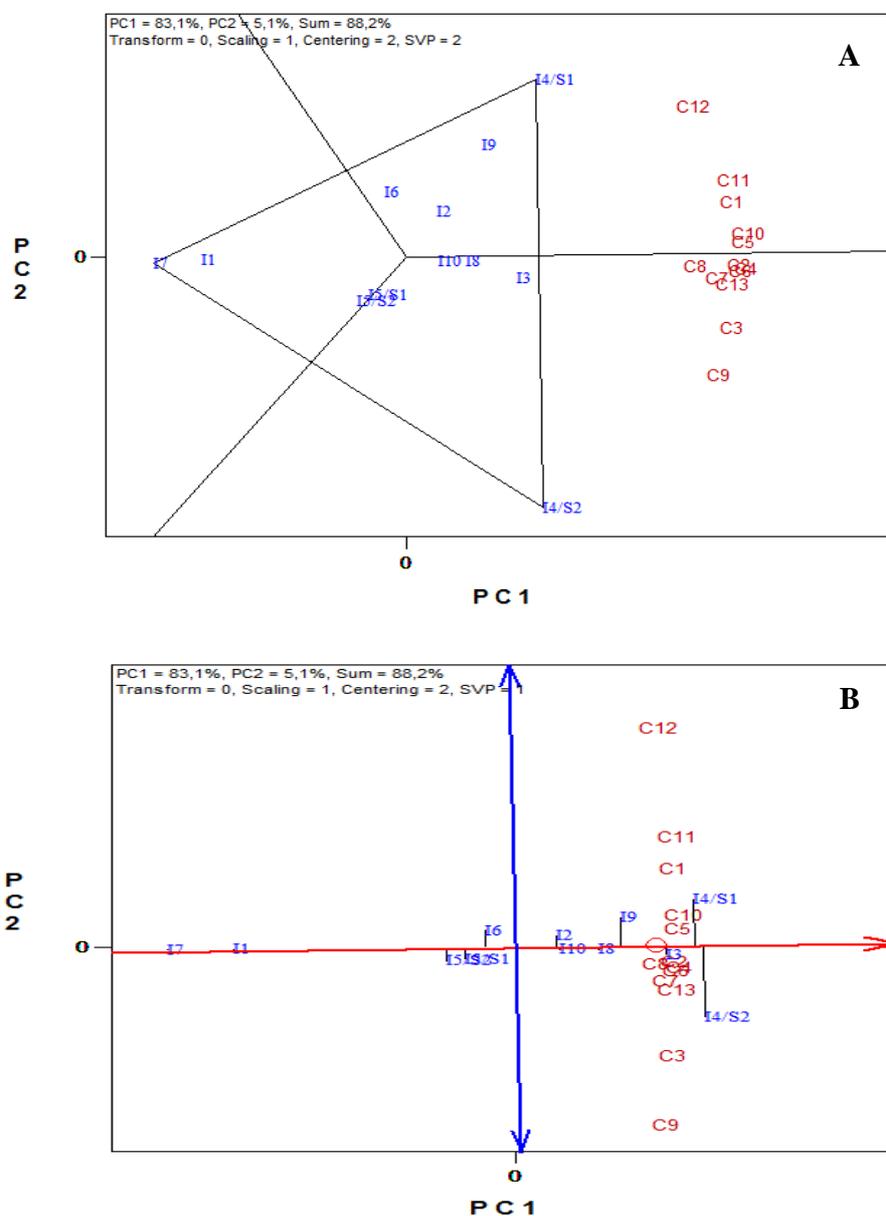


Figura 6 (A) Agressividade dos 10 isolados de *S. Sclerotiorum* quando inoculado nas 13 linhagens/cultivares de feijão; (B) Estabilidade dos dez isolados

Nota: PC1=83.1% e PC2=5.1%, correspondendo a 88.2% da variação total.

### 4.3 Análise dialélica

A partir das médias obtidas nas análises de variância agrupada foi realizada a análise dialélica por meio do modelo IV de Griffing (1956), de acordo com o método proposto por Melo e Santos (1999). Segundo esses autores, o método permite, de maneira simples, informar sobre a existência de resistência vertical e horizontal dos hospedeiros e também sobre a virulência e agressividade dos patógenos.

O resumo da análise dialélica envolvendo as treze linhagens/cultivares de feijão e os 10 isolados de *S. sclerotiorum* é apresentado na Tabela 8. Verifica-se que todas as fontes de variação foram significativas ( $P < 0.05$ ). Analisando os desdobramentos das fontes de variação, observa-se que a maior parte da variação total é explicada pela capacidade geral de agressividade (CGA) e pouco deve-se ao efeito capacidade geral de reação (CGR). Houve diferença significativa entre capacidade específica de interação (CEI), o que a primeira vista sugere a presença da resistência vertical no controle do caráter, porém em baixa magnitude. Resultado semelhante foi também observado pela interação significativa entre isolados x linhagens na análise agrupada (Tabela 5). Entretanto, a presença de interação de pequena magnitude também é típica de resistência horizontal, sendo a CGA e a CGR responsáveis pela maior parte da variação total (Tabela 8). Além disso, o fato de o fungo *S. sclerotiorum* possuir várias espécies hospedeiras também é indício de que interação patógenos por hospedeiros é não específica.

Tabela 8 Análise dialélica para reação das treze linhagens/cultivares, inoculados com 10 isolados de *S. sclerotiorum*

FV	GL	QM	Pr ≤ F
Cruzamentos	179		
CGR (RH)	12	3.63	0.0001
CGA (AH)	9	48.21	0.0001
CEI (RV)	108	0.79	0.0239
Erro	308	0.58	
Média	4.10		

As linhagens diferiram quanto às estimativas da capacidade geral de reação (gi), variando de - 0.433 (linhagem 8) a 0.4729 (linhagem 11), sendo 76.9% das estimativas significativas (Tabela 9). As linhagens mais resistentes, ou seja, aquelas com menores estimativas de gi's foram 8, 12, 13 e 3 e as mais suscetíveis foram as linhagens 11, 1 e 5. As estimativas para capacidade geral de agressividade (gj's) informam sobre a agressividade dos isolados, e estas variaram entre -1.96 (isolado 7), isolado menos agressivo a 1.17 (isolado 4), isolado mais agressivo (Tabela 9). Somente para o isolado 6 não houve diferença significativa da CGA.

Tabela 9 Estimativas da capacidade geral de reação (gi) das linhagens/cultivares de feijão quando inoculados com diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e da capacidade geral de agressividade (gj) dos isolados de *S. sclerotiorum* quando inoculados em diferentes linhagens/cultivares

Linhagens/isolados	gi	gj
1	0.4207**	-1.6525**
2	-0.0010 <sup>NS</sup>	0.3818**
3	-0.3190**	0.9965**
4	0.0539 <sup>NS</sup>	1.1736**
5	0.3376**	-0.2935**
6	-0.1429 <sup>NS</sup>	-0.1623 <sup>NS</sup>
7	-0.3012**	-1.9588**
8	-0.4338**	0.5256**
9	0.3038**	0.6683**
10	0.2747**	0.3213**
11	0.4729**	
12	-0.3444**	
13	-0.3216**	

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Do total de 130 combinações entre isolados x linhagens, apenas 9.23% foram significativas para a capacidade específica de interação (CEI), isso indica mais uma vez ausência da resistência vertical. Por esse método é também possível ver a estabilidade de cada uma das linhagens e dos isolados. Dentre as linhagens mais instáveis estão a 8, 11 e 12, resultado similar ao observado pelo método do GGE; e dentre os isolados o 2 e o 1 foram os mais instáveis, no entanto pelo método do GGE o isolado 4 foi o mais instável, o isolado 1 muito estável e o isolado 2 parcialmente estável (figura 5).

Os três métodos mostraram-se eficientes na avaliação da resistência de linhagens/cultivares de feijão ao mofo branco e da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum*. Tanto o GGE quanto o dialelo foram eficientes em indicar as linhagens mais e menos resistentes e também os isolados mais e menos agressivos. Entretanto, o GGE e o dialelo permitem uma análise mais detalhada explicando principalmente os casos da interação linhagens por isolados.

Muitos programas de melhoramento possuem como fonte de resistência ao mofo branco as linhagens: 'ICA Bunsí, G122, NY6020-4, ou PC-50 (Miklas et al., 2001b; Miklas et al., 2004; Park et al., 2001; Schwartz et al., 1987). Com exceção do ICA Bunsí, a maioria das linhagens/cultivares com altos níveis de resistência ao mofo branco deriva do pool gênico andino (Miklas et al., 1999), um dos dois grandes grupos de origem do feijão (Gepts et al., 1986). Portanto, foi possível nesse trabalho identificar fonte de resistência ao mofo branco pertencente ao pool gênico mesoamericano, como já mencionado, onde poucas fontes são conhecidas. Entre elas uma cultivar já em uso, a Majestoso (7), e duas linhagens melhoradas RC2-G122-89 (3) e CNFC 9506 (13), as três com grãos tipo carioca, o preferido pelo consumidor brasileiro. Avaliar cultivares de feijão local é uma oportunidade para identificar novas fontes de resistência com utilidade específica para o desenvolvimento de cultivares melhorada resistente ao mofo branco para cada região, bem como um fator favorável para sua recomendação.

## 5 CONCLUSÕES

Há linhagens/cultivares de feijão, pertencentes ao pool gênico mesoamericano, com nível de resistência elevado e estável quando inoculados com diferentes isolados de *S. sclerotiorum*.

Há diferença na agressividade de isolados *S. sclerotiorum*, sendo possível selecionar os mais agressivos, estável e mais eficiente na discriminação das linhagens/cultivares.

As três métodos utilizados na avaliação da resistência de linhagens/cultivares de feijão ao mofo branco e na identificação da agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* são promissores.

## REFERÊNCIA

- ABREU, M.J. de. **Caracterização de isolados do agente causal do mofo branco do feijoeiro**. 2011. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 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**, v.7, n.3, p.733-740. 2008.
- BURDON, J.J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 664-669, 1997.
- CHASAN, R. Plant-pathogen encounters in Edinburgh - Meeting report. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1332- 1341, 1994.
- DAVIDE, L.M.; SOUZA, E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.9, n.1, p.23-30, 2009.
- ENDER, M.; KELLY, J.D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, v. 45, n. 6, p. 2482-2489, 2005.
- GEPTS, P., OSBORN, T. C., RASHKA, K., BLISS, F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany** v. 40, p. 451- 468. 1986.
- GRABRIEL, K.R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 453-467. 1971.
- KOLKMAN, J.M.; KELLY, J.D. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 42, p. 693-699, 2002.

KIM, H. S., HARTMAN, G. L., MANANDHAR, J. B., GRIEF, G. L., STEADMAN, J. R., and DIERS, B. W. Reaction of soybean cultivars to Sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science** v. 40, p. 665-669, 2000.

KIM, H. S., SNELLER, C. H., DIERS, B. W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to Sclerotinia stem rot in field environments. **Crop Science**. v. 39, p.64-68, 1999.

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

KULL, L. S., VUONG, T. D., HARTMAN, G. L., POWERS, K. S., ESKRIDGE, K. M., STEADMAN, J. R. Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease** v. 87, p.1471-1476, 2003.

LOBO Jr, M., NASSER, L.C.B. Mofó branco pode limitar o agronegócio da soja, feijão e girassol em áreas infestadas. **Informativo Agromen**, v. 4, n 20, p. 6-8, 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**. v. 39, p. 569-573. 1999.

MIKLAS, P.N.; JOHNSON, W.C.; DELORME, R.; RILEY, R.H.; GEPTS, P. Inheritance and QTL analysis of physiological resistance to white mold in common bean G122. **Crop Science**, v. 41, p. 309-315, 2001a.

MIKLAS, P. N., DELORME, R., JOHNSON, W. C., GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science**. v. 41, p. 309-315. 2001b.

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

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

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

NELSON, B. D., HELMS, T. C., OLSON, J. A. Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v. 75, p. 662-665, 1991.

PARK, S. O., COYNE, D. P., STEADMAN, J. R., SKROCH, P. W. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**. v. 41, p. 1253-1262. 2001.

PASCUAL, A., CAMPA, A., PÉREZ-VEGA, E., GIRALDEZ, R., MIKLAS, P. N., FERREIRA, J. J. Screening common bean for resistance to four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected in northern Spain. **Plant Disease**. v. 94, p. 885-890. 2010.

PARLEVLIET J.E. Disease resistance in plants and its consequences for plant breeding. In: **Frey KJ (ed) Plant breeding II**. The Iowa State University Press. 1981.

PASCUAL, A., CAMPA, A., PÉREZ-VEGA, E., GIRALDEZ, R., MIKLAS, P. N., FERREIRA, J. J.. Screening common bean for resistance to four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected in northern Spain. **Plant Disease**, v. 94, p.885-890. 2010

ROBINSON R.A. Return to resistance – Breeding Crops to Reduce Pesticide **Dependence**. Davis, ag Access, 480p. 1996.

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

SCHWARTZ, H. F., CASCIANO, D. H., ASENGA, J. A., WOOD, D. R. Field measurement of white mold effects upon dry beans with genetic resistance or upright architecture. **Crop Science**. v.27, p. 699-702. 1987.

TERÁN, H., SINGH, S. P. Gamete selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. **Euphytica**, v. 25, n. 3, p. 271-280. 2009.

PYROZINSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems**, v. 6, p. 153-164, 1975.

YAN, W.; TINKER, N. A. A biplot approach for investigating QTL-by-environment patterns. **Molecular Breeding**, v. 15, n. 1, p. 31-43, 2005.

YAN, W. AND KANG, S. M. Biplot Analysis of Host Genotype-by-Pathogen Strain Interactions In: GGE biplot analysis : a graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists, 2002.

WEGULO, S. N., YANG, X. B., and MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environmental studies. **Plant Disease**. v. 82, p. 1264-1270, 1998.

