



RAFAEL PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E REAÇÃO DE LINHAGENS DE
FEIJOEIRO INOCULADAS COM MISTURA DE RAÇAS DE
Pseudocercospora griseola EM DIFERENTES ESTÁDIOS E
AMBIENTES**

**LAVRAS – MG
2017**

RAFAEL PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO
INOCULADAS COM MISTURA DE RAÇAS DE *Pseudocercospora griseola* EM
DIFERENTES ESTÁDIOS E AMBIENTES**

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

Orientadora:
Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS – MG
2017**

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

Pereira, Rafael.

Diversidade genética e reação de linhagens de feijoeiro
inoculadas com mistura de raças de *Pseudocercospora griseola* em
diferentes estádios e ambientes / Rafael Pereira. - 2015.

94 p.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2015.

Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Mancha angular. 3. Mistura. I. Souza,
Elaine Aparecida de. II. Título.

RAFAEL PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO
INOCULADAS COM MISTURA DE RAÇAS DE *Pseudocercospora griseola* EM
DIFERENTES ESTÁDIOS E AMBIENTES**

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

Aprovada em 13 março de 2017.

Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu	Embrapa Arroz e Feijão
Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza	Embrapa Arroz e Feijão
Dr. Trazilbo José de Paula Júnior	EPAMIG

Orientadora:
Profa. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS – MG
2017**

A DEUS, por sempre estar presente em minha vida, sendo provedor da saúde, paz, alegrias e conquistas em toda minha vida. Muito obrigado meu PAI!

OFEREÇO

Aos meus pais, Dirlene e Aroldo; aos meus avós, José, Tonica, Samuel, Dalva (*in memoriam*) e aos meus irmãos, Michel e Rafaela.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre do meu lado, me iluminando e ajudando a vencer os obstáculos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos melhores anos de minha vida, ali vividos.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e orientadora Profa. Elaine Aparecida de Souza pela, amizade, disponibilidade, dedicação e ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos pesquisadores Dra. Ângela e Dr. Thiago pelas imensas contribuições concedidas para realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Ângela, Dr. Thiago, Dr. Trazilbo, Profa. Elaine e Prof. Edson.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, César Brasil, João Bosco, Magno Ramalho, João Candido, José Airton, Elaine, Flávia e Lisete, Vânia pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência e amizade durante o melhor período da minha vida.

À todos os amigos do departamento de Biologia, professores, alunos e servidores, pela boa convivência e amizade.

Aos funcionários do DBI, Zélia, Rafaela, Lilian, Ironcina e Du (*in memoriam*) pela convivência, amizade e auxílio durante o curso.

Aos colegas laboratoristas Lamartine, Miller e Gisele, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Aos companheiros de Laboratório da UFLA, Joyce, Francine, Quelén, Suelen, Larissa, Mariana Andrade, Mariana Junqueira, Luanna, Paula, Júlio, Lucas, Ana, Carol, Margot, Paulo e Samira pelo apoio e amizade.

Aos amigos da pós-graduação, Rafael, Renato, Zé Maria, Kaio, Samira, Camila, pela boa convivência e amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho Rafael e Renato pelas contribuições nas análises estatísticas.

Aos meus pais, Aroldo e Dirlene, por todo apoio e confiança em mim depositados em todos os momentos da minha vida, além dos muitos ensinamentos e exemplos de ética, humildade e honestidade.

Aos meus irmãos, Rafaela e Michel, pela boa convivência, companheirismo e amor.

A minha querida vó Dalva (*in memoriam*), pelo apoio e constante ajuda durante toda minha vida.

A minha tia, Marilene (Nena), pelo amor e carinho concedido a mim durante toda minha vida.

A minha namorada Gabriela, pelo companheirismo e amor.

Aos amigos de república, Andre, Lucas, Renato, Paulo, Cassius, Thiago e Fernando pelos vários momentos de descontração e alegrias.

A todos que de alguma forma fizeram parte de minha vida nesses últimos anos de intenso aprendizado.

RESUMO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a diversidade genética entre diferentes linhagens do feijoeiro; avaliar e comparar diferentes metodologias de fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro para uso no melhoramento; verificar a eficiência do uso de mistura de isolados de *Pseudocercospora griseola* para a avaliação da severidade da doença a partir da comparação da agressividade entre isolados/mistura. Para a análise da diversidade genética das 149 linhagens do feijoeiro foram utilizados 18 marcadores microsatélites polimórficos distribuídos em nove cromossomos do feijoeiro. Foram identificados 127 alelos, com média de 7,47 alelos por loco, e a diversidade média de 0,55. As estimativas das similaridades genéticas variaram de 0 a 0,96. A partir da abordagem utilizada para inferir a estrutura genética populacional, verificou-se a separação das linhagens em sete grupos (K=7). Os marcadores SSRs utilizados foram úteis para estimar parâmetros genéticos no germoplasma do feijoeiro, bem como, para separar as linhagens avaliadas em grupos de maior similaridade genética. Para comparação entre as diferentes estratégias de fenotipagem foram avaliadas 144 linhagens de feijoeiro, quanto à reação a *P. griseola* em casa de vegetação (inoculação nos estádios V2 e V3 das plantas) e no campo. A porcentagem de linhagens resistentes considerando a fenotipagem nos estádios V2, V3 e no campo foi de 31%, 7% e 10%, respectivamente. As estimativas dos índices de coincidência entre as avaliações realizadas no campo e em casa de vegetação foram 63%, 68%, 69% e 88% entre V2-V3-campo, V2-V3, V2-campo e V3-campo, respectivamente. A análise conjunta utilizando abordagem de modelos mistos mostrou-se promissora para a identificação de genótipos resistentes nos diferentes ambientes/estádios de avaliação. Os genótipos resistentes foram aqueles com maior nível de resistência na média dos estádios/ambientes de avaliação. A comparação entre os isolados e a mistura do patógeno foi realizada por meio da avaliação da severidade da doença, utilizando escala de notas e o percentual da área foliar lesionada (%AFL). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo utilizados três isolados e a respectiva mistura, inoculados em seis linhagens de feijoeiro. Na comparação dos isolados e da mistura verificou-se que a escala de notas foi mais eficiente em relação a %AFL para a distinção da agressividade, sendo portanto, o método mais indicado para avaliar a severidade da mancha angular do feijoeiro. A mistura de raças de *P. griseola* foi eficiente na avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro, apresentando maior agressividade em relação às raças inoculadas individualmente.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Mancha angular; Mistura; Fenotipagem; Marcadores moleculares.

GENERAL ABSTRACT

Objectives of this research were: evaluate genetic diversity in different common bean lines; evaluate and compare different phenotyping methodologies of angular leaf spot severity in common bean for use in breeding programs; verify the efficiency of mixture of *Pseudocercospora griseola* strains to evaluate disease severity by comparing aggressiveness among strains/mixture. In genetic diversity analysis of 149 common bean lines, 18 polymorphic microsatellite markers distributed in nine common bean chromosomes were used. One hundred and twenty seven alleles were identified, with average of 7.47 alleles per locus and average diversity among loci of 0.55. Estimates of genetic similarities ranged of 0 to 0.96. Using an approach to infer genetic population structure, common bean lines were separated into seven groups (K = 7). SSR markers used were useful to estimate genetic parameters in common bean germplasm, as well as to separate bean lines evaluated in groups of greater genetic similarity. To comparing different phenotyping strategies, 144 common bean lines were evaluated to reaction to *P. griseola* in greenhouse (inoculation in V2 and V3 stages) and in field. Percentage of resistant lines considering phenotyping at V2 stage, V3 stage and in field was 31%, 7% and 10%, respectively. Estimates of coincidence indices between field and greenhouse evaluations were 68%, 69% and 88% in V2-V3, V2-field and V3-field, respectively. Joint analysis using mixed model approach was promising to identify resistant genotypes in different environments/evaluation stages. Resistant genotypes were those with highest level of resistance in average of environments/evaluation stages. Comparison between individual strains and strains mixture was carried out by assessment of disease severity using a score scale and percentage of leaf area with symptoms (%LAS). Experiments were carried out in greenhouse, using three strains and respective mixture, inoculated in six common bean lines. In comparison of strains and mixture, it was verified that score scale was more efficient than %LAS to distinguish aggressiveness, being therefore, the most indicated method to evaluate angular leaf spot severity in common bean. Mixture of *P. griseola* races was efficient to evaluate angular leaf spot severity in common bean, presenting greater aggressiveness compared with the individually races inoculated.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; Angular Leaf Spot; Mixture; Phenotyping; Molecular markers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 A cultura do feijão	12
2.2 Mancha angular do feijoeiro	13
2.3 Variabilidade patogênica e controle genético da reação a <i>P. griseola</i>	14
2.4 Fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro	16
2.5 Uso de mistura de raças de fungos para avaliação da resistência	18
2.6 Marcadores microssatélites em estudos de divergência genética	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 1: Estrutura e diversidade genética entre linhagens de feijoeiro utilizando marcadores microssatélites	
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Germoplasma utilizado	30
2.2 Extração de DNA e genotipagem com marcadores SSR	30
2.3 Análises estatísticas	32
3 RESULTADOS	32
4 DISCUSSÃO	36
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
6 APÊNDICE	43
CAPÍTULO 2: Fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro e suas implicações no melhoramento convencional para resistência à doenças	
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Linhagens avaliadas	50
2.2 Isolados, mistura e preparo das suspensões	51
2.3 Fenotipagem em casa de vegetação	51
2.3.1 Fenotipagem no estádio V2	51
2.3.2 Fenotipagem no estádio V3	52
2.4 Fenotipagem em campo	52

2.5	Análise dos dados	52
3	RESULTADOS	54
3.1	Resistência genética das linhagens de feijoeiro à <i>P. griseola</i> nos estádios V2, V3 e no campo	54
3.2	Resistência genética das linhagens à <i>P. griseola</i> na média dos estádios de avaliação.....	56
4	DISCUSSÃO	60
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
6	APÊNDICE	69
CAPÍTULO 3: Uso de mistura de raças de <i>Pseudocercospora griseola</i> na avaliação da mancha angular do feijoeiro		
		77
1	INTRODUÇÃO	79
2	MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1	Isolados, mistura e preparo das suspensões.....	80
2.2	Testes de patogenicidade	81
2.3	Análise dos dados	82
3	RESULTADOS	83
4	DISCUSSÃO	86
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Setor de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA), possui uma coleção de trabalho contendo linhagens elites e cultivares, além de linhagens provenientes de vários ciclos do programa de seleção recorrente visando resistência a mancha angular. Essas linhagens de feijoeiro pertencem a diferentes tipos de grãos, no entanto, a maioria dos acessos possuem grãos tipo carioca (MATOS, RAMALHO; ABREU 2007). A caracterização genética das linhagens de feijoeiro provenientes deste programa de melhoramento não tem sido relatada na literatura. Assim, o uso de marcadores moleculares pode auxiliar os melhoristas na avaliação do nível de variabilidade genética presente entre os genótipos, principalmente considerando linhagens com mesmo tipo de grão. Além disso, caracterizar essas linhagens quanto a reação a diferentes patógenos que causam doenças no feijoeiro, como por exemplo, a mancha angular é importante para auxiliar os melhoristas nos programas de melhoramento visando resistência à doenças.

A cultura do feijoeiro é submetida a muitos estresses bióticos e abióticos que causam redução expressiva na produtividade e afetam a qualidade do produto, destacando-se a ocorrência de fitopatógenos causadores de doenças. A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc) Crus & U. Brown, interfere na produção desta cultura, podendo causar perdas de até 80% na produção, dependendo da suscetibilidade das cultivares, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura (JESUS et al., 2001; SINGH et al., 2010). O controle da mancha angular por meio da utilização de cultivares resistentes vem se destacando por apresentar grande potencial em minimizar os custos de produção além de diminuir os danos causados ao ambiente. Entretanto, a variabilidade patogênica de *P. griseola* tem dificultado a obtenção de cultivares com resistência efetiva e durável (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2015; JARA et al., 2015; PEREIRA et al. 2015).

A fenotipagem da severidade da mancha angular das plantas é importante na identificação de novas fontes de resistência, na seleção de progênies nos programas de melhoramento, bem como, na identificação de locos de resistência visando a seleção assistida por marcadores. Uma fenotipagem confiável é uma das etapas fundamentais para que a avaliação da doença seja precisa, e deve ser realizada de maneira criteriosa. A avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro tem sido realizada em casa de vegetação estágio V2 (LIBRELON et al., 2015), V3 (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR CORRALES 1987) e no campo (ARANTES et al., 2010). No entanto, não há informações na literatura sobre a

comparação e eficiência destas diferentes estratégias de fenotipagem para a avaliação da mancha angular do feijoeiro.

A avaliação da reação de linhagens de feijoeiro à *P. griseola* para a identificação de fontes de resistência em condições controladas, tem sido realizada por meio da inoculação de isolados monospóricos, utilizando uma ou poucas raças do patógeno (BALBI et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2014; PÁDUA et al. 2016). O uso de mistura de raças para a avaliação da doença pode ser uma estratégia adequada para a seleção de linhagens com maior espectro de resistência. No entanto, as informações na literatura sobre a eficiência deste método na avaliação da mancha angular no feijoeiro são escassas e não há informações sobre a agressividade de isolados/raças quando se utiliza a mistura.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: determinar a diversidade genética entre diferentes linhagens do feijoeiro; avaliar e comparar diferentes metodologias de fenotipagem da severidade da mancha angular para uso no melhoramento e verificar a eficiência do uso de mistura de isolados de *P. griseola* para a avaliação da severidade da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é amplamente cultivado em países tropicais e subtropicais, constituindo importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, especialmente para a população de baixa renda (SILVA et al., 2010; AKOND et al., 2011; BLAIR 2013). O elevado valor nutritivo e a alta taxa de consumo faz do feijoeiro uma cultura de grande importância para muitas pessoas em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (BEBBE, 2010). Aproximadamente 60% da produção de feijão está concentrada em seis países: Índia, China, Myanmar, México e Estados Unidos da América e Brasil, sendo este último o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa (FAO, 2015).

No Brasil são produzidos vários tipos de grãos comerciais, como por exemplo, preto, rosinha e carioca, sendo possível verificar a preferência regional para o consumo entre a população brasileira (CARDOSO et al., 2013). Em Minas Gerais, por exemplo, o feijão tipo carioca é preferido pelos consumidores, por isso grande parte dos programas de melhoramento

do estado, tem se preocupado em utilizar nos programas linhagens com este tipo de grão (MATOS; RAMALHO; ABREU 2007).

O feijão é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros. Na safra 2015/2016 foram cultivados aproximadamente 2.837,4 mil hectares no país, com retração de 6,2% em relação à safra passada. A região sul é a que apresenta maior produção com 521,1 mil ha cultivados (com produção de 828,6 mil toneladas). A produtividade é variável entre as regiões, sendo dependente de vários fatores como clima, época de plantio, nível de tecnologia empregado, variando de 241 kg/ha, na região nordeste a 1.671 kg/ha, na região sudeste. No entanto, a produtividade média do feijoeiro, considerando todo o território nacional, está muito abaixo de seu potencial produtivo (CONAB, 2016).

Os baixos rendimentos são em grande parte devido aos efeitos negativos de muitos fatores bióticos e abióticos que limitam o potencial genético da cultura no Brasil e no mundo (SINGH & SCHWARTZ, 2010). Além das condições climáticas adversas, a ocorrência de doenças encontra-se entre os principais fatores responsáveis pela redução na produtividade e na qualidade dos grãos do feijoeiro no Brasil (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). Dentre as doenças que infectam a cultura do feijoeiro, pode-se destacar a mancha angular, devido às perdas que a mesma causa na cultura, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis para o progresso da doença (SINGH; SCHWARTZ, 2010; SOUZA et al., 2015).

2.2 Mancha angular do feijoeiro

A ocorrência de mancha angular no feijoeiro tem sido relatada em diversas regiões do mundo, como nas Américas, Europa e Ásia. O agente etiológico dessa doença é um fungo imperfeito (Ascomycota) da classe Pezizomycotina, ordem Dothideomycetes, família Mycosphaerellaceae, primeiramente descrito como *Isariopsis griseola*, por Saccardo em 1878 (STENGLEIN et al., 2006). Em 1909 a espécie foi reclassificada por Ferraris com base em aspectos morfológicos como *Phaeoisariopsis griseola* e, por fim, Crus et al. (2006), mediante estudos com marcadores moleculares, sugeriram *Pseudocercospora griseola*.

A doença é particularmente importante em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são moderadas e ocorrem períodos de alta umidade relativa (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). O início do processo de infecção no feijoeiro ocorre com a germinação dos conídios, aproximadamente três horas após a inoculação, sendo que a penetração ocorre nos estômatos, principalmente na face abaxial das folhas. Os cloroplastos apresentam sinais de degradação três dias após a infecção, seguindo-se de necrose das células-

guarda e das células do mesófilo adjacente, desintegração do parênquima paliçádico e, por fim, destruição da epiderme. Mediante a morte das células e dos tecidos envolvidos, são formados estromas, de onde emergem os conidióforos contendo os conídios (MONDA et al., 2001).

Na porção abaxial da folha, sinêmios com diâmetro de 40 μm e comprimento de 500 μm , são compostos por conidióforos paralelos e escuros, formando tufos visíveis a olho nu. No ápice de cada conidióforo são produzidos os conídios hialinos, geralmente septados, com formato cilíndrico e ligeiramente curvo medindo 33,6 a 43,33 μm de comprimento e 5,2 a 10,8 μm de largura (LIEBENBERG & PRETORIUS, 1997). A principal forma de disseminação dos conídios ocorre pelo vento, entretanto, gotículas de água, implementos agrícolas e sementes contaminadas também transmitem o patógeno (SINGH & SCHWARTZ, 2010).

Os sintomas da mancha-angular podem ocorrer em toda a parte aérea, especialmente nas folhas e vagens (LIEBENBERG & PRETORIUS, 1997; BOREL et al., 2011). Lesões em menor proporção também podem ocorrer no caule. Nas folhas primárias, as lesões geralmente são circulares. Nas folhas trifolioladas, as lesões consistem de pequenas manchas que variam de cinza-escuro a marrom e, geralmente, são delimitadas pelas nervuras, o que proporciona o aspecto angular característico da doença. As lesões podem coalescer, causando a desfolha prematura, que compromete o enchimento das vagens, refletindo em perdas na produtividade. Nas vagens, as lesões apresentam-se na forma de manchas superficiais, geralmente circulares, de coloração castanho-avermelhada. A infecção pode avançar pelas sementes, as quais se tornam manchadas, mal desenvolvidas e enrugadas. As plantas podem apresentar no caule, ramos e pecíolos lesões alongadas de coloração castanho-escuro (BIANCHINI et al., 1997; PEREIRA et al., 2011). Na ausência de hospedeiros vivos, o fungo sobrevive em restos culturais por período superior a 19 meses e, nas sementes, por nove ou doze meses (LIEBENBERG & PRETORIUS, 1997).

2.3 Variabilidade patogênica e controle genético da reação a *P. griseola*

A variabilidade patogênica ou capacidade do patógeno de causar doenças em determinadas cultivares de um mesmo hospedeiro é definida como raça (SARTORATO, 2002). Em 1995 o CIAT, com a finalidade de padronização na caracterização de raças de *P. griseola*, propôs um conjunto de doze cultivares diferenciadoras sendo seis de origem andina e seis de origem mesoamericana (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987). Para a denominação da raça, foi proposta a utilização do método de Habgood (1970).

A alta variabilidade patogênica de *P. griseola* tem sido observada em várias oportunidades (OROZCO E ARAYA 2005; SILVA et al., 2008; JARA et al., 2015; BALBI et al., 2009; PEREIRA et al., 2015). Jara et al. (2015) realizaram uma revisão dos trabalhos de caracterização de raças de *P. griseola*, de 1995 a 2015. Segundo estes autores, neste período foram caracterizados 589 isolados, em 27 países diferentes, incluindo países da África, América Central e América do Sul. Um total de 134 raças de *P. griseola* foi identificado em todo o mundo, demonstrando a ampla variabilidade patogênica desse fungo.

Nos últimos levantamentos realizados no Brasil foi constatada a predominância de isolados da raça 63-63 sendo que esta raça suplanta todos os alelos de resistência presentes no conjunto de diferenciadoras (SILVA et al., 2008; BALBI et al., 2009; PEREIRA et al., 2013). A variação na patogenicidade de isolados já foi verificada até mesmo dentro de uma mesma raça (63-63), quando inoculados em diferentes grupos de cultivares de feijão (PEREIRA et al., 2015; SANGLARD et al., 2015). Segundo Pereira et al. (2015), o conjunto de cultivares diferenciadoras para determinação de raças de *P. griseola* tem sido ineficiente para detectar a diferença apresentada dentro da raça 63-63. Assim, sugeriram uma adequação do grupo de cultivares diferenciadoras de forma que seja detectada a variabilidade dentro da raça 63-63.

Estudos sobre o controle genético da resistência do feijoeiro à mancha angular têm sido realizados, sendo relatada a presença da resistência vertical (CARVALHO et al. 1998; FERREIRA 2000; NIETSCHKE 2000; CAIXETA et al. 2003; MAHUKU et al. 2004; CHATAIKA et al. 2010; BOREL et al., 2011). A presença da resistência horizontal também tem sido verificada em inúmeros trabalhos (AMARO et al. 2007; ARANTES et al. 2010; MAHUKU et al. 2009; OBLESSUC et al. 2012; PEREIRA et al., 2015).

Pereira et al. (2015) avaliaram a agressividade de raças do patógeno em diferentes grupos de linhagens de feijoeiro e verificaram a presença de resistência vertical e horizontal, sendo esta última considerada o principal tipo de resistência no patossistema *P. griseola*-feijoeiro. Amaro et al. (2007) avaliaram a variabilidade entre linhagens de feijão durante cinco ciclos de seleção recorrente para resistência à mancha-angular e observaram uma graduação nos sintomas entre as linhagens consideradas resistentes, e atribuíram essa graduação ao efeito ambiental, enfatizando a possível existência de controle poligênico desse caráter. Logo, infere-se que, além de genes com grande efeito (resistência específica), estejam envolvidos genes de menor efeito ou modificadores, com influência do ambiente, sugerindo que o caráter reação à *P. griseola* apresenta herança quantitativa (MAHUKU et al. 2009).