**ARTIGO 2 Seleção recorrente em feijão para resistência ao mofo branco**

Artigo redigido conforme a norma da revista *Plant Disease*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: 1) obter linhagens/progênes de feijão mesoamericana com alto nível de resistência fisiológica ao mofo branco, porte arbustivo e grão tipo carioca, utilizando a seleção recorrente; 2) Identificar se há possibilidade de maiores ganhos com a seleção e; 3) Identificar se a seleção recorrente é eficiente na obtenção de progênes com alto nível de resistência ao mofo branco. Foram inter cruzadas 12 linhagens: RP-2, MA-IV-18-266, BRS – Cometa, VC-16, Majestoso, CNFRJ10564, ESAL 550, RC<sub>1</sub>-G122-X, RC<sub>2</sub>-G122-Y, RC<sub>2</sub>-G122-Z, RC<sub>1</sub>-Ex Rico-X, A195, de origem mesoamericana e andina, que apresentaram alto nível de resistência ao ácido oxálico, para constituir a população base do primeiro ciclo de seleção recorrente (C0) visando a resistência ao mofo branco. Posteriormente as melhores progênes de cada ciclo foram inter cruzadas a fim de se obter o segundo ciclo e seleção (C1) e a partir do inter cruzamento das melhores do C1 obteve-se o terceiro ciclo (C2). As plantas com maior nível de resistência das populações base de cada um dos três ciclos de seleção foram selecionadas para formar a geração S<sub>0.1</sub>, posteriormente, as progênes mais resistentes foram selecionadas e autofecundadas para formar a geração S<sub>0.2</sub>, isso se procedeu até a geração S<sub>0.5</sub> no C0, S<sub>0.4</sub> no C1 e S<sub>0.3</sub> no C2. Os experimentos foram conduzidos no campo experimental da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. Foram utilizados o delineamento de látice e/ou de blocos casualizados. As progênes foram avaliadas, juntamente com duas testemunhas comuns, quanto à resistência ao mofo branco utilizando o procedimento do *Straw test*. A avaliação foi realizada mediante uma escala diagramática de 1(planta sem sintomas) a 9 (planta morta). Foram selecionadas as progênes mais resistentes, com base na nota média de resistência ao mofo branco, posteriormente avaliadas quanto ao tipo de grão e o porte. A partir das notas médias por parcela foram realizadas as análises de variância individuais por geração, entre geração dentro de cada ciclo e análise agrupada envolvendo todos os ciclos de seleção. Foi possível obter linhagens/progênes de feijão mesoamericanas com alto nível de resistência fisiológica ao mofo branco, porte arbustivo e grão tipo carioca, utilizando a seleção recorrente. A existência de variabilidade genética entre as progênes, para os três caracteres, evidencia a possibilidade de se obter sucesso com a seleção nas gerações e nos ciclos seguintes.

Palavras - chave: Seleção recorrente. Mofo branco. Ganho genético. Resistência de plantas. Melhoramento genético.

## ABSTRAT

This study aimed to: 1) obtain Mesoamerican bean lines with high physiological resistance level to white mold, upright habit and carioca grain type, using recurrent selection, 2) Identify whether there is a possibility of greater gains with selection and 3) Identify whether recurrent selection is efficient in obtaining lines with high resistance level to white mold. Twelve inbreed lines were intercrossed: RP-2, MA-IV-18-266, BRS-Cometa, VC-16, majestoso, CNFRJ10564, ESAL 550, RC1-G122-X, RC2-G122-Y, RC2-G122-Z, RC1-ExRico-X, A195, from Andean and Mesoamerican gene pool, to form the first cycle of recurrent selection base population (C0) for resistance to white mold. The best progenies of each cycle were intercrossed in order to obtain the second selection cycle (CI) and the best CI progenies were crossed to obtain the third cycle (CII). The plants with the highest level of resistance of the populations of each three selection cycles were selected to form a generation  $S_{0:1}$ , the best  $S_{0:1}$  progenies were selected and selfed to form a  $S_{0:2}$  generation, this happened up to the  $S_{0:5}$  generation in C0,  $S_{0:4}$  in CI and  $S_{0:3}$  in CII. The experiment was carried out at Federal University of Lavras experimental field. It was used the experimental lattice and/or randomized block design. The progenies were evaluated with two tester's lines to white mold resistance, using the straw test procedure. The evaluation was conducted using a diagrammatic scale from 1 (the plant without symptoms) to 9 (dead plant). The most resistant progenies were selected, based on resistance to white mold average score. The selected lines were evaluated for grain type and plant architecture. The individual analysis of variance by generation, between generation within each cycle and grouped analysis involving all cycles of selection were conducted. It was possible to obtain Mesoamerican beans progenies with high level of physiological resistance to white mold, carioca grain type and upright plants, using the recurrent selection method. There is genetic variability among the progenies for the three characters with possibility to obtain success through the selection subsequent cycles.

Keywords: Recurrent selection. White mold. Plant resistance. Plant breeding. Selection gain.

## INTRODUÇÃO

Resistência de plantas a doença é um caráter de grande importância em todo programa de melhoramento de plantas. O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é uma das mais devastadora e promíscua doença necrotróficas em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com ampla distribuição geográfica e mais de 400 espécies hospedeiras (Hartman et al., 1999).

Existem vários métodos de controle da doença. Dentre esses, a resistência genética é o mecanismo de controle mais eficiente a esse fitopatógeno, além de reduzir os custos de produção bem como a aplicação de fungicida. Somente a resistência parcial ao mofo branco tem sido relatada em *P. vulgaris*, embora alto nível de resistência tenha sido relatado em pool gênico secundário como em *Phaseolus coccineus* L. (Myers et al., 2008; Singh et al., 2009a). Recentemente, moderado nível de resistência ao mofo branco em feijão comum tem sido introgridida a partir desse conjunto gênico secundário (Singh et al., 2009a, 2009b).

A resistência de cultivares/linhagens de feijão ao mofo branco se deve a dois principais mecanismos: à resistência fisiológica: acarretada pela resistência genética que inibe a infecção e a colonização do patógeno nos tecidos da planta hospedeira; e aos mecanismos de escape da planta: este inclui caracteres morfológicos como: a estrutura ereta das plantas, dossel aberto, hospedagem reduzida e maturidade precoce (Fuller et al., 1984, Schwartz et al., 1987, Kolkman e Kelly, 2002). A resistência fisiológica e os mecanismos de escape são de herança quantitativa (Miklas et al., 2004) e controlada por mais de 20 QTLs, a maioria com pequeno ou moderado efeito (Soule et al., 2011). Estes autores relataram a presença de QTLs, localizados nas mesmas regiões genômicas, associadas com esses mecanismos de escape da planta e gene de defesa.

A resistência ao mofo branco é de herança complexa e altamente influenciada pelo ambiente. Assim, reunir os diferentes alelos de resistência em uma mesma linhagem é viável por meio da seleção recorrente, o método de melhoramento mais eficiente para aumentar a frequência de alelos/QTL favoráveis provenientes de diferentes genitores para as características quantitativas.

A seleção recorrente é um método de melhoramento que permite usar vários parentais resistentes ao mofo branco em sucessivos ciclos de intercruzamento, seleção e avaliação e permite melhorar um ou mais caracteres ao mesmo tempo, especialmente quando alelos/QTL dos diferentes caracteres forem encontrados em diferentes genitores, uma vez que o processo é cíclico e dinâmico e visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis (Geraldi, 2005). Durante o processo de seleção recorrente é possível realizar a seleção gamética, inicialmente proposta para caracteres dominantes e codominantes (Singh, 1994). Segundo Terán e Singh (2009) esse método foi também eficiente para caracteres quantitativos em autógamias, permitindo a piramidação de QTLs presentes em diferentes genitores envolvidos no processo de intercruzamento inicial do processo de seleção recorrente.

É importante mencionar que a maioria das fontes de resistência ao mofo branco é pertencente ao pool gênico andino. Essas, em sua maioria, são fontes não adaptadas às condições de cultivo brasileiro, sendo importante transferir alelos de resistência oriundos dessas fontes de resistências a cultivares provenientes da região mesoamericana que são mais adaptadas ao Brasil e comercialmente mais aceitas. O melhoramento visando aumentar esse nível de resistência certamente terá impacto significativo na cadeia produtiva do feijoeiro comum, pois permitirá o retorno ao sistema produtivo de áreas produtoras de feijão, tornadas impróprias pela alta incidência da doença.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) obter linhagens/progênes de feijão mesoamericana com alto nível de resistência

fisiológica ao mofo branco, porte arbustivo e grão tipo carioca, utilizando a seleção recorrente; 2) Identificar se há possibilidade de maiores ganhos com a seleção e; 3) Identificar de a seleção recorrente é eficiente na obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção da população base**

Doze linhagens e/ou cultivares, com resistência fisiológica parcial ao mofo branco, foram inter cruzadas para se obter a geração da população base (Tabela 1). A linhagem A195 é fonte exótica de resistência fisiológica ao mofo branco, oriunda do programa de melhoramento do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), com sementes grandes, cor creme e hábito de crescimento determinado tipo I (Genchev e Kiryakov, 2002; Singh et al., 2007). Aquelas de número 1 a 7 são adaptadas na região Sul de Minas Gerais. As de número 8 a 11 são progênies derivadas de retrocruzamento em que o doador da resistência ao mofo branco foi a fonte G122 ou Ex Rico 23 e os genitores recorrentes foram as linhagens M20 ou cultivar BRSMG Madrepérola. A G122 tem grãos grandes tipo pintado, a Ex Rico 23 tem grãos pequenos, brancos e ambas têm hábito de crescimento tipo II e resistência fisiológica parcial ao mofo branco. A M20 é portadora dos alelos de resistência à antracnose *Co-5* e *Co-4<sup>2</sup>*, resistência parcial à mancha angular, hábito de crescimento tipo II e grãos tipo carioca (Silva et al., 2006) e a BRSMG Madrepérola possui o hábito de crescimento tipo III, tem excelente tipo de grão carioca e alta produtividade.

Essas linhagens/cultivares foram inter cruzadas no esquema dialelo circulante ou cônico para gerar a população do ciclo 0. Nesse esquema, cada genitor foi cruzado com dois outros genitores. Na população  $S_0$ , de cada cruzamento, todas as plantas foram inoculadas e posteriormente selecionadas as duas plantas mais resistentes ao mofo branco, essas foram inter cruzada com plantas  $S_0$  selecionadas de outros dois cruzamentos, para serem obtidos os ciclos sucessivos. Foram feitos cruzamentos priorizando-se os genitores não comuns (Tabela 2). Assim, a grande maioria das combinações envolvendo os alelos de todos os genitores teve a possibilidade de ter acontecido até o ciclo III (Bearzoti, 1997; Ramalho, 1997). É importante mencionar que sendo a seleção recorrente um procedimento dinâmico, foi possível inserir uma nova fonte promissora de resistência, ESAL 550, no processo de recombinação para se obter a população base do segundo ciclo de seleção.

Assim, para se obter a população base do ciclo 0, cada linhagem foi inter cruzada com outras duas, formando uma população composta por híbridos simples. As sementes  $F_1$  de cada híbrido simples foram plantadas separadamente e autofecundadas a fim de se obter sementes  $F_2$ . No total, 2350 plantas  $F_2$  constituíram a população base do primeiro ciclo de seleção recorrente (C0). Subsequentemente, procedeu-se o inter cruzamento entre as plantas mais resistentes ao mofo branco, de cada híbrido simples da população base para formar a população do segundo ciclo (CI), de modo que cada híbrido se cruze com outros dois, priorizando os genitores não comuns, em outras palavras, cada progênie do segundo ciclo é proveniente do genoma de quatro cultivares/linhagens. As progênies provenientes desses inter cruzamentos constituíram a população do segundo ciclo de seleção (CI), que nada mais é que uma mistura de híbridos duplos.

Para formar o terceiro ciclo (CII), cruzamento entre os melhores “híbridos duplos” quanto a resistência ao mofo branco foram realizados, priorizado os

genitores não comuns, ou seja, a população do terceiro ciclo de seleção é uma mistura de progênies oriundas do genoma de doze diferentes cultivares/linhagens, cada progênie oriunda do cruzamento entre dois híbridos duplos. Sendo a mistura das sementes das progênies desses cruzamentos a população base do terceiro ciclo de seleção.

Os experimentos foram conduzidos em Lavras-MG na área experimental do Departamento de Biologia situada a 21° 14' S de latitude, 44° 59' W de longitude e 919 m de altitude. Em todos os experimentos utilizaram-se duas testemunhas comuns, linhagens RP-2 e CNFC9506.

#### **Obtenção das progênies $S_{0:1}$ , $S_{0:2}$ , $S_{0:3}$ , $S_{0:4}$ e $S_{0:5}$**

Depois de identificar as melhores progênies de cada ciclo de seleção, estas foram autofecundadas até estabelecerem um maior nível de homozigose em seus locos. As plantas com maior nível de resistência das populações base de cada um dos três ciclos de seleção foram selecionadas para formar a geração  $S_{0:1}$ , posteriormente, as progênies mais resistentes foram selecionadas e autofecundadas para formar a geração  $S_{0:2}$ , assim se procedeu até a geração  $S_{0:5}$  no primeiro ciclo de seleção (C0),  $S_{0:4}$  no segundo ciclo (CI) e  $S_{0:3}$  no terceiro ciclo (CII).

As progênies  $S_{0:1}$ ,  $S_{0:2}$ ,  $S_{0:3}$ ,  $S_{0:4}$  e  $S_{0:5}$  foram avaliadas considerando alguns caracteres (Tabela 3), a seleção sempre foi realizada em função da resistência ao mofo branco e dentre as progênies mais resistentes ao mofo branco procedeu-se a avaliação dos demais caracteres: tipo de grão e porte. O método de condução foi o *bulk* dentro de progênies  $S_0$ . Os delineamentos e os tamanhos das parcelas utilizados em cada uma das gerações estão apresentados na tabela 3.

Os experimentos foram conduzidos em três safras geralmente usadas para o cultivo do feijão no Sul de Minas Gerais, com semeadura em: fevereiro, julho e

novembro. Todos os experimentos foram submetidos aos mesmos tratamentos culturais. Na semeadura, a adubação utilizada foi de 300 kg/ha do formulado 8-28-16 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O, respectivamente) e, aos 20 dias após a emergência, 150 kg/ha de sulfato de amônio, em cobertura. A irrigação foi realizada por aspersão, sempre que houve escassez de chuvas, principalmente na semeadura de julho, denominada safra de inverno e na safra da seca. Os demais tratamentos culturais foram os normalmente utilizados para a cultura do feijoeiro na região.

### **Inoculação e avaliação da resistência ao mofo branco**

As plantas foram inoculadas 28 dias após a semeadura com o micélio do patógeno, utilizando o método do straw test. Nas populações do C0, CI e CII, a inoculação foi realizada em dois ramos principais de cada planta, como sugerido por Terán e Singh (2010). Nas progênies S<sub>0:1</sub> a S<sub>0:5</sub> foi inoculado o ramo principal de 10 plantas por parcela. 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, foram utilizadas ponteiras tipo eppendorf de 200 µL com disco de ágar contendo micélio para inocular as plantas. Seis a oito dias após a inoculação realizou-se a avaliação da reação do feijão ao mofo branco por meio de uma escala diagramática de 1 a 9 (Terán e Singh, 2010), 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. Na seleção

das melhores progênies da população base foi utilizada a nota média de resistência de cada planta. As plantas selecionadas foram inter cruzadas e assim se obteve a população base do novo ciclo de seleção.