Oblessuc et al. (2012) estudaram uma população de 346 linhagens recombinantes (RILs) provenientes do cruzamento entre IAC-UNA x CAL 143, avaliadas em casa de vegetação com inoculação da raça 0-39, e em campo. Foram mapeados vários QTLs em diferentes grupos de ligação. Porém, entre os QTLs identificados, apenas ALS10.1^{DG,UC} mostrou efeito importante em ambos os ambientes, sendo que a baixa correlação entre notas de campo e casa de vegetação foi devido principalmente à interação genótipos x ambientes. Utilizando a mesma população descrita anteriormente e a raça 0-39, Oblessuc et al. (2013) mapearam um QTL no grupo de ligação 10 (ALS10.2^{DG,UC}) que explica 5% e 15% da variância fenotípica nos experimentos de campo e casa de vegetação, respectivamente.

Keller et al., (2015) realizaram um estudo de mapeamento utilizando uma população oriunda do cruzamento entre G5686 x Sprite, inoculadas com a raça 31-0 em casa de vegetação. Foram identificados três QTLs associados a variação fenotípica envolvidos na expressão da reação à mancha angular. O principal QTL identificado (ALS4.^{1GS}) foi encontrado no grupo de ligação 4 explicou 75% da variação fenotípica. Os outros dois QTLs de menor efeito (ALS10.1DG, UC, GS e ALS9.1GS) explicaram 4.9 e 1.7 % da variação fenotípica, respectivamente.

2.4 Fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro

A fenotipagem da severidade da mancha angular das plantas é importante na identificação de novas fontes de resistência, na seleção de progênies nos programas de melhoramento, bem como, na identificação de locos de resistência visando à seleção assistida por marcadores. Uma fenotipagem confiável é uma das etapas fundamentais para que a avaliação da doença seja precisa, e deve ser realizada de maneira criteriosa. Em programas de melhoramento e também, na identificação de QTLs a precisão na fenotipagem é essencial para a seleção de genótipos favoráveis, visando maximizar os ganhos com a seleção (OBLESSUC et al., 2012; REZENDE et al., 2014).

Para identificação de progênies ou linhagens resistentes à mancha angular é necessário quantificar os sintomas e então proceder à análise dos dados. Para isso, pode ser avaliada a severidade da doença que consiste na porcentagem da área foliar com sintomas. Nesse caso alguns procedimentos foram sugeridos: o uso de escalas descritivas, escalas diagramáticas, medidas relativas de área, análise de imagens, sensoriamento remoto, dentre outros. A utilização de escalas diagramáticas tem sido recomendada e amplamente utilizada nos trabalhos para a avaliação da severidade da mancha angular (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-

CORRALES 1987; GODOY et al., 1997; NIESTCHE et al., 2001; LIBRELON et al., 2015). Estas escalas utilizam vários graus (notas), geralmente de um a nove, para descrever a intensidade da doença.

A fenotipagem de plantas em casa de vegetação tem sido realizada por meio de inoculação artificial de isolados de *P. griseola* no estágio de desenvolvimento V3 (SILVA et al. 2008; PEREIRA et al. 2013; JARA et al., 2015). Neste caso, a inoculação é realizada após a expansão completa das folhas trifolioladas, sendo a avaliação realizada visualmente utilizando uma escala com nove graus de severidade proposta por Van Schoonhoven; Pastor-Corrales (1987). Essa metodologia é a mais comumente utilizada, tanto para a identificação de raças quanto para a identificação de fontes de resistência em condições controladas.

A avaliação da severidade da mancha angular para seleção de progênies no campo tem sido realizada com sucesso, no programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular da Universidade Federal de Lavras, em parceria com a Embrapa Arroz e Feijão (AMARO et al., 2007; ARANTES et al., 2010; REZENDE et al., 2014; LIBRELON et al., 2016). Neste programa, a fenotipagem das plantas é realizada no campo, sendo atribuída uma nota média para a parcela utilizando a escala de Van Schoonhoven; Pastor-Corrales (1987). A avaliação é realizada 33 dias após o florescimento, na safra da seca, quando as condições são favoráveis para o desenvolvimento da doença e há maior ocorrência do patógeno no campo (REZENDE et al., 2014).

Recentemente, tem sido proposta a avaliação precoce de plantas de feijoeiro, ou seja, no estágio V2, cuja principal vantagem é avaliar um grande número de genótipos simultaneamente. A avaliação da severidade da mancha angular neste estágio de desenvolvimento do feijoeiro, com a utilização de uma escala específica, tem se mostrado eficiente na seleção de progênies e linhagens resistentes (PEREIRA et al., 2011; LIBRELON et al., 2015; PÁDUA et al., 2016). Utilizando esta metodologia é possível acelerar o programa de seleção recorrente realizando três ciclos de avaliação, seleção e recombinação por ano em casa de vegetação, ao contrário do método convencional em que é realizado apenas um ciclo por ano.

Como mencionado, a escolha da estratégia de fenotipagem é essencial em diversas situações para o melhorista na obtenção de linhagens com resistência efetiva e duradoura. Contudo, não existem relatos na literatura da comparação entre estes diferentes métodos de fenotipagem, e qual representaria maiores ganhos para os programas de melhoramento.

2.5 Uso de mistura de raças de fungos para avaliação da resistência

A avaliação da reação de linhagens e progênies de feijoeiro à *P. griseola* tem sido realizada por meio da inoculação artificial de isolados monospóricos utilizando as raças mais frequentes (BALBI et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2014; PÁDUA et al. 2016). No entanto, quando o número de raças é elevado, torna-se necessária uma grande quantidade de sementes, o que pode inviabilizar a avaliação das progênies em um programa de melhoramento (FALLEIROS 2016). Além disso, a inoculação de apenas uma ou poucas raças pode explicar a dificuldade dos melhoristas em obter cultivares com resistência durável que seja efetiva em diferentes locais (CHILIPA et al., 2016; WANJAU et al., 2016).

Desta forma, uma alternativa para a avaliação de genótipos quanto à resistência genética é o uso de uma mistura de isolados das diferentes raças do patógeno. Estudos utilizando mistura de isolados têm sido realizados com sucesso em diferentes patossistemas (MEBRATE; COOKE 2001; OHE; MIEDANER 2010; CHILIPA et al., 2016; WANJAU et al., 2016; FALLEIROS 2016).

A avaliação de progênies utilizando inoculação artificial de uma mistura de isolados tem sido utilizada em alguns trabalhos visando à seleção de genótipos resistentes (BOTELHO et al., 2011; MACCAFERRI et al., 2008; WANJAU, 2016). Neste caso, a inoculação de mistura é utilizada para garantir a predominância das raças presentes nas principais áreas produtoras, constituindo-se de uma alternativa para viabilizar a avaliação de progênies no programa de melhoramento. No entanto, nestes estudos, os isolados utilizados para compor a mistura não foram previamente caracterizados quanto à agressividade.

Mebrate; Cooke (2001) realizaram um estudo no patossistema *Stagonospora nodorum*-trigo, com o objetivo de comparar o progresso da doença, utilizando três isolados monospóricos e uma mistura destes isolados. Estes autores verificaram menor período de incubação e maior severidade da doença quando se utiliza a mistura de isolados ou o isolado mais agressivo. Ohe; Miedaner (2010) realizaram um estudo no patossistema *Fusarium graminearum*-trigo, com o objetivo de verificar a agressividade de isolados e misturas binárias do fungo quando inoculados nas plantas, e a competição de isolados presentes na mistura. De forma semelhante ao trabalho citado anteriormente, estes autores concluíram que não existe diferença na agressividade entre a mistura e o isolado mais agressivo. Com a utilização de marcadores moleculares verificou-se a ocorrência de competição entre os isolados da mistura.

Chilipa; Lungu; Tembo (2016) avaliaram a severidade da antracnose em diferentes progênies do feijoeiro inoculados com as raças 54 e 311, utilizando os isolados separadamente e em mistura. Com base nos resultados obtidos os autores sugeriram que, devido aos efeitos sinérgicos da mistura de isolados de *C. lindemuthianum*, sua utilização é adequada para selecionar genótipos de feijão resistentes nos programas de melhoramento. Falleiros (2016) avaliaram a severidade da antracnose do feijoeiro em diferentes linhagens, a partir da inoculação das raças 65, 73 e 81 individualmente e também em misturas. A partir dos resultados obtidos, foi evidenciado que a mistura de raças de *C. lindemuthianum* foi eficiente na avaliação da severidade da antracnose e que a maioria das misturas de raças de *C. lindemuthianum* apresentaram maior agressividade que as raças individualmente.

2.6 Marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética

O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético tem se tornado frequente devido a suas diversas vantagens, como por exemplo: elevado polimorfismo, inexistência de influência ambiental, distribuição ao longo de todo genoma e o fato de serem herdáveis. Esta ferramenta tem sido utilizada em análise genética com as mais diversas finalidades, entre estas: estudos de fluxo gênico, estimativa de taxa de cruzamento e parentesco, análise de diversidade genética, identificação de genótipos (*fingerprinting*), construção de mapas genéticos, seleção assistida por marcadores, dentre outros. Existe atualmente uma variedade enorme de marcadores moleculares, cuja escolha irá depender de inúmeros fatores, tais como: objetivo da pesquisa, recursos financeiros e infraestrutura disponível (SANTOS 2011).

Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados para desenvolver marcadores moleculares e sequenciar o genoma do feijoeiro comum, visando ampliar a exploração dos recursos genômicos dessa espécie. Dentre os marcadores moleculares utilizados nos estudos de genética molecular do feijoeiro, destacam-se os microssatélites (MULLER et al., 2014). A vantagem na utilização desses marcadores consiste no fato de serem multialélicos, possuírem herança codominante, ampla distribuição no genoma, alta taxa de polimorfismo, necessitarem da utilização de pequena quantidade de DNA dos indivíduos sob análise, alta reprodutibilidade por meio de PCR e não sofrerem influência ambiental (ANDRADE et al., 2013; SCHUSTER et al., 2004). Além disso, os SSRs são reconhecidos internacionalmente como descritores moleculares para várias análises de caracterização genotípica, tais como, avaliação de pureza em sementes, mapeamento genético, teste de paternidade, identificação de QTLs, seleção

assistida e estudos de divergência genética (JESUS et al., 2006; RAMOS et al., 2006; SHUSTER et al., 2004; MULLER et al., 2014).

Nos programas de melhoramento genético do feijoeiro, os marcadores SSR podem ser utilizados como ferramentas para auxiliar no planejamento de cruzamentos e a escolha de genitores, bem como na caracterização de linhagens pertencentes a bancos de germoplasma, uma vez que permitem uma análise dos genótipos por meio de estudos de diversidade genética (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014). A caracterização de linhagens de feijoeiro por meio de marcadores SSR têm sido realizado com sucesso em várias oportunidades (MULLER et al., 2015; ZARGAR et al., 2016; CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014).

Cardoso et al. (2013) estimaram a diversidade genética de 172 linhagens e cultivares do feijoeiro utilizadas em cinco ciclos de ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), conduzidos nos últimos oito anos pelo programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão. Foram utilizados nove sistemas de genotipagem multilocus compostos por 24 marcadores SSRs polimórficos. Foram identificados 187 alelos, com média de 7,79 alelos por loco e uma diversidade genética média de 0,65. Foram identificadas linhagens com maior divergência genética, o que permite o uso destas informações para planejamento de cruzamentos entre linhagens elite com baixo grau de parentesco genético.

Cardoso et al. (2014) caracterizaram cultivares comerciais de feijão desenvolvidas em várias instituições de pesquisa do Brasil, usando marcadores microssatélites com objetivo de determinar o grau de diversidade genética entre as amostras analisadas. Foram utilizados 24 marcadores SSRs polimórficos sendo identificados um número médio de alelos por loco e a diversidade genética de 8,29 e 0,65, respectivamente. Os perfis obtidos para as diferentes cultivares podem ser utilizados como descritores moleculares para complementar os descritores tradicionais usados em testes de distinção, uniformidade e estabilidade (DHE), melhorando assim a rastreabilidade das amostras e seus derivados, auxiliando na proteção de cultivares.

Muller et al. (2015) estimaram a diversidade genética de 88 acessos do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa, utilizando 24 marcadores microssatélites. Foram identificados 9,9 alelos por loco e uma diversidade genética média de 0,72. As análises de agrupamento e a estrutura genética permitiu a distinção entre genótipos de origem andina e mesoamericana, possibilitando ainda a separação de linhagens melhoradas e não melhoradas, dentro do grupo mesoamericano. Zargar et al. (2016) caracterizaram 51 genótipos de feijão provenientes de diferentes regiões da Índia utilizando 23 marcadores microssatélites. Foram

identificados 268 alelos, e uma diversidade genética média de 0,30, sendo observado um elevado nível de diversidade genética dentro da população.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOND, A.S.M.G.M. et al. Minerals (Zn, Fe, Ca and Mg) and antinutrient (phytic acid) constituents in common bean. **American Journal of Food Technology**, Dubai, v. 6, p. 235-243, Jul. 2011.
- AMARO, G. B.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 584-588, 2007.
- ANDRADE, M. T. et al. Paternity test for IAPAR 139 cultivar of common bean. **Annual report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 56, p. 161-162, 2013.
- ARANTES, L.O.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.10, p. 232-237, Abr. 2010.
- BALBI, B. P. et al. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 52, p.56-57, 2009.
- BEEBE, S. **Feijão Biofortificado**. Disponível em:<<http://www.harvestplus.org/publications>>. Acesso em: 27 Nov. 2010.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v. 1, p. 376-399.
- BLAIR, M. W. "Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean." **Journal of agricultural and food chemistry**, Munique, v. 61, n. 35, p. 8287-8294, July 2013.
- BOREL, J. C. et al. Genetic control of the angular leaf spot reaction in common bean leaves and pods. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 661-664, Nov./Dec. 2011.
- BOTELHO, F. B. S. et al. Multiline as a strategy to reduce damage caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 3, p. 175-180, Sept. 2011.

CAIXETA, E. T. et al. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, Dordrecht, v. 134, n. 3, p. 297-303, Dec. 2003.

CARDOSO, P. C. B. et al. Discrimination of common beans cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 1, p. 1964-1978, Mar. 2014.

CARDOSO, P. C. B. et al. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5467-5484, Fev. 2013.

CARVALHO, G. A. et al. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 482-485, 1998.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO. **Produção**. Disponível em: <<http://www.cifeijao.com.br/>>. Acesso em: 5 out. 2013.

CHATAIKA, B. Y. E. et al. Performance of parental genotypes and inheritance of Angular Leaf Spot (*Phaeoisariopsis griseola*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 9, n. 28, p. 4398-4406, 2010.

CHILIPA, L. N. K.; LUNGU, D. M.; TEMBO, L. Multiple race inoculation as an option in breeding for resistance to *C. lindemuthianum* in common beans. **Journal of Agriculture and Crops**, Rahim Yar Khan, v. 2, n. 5, p. 45-50, May 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 5 Jan. 2016.

CROUS, P. W. et al. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, New York, v. 55, n. 1, p. 163-173, 2006.

FALLEIROS, M. O. **Uso de mistura de raças de *C. lindemuthianum* na avaliação da antracnose no feijoeiro**. 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FAO. **Undernourishment Around the World: Counting the Hungry: Latest Estimates**. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp.htm>. Acesso em: 2 Maio 2015.

FERREIRA, C. F. et al. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 4, p. 1130-1133, 2000.

GODOY, C. V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 104, n. 4, p. 336-345, 1997.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, London, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, Sept. 1970.

JARA, C et al. **Virulence diversity of *Pseudocercospora griseola* and its implication for breeding Common bean for resistance to angular leaf spot.** Cali: CIAT, 2015. 1p.

JESUS, O. N. et al. Diferenciação molecular de cultivares elite de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1739-1748, Dec. 2006.

JESUS, W.C. et al. Effects of angular leaf spot and rust on yield loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 11, p. 1045–1053, Nov. 2001.

KELLER, B. et al. Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 5, p. 813–826, May 2015.

LIBRELON, S. S. et al. Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. **Australasian Plant Pathology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 385–395, July 2015.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, Aug. 1997.

MACCAFERRI, M. et al. A major QTL for durable leaf rust resistance widely exploited in durum wheat breeding programs maps on the distal region of chromosome arm 7BL. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 8, p. 1225–1240, Nov. 2008.

MAHUKU, G. S.; IGLESIAS, A. M.; JARA, C. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, n. 3, p. 381-396, June 2009.

MAHUKU, G. et al. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1817-1824, 2004.

MASI, P.; ZEULI, S. P.L.; DONINI, P. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 303-313, May 2003.

MATOS, J.W.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; Trinta e dois anos do programa de melhoramento do feijoeiro comum em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1749-1754, Nov./Dec. 2007.

MEBRATE, S. A.; COOKE, B. M. Response of wheat cultivars to infection by *Stagonospora nodorum* isolates/mixture on detached and intact seedling leaves. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, n. 2, p. 263–268, Nov. 2001.

MONDA, E. O.; SANDERS, F. E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 1, p. 103-110, Jan. 2001.

MÜLLER, B.S.F et al. Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs. **Plant Molecular Biology**, Rockville, v. 86, n. 4/5, p. 455–470, Nov. 2014.

MÜLLER, B. S. F. et al. "An operational SNP panel integrated to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean." **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 33, n. 6, p. 1697-1711, Dec. 2015.

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

NIETSCHKE, S. et al. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 2, p. 117–121, Feb. 2000.

OBLESSUC, P.R. et al. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 10, p. 2451–2465, Oct. 2013.

OBLESSUC, P. R. et al. Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. **BMC Genetics**, Amsterdam, v. 13, n.1, p. 50, June 2012.

OHE, C.V.; MIEDANER, T. Competitive aggressiveness in binary mixtures of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. **Journal Phytopathology**, Oxford, v. 159, n. 6, p. 401–410, Dec. 2011.

OROZCO, S.; ARAYA, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 589-593, Nov./Dec. 2005.

PÁDUA, P. F. et al. Identification of common bean resistant sources to angular leaf spot disease in a brazilian germplasm collection. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 59, p.115-116, 2016.

PAULA JÚNIOR, T.; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata, 2012. 157p.

PEREIRA, R.; ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. Alternative method to assess the reaction of common bean strains to *Pseudocercospora griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 54, p. 230-231, 2011.

PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 5044-5053, May 2015.

PEREIRA, R. et al. Evaluation of resistance in common bean genotypes to the causal agent of angular leaf spot. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 56, p. 33-34, 2013.

- RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 566 p.
- RAMOS, N. P. et al. Sensibilidade do microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.
- REZENDE, B. A. et al. Severity Evaluation Methods in Common Bean Recurrent Selection Programme for Resistance to Angular Leaf Spot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 643–649, Feb. 2014.
- RODRIGUEZ, I. J. et al. Resistance of common bean breeding lines to *Phaeoisariopsis griseola* isolates from Honduras. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 57, p. 215-216, 2014.
- SANGLARD, D. A. et al. Severity levels of angular leaf spot in common bean cultivars and elite lines. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 58, p. 27-28, 2015.
- SANTOS, J.B. **Marcadores Moleculares**. Lavras: UFLA, 2011. 74p.
- SCHUSTER, I. et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 247-253, Mar. 2004.
- SILVA, C. A. et al. Genetic variability for protein and mineral content in common bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p.92-93, 2010.
- SILVA, K. J. D. et al. Anastomosis groups and molecular variation in *Pseudocercospora griseola*. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 7436-7445, July 2015.
- SILVA, K. J. D. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 10, p. 602-606, May 2008.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2200-2223, Mar. 2010.
- SOUZA, T. L. P. O. et al. Progress in Common Bean Breeding for Angular Leaf Spot Resistance. In: COMMON BEAN DISEASE WORKSHOP ON ANGULAR LEAF SPOT AND ROOT ROTS, 2015, Skukuza, África do Sul, v. 1, p. 8, 2015.
- STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 158-167, Apr./June 2006.
- VALDISSER, P.A.M.R. et al. **Protocolo de extração de DNA e genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2013. 6p.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT, Cali, 1987.

ZARGAR, S. M. et al. Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 23, n. 1, p. 139-149, Jan. 2016.

WANJAU, B. N. N. et al. Development of a breeding method for durable resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 208, n. 1, p. 91-100, Mar. 2016.

CAPÍTULO 1

ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE FEIJOEIRO COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

A caracterização da variabilidade genética entre linhagens do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) é de grande importância para o eficiente gerenciamento dos programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 149 linhagens de feijoeiro. Para a análise da diversidade foram utilizados 18 marcadores microssatélites (SSRs) polimórficos distribuídos em nove dos 11 cromossomos do feijoeiro. Foram identificados 127 alelos, com média de 7,47 alelos por loco e diversidade média de 0,55. As estimativas das similaridades genéticas variaram de 0 a 0,96. A partir da abordagem utilizada para inferir quanto à estrutura genética populacional, verificou-se a separação das linhagens em sete grupos (K=7). Os marcadores SSRs utilizados foram úteis para estimar diversidade genética/estrutura genética das linhagens pertencentes a coleção de trabalho do Programa de Melhoramento da Universidade Federal de Lavras, bem como, para separar as linhagens em grupos de maior similaridade genética.

ABSTRACT

Characterization of genetic variability among common bean lines (*Phaseolus vulgaris*) present great importance for efficient management of breeding programs. Objective of this study was evaluate genetic diversity among 149 common bean lines. Eighteen polymorphic microsatellite markers distributed across nine different chromosomes of common bean were used. One hundred and twenty seven alleles were identified, with average of 7.47 alleles per locus and average diversity among loci of 0.55. Estimates of genetic diversity, ranging from 0 to 0.96. Using an approach to infer genetic population structure, bean lines were separated into seven groups ($K = 7$). SSR markers used were useful to estimate genetic parameters in common bean germplasm, as well as to separate bean lines evaluated in groups of greater genetic similarity.

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma espécie amplamente cultivada, sobretudo nos países em desenvolvimento. Os grãos são considerados excelentes fontes de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, principalmente para a população de baixa renda (AKOND et al., 2011; BLAIR 2013). O elevado valor nutritivo e a alta taxa de consumo fazem do feijoeiro uma cultura de grande importância para a população em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (BEBBE 2010; DDAMULIRA et al., 2015). Aproximadamente 60% da produção de feijão está concentrada em seis países: Índia, China, Myanmar, México, Estados Unidos da América e Brasil, sendo este último o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa (FAO, 2015).