A avaliação e seleção das plantas nas populações base foram feitas antes da floração, assim as progênies selecionadas foram inter cruzadas no campo, isso contribuiu para acelerar o processo de seleção recorrente, ou seja, cada ciclo de seleção recorrente foi obtido em cada safra. Como na região de Minas Gerais há três safras do feijoeiro por ano, foi possível conduzir três ciclos em um ano.

#### **Avaliação do tipo de grão e porte**

A avaliação quanto ao tipo de grão também foi realizada por meio de uma escala de notas, modificada de Ramalho et al. (1998), em que: nota 1 refere-se ao grão típico carioca, de cor creme com estrias marrom-claras, fundo claro, halo creme, peso médio de 100 sementes de 22 a 24g e não achatado; nota 2 ao grão tipo carioca com deficiência em uma das características mencionadas no padrão; nota 3 ao grão tipo carioca com deficiência em duas características mencionadas no padrão; nota 4 ao grão tipo carioca com deficiência em características mencionadas no padrão e nota 5, refere-se ao grão de cor creme com estrias marrom-escuras, fundo escuro, com halo não creme, peso médio de 100 sementes menor que 22g e achatado.

A avaliação do porte foi realizada, por uma escala de 1 a 9, conforme Mendes et al. (2011), em que a nota 9 - refere-se à planta de hábito tipo I ou II, ereta, com uma haste e alta inserção das primeiras vagens; 8 – plantas com hábito I ou II, ereta e com guia curta; 7 – plantas com hábito I ou II, ereta e com algumas ramificações; 6 – plantas de hábito I ou II, ereta e com algumas guias longas; 5 – plantas de hábito II ou III, ereta, com muitas ramificações e tendência a prostada; 4 – plantas hábito II ou III, semi-ereta e pouco prostada; 3 – plantas de hábito III, semi-ereta e mediantemente prostada; 2 – plantas de hábito III e

prostada; e a nota 1 à planta do tipo III, com entrenós longos e completamente prostrada.

### Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância individuais por geração, entre gerações dentro de cada ciclo e uma análise combinada envolvendo todos os ciclos de seleção. As análises foram realizadas com o auxílio do software SAS® (SAS Institute, 2005), procedimento PROC GLM. O modelo utilizado entre as gerações dentro de cada ciclo foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + t_{i(k)} + b_{j(k)} + g_k + r_{l(k)} + e_{ijkl}$$

Onde:  $Y_{ijkl}$ : refere à observação obtida na progênie  $i$ , no bloco  $j$ , na geração  $k$ , na repetição  $l$ ;  $\mu$ : média geral;  $t_{i(k)}$ : efeito aleatório da progênie  $i$  dentro da geração  $k$ ;  $b_{j(k)}$ : efeito aleatório do bloco  $j$  dentro da repetição  $l$ , dentro da geração  $k$ ;  $g_k$ : efeito fixo da geração  $k$ ;  $r_{l(k)}$ : efeito de repetição  $l$  dentro da geração  $k$ ,  $e_{ijkl}$ : erro experimental  $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$ .

O modelo utilizado para a análise combinada entre os ciclos de seleção foi

$$Y_{ijklm} = \mu + c_m + r_{l(km)} + g_{k(m)} + t_{i(km)} + b_{j(km)} + e_{ijklm}$$

Em que:  $Y_{ijklm}$ : refere a observação obtida no ciclo  $m$  na geração  $k$  na repetição  $l$  no bloco  $j$  na progênie  $i$ ;  $\mu$ : média geral;  $c_m$ : efeito do ciclo  $m$ ;  $r_{l(km)}$ : efeito da repetição  $l$ , na geração  $k$ , no ciclo  $m$ ;  $g_{k(m)}$ : efeito da geração  $k$  no ciclo  $m$ ;  $t_{i(km)}$ : efeito da progênie  $i$ , na geração  $k$ , no ciclo  $m$ ;  $b_{j(km)}$ : efeito do bloco  $j$ , na repetição  $l$ , na geração  $k$ , no ciclo  $m$ ;  $e_{ijklm}$ : erro experimental  $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma^2)$ .

Foram feitas comparações múltiplas utilizando o teste LSD (Least Square difference) a fim de estimar se há diferença significativa entre as gerações

dentros dos ciclos de seleção e entre os três ciclos de seleção. As médias das testemunhas foram usadas como covariável para eliminar o efeito ambiental durante as diferentes safras de avaliação. Para ajustar melhor a inflação no valor de alfa usou-se a correção de Bonferroni. Esta correção consiste em ajustar o valor de alfa para alfa dividido por c, onde c é o número de possíveis combinações de médias.

O ganho com a seleção (GS) foi estimado a partir da regressão linear entre as médias corrigidas pelas médias das testemunhas e pela média das gerações anteriores. Esse procedimento foi realizado entre as progênes das gerações dentro dos ciclos e entre os ciclos, sendo a resistência média a variável independente e a geração ou o ciclo como variável dependente. O GS foi

estimado de acordo com a expressão:  $GS = \left(\frac{b_1}{b_0}\right) * 100$ , onde  $b_1$  é o coeficiente linear estimado ou ganho absoluto e  $b_0$  é o intercepto estimado ou resistência média na geração  $S_{0:1}$  ou no ciclo zero ( $C_0$ ).

A herdabilidade realizada foi estimada a partir da expressão:  $h_R^2 = \frac{GS/m_j}{ds/m_i}$  em que:  $h_R^2$ : herdabilidade realizada;  $GS$ : ganho com a seleção na geração j, pela seleção efetuada na geração i;  $m_j$ : média geral do caráter na geração j;  $ds$ : diferencial de seleção dos indivíduos e/ou progênes na geração i. O  $ds$  é estimado por  $ds = m_{ts} - m_t$ , em que  $m_{ts}$  é a média das progênes selecionadas na geração i;  $m_t$ : média geral do caráter na geração i.

A fim de estimar a precisão experimental obteve-se a estimativa da acurácia

seletiva ( $r_{gs\%}$ ), calculada a partir de:  $r_{gs\%} = \left(1 - \frac{1}{F}\right)^{\frac{1}{2}}$  onde: F corresponde ao valor do teste F de Snedecor para o efeito de tratamentos (progênes) da análise de variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, a partir do elevado valor da acurácia seletiva ( $r_{st}^2$ ), que os experimentos de avaliação da resistência ao mofo branco e do tipo de grão foram conduzidos com boa precisão experimental, com estimativas da acurácia maior que 66% (Tabelas 4, 8 e 13). Para avaliação do caráter porte a estimativa da acurácia seletiva não foi de elevada magnitude (tabela 11 e 13), isso se deve ao fato dos genitores utilizados no programa de seleção recorrente não serem muito contrastantes para o caráter porte. No total de doze genitores, apenas dois têm hábito de crescimento tipo I, sete com hábito de crescimento tipo II e três do tipo III, portanto o cruzamento entre estes genitores não geraram uma ampla variação genética para tal caráter, o que contribui para reduzir o valor de F-Snedecor utilizado para calcular a estimativa da acurácia seletiva. Tal parâmetro não depende apenas da magnitude da variação residual e do número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação. Este parâmetro refere-se à correlação entre o valor genotípico verdadeiro do tratamento genético e aquele estimado ou predito a partir das informações dos experimentos. Os valores adequados de acurácia são aqueles próximos à unidade ou 100% (Resende e Duarte, 2007).

A nota média das duas testemunhas comuns foi usada como uma covariável visando minimizar o efeito ambiental da variação da severidade da doença de safra a safra. No entanto, embora a resistência média das testemunhas comuns fosse usada para amenizar o efeito ambiental, é importante enfatizar que o efeito de gerações é confundido com o efeito de safra, uma vez que cada geração foi avaliada em diferente safra e apenas duas testemunhas comuns foram avaliadas.

É importante frisar que as testemunhas comuns, utilizadas como covariáveis, apresentam reações intermediárias ao mofo branco.

Pode-se observar, a partir das análises de variância das avaliações das progênes dentro dos ciclos de seleção (Tabelas 4 e 8) e a partir da análise combinada dos diferentes ciclos (Tabela 13), que todas as fontes de variação foram significativamente diferentes para os caracteres resistência ao mofo branco em todos os ciclos de seleção, o mesmo foi observado para tipo de grão (tabela 8). É importante enfatizar que houve diferença altamente significativa entre as gerações nos três ciclos de seleção recorrente para ambos os caracteres ( $P \leq 0.10$ ) e entre as progênes dentro das gerações ( $P \leq 0.01$ ), indicando a presença de variabilidade genética entre as gerações de seleção e entre as progênes dentro de cada uma das gerações para resistência ao mofo branco e para o tipo de grão (Tabela 4, 8 e 13). A presença dessa variabilidade é de suma importância para se obter contínuo progresso genético com a seleção ao longo dos ciclos de seleção.

Em contrapartida, para o caráter porte, não houve diferença significativa entre as gerações em nenhum dos ciclos de seleção e houve diferença significativa entre as progênes dentro das gerações apenas no ciclo II de seleção e na análise combinada (Tabela 11). No entanto, pode-se inferir, que a variabilidade existente para esse caráter é de pequena magnitude, o que proporcionará um pequeno ganho com a seleção ao longo dos ciclos de seleção para o caráter porte.

A nota média das progênes  $S_{0:1}$  do ciclo 0 foi de 2.83, houve tendência de aumento na média da geração das progênes  $S_{0:1}$  para as progênes  $S_{0:2}$ , com nota média de 2.93, no entanto, a resistência média entre esses dois ciclos não diferiram significamente pelo teste de comparação múltipla LSD (Tabela 5).

Quando a seleção foi realizado na geração  $S_{0:2}$  para se obter as geração seguinte  $S_{0:3}$  houve uma redução significativa na nota média das progênes de -2.02%, o

valor negativo é devido às progênes resistentes receberem as menores notas, portanto, pode-se inferir que esse ganho foi eficiente para aumentar a resistência ao mofo branco da geração  $S_{0.2}$  para a resistência  $S_{0.3}$ . No entanto, embora houvesse uma redução significativa na nota média da geração  $S_{0.2}$  para a geração  $S_{0.3}$ , as notas médias das gerações  $S_{0.3}$ ,  $S_{0.4}$  e  $S_{0.5}$  não diferiram da nota média das progênes na geração  $S_{0.1}$ . Mesmo assim, a tendência do ganho com a seleção foi no sentido de aumentar a resistência média, sendo esse ganho de -0.86 e -0.51 nas gerações  $S_{0.4}$  e  $S_{0.5}$ , respectivamente, em comparação com as gerações anteriores. Vale enfatizar que esses ganhos não diferem significativamente (Tabela 5).

Esse aumento na média das progênes na geração  $S_{0.2}$  do C0 em comparação com as demais gerações pode ser explicado pelo fato de o isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado para avaliar as progênes na geração  $S_{0.1}$  ser diferente do isolado inoculado nas demais gerações. A partir da geração  $S_{0.2}$  foi utilizado um dos isolados mais agressivos já caracterizados em trabalhos anteriores nas mesmas condições de avaliação das progênes desse experimento, o isolado 4 (55-31), proveniente de Goiânia, Goiás. Assim, pode-se inferir que, embora as médias das geração  $S_{0.1}$  não diferiram das demais gerações  $S_{0.3}$ ,  $S_{0.4}$  e  $S_{0.5}$ , houve um ganho expressivo, uma vez que a resistência médias das gerações mais avançadas tenderam a reduzir mesmo quando avaliadas com um isolado bem mais agressivo do que o utilizado na avaliação das progênes nas gerações  $S_{0.1}$ .

Entre as gerações  $S_{0.1}$ ,  $S_{0.2}$ ,  $S_{0.3}$  e  $S_{0.4}$  do ciclo I de seleção recorrente, pode-se observar que a resistência média reduziu significativamente na geração  $S_{0.2}$  (Tabela 5). Nas demais gerações, embora houvesse uma tendência na redução da nota, a resistência média não diferiu entre si. É importante destacar que as intensidades de seleção de uma para outra foram baixas, variando de 28% a 43%. O resultado discrepante no aumento da média das progênes na geração  $S_{0.2}$  provavelmente foi devido a presença de muitas plantas daninhas durante a

avaliação dessa geração, o que possivelmente contribuiu para o condicionamento favorável ao desenvolvimento do patógeno, conseqüentemente, ao aumento na nota média da doença durante essa avaliação das progênies dessa geração.

No ciclo II de seleção, houve redução significativa na nota da resistência da geração  $S_{0.1}$  para a  $S_{0.2}$ , com o ganho de seleção de -3.81% (Tabela 5). A geração  $S_{0.3}$  teve um ganho de -1.35 em relação a média das gerações anteriores, porém esse ganho não foi significativamente diferente da resistência média obtida na geração  $S_{0.1}$  e da  $S_{0.2}$ . É necessário salientar também que, da geração  $S_{0.1}$  para a  $S_{0.2}$  foi quando se aplicou uma intensiva seleção para o tipo de grão, isso pode ter contribuído para com a ausência de ganho para a resistência.

A partir do intervalo de confiança das notas de resistência média é possível observar que o limite inferior é constituído por progênies altamente resistentes, nota média  $\leq 3$ , em todas as gerações nos três diferentes ciclos de seleção, excetuando a geração  $S_{0.2}$  do CI que teve o limite inferior de 3.16, consideradas moderadamente resistentes (Tabela 5). Isso permite concluir que com uma avaliação bem precisa e com o cruzamento entre as progênies selecionadas é possível aumentar o ganho com a seleção e assim aumentar o nível de resistência entre as cultivares de feijão de origem mesoamericana. Outra observação que pode ser feita a partir desses dados é que o intervalo entre as menores e as maiores médias de cada ciclo de seleção tende a diminuir ao longo das gerações dentro de cada ciclo e isso se deve a redução no limite superior. Embora em alguns casos não houve ganho significativo nas gerações mais avançadas em relação as gerações anteriores, foi possível aumentar a variância aditiva do caráter devido as gerações de endogamia isso implicará em aumento na herdabilidade no sentido restrito e conseqüentemente em futuros ganhos.