O Setor de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA), possui uma coleção de trabalho contendo linhagens elite e cultivares, além de linhagens provenientes de vários ciclos do programa de seleção recorrente visando a resistência à mancha angular. Essas linhagens de feijoeiro pertencem a vários tipos de grãos: preto, roxo, rosinha, rajado, vermelho e carioca. No entanto, a maioria dos acessos possuem grãos tipo carioca, uma vez que o programa de melhoramento da UFLA, desde a recomendação da cultivar Carioca, tem dado ênfase à obtenção de linhagens com esse tipo de grão (MATOS, RAMALHO; ABREU 2007). Considerando as linhagens com um mesmo tipo de grão, a distinção de genótipos diferentes por meio, exclusivamente, de avaliação fenotípica torna-se impraticável, uma vez que estas diferentes linhagens apresentam alta similaridade para os descritores morfológicos. A caracterização genética das linhagens de feijoeiro provenientes deste programa de melhoramento não tem sido relatada na literatura. Portanto, o uso de marcadores moleculares podem auxiliar os melhoristas na avaliação do nível de variabilidade genética entre os genótipos, principalmente dentro de cada tipo de grão. Nos programas de melhoramento genético do feijoeiro, marcadores moleculares microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) têm sido utilizados como ferramentas para estudos de diversidade e estruturação populacional, bem como, para auxiliar no planejamento de cruzamentos e na escolha de genitores, além de outras aplicações visando a caracterização molecular de linhagens pertencentes a coleções de trabalho dos programas de melhoramento (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; MULLER et al., 2015; ZARGAR et al., 2016).

Os sistemas de genotipagem automatizados usando microssatélites estão disponíveis para análises genéticas em várias espécies de plantas, incluindo o feijão (BORBA et al., 2009; CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014). Esses sistemas possuem várias vantagens em

relação aos métodos convencionais de genotipagem, uma vez que análises simultâneas podem ser realizadas envolvendo maior número de locos, há redução no tempo demandado para a genotipagem de um grande número de indivíduos, além de maior precisão na determinação dos alelos. Resultados promissores têm sido obtidos na avaliação de linhagens do feijoeiro com o uso desta metodologia (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; VALDISSER et al., 2013; MORAES et al., 2016). Assim, a utilização desses marcadores para a caracterização molecular das linhagens da coleção de trabalho do programa de melhoramento da UFLA poderá contribuir para o melhor entendimento sobre a diversidade genética, grau de parentesco e estrutura populacional, fornecendo informações complementares importantes aos melhoristas.

Diante do exposto, uma análise molecular das linhagens da coleção de trabalho do programa de melhoramento da UFLA foi realizada com marcadores SSR e seus resultados e implicações nos programas de melhoramento genético foram discutidas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Genótipos utilizados

Um conjunto de 149 genótipos do feijoeiro, sendo 20 linhagens comerciais lançadas por instituições de pesquisa do Brasil, 55 linhagens do programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular e 74 provenientes dos ensaios de valor de cultivo e uso (VCU-cores, VCU- Carioca e VCU-Preto) da Universidade Federal de Lavras. As linhagens caracterizadas foram: 122 grão tipo carioca; 13 grão tipo preto; 7 grão tipo roxo; 3 grão tipo rajado; 3 tipo rosinha; 1 vermelho. A predominância de linhagens com grãos carioca ocorreu devido à importância desta classe comercial para o Brasil, sendo que a maioria das linhagens pertencem ao pool gênico Mesoamericano (Apêndice-Tabela 1).

2.2 Extração de DNA e genotipagem com marcadores SSR

A extração do DNA genômico das linhagens de feijão analisadas foi realizada a partir de amostras compostas pelo tecido foliar de 10 plantas de cada um dos genótipos, coletadas em *bulk*, utilizando o método do CTAB, conforme metodologia descrita por Ferreira; Grattapaglia (1998). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis). Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas em água ultra-pura, até a concentração de 5,0 ng μL^{-1} .

As reações de amplificação do DNA com os marcadores SSR foram realizadas em sistemas de genotipagem multiloco semiautomatizada, utilizando 20 pares de primers que flanqueiam regiões microssatélites no feijoeiro-comum, marcados com as fluorescências 6-FAM™, HEX™, NED™, PET™ e VIC™ (Morais et al. 2016 – Tabela 2). Cada reação foi constituída por 1,0 ng de DNA genômico, 2,5 µL de *Master Mix* (QIAGEN Multiplex PCR Kit), 0,5µL de Q-solution, 0,1 µL de cada par de *primers* (10 µM) e o volume final foi completado com água ultra-pura para 5,0 µL. As condições de amplificação incluíram as seguintes etapas: i) um ciclo inicial a 95°C por 15 minutos (desnaturação inicial); ii) 40 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida por outra etapa de anelamento a 56°C por 90 segundos; e iv) um ciclo final a 72°C por 10 minutos (extensão final). Os fragmentos de DNA amplificados foram identificados via eletroforese capilar, conduzida na plataforma ABI3500 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems), utilizando o filtro “D” para detecção das fluoresceínas. Os dados foram processados com o aplicativo Foundation Data Collection v.2.0 (AppliedBiosystems) e genotipados com o aplicativo GeneMapper v.3.5 (AppliedBiosystems).

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados para a caracterização molecular de linhagens de feijoeiro, incluindo o nome do loco, tamanho do alelo, sua respectiva fluorescência e cromossomos.

Sequencial	Locus	Tamanho do alelo (pb)	Fluorescência	Cromossomo
1	BM 114*	230-260	6- FAM	9
2	BM 143*	100-170	HEX	2
3	BM 164	130-190	NED	2
4	PVBR25*	140-180	6-FAM	9
5	PVBR169*	195-220	HEX	3
6	BM155	100-145	HEX	5
7	BM189*	80-120	NED	3
8	BM202*	100-173	6-FAM	11
9	BM210*	160-220	NED	7
10	PVBR35*	190-260	6-FAM	4
11	PVBR5*	160-220	HEX	6
12	BM113*	60-110	NED	6
13	BM187*	120-220	HEX	6
14	PVBR272*	70-135	6- FAM	2
15	PVBR87*	150-201	NED	5
16	BM181*	170-250	NED	5
17	BM 183*	130-170	6-FAM	7
18	BM201*	90-120	NED	1
19	PVBR11*	175-192	HEX	2
20	PVBR163*	180-350	6- FAM	6

* Marcadores que apresentaram polimorfismo no presente trabalho

2.3 Análises estatísticas

A diversidade genética entre as linhagens por meio dos marcadores foi determinada usando estimativas da frequência alélica, o número de alelos por loco, heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_o) e PIC (*Polymorphism Information Content*), de acordo com Ney (1987). As frequências alélicas e o número de alelos efetivos foram estimados de acordo com Cruz; Ferreira; Pessoni (2011). Apenas os locos que apresentaram alelos com frequência alélica inferior a 95% foram considerados polimórficos.

A partir dos dados de genotipagem, e considerando que os marcadores SSR são codominantes, foram estimados os coeficientes de dissimilaridade ponderados ($1 - S_{ij}$) (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Para facilitar a identificação visual de grupos de linhagens quanto ao grau de similaridade, foi utilizado o método hierárquico da ligação média não ponderada entre grupos (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para construção de um dendograma. De acordo com essa metodologia, foram utilizadas as médias não ponderadas das medidas de dissimilaridade com a finalidade de evitar que os valores extremos influenciem na caracterização dos genótipos considerados. O dendograma foi obtido com o auxílio do pacote APE (*Analyses of Phylogenetics and Evolution*) no programa R.

A estrutura genética da população também foi estudada empregando o método bayesiano proposto por Pritchard et al. (2000), utilizando o software STRUCTURE v.2.2.4. A estrutura dos genótipos foi classificada em “ K ” *subpopulações*, de acordo com suas similaridades genéticas. O modelo *admixture* foi aplicado, com frequências alélicas correlacionadas e nenhuma informação anterior sobre a população foi utilizada. Para o cálculo do número de subpopulações (k), foram utilizados os seguintes parâmetros: 10 corridas independentes com k variando entre 1 e 10, sendo realizadas 10 interações para cada valor de K , 500.000 *burn-ins* e simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov (MCMC). Para determinar o número de grupos genéticos, ou seja, o valor de K mais provável, utilizou-se o critério proposto por Evanno et al. (2005), utilizando o software Structure Harvester v0.6.93 (EARL; VONHOLDT, 2011).

3 RESULTADOS

A partir dos 20 marcadores microssatélites utilizados para a análise molecular das linhagens de feijoeiro, verificou-se que 18 locos foram polimórficos, sendo identificado um total de 131 alelos, com variação de 3 a 14, com média de 7,27 por loco, sendo os *primers* PV-

272, PV-163 e PV-87 os mais informativos. A heterozigosidade média observada (H_O) foi menor que a heterozigosidade média esperada (H_E) para a maioria dos locos analisados (Tabela 3).

A H_E encontrada foi de 0,56, variando de 0,09 no loco BM 181 a 0,76 no loco PV 25 (76%), sendo que 67% dos locos apresentaram estimativas maiores que 0,5. A H_O entre os diferentes locos foi de 22%, variando de 0 no loco BM 181 a 0,91 no loco PV 87, sendo que 44% dos locos apresentaram estimativas maiores que 0,2. O número de alelos efetivos (N_e) variou de 1,10 a 4,17, com média de 2,60. A frequência alélica máxima (Fr_{Max}) entre os locos polimórficos variou de 37% a 95% (Tabela 3).

Tabela 3. Descritores genéticos de 18 locos microssatélites polimórficos, incluindo o número de alelos por loco (N_A), frequência alélica máxima (Fr_{Max}), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O), número de alelos efetivos (N_e) e *Polymorphism Information Content* (PIC).

Locus	Tamanho da banda (pb)	N_A	Fr_{max}	H_E	H_O	N_e	PIC
BM 183	142-172	7	0.602	0,580	0,159	2,380	0,580
PV163	210-310	12	0.689	0,508	0,159	2,030	0,508
BM 143	111-163	9	0.493	0,696	0,278	3,289	0,696
PV25	155-177	10	0,370	0,760	0,252	4,167	0,760
PV5	165-193	9	0.462	0,729	0,205	3,690	0,729
PV35	204-250	5	0.495	0,562	0,152	2,283	0,562
PV87	160-196	14	0.447	0,735	0,914	3,773	0,735
BM 114	245-257	6	0,831	0,301	0,060	1,430	0,301
BM187	162-188	9	0.700	0,491	0,225	1,964	0,491
BM181	182-188	4	0.950	0,089	0	1,097	0,089
BM113	81-97	6	0.702	0,473	0,185	1,897	0,473
BM202	134-154	4	0.589	0,502	0,093	2,008	0,502
BM201	98-112	5	0.646	0,546	0,146	2,202	0,546
PV169	203-211	3	0.765	0,363	0,166	1,569	0,363
BM189	103-111	3	0.804	0,328	0,086	1,488	0,328
BM210	166-186	9	0.446	0,704	0,139	3.412	0,704
PV272	85-113	12	0.402	0,746	0,245	3,937	0,746
PV11	180-188	4	0.698	0,443	0,238	1,795	0,443
Média	-	7,47	-	0,558	0,217	2,604	0,556
Total	-	131	-				

Com base nos 131 alelos analisados, oriundos dos 18 marcadores polimórficos entre os genótipos analisados, foram obtidas as estimativas das similaridades genéticas entre as linhagens, que variaram de 0 a 0,96. Para melhor visualização, foi construído um dendograma (Figura 1). A maior estimativa de similaridade genética foi encontrada entre as linhagens MAX-4 e MAX-11 (0,96). Já as cultivares MAX-5 e Radiante apresentaram a menor estimativa de similaridade genética.

De acordo com as análises para estimar o número ideal de grupos, utilizando o programa Structure, o agrupamento mais adequado para os 149 genótipos de feijão comum, tomando por base o método de Evanno et al. (2005), foi de $K=7$ (Figura 2 e 3).

Figura 2. Representação gráfica do número ideal de grupos baseados na no programa Structure inferido utilizando o critério de Evanno et al. (2005). A análise foi baseada em dados obtidos a partir de 18 locos SSR polimórficos e 149 genótipos de feijão, avaliados quanto à diversidade genética.

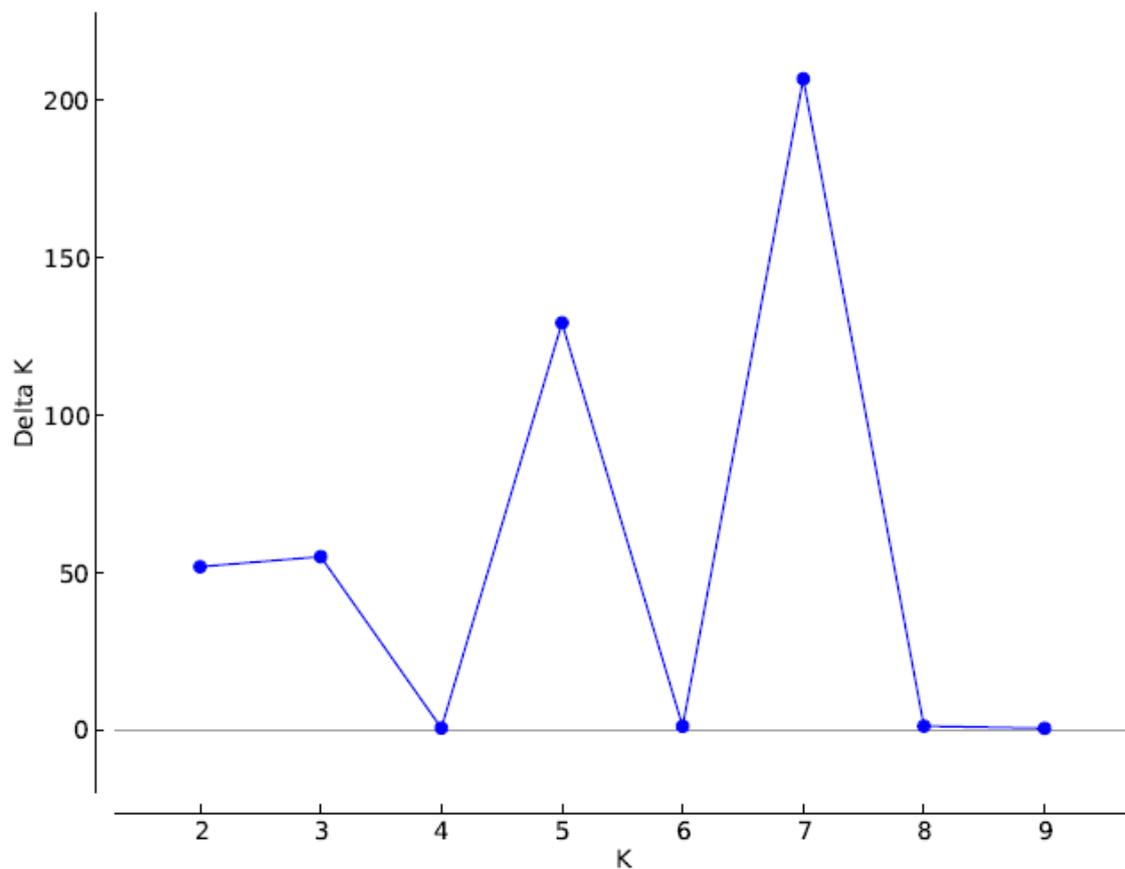
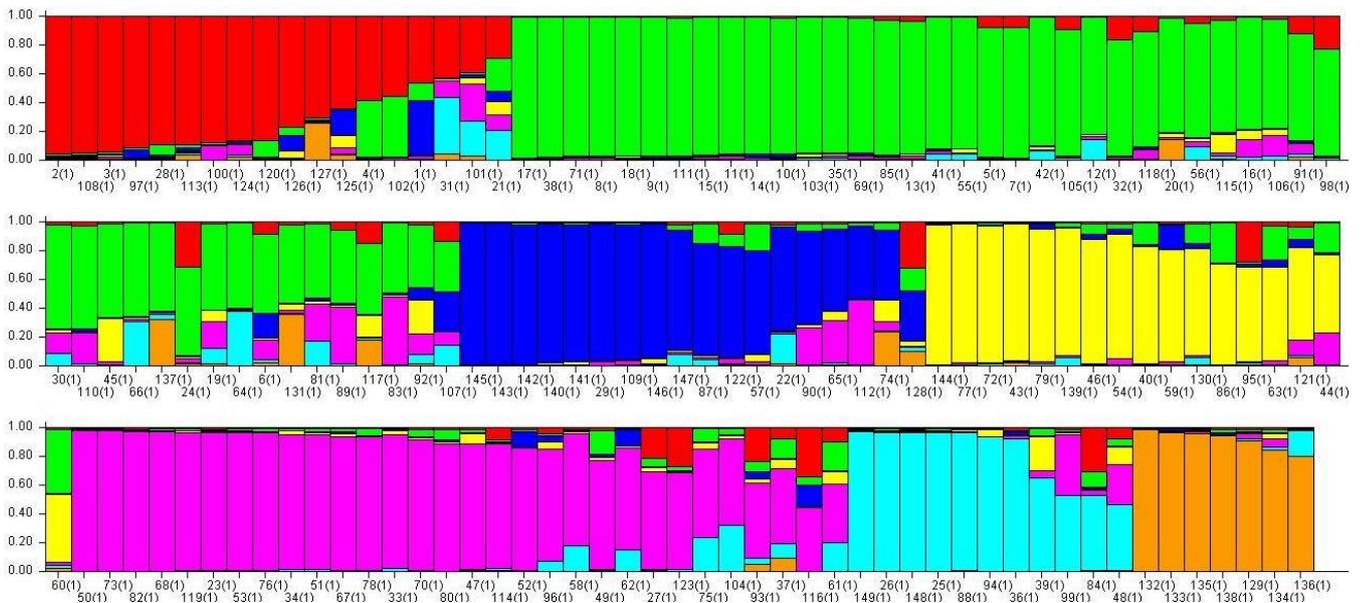


Figura 3. Estrutura populacional inferida pela abordagem Bayesiana com base em 18 locos SSR com valor de $K=7$. Cada barra sólida representa um único genótipo, sendo o número abaixo das barras correspondente à ordem dos acessos na Tabela 1. As barras com diferentes cores representam genótipos pertencentes a diferentes subpopulações. As barras com mais de uma cor representam genótipos com *admixture*, ou seja, pertencentes a mais de uma subpopulação.



4 DISCUSSÃO

As linhagens das coleções de trabalho são caracterizados principalmente com a utilização de descritores morfológicos, no entanto, a caracterização molecular pode auxiliar nos programas de melhoramento do feijoeiro. As informações fornecidas por estes marcadores podem ser úteis para os melhoristas, na identificação da divergência entre genótipos utilizados em cruzamentos, além de auxiliar na escolha de linhagens a serem utilizadas em futuros estudos de mapeamento associativo. Análise com marcadores microssatélites tem se mostrado vantajosa, devido a praticidade, além de ter se mostrado promissora na avaliação de linhagens do feijoeiro em algumas oportunidades (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014). A genotipagem dos indivíduos no presente estudo utilizou marcadores microssatélites, com uso de um sistema semi-automatizado e multilocus, apresentando um aumento na automação e eficiência dos reagentes para análises moleculares. Neste trabalho foram utilizados 20 marcadores microssatélites que não apresentam evidência de ligação, sendo distribuídos em nove dos 11 cromossomos no genoma do feijoeiro (MORAES et al., 2016). Esses marcadores

são derivados de sequências repetidas em que os alelos diferem em 2pb, sendo este tipo de marcador microssatélite o mais utilizado em estudos de diversidade genética no feijoeiro devido à sua abundância e facilidade de identificação no genoma (VELOSO 2014; CARDOSO et al., 2013; MORAES et al., 2016).

Os SSRs utilizados neste trabalho permitiram detectar múltiplas formas alélicas por loco gênico (SSRs $n_A = 7,47$), e as estimativas de diversidade genética foram relativamente elevadas ($H_E = 0,56$), possibilitando a discriminação genética das 149 linhagens avaliadas. Do ponto de vista do melhoramento genético, essas informações podem auxiliar na seleção de linhagens que possuam alelos mais divergentes com potencial de incorporação em blocos de cruzamentos, contribuindo efetivamente para a ampliação da base genética no pool gênico do germoplasma melhorado (CARDOSO et al. 2013).

As estimativas de H_E foram superiores em relação a H_o , indicando excesso de homozigose para a maioria dos locos avaliados em relação a uma população ideal (Tabela 3), conforme o esperado. H_o é um índice de diversidade genética influenciado pelo modo de reprodução da espécie, apresentando baixa magnitude em espécies autógamas, uma vez que neste caso a reprodução por autofecundação faz com que grande parte dos locos se encontrem em homozigose (ZIZUMBO-VILLARREAL et al, 2005; FERREIRA et al., 2007). No entanto, isso não foi verificado para o loco PV 87, semelhante ao obtido por VELOSO (2011), sendo neste caso a H_o (0,91) maior que a H_e (0,73). É necessário considerar, contudo, que em vários locos SSR em feijão pode ocorrer heterozigose, mesmo após 24 gerações de autofecundação (RODRIGUES; SANTOS, 2006).

A diversidade genética também pode ser compreendida pela estimativa do número efetivo de alelos ($N_e = 2,60$), sendo esta estimativa a representação de alelos igualmente frequentes em uma população ideal, em Equilíbrio de Hard-Weinberg, necessário para se atingir um valor determinado de 'He'. No presente trabalho, essa estimativa foi inferior ao número médio de alelos por loco ($N_a = 7,47$), indicando a presença de alelos privados na população. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos com microssatélites em linhagens de feijão comum (VELOSO et al., 2014).

Os marcadores utilizados no presente trabalho, pertencentes à série "BM" e "PVBR", já foram previamente utilizados em outros estudos de diversidade genética. Sendo assim os dados obtidos no presente trabalho permitem a comparação com outros estudos já realizados com linhagens de diferentes bancos de germoplasma. No presente estudo verificou-se que o número médio de alelos de 7,47 e um PIC médio de 0,55. Estudos de diversidade genética utilizando estes marcadores verificaram número médio de alelos e PIC médio inferiores ao presente estudo

(BENCHIMOL et al., 2007; MÉTAIS et al. 2002; BLAIR et al., 2009; VELOSO 2014). No entanto, outros trabalhos mostram uma maior diversidade, provavelmente devido ao maior número de genótipos e marcadores avaliados e ao menor parentesco entre as linhagens avaliadas. (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; MULLER et al., 2015). Deve se ressaltar que valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos (MCMANUS et al., 2011). O valor de PIC reflete tanto o número de alelos assim como a frequência de cada alelo, sendo maior quando o número de alelos for alto e as frequências alélicas mais equivalentes, podendo assim ser considerado sinônimo de heterozigosidade esperada (H_E) e diversidade genética (ROBINSON, 1998).