Para a resistência média ao mofo branco de cada um dos três ciclos de seleção, o ganho com a seleção e a estimativa da herdabilidade realizada está disposto na Tabela 6. A média do CI corrigida pela média das testemunhas e em

relação a geração anterior foi bem semelhante a média do ciclo C0, não havendo diferença significativa entre ambas. No entanto, houve uma redução significativa na nota média no ciclo II comparada aos dois ciclos anteriores, com um ganho de -2.90%. A estimativa do ganho esperado com a seleção é muito importante nos programas de melhoramento de qualquer espécie, pois permite prever a resposta com a seleção antes de sua realização, assim permite aos melhoristas procurar alternativas para melhorar a eficiência do processo de melhoramento (Ramalho et al., 2012).

A presença da variabilidade genética entre as gerações de cada ciclo pode ser também confirmada a partir das estimativas da herdabilidade, sendo todas as estimativas da herdabilidade realizada positiva, exceto na geração  $S_{0.4}$  do ciclo I. As estimativas da herdabilidade realizada ( $h^2_R$ ) das gerações de cada um dos ciclos de seleção variaram de -6.55 a 79.40 (Tabela 5). A estimativa da herdabilidade na geração  $S_{0.4}$  do ciclo I foi negativo, indicado nesse caso que a herdabilidade é zero, isto se deve a baixa variabilidade genética existente nessa geração, possivelmente devido ao pequeno número de progênies avaliadas. Nos demais casos essas estimativas foram sempre positivas evidenciando a presença de variabilidade e a possibilidade de sucesso com a seleção, especialmente em  $S_{0.2}$  quando o número de progênies era maior e as estimativas indicam a presença de variação genética ampla.

A  $h^2$  de certa característica não é imutável. A  $h^2$  pode ser incrementada pela introdução de mais variação genética na população, por meio de cruzamento de genitores mais divergentes para as características e também uniformizando as condições ambientais em que as plantas são avaliadas. Da mesma forma, o uso de ambientes desfavoráveis e populações provenientes de genitores menos divergentes podem reduzir a estimativa de  $h^2$  (Ramalho et al., 2012). Além disso, no presente caso, o uso de isolado menos agressivo como na geração  $S_{0.1}$

do C0 também impede a expressão de toda a variabilidade dos linhagens/cultivares para a reação ao patógeno.

A eficiência da seleção foi similar na obtenção das linhagens, diferindo apenas no número de progênies avaliadas em cada geração, o que é importante para uma boa estimativa do progresso genético. O número de linhagens obtidos no final de cada ciclo de seleção foi diferente, isso poderia ser questionado, porém Silva et al. (2010) relataram que o progresso genético estimado a partir de diferentes números de linhagens obtidas nos ciclos de seleção foi similar ao progresso genético obtido quando seis progênies aleatórias de cada ciclo foram usadas para estimar o progresso genético. Para se ter uma boa estimativa do progresso genético ao longo das gerações dentro de cada ciclo de seleção, bem como entre os diferentes ciclos, foram utilizadas duas linhagens, RP-2 e CNFC9506 como covariável visando reduzir o efeito ambiental entre as gerações e ciclos avaliados em diferentes safras, como mencionado anteriormente.

O pequeno progresso no ganho ao longo das gerações e ao longo dos ciclos de seleção deve-se ao fato do caráter, resistência ao mofo branco, ser de herança quantitativa, ou seja, controlado por vários genes de pequeno a médio efeito como relatado por Soule et al. (2011), em que mais de 20 QTL envolvidos no controle desse caráter já foram identificados em diferentes populações. Caso ocorra genes de efeito maior controlando o caráter é esperado que o ganho seja maior em gerações de seleção iniciais, caso contrário, o ganho será progressivo ao longo das gerações de avaliação, como o observado neste trabalho, o que comprova a presença de genes de pequeno a médio efeito no controle do caráter.

A maioria das linhagens utilizadas como genitoras do programa de seleção recorrente possuem grão tipo carioca (75%), mesmo assim pode-se observar diferença significativa entre as gerações dentro dos três ciclos de seleção recorrente para o caráter tipo de grãos (Tabela 8). Nos três ciclos de seleção

recorrente houve redução da nota média ao longo das gerações de avaliação com diferença significativa entre algumas dessas (Tabela 7). No primeiro ciclo de seleção (C0) observou-se que a média das progênes na geração  $S_{0.5}$  foi significativamente diferente das médias nas gerações  $S_{0.3}$  e  $S_{0.2}$ , bem como a média da geração  $S_{0.4}$  em relação as médias nas gerações  $S_{0.2}$  e  $S_{0.3}$ . A geração  $S_{0.1}$  não foi avaliada quanto ao caráter tipo de grão nesse mesmo ciclo de seleção. No segundo ciclo de seleção (C1) houve diferença significativa entre as médias da progênes  $S_{0.1}$  com as progênes das demais gerações, a média das progênes na geração  $S_{0.2}$  foi também significativamente diferente da média na geração  $S_{0.3}$ . No terceiro ciclo (CII) houve alteração significativa na média das progênes  $S_{0.1}$  com as duas demais geração de avaliação,  $S_{0.2}$  e  $S_{0.3}$ .

Quando procedeu-se a comparação entre os três diferentes ciclos de seleção para o caráter tipo de grão, observou-se diferença significativa apenas entre a média do ciclo C0 com a do CII no sentido de aumentar a média do caráter (Tabela 9), porém mesmo com o aumento a nota média do ciclo CII, essa foi menor do que 2, permanecendo ainda dentro dos padrões exigidos pelo o consumidor. É importante mencionar que para esse caráter a seleção de progênes dentro das gerações nos ciclos de seleção foi mais eficiente para se obter ganho, isso se deve ao fato das progênes dessas gerações serem avaliadas com mais precisão, uma vez que são avaliadas em experimentos com repetição e com várias plantas por parcela. A seleção para o tipo de grãos só foi realizada entre as de melhor desempenho quanto a resistência ao mofo branco. Portanto, não se espera que o efeito da seleção visual no tipo de grãos, altera a classificação das progênes quanto a resistência ao mofo branco, que é o principal objetivo deste trabalho.

Pode-se observar, nos intervalos de confiança das estimativas das médias, que é possível obter progênes com cor de grãos altamente aceitáveis nas condições comerciais em todas as gerações de seleção dentro dos ciclos de seleção (Tabela

7) e entre os ciclos (Tabela 9), sendo o intervalo de confiança em alguns casos de pequena magnitude. A partir da magnitude da estimativa de  $h^2_R$  pode-se inferir a possibilidade de se continuar obtendo sucesso com a seleção recorrente para o caráter tipo de grão, embora a maioria das linhagens/cultivares utilizadas nesse programa seja do tipo grão carioca há variabilidade o suficiente para se obter futuros ganhos.

O tipo dos grãos do feijoeiro tem sido um dos principais limitantes na recomendação de uma nova cultivar, pois o mercado consumidor é muito exigente e rejeita qualquer tipo de grão que seja fora dos padrões comerciais. A fidelidade do consumidor por tipos específicos de feijão tem obrigado os programas de melhoramento a dedicar grande atenção para esta característica, que se tornou um quesito básico em todas as avaliações que visam identificar linhagens para serem recomendadas. Porém, selecionar o tipo de grão desejado não tem sido uma tarefa muito fácil, pois o feijoeiro apresenta variabilidade muito grande para o tipo dos grãos. Tal variabilidade deve-se à complexa herança do caráter, em que estão envolvidos muitos genes com presença de interações epistáticas, de efeitos pleiotrópicos, alelismo múltiplo e de ligação gênica, fatores que têm dificultado o entendimento do controle genético da cor do tegumento (Menezes Júnior et al., 2008). Pelo exposto, é de suma importância selecionar progênies resistentes ao mofo branco, mas que também apresentem cor de grão de acordo com a exigência do consumidor brasileiro, o que permitirá que a progênies selecionadas sejam cultivadas em áreas contaminadas com *S. sclerotiorum* e comercializadas com boa aceitação.

A partir da análise de variância entre gerações dentro de ciclos para porte, não se observou diferença significativa entre as gerações nos três ciclos de seleção realizados (tabela 10 e 13). Somente no ciclo CII que se pôde obter diferença entre as progênies dentro das gerações de avaliação (tabela 11 e 13). Também não se observou diferença significativa entre os três diferentes ciclos de seleção,

variando a média das progênies dentro de cada ciclo de 6.90 no C0 a 6.97 no ciclo CI (tabela 12 e 13). Provavelmente essa pequena diferença entre as médias nos diferentes ciclos de seleção se deve ao fato de os genitores utilizados nos cruzamentos para se obter a população base sejam a maioria de porte tipo II (75%).

A baixa magnitude da estimativa da  $h^2$  também comprova a baixa variabilidade existente entre as progênies nesse programa de melhoramento para o caráter porte, o que conseqüentemente, contribuiu para o baixo ganho com a seleção como pode ser observado nas tabelas 10 e 12. É importante mencionar que, semelhante a avaliação para o tipo de grãos, o porte só foi avaliado entre as progênies anteriormente selecionadas para o caráter resistência ao mofo branco, o que contribuiu para restringir ainda mais a variabilidade entre as progênies para esse caráter.

Alguns autores dizem que o controle genético desse caráter é realizado por um único gene (Fin), cujo alelo dominante é responsável pelo hábito indeterminado (Leakey, 1988; Koinange et al., 1996). Porém, MacClean et al. (2002) e Tar'an et al. (2002) sugerem a existência de múltiplos genes controlando o hábito de crescimento no feijoeiro, com base em mapeamento do referido gene em diferentes grupos de ligação. A arquitetura é um caráter dependente da expressão de outros caracteres morfológicos que, em conjunto, contribuem para que a planta seja ereta ou prostrada, o que o torna um caráter complexo.

Os programas de melhoramento que buscam um ideótipo para arquitetura do feijoeiro devem levar em consideração várias características relacionadas ao porte da planta, tais como: altura da planta, número e comprimento de entrenós na haste principal, número de ramificações que se iniciam na haste principal, altura de inserção da primeira vagem, hábito de crescimento (determinado ou indeterminado), tendência da planta de se enrolar em um suporte, diâmetro e comprimento do hipocótilo, ângulo de ramificações, tamanho das folhas,

tamanho dos grãos e distribuição de vagens na planta (Teixeira et al., 1999; Kelly, 2001).

É de suma importância avaliar a arquitetura da planta em um programa de seleção recorrente visando resistência ao mofo branco, haja visto que o porte ereto das plantas e a porosidade do dossel está diretamente relacionada com a resistência ao mofo branco. O porte ereto é um mecanismo de escape da planta relatada em vários trabalhos na literatura (Ando et al., 2007; Kelly, 2001; Kolkman e Kelly, 2002; Kolkman e Kelly, 2003) mencionando que a planta ereta não permite que as condições sejam favoráveis para o desenvolvimento do fungo. Vários estudos de identificação de QTL para a resistência ao mofo branco mencionam a presença de vários QTLs responsáveis pelos mecanismos de escape, como arquitetura, localizados juntamente aos QTLs que conferem resistência ao mofo branco em feijão. Soule et al. (2011) reportaram três QTL (WM1.1, WM3.1, WM5.3) localizados na mesma posição no mapa que estão envolvidos com os dois mecanismos de resistência fisiológica. O QTL WM1.1<sup>AG,XC</sup> está associado com o gene *fin* que confere forte influência com o hábito de crescimento da planta e com a porosidade do dossel (Miklas et al., 2001). QTL que controla a área de superfície e densidade de comprimento de raiz (Cichy et al., 2009) está mapeado nessa mesma região, indicando efeito pleiotrópico do gene com os efeitos de raiz. Os QTL WM3.1AN e WM5.3R31 estão também correlacionados com o efeito de porosidade do dossel (Miklas et al., 2007). Park et al. (2001) identificou um QTL para a altura de planta que está localizado próximo ao QTL WM5.3 fornecendo suporte adicional de que esse QTL confere a prevenção da doença.

## **CONCLUSÃO**

Há linhagens/progênes de feijão mesoamericanas com alto nível de resistência fisiológica ao mofo branco, porte arbustivo e grão tipo carioca.

Há possibilidade de se obter mais sucesso com a seleção para a resistência ao mofo branco e cor de grãos, devido a presença da variabilidade genética existente entre as progênes.

A seleção recorrente é eficiente para obtenção de progênes com alto nível de resistência ao mofo branco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, K., GRUMET, R., TERPSTRA, K., KELLY, J. D. Manipulation of plant architecture to enhance crop disease control. **CAB Reviews: perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition, and Natural Resources**, v. 2, p.1-8, 2007.

CICHY, K. A., BLAIR, M.W., GALEANO MENDOZA, C. H., SNAPP, S. S., KELLY, J. D. QTL analysis of root architecture traits and low phosphorus tolerance in an Andean bean population. **Crop Science**, v. 49, p. 59-68. 2009.

FULLER, P.A.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R.; MUNN, R. Inter- and intra-row inter-genotypic competition influences selection for avoidance of white mold disease in dry edible beans. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 109, p. 567-572, 1984.

GENCHEV, D., KIRYAKOV I. Inheritance of resistance to white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) in A195 (*Phaseolus vulgaris* L.). **Bulg. J. Agric. Sci.** v. 8, p. 181-187, 2002.

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

KELLY, J. D. Remaking bean plant architecture for efficient production. **Advances in Agronomy**, v. 7, p. 109-143. 2001

KOINANGE, E. M. K.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. **Crop Science**, v. 36, p. 1037-1045, 1996.

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

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

LEAKEY, C. L. A. Genotypic and phenotypic markers in common bean. In: GEPTS, P. (Ed.). **Genetic Resources of *Phaseolus* beans: Their maintenance, domestication, evolution, and utilization**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 245-327. 1988.

MACCLEAN, P. E.; LEE, R. K.; OTTO, C.; GEPTS, P.; BASSETT, M. J. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, v. 93, p. 148-152, 2002.

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

MENEZES JÚNIOR, J. Â. N. ; RAMALHO, M. A. P. ; ABREU, A. F. B. . Seleção Recorrente para três caracteres do feijoeiro. **Bragantia** (São Paulo), v. 67, p. 833-838, 2008.

MIKLAS, P. N.; HAUF, D. C.; HENSON, R. A.; GRAFTON, K. F. Inheritance of ICA-Bunsi derived resistance to white mold in a navy × pinto bean cross. **Crop Science**, v. 44, p.1584-1588, 2004.

MIKLAS, P.N.; JOHNSON, W.C.; DELORME, R.; RILEY, R.H.; GEPTS, P. Inheritance and QTL analysis of physiological resistance to white mold in common bean G122. **Crop Science**, v. 41, p. 309-315, 2001.