Os marcadores 'BM 164' e 'BM 144' não apresentaram polimorfismo no presente trabalho, corroborando com dados existentes na literatura (CARDOSO et al 2013; 2014). O marcador PV-163 apresentou alto polimorfismo para as linhagens avaliadas, com 12 alelos (H_E de 0,51), semelhante aos resultados obtidos por Muller et al., (2015) ao utilizar este marcador, sendo verificado um alto polimorfismo na população estudada (23 alelos, H_E de 0,89). Segundo Nagasaki et al. (2010), dependendo da finalidade do estudo e do grupo de germoplasma avaliado, diferentes conjuntos de marcadores devem ser utilizados, sendo que o uso de grupos de marcadores comuns torna-se atrativo, pois possibilita o compartilhamento de resultados e consolidação de um banco de dados integrados.

A maior estimativa de similaridade genética foi verificada entre as linhagens MAVIII-128 e MAVIII-5. Ambas as linhagens são provenientes do VIII ciclo do programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular da Universidade Federal de Lavras/ Embrapa Arroz e Feijão e possuem alta frequência de alelos em comum. No entanto também é possível verificar divergência genética entre as linhagens de um mesmo ciclo deste programa, observada no dendograma e na análise da estrutura populacional (Figura 1; Figura 3). O programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular, utilizou para a formação da população base, genótipos com diferentes tipos de grãos e origens (AN512561, AND-277, Ouro Negro, Campuesto Negro Chimaltengo, CAL143, MAR-2, MAR-1, G5686, MA4.137 e Jalo), o que pode explicar a variabilidade genética existente entre as linhagens do programa observadas neste estudo.

A existência de diversidade genética entre linhagens oriundas de ciclo avançado do programa de seleção recorrente, pode confirmar a existência variabilidade mesmo após vários ciclos de seleção e recombinação. A seleção recorrente é um método em que a variabilidade genética é liberada ao longo das gerações, e esse fato tem sido confirmado em alguns estudos (DUDLEY; LAMBERT, 2010). Estas informações podem ter utilidade prática em programas de

melhoramento. Em programa de seleção recorrente, existe um limite de genitores que são recombinados a cada ciclo. Considerando que em um determinado ciclo sejam selecionadas 50 linhagens com resistência ao patógeno e o limite de linhagens a ser recombinado seja de apenas 20 genitores, é possível selecionar com base na diversidade genética das linhagens, utilizando as 20 linhagens mais divergentes com base na análise pelos marcadores, garantindo uma maior variabilidade para os ciclos posteriores.

A partir do dendograma e da análise da estrutura populacional (Figura 2;3), é possível observar que os maiores agrupamentos formados são compostos principalmente por linhagens de grão comercial tipo carioca. Entretanto, algumas linhagens do tipo carioca se apresentaram mais similares às do tipo preto, evidenciando que a existência de alelos característicos de um grupo que também podem ser encontrados no outro grupo, devido à existência de parentesco entre estas linhagens. Nos programas de melhoramento para obtenção de cultivares, são realizados cruzamentos utilizando-se genitores de grupos comerciais distintos (preto, carioca, roxo, rajado, entre outros) visando associar alelos favoráveis presentes em diferentes genitores (Tabela 1). Portanto, as análises de agrupamento foram eficientes para separar as cultivares em grupos de maior similaridade genética, porém não houve formação de grupos definidos que separassem o tipo comercial carioca do tipo comercial preto em razão da origem das cultivares e dos marcadores utilizados, corroborando com dados existentes na literatura (VELOSO et al., 2014).

A menor estimativa de similaridade foi observado entre as cultivares MAX-5 e Radiante. As duas linhagens pertencem a tipos comerciais e grupos gênicos distintos, sendo a MAX-5 tipo carioca e grupo mesoamericano e Radiante grão tipo rajado e grupo andino. As cultivares RAD 155 e Radiante que é do tipo comercial Rajado, apresentaram alta divergência em relação a todas as outras estudadas (Figura 2).

A partir da análise de estrutura populacional é possível identificar sete subpopulações distintas ($K=7$) (Figura2;3), contrastante com os resultados obtidos por Muller et al. (2015) e Cardoso et al. (2013) que observaram $K=3$ e 2 respectivamente nas populações avaliadas. De forma geral, é possível observar que as linhagens provenientes de um mesmo programa de melhoramento, ou de mesma instituição de origem, apresentam uma maior similaridade genética considerando os marcadores utilizados. Portanto, ratifica-se que na escolha de genitores para iniciar um programa de melhoramento devem ser selecionadas linhagens de subpopulações distintas e se possível, de diferentes programas de melhoramento. É possível observar divergência genética entre linhagens de grão tipo carioca corroborando com dados existentes na literatura (VELOSO et al., 2014).

Os marcadores SSRs utilizados foram úteis para estimar parâmetros genéticos no germoplasma do feijoeiro bem como para separar as linhagens em grupos de maior similaridade genética, sendo portanto indicados para serem testados em outros bancos de germoplasma, principalmente para programas com predominância de acessos de origem mesoamericana. Uma vez que linhagens distintas de diferentes bancos de germoplasma tenham sido caracterizados com esses marcadores, seria interessante o compartilhamento de informações entre os diferentes programas de melhoramento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOND, A.S.M.G.M. ET al. Minerals (Zn, Fe, Ca and Mg) and antinutrient (phytic acid) constituents in common bean. **American Journal of Food Technology**, Dubai, v. 6, p. 235-243, July 2011.
- BEEBE, S. **Feijão Biofortificado**. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/publications>>. Acesso em: 27 Nov. 2010.
- BENCHIMOL, L. L. et al. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 54, p. 1747-1762, Apr. 2007.
- BLAIR, M.W. et al. Development and diversity of Andean-derived, gene-based microsatellites for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, Reading, v. 9, n. 9, p. 100, July 2009.
- BLAIR, M.W. et al. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMC series. **BMC Plant Biology**, Reading, v. 11, p. 50, Mar. 2011.
- BLAIR, M. W. "Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean." **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 61, n. 35, p. 8287-8294, 2013.
- BORBA, T.C.O. et al. Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. **Genetica**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p. 293-304, Dec. 2009.
- BURLE, M. L. et al. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, n. 5, p. 801-813, Sept. 2010.
- CARDOSO, P. C. B. et al. Discrimination of common beans cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 1, p. 1964-1978, Mar. 2014.

CARDOSO, P. C. B. et al. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5467-5484, Feb. 2013.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 585 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora UFV, 2011. 620 p.

DDAMULIRA, G. et al. Gene pyramiding improved resistance to angular leaf spot in common bean. **American Journal of Experimental Agriculture**, Washington, v. 9, n. 2, p. 1-12, July 2015.

EARL, D.A.; VONHOLD, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, London, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, July 2005.

FAO. **Undernourishment Around the World: Counting the Hungry: Latest Estimates**. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp.htm>. Acesso em: 2 Maio 2015.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Cenargen, 1998.

KWAK M, GEPTS P. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 5, p. 979-992, Mar. 2009.

MATOS, J.W.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; Trinta e dois anos do programa de melhoramento do feijoeiro comum em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1749-1754, Nov./Dec. 2007.

MCMANUS, C. et al. **Estatísticas para descrever Genética de Populações**. Brasília: INC, 2011. 620 p.

MÉTAIS, I. et al. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1346-1352, June 2002.

MORAIS, S. R. P. et al. Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 234-239, 2016.

MÜLLER, B.S.F et al. Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs. **Plant Molecular Biology**, Rockville, v. 86, n. 4/5, p. 455–470, Nov. 2014.

MÜLLER, B. S. F. et al. "An operational SNP panel integrated to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean." **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 33, n. 6, p. 1697-1711, Dec. 2015.

NAGASAKI H, et al. Core single-nucleotide polymorphisms a tool for genetic analysis of the Japanese rice population. **Breeding Science**, Tóquio, v. 60, n. 5, p. 648-655, 2010.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 945-959, June 2000.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 566 p.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2015.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. cap. 7, 329-380.

RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 345-352, 2006.

VALDISSER, P.A.M.R. et al. **Protocolo de extração de DNA e genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2013. 6p.

VELOSO, J. S. **Divergência genética de cultivares de feijão**. 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ZARGAR, S. M. et al. Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riade, v. 23, n. 1, p. 139-149, Jan. 2016.

ZIZUMBO, V. D. et al. Population structure and evolutionary dynamics of wild - weedy - domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican Region. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 1073-1083, May 2005.

6 APÊNDICE

Tabela 1. Linhagens de feijoeiro comum e seus respectivos tipos de grãos, instituição ou local de origem.

Acesso	Linhagem	Tipo de grão	Origem
1	MAVII-127	Carioca	UFLA ¹
2	MAIII-16.155	Carioca	UFLA
3	MAVI-24	Carioca	UFLA
4	MAIII-17.159	Carioca	UFLA
5	MAVIII-5	Carioca	UFLA
6	MAVII-129	Carioca	UFLA
7	MAI-18.13	Carioca	UFLA
8	MAVIII-128	Carioca	UFLA
9	MAII-10	Carioca	UFLA
10	MAVII-244	Carioca	UFLA
11	MAI-2.10	Carioca	UFLA
12	MAVIII-78	Carioca	UFLA
13	MAVIII-34	Carioca	UFLA
14	MAV-5.60	Carioca	UFLA
15	MAV-14.206	Carioca	UFLA
16	MAII- 22	Carioca	UFLA
17	MAVII-2	Carioca	UFLA
18	MAVIII-94	Carioca	UFLA
19	MAI-6.10	Carioca	UFLA
20	MAI- 2.5	Carioca	UFLA
21	MAIII-16.159	Carioca	UFLA
22	MAII-8	Carioca	UFLA
23	MAVIII-89	Carioca	UFLA
24	MAIV-15.203	Carioca	UFLA
25	MAV-3.36	Carioca	UFLA
26	MAIII-9.91	Carioca	UFLA
27	VC-26	Carioca	UFV ²
28	MAIX-5	Carioca	UFLA
29	Carioca	Carioca	IAC ³
30	E 09/10-8	Carioca	UFLA
31	CXI-26	Carioca	UFLA
32	MBC1-31/32	Carioca	UFLA
33	BRSMG-Talismã	Carioca	Embrapa/UFLA/UFV/Epamig
34	CNFC 11-06	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão
35	BRS Ametista	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão
36	CXII-1	Carioca	UFLA
37	CNFC 11-08	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão
38	MBC1 17/5	Carioca	UFLA
39	CXII-23	Carioca	UFLA
40	MAIX 14	Carioca	UFLA
41	CXII-13	Carioca	UFLA
42	MBCO-22/3	Carioca	UFLA
43	MAIX 12	Carioca	UFLA