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

MYERS, J.R., B.S. GILMORE, J.E. HAGGARD. Progress in characterization and transfer of white mold resistance from runner to common bean. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** v. 51, p.80–81, 2008.

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

PARK, S. O., COYNE, D. P., STEADMAN, J. R., SKROCH, P. W. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**, v. 41, p. 1253-1262, 2001.

RAMALHO, M.A.P., ABREU, A. de F.B., SANTOS J.B. dos, NUNES J.A.R.N. Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas. 1ª ed. Lavras. 522p. 2012.

SCHWARTZ HF, CASCIANO DH, ASENGA JA, WOOD DR. Field measurement of white mold effects upon dry beans with genetic resistance or upright architecture. **Crop Sci** v. 27, p. 699–702, 1987.

SINGH S.P., H. TERÁN, M. LEMA, H.F. SCHWARTZ, P.N. MIKLAS. Registration of white mold resistant dry bean germplasm line A 195. **Plant Regist** v.1, p.62-63, 2007.

SCOTT A.J.; KNOTT M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** v. 30, p. 507-51, 1974.

SILVA, G. S. ; RAMALHO, M. ; ABREU, A.F.B. ; NUNES J. A. R. . Estimation of genetic progress after eight cycles of. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** (Impresso), v. 10, p. 351-356, 2010.

SINGH, S.P., TERÁN H.; SCHWARTZ, H.F.; OTTO, K.; LEMA, M. Introgressing White mold resistance from *Phaseolus vulgaris* species of the secondary gene pool into common bean. **Crop Sci**. v. 49, p. 1629-1637, 2009a.

SINGH, S.P., TERÁN H.; SCHWARTZ, H.F.; OTTO, K.; LEMA, M. Development of white mold resistant interspecific common bean germplasm lines VCW 54 and VCW 55. **J. Plant Regist**. v. 3, p. 191-197, 2009b.

SOULE, M., PORTER, L., MEDINA, J., SANTANA, G. P., BLAIR, M. W., MIKLAS, P. N. Comparative QTL map for white mold resistance in common

bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, v.51, p.123-139, 2011.

TAR'AN, B.; MICHAELS, T. E.; PAULS, K. P. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. **Crop Science**, v. 42, p. 544-556, 2002.

TERÁN, H., SINGH, S.P. Gamete selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v.25, p271-280. 2009.

TERA N. H., SINGH S. P. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. **Plant Breeding** v.129, p.327-333, 2010.

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

## TABELAS

**Tabela 1** - Linhagens e cultivares utilizadas no inter cruzamento com algumas de suas características

<b>Cultivar/linhagem</b>	<b>Tipo/ peso 100 grãos (g)</b>	<b>Hábito de crescimento</b>	<b>Alelo-resis- tência a antracnose</b>	<b>Reação a mancha angular</b>
<b>1-RP-2</b>	Carioca/25	II	-	
<b>2-MA-IV-18-266</b>	Carioca/23	II	-	Resistente
<b>3-BRS – Cometa</b>	Carioca/23	II	-	
<b>4-VC-16</b>	Carioca/25	III	-	
<b>5-Majestoso</b>	Carioca/25	III	-	
<b>6-CNFRJ10564</b>	Pintado/42	I	-	
<b>7-ESAL 550</b>	Jalo/45	III	-	
<b>8-RC1-G122-x</b>	Carioca/22	II	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Resistente
<b>9-RC2-G122-y</b>	Carioca/25	II	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Resistente
<b>10-RC2-G122-z</b>	Carioca/23	II	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Resistente
<b>11-RC1-ExRico-x</b>	Carioca/20	II	-	
<b>12-A195</b>	Bege/54	I		Resistente

**Tabela 2-** Esquema de inter cruzamento do dialelo circulante com cada genitor cruzando-se com dois outros, de forma orientada, priorizando-se os não comuns.

<b>Ciclo</b>	<b>Cruzamentos</b>
O	1x2 2x3 3x4 4x5 5x6 6x7 7x8 8x9 9x10 10x11 11x12 12x1
I	12x34 34x56 56x78 78x910 910x1112 1112x12 23x45 45x67 67x89 89x1011 1011x121 121x23
II	1234x5678 5678x9101112 9101112x2345 2345x6789 6789x1011121 1011121x3456 3456x78910 78910x111212 111212x4567 4567x891011 891011x12123 12123x1234

**Tabela 3** – Delineamento experimental utilizado, tamanho da parcela e caracteres avaliados em cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente (C0, CI e CII)

	Delineamento			Caracteres avaliados		
	C0	CI	CII	C0	CI	CII
S <sub>0:1</sub>	Látice 15x15, com duas repetições, com uma linha de um metro	Látice 13x13, com duas repetições, com uma linha de um metro	Látice 15x15, com duas repetições, com uma linha de um metro	Resistência		
S <sub>0:2</sub>	Látice 8x8, com três repetições, com uma linha de dois metros			Resistência e tipo de grãos	Resistência e tipo de grão	Resistência, tipo de grão e porte
S <sub>0:3</sub>	Látice 5x5, com três repetições, com duas linhas de dois metros	Delineamento de blocos casualizados, com três repetições, duas linhas de dois metros	Delineamento de blocos casualizados, com três repetições, duas linhas de dois metros	Resistência e tipo de grão	Resistência, tipo de grão e porte	
S <sub>0:4</sub>	Delineamento de blocos casualizados, com três repetições, duas linhas de dois metros	Delineamento de blocos casualizados, com três repetições, duas linhas de dois metros		Resistência, tipo de grão e porte		
S <sub>0:5</sub>	Delineamento de blocos casualizados, com três repetições, duas linhas de dois metros			Resistência, tipo de grão e porte		

**Tabela 4** - Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para a resistência ao mofo branco.

FV	CICLO 0			CICLO I			CICLO II		
	GL	QM	$r^2(\%)$	GL	QM	$r^2(\%)$	GL	QM	$r^2(\%)$
Geração(Ge)	4	0.69*	78	3	4.95**	97	2	1.54*	90
Progênes/Ge	333	0.47**	66	269	0.44**	66	304	0.74**	78
Bloco/Rep/Ge	61	0.59**		45	0.64**		49	0.85**	
Rep/Ge	9	3.64**		7	2.23**		5	1.96**	
Erro	377	0.27		324	0.25		344	0.30	
TOTAL	784			648			704		
Média	2.84			3.87			4.32		

\*, \*\*: significativo a 5% e a 1% de probabilidade , respectivamente, pelo teste F.

**Tabela 5** - Resistência média de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância (LSD) entre as gerações dentro de cada ciclo

Ciclo	Geração	Média <sup>1</sup>	Ganho %	h <sup>2</sup> realizada
C0	S <sub>0:1</sub>	2.83 (1.28-5.00)		
	S <sub>0:2</sub>	2.93 (3.00-6.40)	3.51	35.35
	S <sub>0:3</sub>	2.71 (2.54-7.43)	-2.02	17.72
	S <sub>0:4</sub>	2.82 (2.22-4.63)	-0.86	79.40
	S <sub>0:5</sub>	2.81 (2.11-4.30)	-0.51	26.53
C1	S <sub>0:1</sub>	3.76 (2.33-5.40)		
	S <sub>0:2</sub>	4.10 (3.16-6.85)	10.10	26.84
	S <sub>0:3</sub>	3.83 (1.75-4.85)	1.01	12.83
	S <sub>0:4</sub>	3.81 (2.20-4.11)	-0.32	-6.55
CII	S <sub>0:1</sub>	4.41 (1.80-7.00)		
	S <sub>0:2</sub>	4.23 (2.00-5.55)	-3.81	22.73
	S <sub>0:3</sub>	4.29 (2.30-4.10)	-1.35	11.61

“Tabela 5, conclusão”

Gerações	CICLO 0			CICLO I		
	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança		Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	
$S_{0:2} - S_{0:4}$	0.10680	-0.17815	0.39175	0.2968**	0.05099	0.54261
$S_{0:2} - S_{0:5}$	0.11518	-0.16977	0.40013			
$S_{0:2} - S_{0:3}$	0.21483**	0.00112	0.42854	0.2677**	0.07395	0.46146
$S_{0:1} - S_{0:2}$	-0.09598	-0.23155	0.03959	-0.3446**	-0.47516	-0.21421
$S_{0:1} - S_{0:4}$	0.01082	-0.26088	0.28252	-0.04788	-0.28401	0.18824
$S_{0:1} - S_{0:5}$	0.01920	-0.25250	0.29090			
$S_{0:1} - S_{0:3}$	0.11885	-0.07684	0.31454	-0.07698	-0.25829	0.10433
$S_{0:4} - S_{0:5}$	0.00838	-0.36127	0.37803			
$S_{0:3} - S_{0:4}$	-0.10803	-0.42601	0.20995	0.02909	-0.24708	0.30527
$S_{0:3} - S_{0:5}$	-0.09965	-0.41763	0.21833			
CICLO 2						
Gerações	Diferença entre as médias		Intervalos de confiança			
$S_{0:1} - S_{0:3}$	0.08546		-0.08954		0.26046	
$S_{0:1} - S_{0:2}$	0.14074**		0.01537		0.26610	
$S_{0:2} - S_{0:3}$	-0.05528		-0.24678		0.13622	

<sup>vi</sup> Média de cada geração corrigida em função da covariável e da geração inicial com seus respectivos intervalos de confiança.

**Tabela 6** - Resistência média de cada dos ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração  $S_{0,1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das gerações iniciais e diferença significativa (LSD) entre os ciclos de seleção

Ciclo	Média	Ganho %	$h^2$ realizada
C0	2.84		
CI	2.87	0.94	35.14
CII	2.67	-2.90	17.95
Ciclos	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	
I-II	0.22085**	0.14604	0.29566
0-I	-0.02643	-0.09944	0.04659
0-II	0.19443**	0.12307	0.26578

**Tabela 7** - Nota média do tipo de grão de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância (LSD) entre as gerações dentro de cada ciclo

Ciclo	Geração	Média <sup>1</sup>	Ganho	h <sup>2</sup> realizada
C0	S <sub>0.1</sub>	-	-	-
	S <sub>0.2</sub>	1.98 (1.50-3.50)	-	-
	S <sub>0.3</sub>	1.96 (1.50-4.00)	-1.13	50.53
	S <sub>0.4</sub>	1.73 (1.50-2.50)	-5.89	26.78
	S <sub>0.5</sub>	1.73 (1.50-2.50)	-4.61	21.50
CI	S <sub>0.1</sub>	2.66 (1.50-5.00)		
	S <sub>0.2</sub>	2.31 (1.50-3.50)	-11.70	39.61
	S <sub>0.3</sub>	2.14 (1.50-3.00)	-9.09	22.79
	S <sub>0.4</sub>	2.16 (1.50-2.50)	-6.12	15.89
CII	S <sub>0.1</sub>	2.67 (2.00-4.50)		
	S <sub>0.2</sub>	2.36 (2.00-5.00)	-10.27	37.99
	S <sub>0.3</sub>	2.37 (1.50-3.00)	-5.36	20.35

“Tabela 7, conclusão”

<b>CICLO 0</b>			<b>CICLO I</b>			
Gerações	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança
S0:2 - S0:4	0.25195**	0.08747	0.41643	0.14789	-0.00348	0.29925
S0:2 - S0:5	0.24483**	0.08035	0.40931	-	-	-
S0:2 - S0:3	0.0226	-0.10196	0.14716	0.17349**	0.0547	0.29227
S0:1 - S0:2	-	-	-	0.35276**	0.27288	0.43265
S0:1 - S0:4	-	-	-	0.50065**	0.3553	0.646
S0:1 - S0:3	-	-	-	0.52625**	0.41524	0.63726
S0:4 - S0:5	-0.00712	-0.22049	0.20625	-	-	-
S0:3 - S0:4	0.22935**	0.04499	0.41371	-0.02560	-0.19546	0.14426
S0:3 - S0:5	0.22223**	0.03787	0.4065			
<b>CICLO 2</b>						
Gerações	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança				
S0:1 - S0:3	0.29647**	0.17808				
S0:1 - S0:2	0.30529**	0.21867				
S0:2 - S0:3	-0.00882	-0.13945				
		0.41486				
		0.3919				
		0.12182				

<sup>11</sup> Média de cada geração corrigida em função da covariável e da geração inicial com seus respectivos intervalos de confiança.

**Tabela 8** - Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para o tipo de grão

FV	CICLO 0			CICLO I			CICLO II			
	GL	QM	$r^2_{ge}$	GL	QM	$r^2_{ge}$	GL	QM	$r^2_{ge}$	
Geração(Ge)		3	1.12**	96.04	3	9.82**	99.58	3	6.83**	99.24
Progênes/Ge		109	0.35**	86.49	269	0.51**	91.48	314	0.28**	79.94
Bloco/Rep/Ge		33	0.15*		45	0.19*		49	0.11 <sup>NS</sup>	
Rep/Ge		8	0.0416 <sup>NS</sup>		7	0.35*		5	0.31*	
Erro		182	0.087		318	0.083		320	0.1	
TOTAL		335			642			690		
Média		1.92			2.5				2.92	

\*, \*\*: significativo a 5% e a 1% de probabilidade , respectivamente, pelo teste F.

**Tabela 9** – Média do tipo de grão para cada ciclo de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração  $S_{0,1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das gerações iniciais e diferença significativa entre os ciclos de seleção

Ciclo	Média	Ganho %	$h^2$ realizada
C0	1.92 (1.05-3.55)		
CI	1.95 (1.43-5.00)	1.75	51.99
CII	1.98 (1.97-5.22)	1.66	25.57
Ciclos	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	
I-II	-0.02985	-0.07376	0.01406
0-2	-0.0629**	-0.11619	-0.00961
0-I	-0.03305	-0.08699	0.02089

**Tabela 10** - Nota média de porte de cada uma das gerações dos três ciclos de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis); ganho realizado com a seleção em cada ciclo de seleção, estimativas de herdabilidade realizada e teste de significância entre as gerações dentro de cada ciclo

Ciclo	Geração	Média <sup>1</sup>	Ganho %	h <sup>2</sup> realizada
C0	S <sub>0:4</sub>	6.833333	-	-
	S <sub>0:5</sub>	6.973973	2.100796	14.63617
C1	S <sub>0:3</sub>	6.833333	-	-
	S <sub>0:4</sub>	6.895239	0.914139	14.63411
CII	S <sub>0:2</sub>	6.604167	-	-
	S <sub>0:3</sub>	6.592827	-0.17081	15.0886
		Diferença entre as médias		
Ciclos	Geração			
C0	S0:4-S0:5	0.14064		NS
C1	S0:3-S0:4	0.061905		NS
CII	S0:2-S0:3	-0.01134		NS

<sup>1</sup> Média de cada geração corrigida em função da covariável e da geração inicial com seus respectivos intervalos de confiança.

**Tabela 11** - Resumo das análises de variâncias entre as gerações dentro do ciclo de seleção para porte

FV	CICLO 0			CICLO I			CICLO II		
	GL	QM	$r^2$	GL	QM	$r^2$	GL	QM	$r^2$
Geração(Ge)	1	0.35 <sup>NS</sup>	-	1	0.10 <sup>NS</sup>	-	1	0.007 <sup>NS</sup>	
Progênie/Ge	22	0.88 <sup>NS</sup>	58.49	38	0.47 <sup>NS</sup>	31.48	89	1.11*	53.45
Bloco/Rep/Ge	-	-			-		21	0.87 <sup>NS</sup>	
Rep/Ge	4	1.97*		4	2.76**		4	2.92**	
Erro	44	1.02		76	0.42		157	0.79	
TOTAL	71	0.58		119			272		
Média		6.90			6.86			6.6	

\*, \*\*, <sup>NS</sup>: significativo a 5% e a 1% de probabilidade; <sup>NS</sup> não significativo, respectivamente, pelo teste F.

**Tabela 12** - Média de porte para cada ciclo de seleção recorrente, ajustadas em função das testemunhas comuns (covariáveis) e em relação a geração  $S_{0,1}$ ; ganho realizado com a seleção e estimativas de herdabilidade realizada, estimados a partir das gerações iniciais e diferença significativa entre os ciclos de seleção

Ciclo	Média	Ganho %	$h^2$ realizada
C0	6.90 (5.00-8.17)	-	-
CI	6.97 (5.00-8.01)	0.93	14.50
CII	6.94 (3.87-8.85)	0.25	7.21
Ciclos	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança	
I-II	0.02887	-0.20706	0.26479
0-I	-0.06365	-0.38476	0.25746
0-II	-0.03478	-0.32016	0.25059

**Tabela 13** - Análise combinada entre os ciclos de seleção agrupada para resistência ao mofo branco, tipo de grãos e porte

FV	Mofo branco			Cor de grão			Porte		
	GL	QM	$r^2$ (%)	GL	QM	$r^2$ (%)	GL	QM	$r^2$ (%)
Ciclo	2	8.20**	98.33	2	0.79**	94.06	2	0.12 <sup>NS</sup>	-
rep/ge/ciclo	21	2.77**		20	0.21**		12	2.55**	
ge/ciclo	9	2.30**	93.91	8	5.81**	99.21	3	0.16 <sup>NS</sup>	-
progênies/ge/ciclo	907	0.56**	71.57	692	0.38**	87.19	149	0.91**	52.97
bloco/rep/ge/ciclo	155	0.69**		127	0.12**		21	0.87 <sup>NS</sup>	
Erro	1046			820	0.092		277	0.66	
Total	2140			1669			464		
Média	2.79			1.96			6.94		

\*, \*\*, <sup>NS</sup>: significativo a 5% e a 1% de probabilidade; <sup>NS</sup> não significativo, respectivamente, pelo teste F.

**ARTICLE 3** Gene validation and gene expression for resistance to white mold in common bean

**ARTIGO 3** Validação e expressão gênica para a resistência ao mofo branco em feijão comum português

Artigo redigido conforme a norma da revista *Plant Disease*.

## ABSTRACT

White mold caused by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is one the most infectious common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) diseases worldwide. In this study the objectives were to: 1) determine gene expression variations and their relationship with white mold resistance in common bean; 2) Verify the expression level at different times following inoculation and; 3) Map in the common bean genome in order to identify markers associate with *S. sclerotiorum* resistance in common bean. These genes had their expression evaluated in lines partially resistant to white mold and lines susceptible through transcriptional variation analysis during different times of inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum*, and these genes were mapped in bean genome to identify markers in close proximity, to recognize bean resistance markers for *S. sclerotiorum*. Three genes identified were involved with the white mold resistance, PGIP2, PGIP3 and PGIP4. These genes had high expression in resistant genotype, and in susceptible genotype the expression were low. The resistant genotypes started to release the PGIP2 one day after inoculation (DAI) and its transcript accumulates progressively until reaching the highest level in day 4, after that the transcript reduces drastically in 7 DAI. PGIP3 and PGIP4 had, in resistant genotypes, significant high expression level in early stage of pathogen infection 1 DAI compare with the susceptible genotypes and the expression of these genes is similar. Those three genes are located inside the QTL WM 2.3. This QTL is one of those QTLs that conferring partial resistance to white mold. It would be possible to use those three genes to select resistant common bean genotypes to white mold. Also, the cDNA sequence can be use as new candidate genes for resistance and for marker development.

## RESUMO

O mofo branco causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um dos mais severos a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar variações de expressão gênica e sua relação com a resistência mofo branco em feijoeiro; 2) verificar diferença na expressão gênica após a inoculação e, 3) mapear os genes de resistência no genoma do feijão comum, a fim de identificar marcadores associados com a resistência. Três genes envolvidos com a resistência a mofo branco foram identificados, PGIP2, PGIP3 e PGIP4. Os genótipos resistentes começam expressar o gene PGIP2 um dia após a inoculação (DAI) e sua transcrição se acumula progressivamente até alcançar o nível máximo no quarto DAI e sua expressão reduz drasticamente sete DAI. Os genótipos resistentes possuem elevada expressão dos genes PGIP3 PGIP4 na fase inicial da infecção patógeno (1 DAI) quando comparado com os genótipos suscetíveis e a expressão destes dois genes é semelhante. Esses três genes estão localizados no interior do QTL WM 2.3. Esse QTL é um dos que conferem resistência parcial à mofo branco. É possível utilizar estes três genes para selecionar genótipos de feijão resistentes ao mofo branco. Além disso, o cDNA dos mesmos pode ser usado como genes candidatos à resistência e para o desenvolvimento do marcador molecular visando a seleção assistida para a resistência do feijoeiro ao mofo branco.

## INTRODUCTION

White mold caused by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is one of the most destructive diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris*). This fungus can cause up to 80% reduction in yield and can remain viable in the soil as resistance structures called sclerotia for up to 15 years (Lobo and Nasser, 2007). Some farming practices such as crop rotation, increase space between plant and row, avoiding excessive irrigation during blossoming, and fungicide applications can reduce disease severity (Soule et al., 2011).

The most effective method for controlling white mold disease is to grow resistant bean cultivar. Resistance has two distinct mechanisms: avoidance, which inhibits establishment of the infection, and physiological resistance, involving defense mechanisms that inhibit infection and spread of the pathogen within host tissues. Avoidance mechanisms such as upright architecture, reduced branching, resistance to lodging, and open canopy, can contribute to resistance by reducing white mold development (Soule et al., 2011; Miklas et al., 2001).

Both avoidance and physiological mechanisms of resistance to white mold in common bean are quantitatively inherited (Soule et al., 2011; Miklas et al., 2006b, Miklas and Singh, 2007; Ender and Kelly, 2005; Kolkman and Kelly, 2003; Maxwell et al., 2007; Miklas et al., 2001). Developing cultivar resistance to white mold is difficult because more than 20 quantitative trait loci (QTL) conferring resistance to this pathogen have been identified (Soule et al., 2011), and field resistance is under major environmental influence.

It is widely accepted that the pathogens produce active substances during host infection, among these compounds are endopolygalacturonases (PGs), and cell wall degrading enzymes (CWDEs) that are the first enzymes produced during the infection process (Kalunke et al., 2011).

Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the host recognizes cell wall-degrading enzymes produced by pathogens and inhibit their enzymatic activity to hamper the invasion process and the release of nutrients necessary for pathogen growth (D'Ovidio et al., 2004). PGIPs are plant cell wall glycoproteins that belong to the superfamily of leucine-rich repeat protein (LRRs) belonging to the extracytoplasmic class (Jones and Jones, 1997).

In *Phaseolus vulgaris* this family of genes comprises four gene cluster (PGIP1, PGIP2, PGIP3 and PGIP4) that is localized on the linkage group Pv02 (Geffroy et al., 2002). The arrangement and similarities among these genes suggest that they are derived from a common ancestor by a sequence of duplication-divergent-duplication events (D'Ovidio et al. 2004). PGIP2 is the most effective and wide spectrum inhibitor of fungal PGs (Manfredini et al., 2006; D'Olvidio et al., 2004b, 2006).

The interaction between fungal PGs and PGIPs found in plant cell walls has established that the LRRs structure of PGIPs is responsible for the molecular interaction, so the diversity in the LRRs domain is crucial for determining recognition specificity toward different pathogens (D'Ovidio et al., 2004). To accommodate pathogenesis in a variety of different conditions and on various hosts, pathogens produce a variety of PG isoenzymes (De Lorenzo et al., 2001), which often exhibit polymorphism between different pathogenic isolates or races (Daroda et al., 2001; Poinssot et al., 2003). Furthermore, the PGIP genes showed inter- and intra-specific variation in the transcriptional regulation and inhibition properties against fungal and insect PGs (De Lorenzo et al., 2001; D'Ovidio et al., 2004; Protsenko et al., 2008).

Identification of genes related with resistance and their differential expression during defense of common bean to *S. sclerotiorum* should contribute to the understanding of the physiology and molecular basis of defense, and the

molecular information may also provide candidate genes for QTL mapping and marker-assisted selection (Calla et al., 2009).

One method that is being utilized to quantify gene expression is the real-time RT-PCR or quantitative RT-PCR (qRT-PCR): a powerful tool combining both high sensitivity and specificity with efficient signal detection. It has been used to monitor gene expression, even if the expression is closely related, and to quantify transcript levels of very weakly expressed genes (Czechowski et al., 2004).

In this study our objectives were to: 1) determine gene expression variations and their relationship with white mold resistance in common bean; 2) Verify the expression level at different times following inoculation and; 3) Map in the common bean genome in order to identify markers associate with *S. sclerotiorum* resistance in common bean.

## **MATERIAL AND METHODS**

Four bean genotypes were evaluated for physiological resistance to white mold, two genotypes that are partially resistant in field and in greenhouse, G122 and A195 (Miklas et al., 2001; Singh et al., 2007; Pascual et al., 2010) and two susceptible genotypes, Beryl great northern, (McCoy et al., 2011, Otto-Hanson et al., 2011) and Matterhorn great northern, susceptible only in field (Mkwaila et al., 2011). The experiment was conducted in randomized block design with three replicates. The seeds of each line were shown in 6 L plastics pots (3 seeds per pot) in sterile soil and maintained in a greenhouse at 18°C night/28°C day.

The isolate of *S. sclerotiorum* was collected on the Montcalm research farm in Michigan, US (Otto-Hanson et al., 2011). This isolate was grown in Petri dishes containing potato dextrose agar medium (PDA), kept in a temperature of  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Three days later, discs of agar with mycelium were

transferred to culture dishes with PDA. Pure cultures were allowed to multiply for an additional three days. After the second multiplication, Eppendorf pipette tips were used to cut out an agar disk containing mycelium from the culture plate, in order to inoculate plants 21 days after planting (DAP).

The plants were cut horizontally at the stem with a clean straight-edge razor under the node of the first trifoliolate. A mini-agar plug colonized with *S. sclerotiorum* mycelia were placed on the fresh stem wound. For this test, the pathogen must penetrate natural structural defense barriers (cuticle and epidermal layers) before infecting stem tissues; therefore, additional mechanisms conferring partial resistance to white mold infection may be detected which bypasses the cut-stem straw test method (Soule et al., 2011).

Samples were taken at 24, 48, 96 and 168 hours post inoculation (1, 2, 4 and 7 Day After Inoculation - DAI) by cutting the top 2.5 cm of stem, collecting samples both from infected and healthy stems. Stem segments from ten different plants infected and control plants were cut transversally below the agar plugs. Stems of control plants were treated similarly using a plug of agar without the fungal mycelia. After cutting, the samples were quickly frozen in liquid nitrogen. Samples were transported under liquid nitrogen to the laboratory and stored in -80°C freezer until used for RNA extraction.

The inoculated plants were scored on a scale of 1 to 9; 24, 48, 96 and 128 hours post inoculation, where 1 = no symptoms, 2 = invasion of the stem past the site of inoculation but not to the first node, 3 = invasion of the stem to the first node, 4 = invasion of the internode slightly past the first node, 5 = invasion to the middle of the internode, 6 = invasion to the second node, 7 = invasion slightly past the second node, 8 = invasion to the middle of the second internode and beyond, and 9 = total plant collapse (Petzoldt and Dickson, 1996).

Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's protocol and further purified through Qiagen

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA samples were quantified using a spectrophotometer BioPhotometer plus, Eppendorf. RNA quality was determined by combination of spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. High quality RNA was reverse transcribed into cDNA with GoScript™ Reverse Transcription System enzyme (Promega) following Promega protocol in presence of primer oligo (dt)<sub>15</sub>. Two biological replications were used for each genotype.

cDNA was analyzed using real-time PCR to compare the different levels of expression in susceptible and resistant plants using eight different genes; PGIP1, PGIP2, PGIP3, PGIP4 and four other genes identified in soybean that could be related to common bean resistance reaction to *S. sclerotiorum*.

qRT-PCR experiments were performed using the Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR Systems (Life Technologies, United State) and KAPA SYBR® FAST ABI Prism® 2X qPCR Master Mix (KapaBiosystem, US) containing the flurogenic SYBER Green I DNA binding dye. Each reaction was made in triplicate. Oligonucleotide primers were designed on the basis of the four PGIP genes (EMBL/GenBank data libraries accession AJ786408, AJ786409, AJ786410, AJ786411) and four other genes (Microarray clone ID data libraries accession Gm-r1089-8081, Gm-r1083-1013, Gm-r1089-3849, Gm-r1083-517) using Geneious Basic 5.5.4. The sequence of the primers is shown on table 1 and all primers were synthesized commercially (Invitrogen).

For each cDNA samples, three replicate of real time PCR reactions were performed with each primer set. qRT-PCR analyses were repeated in at least two different biological replication. Each sample provides material for both target and reference gene reactions, so these are paired for each biological replication. To normalize the relative quantification an invariant endogenous control (reference gene - Actin) was included in the assay to correct for sample to sample variations in RT-PCR efficiency and errors in sample quantification. All

experimental samples and the relative abundance values were calculated for internal control as well as for the target gene. For each target gene sample, the relative abundance value obtained is divided by the value derived from the control sequence in the corresponding target gene. The normalized values for different samples can then be compared directly (Pfaffl, 2001). Each single plate (96 well) provides one primer pair with two genotypes, one resistant and one susceptible with water in the first six wells, in sequence six wells at zero time, six wells with samples at 1 DAI, six wells with samples at 2 DAI, six wells with samples at 4DAI and six wells at 7DAI for one resistant and one susceptible genotype, respectively.

Actin was validated as a reference gene using genNorm software and has been shown specifically to be stably expressed under relevant experimental conditions. Each mean fold change in gene expression of target were normalized in term of the ratio of the target expression to the level of the reference samples (no inoculated genotype), which should be the product of a stably expressed gene whose abundance is strongly correlated to the total amounts of expression in each sample.

Primer specificity was tested before in separate PCR experiments. The qRT-PCR reaction volume was 10 $\mu$ l and include 5 $\mu$ l KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (1x), 0.2 $\mu$ l forward primer (10 $\mu$ M), 0.2 $\mu$ l reverse primer (10 $\mu$ M), 1 $\mu$ l template DNA (<20ng/10 $\mu$ l of reaction) and volume adjusted with water (3.6 $\mu$ l). Reaction conditions were as follows: 40 cycles at 95°C for 1 min to enzyme activation, 95°C for 2 sec to denature, 62°C for 30 sec to anneal/extend and dissociation according to instrument guidelines.

For statistical analysis of qPCR data, reference-gene corrected threshold cycle (Ct) values were used. These were obtained by converting the Ct values to relative quantities, which were corrected with the calculated normalization factors and were back-transformed to Ct values. The relative expression analysis

was determined by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak et al., 2001). The CT values of target genes and housekeeping genes were used for further analysis and samples with more than 0.6 value difference within triplicate were not considered, as shown by Kalunke et al. (2011).

Analysis of variance (ANOVA) was applied for both phenotypic and gene expression evaluation. In order to correct for heterogeneity of variance and the normality of the errors, a  $\log_{10}$  transformation was applied to the gene expression data. Least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between resistant and susceptible genotypes and between times of inoculation. Analyses were performed with the aid of the SAS ® software (SAS Institute, 2005), PROC MIXED. The model used in the phenotypic analysis was:  $Y_{ijk} = \mu + trt_i + time_j + trt_i * time_j + \epsilon_{ijk}$ , where:  $\mu$  : overall means;  $trt_i$  : effect of i-th treatment resistant and susceptible genotype, with  $i = 1, 2$ ;  $time_j$  = effect of j-th time of inoculation, with  $j = 1, \dots, 5$ ;  $trt_i * time_j$  = effect of the interaction between j-th time with j-th treatment;  $\epsilon_{ijk}$  = mean experimental error.

The model used in the gene expression analysis was:  $Y_{ijk} = \mu + trt_i + time_j + gene_k + time_j * trt_i + trt_i * gene_k + time_j * gene_k * trt_i + \epsilon_{ijk}$ , where:  $\mu$  : overall means;  $trt_i$  : effect of i-th treatment resistant and susceptible genotype, with  $i = 1, 2$ ;  $time_j$  = effect of j-th time of inoculation, with  $j = 1, \dots, 5$ ;  $gene_k$  = effect of k-th gene, with  $k = 1, \dots, 8$ ;  $time_j * trt_i$  = effect of the interaction between j-th time with i-th treatment;  $trt_i * gene_k$  = interaction treatment i-th treatment with the k-th gene;  $time_j * gene_k * trt_i$  = interaction between j-th time with k-th gene with i-th treatment;  $\epsilon_{ijk}$  = mean experimental error.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Phenotypic variation**

All effects including time of evaluation, treatment and genotypic effects, and interaction between time by treatment were statistically significant (data not shown). The resistant and susceptible genotypes responded differently to the inoculation with white mold as expected.

One day after inoculation (DAI), the symptoms were faintly detectable and there were no statistically difference between resistant and susceptible genotypes (Figure 1). From the second evaluation, a necrotic zone appeared below the agar plug and were clearly visible symptoms expanding along the stem outside the area of contact with the inoculum throughout the next periods evaluated.

Significant differences between resistant and susceptible genotypes were detectable after two days following inoculation with the partially resistant genotypes exhibiting lower disease severity (Figure 1). In the susceptible genotypes the necrotic zone progressed faster compared to the resistant genotypes. Both resistant and susceptible genotypes had necrosis expanding in the stem with two days after inoculation, with statistical difference between different times of evaluation. The susceptible genotypes reached a high score in 4 DAI, so no observed significant differences between evaluation in day 4 and day 7 were detected for these genotypes.

### **Gene expression qRT-PCR evaluation**

Quantitative RT-PCR assays were performed to verify the expression of each member of PGIP family and four Gm-r genes in the partially resistant and susceptible bean genotypes during the infection and colonization of *S. sclerotiorum*, at different times following inoculation.

In the analysis of variance the interaction between: time by treatment by gene was statistically significant. Four of those eight genes evaluated were significant different between resistant and susceptible genotypes. These four genes were also differently expressed during the times of evaluation.

In the PGIP gene family, PGIP1 expression was not statistically different between resistant and susceptible genotypes and there was a huge variation between the two biological replicates, so the contribution of this gene to the response to *S. sclerotiorum* is not clear and probably is not related with resistance to white mold in common bean.

The PGIP2 expression was consistent in both biological replicates, which is indicative that this gene is stable and there is a relationship with resistance to white mold. The expression of this gene was lower in the susceptible cultivars and higher levels of the PGIP2 transcripts indicated a strong accumulation at 2 and 4 DAI in resistant cultivars A195 and G122. At both evaluation times resistance was significantly different from the susceptible genotypes, and the gene expression in day 4 was statistically different from day 2 in the resistant genotypes, although gene expression in day 2 was not statistically different from the zero day control (Figure 2).

The resistant genotypes started to release the PGIP2 one DAI and its transcript accumulated progressively until reaching the highest level in day 4, after which the transcript reduced drastically in 7 DAI. This stronger induction of PGIP2 transcript during fungal infection could be regarded as a strategy of the host plant to counteract of a particularly effective PGIP (Kalunke et al., 2011). These same authors, studying the bean and *S. sclerotiorum* interaction, observed

that the PGIP1 and PGIP2 transcripts accumulated progressively with the time after inoculation and it was possible to detect the expression of these genes in several organs analyzed, whereas PGIP3 was slightly induced and PGIP4 was not induced. Janni et al. (2008) showed that transgenic wheat tissue expressing PGIP2 reduced degradation when treated with a fungal PG that is specifically recognized by PGIP2.

PGIP3 and PGIP4 had, significant high expression levels in early stage of pathogen infection 1 DAI in resistant genotypes compared with the susceptible genotypes and the expression of these genes was similar (figure 2). D'Ovidio et al. (2004) reported that the members of PGIP family are grouped in two categories PGIP1/PGIP2 and PGIP3/PGIP4 based on their similarity. These same authors suggested that they are derived from a common ancestor by a sequence of duplication-divergence-duplication events, each of which independently underwent diversification. These similarities can explain why these two genes have similar expression when inoculated with white mold and the implication is that these genes are related with early reaction to white mold at 1 DAI. Since our goal was to evaluate genotypes for resistance to white mold, one of these two genes can be used for screening, and in this case is better to use the PGIP3 since the standard error is lower, so the results are more reproducible, since the early stages of pathogen infection are more robust and easier to assign differences between resistant and susceptible genotypes (Calla et al., 2009).

Although these four genes have high level of sequence similarity (>80%), the expression of the four PGIP genes during the *S. sclerotiorum* infection showed a wide variation between genotypes and between time of inoculation, suggesting differential contribution of each single PGIP in plant defense. D'Olvidio et al. (2004b) showed through transcript analysis that these four PGIP genes had different responses to elicitors, salicylic acid or mechanical injury. These same authors conclude that biochemical, regulatory and

subfunctionalization of PGIP gene are important for the adaptation of plants to pathogenic fungi and phytophagous insects.

The PGIP2 gene was related to later signal transduction in response to infection and the PGIP3 and PGIP4 genes were related to early signal transduction in response to infection that elicit rapid defense. The synthesis and modification-related transcripts were differentially expressed with statistical significance between resistant and susceptible genotypes upon infection with *S. sclerotiorum*, supporting the hypothesis that PGIP proteins interfere with the pathogen and host interaction. These results suggest that resistant genotypes are able to react to the pathogen infection more rapidly or efficiently as compared to the susceptible genotypes. This supports the idea of polygalacturonase inhibitor protein plays an important role in defense of common bean against *S. sclerotiorum*.

The members of PGIP family are localized on Pv02. In this chromosome three different QTLs WM2.1, WM2.2 and WM2.3 conferring partial resistance to white mold were previously reported (Soule et al., 2011). Comparing PGIP2, PGIP3 and PGIP4 sequence with the molecular markers already identified on Pv02 using Geneious Basic 5.5.4 software, it was possible to see that those three genes are located inside the WM 2.3 QTL (figure 3). This QTL, WM2.3<sup>BR,GC</sup> on Pv02, was identified in Bunsi/Raven (Ender and Kelly, 2005) and G122/CO72548 (Maxwell et al., 2007) populations, and this QTL conditions resistance in field and greenhouse straw test. Plant architectural traits conferring resistance through avoidance do not map near any of the QTL on Pv02, indicating that resistance mediated by these QTL is physiological (Soule et al., 2011). As recognized in previous studies (Miklas et al., 2007; Kolkman and Kelly, 2003; Ender and Kelly, 2005), the QTL region on Pv02 is in close proximity to chalcone synthase ChS, pathogenesis-related protein PvPR-2 (Walter et al., 1990), and polygalacturonase-inhibiting protein PGIP (Toubert et

al., 1992). These three genes are involved in plant defense against fungal pathogens, thus may be involved in host defense to infection by *S. sclerotiorum*.

Three of those four genes SUI-1, CHL and MYB, previously identified as involved in soybean response to the pathogen, showed different expression patterns across time points but did not show differential expression patterns across resistant and susceptible genotypes, suggesting that they are possibly related with a general response of the plant to the infection. These genes transcript were significantly higher in abundance in soybean resistant genotype compared to susceptible (Calla et al., 2009).

MtN3, with an unknown function was one of those genes proposed by Calla et al., (2009) with significant difference between resistant and susceptible genotypes on 7 DAI, which the susceptible genotype had higher expression compare to the resistant (figure 2). However, when the expression in 7 DAI and the control (day 0) was compared no significant differences between these two evaluation times were detected suggesting that the MtN3 gene has no relationship with resistance to white mold.

The contrast between control against average of resistance and susceptible genotypes in those different times of evaluation: 1, 2, 4 and 7 DAI, for the genes PGIP2, PGIP3, PGIP4 and MtN3 were conducted. This analysis showed in three of those four genes: PGIP2, PGIP3 and PGIP4 the average of the resistant genotype was not significantly different the control and the average of susceptible genotypes significant difference were observed. In the control the gene expression for those three genes were higher than in the other times of evaluation in the susceptible genotypes, after this, the expressions reduce along the times of evaluations (figure 2). This may happen because the plant response to wounding may release some PGIP protein, as reported by D'Olvidio et al. (2004b). The expressions of what in the resistance genotypes increase with the reaction to the inoculum but after reaching one high peak, the expression reduce

drastically, for this reason in average these genotypes do not differed from the control.

### CONCLUSION

It is possible to use those three genes: PGIP2, PGIP3 and PGIP4 to select resistant common bean genotypes to white mold.

The cDNA sequence can be used as new candidate genes for resistance and for marker development.

### REFERENCE

- Calla B., Vuong T., Radwan O., Hartman G. L., and Clough S. J. 2009. Gene Expression Profiling Soybean Stem Tissue Early Response to *Sclerotinia sclerotiorum* and In Silico Mapping in Relation to Resistance Markers. *The Plant Genome*. 2:149-166.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerré-Tugayé, M. T., and Dumas, B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:769-775.
- Cervone, F., De Lorenzo G., Degrà, L., Salvi, G., and Bergami, M. 1987. Purification and characterization of a polygalacturonase inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 85:631-637.
- Cober, E.R., S. Rioux, I. Rajcan, P.A. Donaldson, and D.H. Simmonds. 2003. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Science*. 43:92-95.
- Cooper, R. M. 1983. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. Pages 101-135 in: *Biochemical Plant Pathology*. J.A. Callow, ed. John Wiley and Sons, New York.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R., and Udvardi, M.K. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors:

Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* 38: 366–379.

Daroda L., Hahn K., Pashkoulov D., Benvenuto E. 2001. Molecular characterization and in planta detection of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonases isoforms. *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 317–325

Darvill, A., Bergmann, C., Cervone, F., De Lorenzo, G., Ham, K.-S., Spiro, M. D., York, W. S., and Albersheim, P. 1994. Oligosaccharins involved in plant growth and host-pathogen interactions. *Biochem. Soc. Symp.* 60:89-94.

De Lorenzo, G., D'Ovidio R., Cervone F., 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39:313-335.

De Lorenzo, G., and Ferrari, S. 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:1-5.

Di Matteo, A., Federici, L., Salvi, G., Johnson, K. A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., and Cervone, F. 2003. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(17):10124-10128

Di Pietro, A., and Roncero, M. I. G. 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*: Purification, characterization, and production during infection of tomato plants. *Phytopathology.* 86:1324-1330.

D'Ovidio R., Mattei B., Roberti S., Bellincampi D., 2004a. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696:237-244.

D'Ovidio R., Raiola A., Capodicasa C., Devoto A., Pontiggia D., Roberti S. Galletti R., Conti E., O'Sullivan D., De Lorenzo G., 2004b. Characterization of the complex locus of *Phaseolus vulgaris* encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) reveals sub-functionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiology* 135:2424-2435.

D'Ovidio R., roberti S., Di Giovanni M., Capodicasa C., Melaragni M., Sella L., Tosi P., Favaron F., 2006. The characterization of the soybean Pgip family reveals that a single member is responsible for the activity detected in soybean tissues. *Planta* 224:633-645.

- Ender, M., and J.D. Kelly. 2005. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. *Crop Sci.* 45:2482–2490.
- Greffroy V., Sévignac M., De Oliveira J.C.F., Fouilloux G., Sroch P., Thoquet P., Gepts P., Langin T., Dron M. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative traits loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13:287-296.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Janni M., Sella L., Favaron F., Blechl A.E., de Lorenzo G., D'Ovidio R., 2008. The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:171-177.
- Jones, D. A., and Jones, J. D. G. 1997. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv. Bot. Res.* 24:89-167.
- Jones, T. M., Anderson, A. J., and Albersheim, P. 1972. Host-pathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* 2:153-166.
- Kalunke, R.M., Janni, M., Sella, David, P., Geffroy V., Favaron, F., D'Ovidio R. 2011. Transcript analysis of the bean polygalacturonase inhibiting protein gene family reveals that Pvp<sub>gip2</sub> is expressed in the whole plant and is strongly induced by pathogen infection. *Journal of Plant Pathology.* 93(1): 141-148.
- Kolkman, J.M., and J.D. Kelly. 2003. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. *Crop Sci.* 43:539–548.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Lobo Jr, M and Nasser, L.C.B. 2007. Mofo branco pode limitar o agronegócio da soja, feijão e girassol em áreas infestadas. *Informativo Agromen.* 4:6-8.
- Manfredini C., Sicilia F., Ferrari S., Pontiggia D., Salvi G., Caprai C., Lorito M., De Lorenzo G. 2006. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus*

vulgaris inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:108-115.

Maxwell, J.J., M.A. Brick, P.F. Byrne, H.F. Schwartz, X. Shan, J.B. Ogg, and R.A. Hensen. 2007. Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. *Crop Sci.* 47:2285–2294.

Miklas, P.N. 2007. Marker-assisted backcrossing QTL for partial resistance to *Sclerotinia* white mold in dry bean. *Crop Sci.* 47:935–942.

Miklas, P.N., W.C. Johnson, R. Delorme, and P. Gepts. 2001. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. *Crop Sci.* 41:309–315.

Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.E. Beebe, and M.W. Blair. 2006b. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147:105–131.

Miklas, P.N., and S.P. Singh. 2007. Common bean. p. 1–31. In C. Kole (ed.) *Genome mapping and molecular breeding in plants Volume 3: Pulses, sugar, and tuber crops*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Mkwaila W.; Terpstra K. A.; Ender M.; Kelly J. K. 2011. Identification of QTL for agronomic traits and resistance to white mold in wild and landrace germplasm of common bean. *Plant Breeding* 130: 665-672.

Otto-Hanson, L., Steadman, J. R., Higgins, R., and Eskridge, K. M. 2011. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. *Plant Disease*. 95:1370-1377.

Pascual A., Campa A, Pérez-Vega E, Giraldez R, Miklas P, Ferreira JJ. 2010. Screening Common Bean for Resistance to Four *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates Collected in Northern Spain *Plant Dis.* 94:885-890.

Poinssot B., Vandelle E., Bentejac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos-Thevenot P, Pugin A. 2003. The endopolygalacturonases 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 553–564.

Protsenko M. A., Buza N.L., Krinitsyna A. A., Bulantseva E. A., Korableva N. P. 2008. Polygalacturonase inhibiting protein is a structural component of plant cell wall. *Biochemistry*. 73: 1053-1062.

Singh S.P., H. Terán, M. Lema, H.F. Schwartz, P.N. Miklas. 2007. Registration of white mold resistant dry bean germplasm line A 195. *Plant Regist.* 1:62-63.

Stotz, H. U., Bishop, J. G., Bergmann, C. W., Koch, M., Albersheim, P., Darvill, A. G., and Labavitch, J. M. 2000. Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56:117-130.

Toubert, P., A. Desiderio, G. Salvi, F. Cervone, L. Daroda, and G. De Lorenzo. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J.* 2:367–373.

Walter, M.H., J. Liu, C. Grand, C.J. Lamb, and D. Hess. 1990. Bean-pathogenesis-related proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol. Gen. Genet.* 222:353–360.

**TABLE**

TABLE 1 – Primers used in qRT-PCR

Primer	Gene	Sequence (5' -> 3')	Tm	%GC
PGIP1_F	AJ786408	CCTCACCGGGAAGATTCCA	56.70	57.9
PGIP1_R		TTAGCTGCGCTAGTCCCTGA	58.10	55.0
PGIP2_F	AJ786409	CCTCACCGGGAAGATTCCG	57.80	63.2
PGIP2_R		TTAGCTGCGTCAGTCCCTGC	59.80	60.0
PGIP3_F	AJ786410	TCGCATCAACAACCTCGTCGGT	61.10	54.5
PGIP3_R		TGGGACAAGAAATTGGGTATCTGGC	59.00	48.0
PGIP4_F	AJ786411	CGGAAACCGCATCTCCGGCACCATT	65.50	60.0
PGIP4_R		ACAGTCCCAACTTAGCCAGCGTCGT	64.00	56.0
Chl_1F	Gm-r1089-8081	AAAGAGAAACGGCGAACGAGGCTG	60.00	54.0
Chl_1R		CTTCATTCTGGGGCGTCGATCTGC	59.95	58.0
MtN3_1F	Gm-r1083-517	TTTGCTGGGGGCCATGCAATTAGG	60.00	54.0
MtN3_1R		GGCCAGTGTTCCCTCTGATGTGA	60.18	58.0
MYB_1F	Gm-r1089-3849	TGAAATGGCAACGAACGAGGCTCT	59.18	50.0
MYB_1R		GTGAAGGGGAATTGTGGTCGGTGT	59.11	54.0
SUI1_1F	Gm-r1083-1013	ACGCCATTGACCCATTTGCTGAG	60.06	54.0
SUI1_1R		CCCCTGCACTGTGGTCAGACTCTT	60.12	58.0
Actin_F	Housekeeping	GAAGTTCTCTTCCAACCATCC	53.1	47.6
Actin_R		TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	55.3	47.6

**FIGURE**

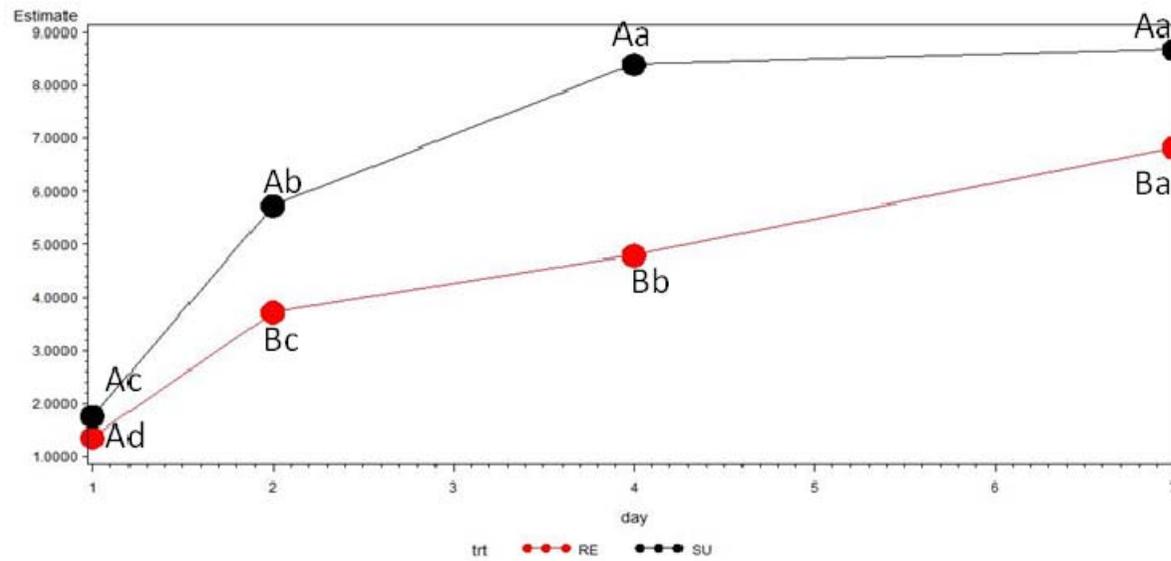


FIGURE 1 – Response of the resistance and susceptible genotypes in 1, 2, 4 and 7 days after inoculation. The capital letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between resistant and susceptible. The lowercase letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between times of inoculation

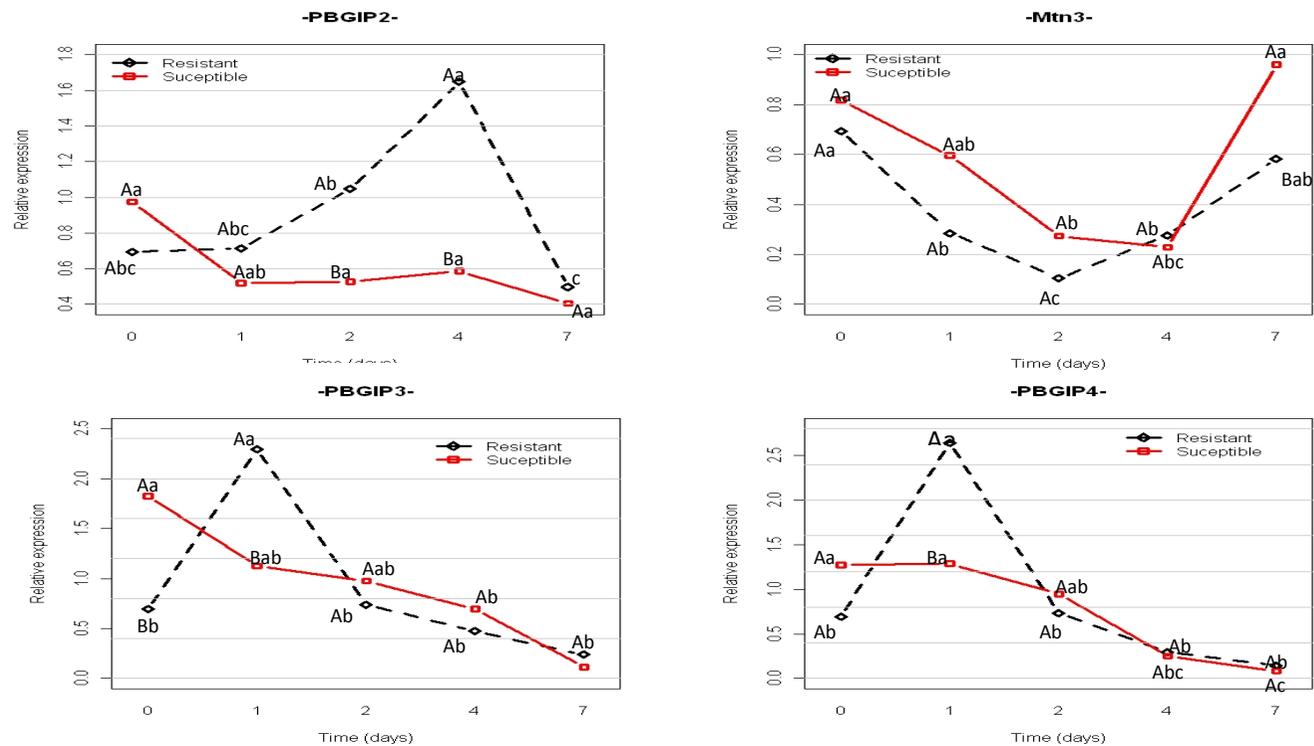


FIGURE 2 – Expression of genes: PGIP2, PGIP3, PGIP4 and Mtn3 in resistant and susceptible genotypes in different times of evaluation: day 0 (control), day 1, day 2, day 4 and day 7. The capital letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between resistant and susceptible. The lowercase letter represents the least significant differences (LSMEANS) at 5% were used to assess significance between times of inoculation

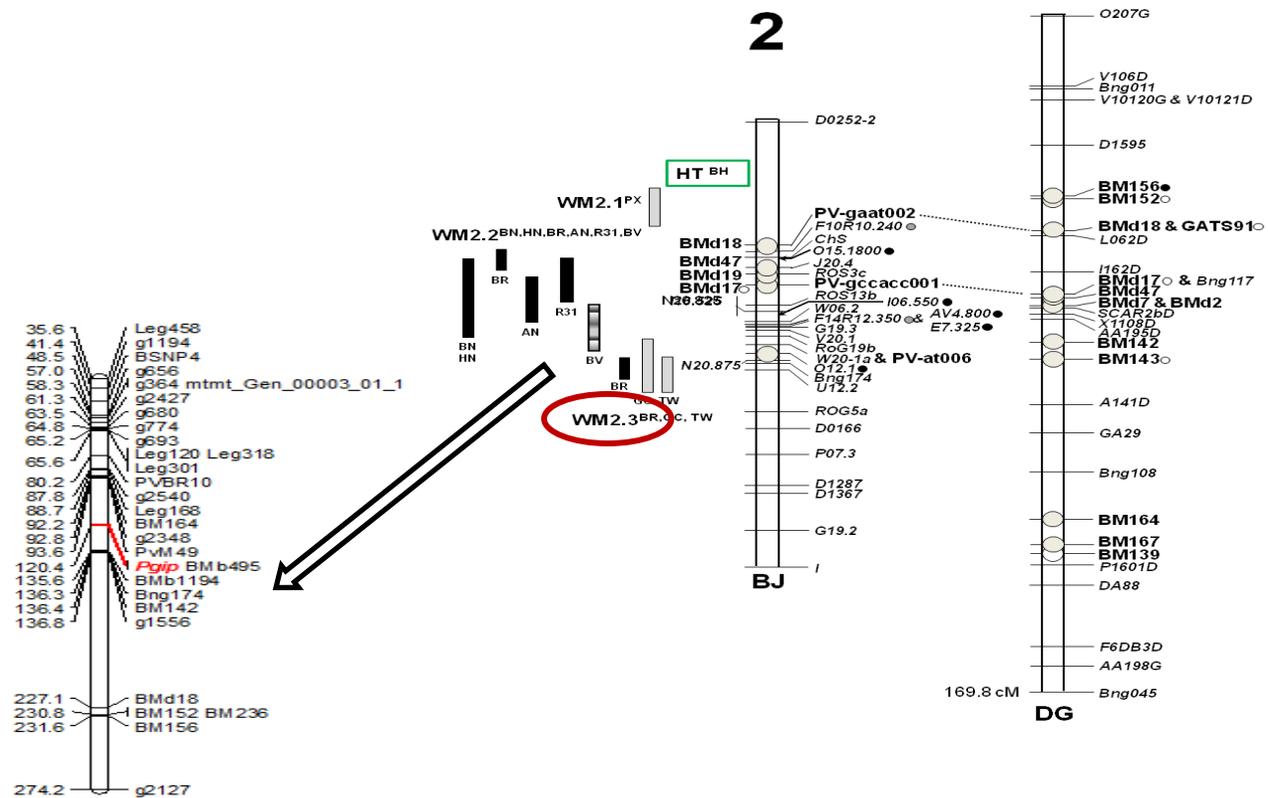


FIGURE 3 - Position of members PGIP of family genes in the linkage group 2 of common bean and the three QTLs: WM2.1, WM2.2 and WM 2.3 conferring resistance to white mold already identify in this LG