44	CXII-8	Carioca	UFLA
45	MAIX-4	Carioca	UFLA
46	RPCVIII-1	Carioca	UFLA
47	MBC1-36/8	Carioca	UFLA
48	E09/10-28	Carioca	UFLA
49	MAV-1.7	Carioca	UFLA
50	MAVII-92	Carioca	UFLA
51	MAVI-60	Carioca	UFLA
52	RPCVIII-4	Carioca	UFLA
53	Carioca MG	Carioca	UFLA
54	MAVI-39	Carioca	UFLA
55	MAIII-17.185	Carioca	UFLA
56	MAII-16	Carioca	UFLA
57	MAIV-15.204	Carioca	UFLA
58	MAVI -21	Carioca	UFLA
59	MAIV-8.102	Carioca	UFLA
60	CXII-15	Carioca	UFLA
61	MAI-8.9	Carioca	UFLA
62	MAIV-18.259	Carioca	UFLA
63	MAIV-15.524	Carioca	UFLA
64	MAVI-20	Carioca	UFLA
65	MAV-7.85	Carioca	UFLA
66	E09/10-7	Carioca	UFLA
67	E09/ 10-27	Carioca	UFLA
68	VC 27	Carioca	UFV
69	VC 25	Carioca	UFV
70	CXII-6	Carioca	UFLA
71	BRSMGMadrepérola	Carioca	Embrapa/UFLA/UFV/Epamig
72	VC 24	Carioca	UFV
73	CNFC 11-13	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
74	CXII 19	Carioca	UFLA
75	CNFC 11-07	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
76	E09/ 10-5	Carioca	UFLA
77	CNFC 10429	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão
78	VC 28	Carioca	UFV
79	CNFC 11946	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão
80	RPCVIII 13	Carioca	UFLA
81	RPCVIII 6	Carioca	UFLA
82	CXII 16	Carioca	UFLA
83	MAIX 10	Carioca	UFLA
84	RPCVIII-8	Carioca	UFLA
85	MBCI 32/14	Carioca	UFLA
86	MB 89	Carioca	UFLA
87	MBC1 35/12	Carioca	UFLA
88	CXI 18	Carioca	UFLA
89	Ouro Negro	Preto	HONDURAS
90	CXI 1	Carioca	UFLA
91	RPCVIII 7	Carioca	UFLA
92	CXI 7	Carioca	UFLA
93	Perola	Carioca	EMBPRAPA Arroz e Feijão

94	BRSMG-Majestoso	Carioca	Embrapa/UFLA/UFV/Epamig
95	PT-68	Rosinha	UFLA
96	VR 18	Roxo	UFV
97	VR 15	Roxo	UFV
98	RC2 RAD 155	Rajado	-
99	CNFRX 15 275	Roxo	EMBRAPA Arroz e Feijão
100	VR 16	Roxo	UFV
101	BRS Vereda	Rosinha	EMBRAPA
102	PT 65	Rosinha	UFLA
103	VR 17	Roxo	UFV
104	Ouro Vermelho	Vermelho	Embrapa/UFLA/UFV/Epamig
105	CNFRJ 15288	Rajado	EMBRAPA Arroz e Feijão
106	BRS Radiante	Rajado	EMBRAPA Arroz e Feijão
107	BRS Timbó	Roxo	EMBRAPA Arroz e Feijão
108	VR 14	Roxo	UFV
109	CNFP MG 11-18	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
110	CNFP MG 11-08	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
111	CNFPMG -1106	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
112	CNFPMG -11-21	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
113	BRS Campeiro	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
114	BRS Valente	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
115	VP 30	Preto	UFV
116	VP 31	Preto	UFV
117	BRS Esteio	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
118	CNFP11978	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
119	BRS Esplendor	Preto	EMBRAPA Arroz e Feijão
120	VC20	Carioca	UFV
121	VC 22	Carioca	UFV
122	VC23	Carioca	UFV
123	CVIII 5	Carioca	UFLA
124	CVIII 2	Carioca	UFLA
125	CNFC 11965	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
126	VC 21	Carioca	UFV
127	VC 19	Carioca	UFV
128	CVIII 2	Carioca	UFLA
129	EMB9	Carioca	UFLA
130	CNFC 10432	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
131	VC 18	Carioca	UFV
132	BRS Notável	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
133	BRS Estilo	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
134	VC 17	Carioca	UFV
135	CNFC 10108	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
136	IPR Uirapuru	Preto	IAPAR ⁴
137	BRS Cometa	Carioca	EMBRAPA Arroz e Feijão
138	MAX -9	Carioca	UFLA
139	MAX-7	Carioca	UFLA
140	MAX-2	Carioca	UFLA
141	MAX-11	Carioca	UFLA
142	MAX-8	Carioca	UFLA
143	MAX-10	Carioca	UFLA

144	MAX-6	Carioca	UFLA
145	MAX-4	Carioca	UFLA
146	MAX-1	Carioca	UFLA
147	MAX-5	Carioca	UFLA
148	IAC Alvorada	Carioca	IAC
149	BRS Sublime	Carioca	Embrapa

¹Universidade Federal de Lavras; ² Universidade Federal de Viçosa; ³Instituto Agronômico de Campinas; ⁴Instituto Agronômico do Paraná

CAPÍTULO 2

FENOTIPAGEM DA SEVERIDADE DA MANCHA ANGULAR DO FEIJOEIRO E SUAS IMPLICAÇÕES NO MELHORAMENTO CONVENCIONAL PARA RESISTÊNCIA À DOENÇAS

RESUMO

A fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro é importante na identificação de novas fontes de resistência, na seleção de progênies superiores nos programas de melhoramento. Neste trabalho, três métodos de fenotipagem para a severidade da mancha angular foram avaliados e suas implicações no melhoramento visando resistência são discutidas. Foi avaliada a reação de 144 linhagens de feijoeiro à *P. griseola*. Três experimentos distintos foram conduzidos, sendo realizados em casa de vegetação (estádio V2 e estágio V3) e no campo. As linhagens foram inoculadas com uma mistura de esporos das raças 63-63 e 63-23 do patógeno. O número de linhagens resistentes no estágio V2, V3 e campo foi de 31%, 7% e 10%, respectivamente. As estimativas dos índices de coincidência V2-V3-campo, V2-V3, V2-campo e V3-campo foram de 63%, 68%, 69% e 88%, respectivamente. A análise conjunta utilizando abordagem de modelos mistos mostrou-se promissora para identificação de genótipos resistentes nos diferentes ambientes/estádios de avaliação. Todas as estratégias de fenotipagem foram eficientes para a identificação de fontes de resistência para mancha angular e devem ser utilizadas, quando possível, simultaneamente para maior confiabilidade dos resultados. Os genótipos selecionados como resistentes foram aqueles com maior nível de resistência na média dos estádios/ambientes de avaliação.

ABSTRACT

Phenotyping the severity of the angular leaf spot in common bean is important to identify new sources of resistance, in selection of progenies in conventional and molecular marker-assisted breeding. In this study, three phenotyping methods for severity of angular leaf spot were assessed and the implications in breeding for resistance to *Pseudocercospora griseola* are discussed. The reaction of 144 common bean lines to *P. griseola* was evaluated. Three different experiments were conducted in a greenhouse (V2 and V3 stages) and in the field. Common bean lines were inoculated with a mixture of spores of races 63-63 and 63-23 of pathogen. The number of resistant lines at stages V2, V3 and in the field was 31%, 7% and 10%, respectively. Estimates of coincidence indices V2-V3, V2-field and V3-field were 68%, 69% and 88%, respectively. The joint analysis using mixed model approach is promising for the identification of resistant genotypes in different environments/stages of evaluation. All phenotyping strategies were effective for identifying sources of resistance to angular leaf spot and should be used, if possible, simultaneously for greater reliability of results. Common bean lines selected were those with higher resistance level in average of evaluation stages/environments.

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do feijoeiro comum, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, se destaca como uma das principais doenças que acometem a cultura. Essa doença infecta principalmente a parte aérea do feijoeiro, sendo os sintomas notáveis principalmente nas folhas e vagens, onde o patógeno induz a desfolha prematura e provoca a depreciação na qualidade dos grãos (MAHUKU et al., 2009; BOREL et al., 2011). O manejo da doença tem sido realizado por meio de controle químico e o uso de cultivares resistentes. No entanto, a utilização da resistência genética é o método mais eficiente, econômico e sem impacto ao meio ambiente para o controle da mancha angular do feijoeiro. Contudo, a obtenção de resistência durável no patossistema *P. griseola*-feijoeiro é dificultada pela ampla variabilidade patogênica do fungo (MAHUKU et al., 2011).

Inúmeros trabalhos têm avaliado a variabilidade de *P. griseola* e a existência de fontes de resistência no feijoeiro, sendo constatado a predominância de isolados da raça 63.63 e a presença de variação dentro de uma mesma raça (BALBI et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; PÁDUA et al., 2016). Estudos sobre o controle genético da resistência do feijoeiro à mancha angular têm sido realizados em algumas oportunidades, sendo identificada a presença de resistência vertical e horizontal, em que esta última considerada o principal tipo de resistência no patossistema *P. griseola*-feijoeiro (BOREL et al., 2011; CHATAIKA et al., 2010; PEREIRA et al., 2015). Dessa forma, a seleção recorrente é um método de condução de populações segregantes adequado visando obter linhagens com resistência durável.

A seleção recorrente é uma estratégia que tem sido utilizada para este fim, desde 1998, na Universidade Federal de Lavras em parceria com a Embrapa Arroz e Feijão. Este programa iniciou com o cruzamento dialélico entre 17 linhagens para a formação da população base. Várias fontes de resistência à mancha angular foram utilizadas. Neste programa a avaliação das progênies, isto é, a fenotipagem da severidade da mancha angular das plantas é realizada no campo no estádio R7 (FERNADEZ et al., 1982), a partir da ocorrência natural do patógeno, na safra da seca permitindo a condução de um ciclo de seleção recorrente por ano. Ao longo de 16 ciclos de seleção, várias linhagens têm-se mostrado resistentes à mancha angular e, portanto, tem havido a fixação de regiões genômicas responsáveis pela resistência vertical e horizontal (ARANTES, 2010; REZENDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

A fenotipagem da severidade da mancha angular das plantas é importante na identificação de novas fontes de resistência, na seleção de progênies nos programas de melhoramento, bem como, na identificação de locos de resistência visando à seleção assistida por marcadores. Uma fenotipagem confiável é uma das etapas fundamentais para que a avaliação da doença seja precisa, e deve ser realizada de maneira criteriosa. Em programas de melhoramento e também, na identificação de locos de resistência a precisão na fenotipagem é essencial para a seleção de genótipos favoráveis, visando maximizar os ganhos com a seleção (OBLESSUC et al., 2012; REZENDE et al., 2014).

A fenotipagem de plantas em casa de vegetação tem sido realizada por meio de inoculação artificial de isolados de *P. griseola* (SILVA et al., 2008; PEREIRA et al., 2013; JARA et al., 2015). Recentemente, tem sido proposta a avaliação precoce de plantas de feijoeiro, ou seja, no estágio V2, cuja principal vantagem é avaliar grande número de genótipos simultaneamente. A avaliação da severidade da mancha angular neste estágio de desenvolvimento do feijoeiro, com a utilização de uma escala específica, tem se mostrado eficiente na seleção de progênies e linhagens resistentes (PEREIRA et al., 2011; LIBRELON et al., 2015; PÁDUA et al., 2016). Utilizando esta metodologia é possível acelerar o programa de seleção recorrente realizando três ciclos de avaliação, seleção e recombinação por ano em condições de casa de vegetação, ao contrário do método convencional em que é realizado apenas um ciclo por ano.

Como mencionado, a escolha da estratégia de fenotipagem é essencial em diversas situações para o melhorista na obtenção de linhagens com resistência efetiva e duradoura. Neste trabalho, três métodos de fenotipagem para a severidade da mancha angular foram avaliados e suas implicações no melhoramento visando resistência à *P. griseola* são discutidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens avaliadas

Foram avaliadas 144 linhagens de feijoeiro provenientes do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre elas, linhagens provenientes dos ensaios de valor de cultivo e uso (VCU) e linhagens provenientes de dez ciclos do programa de seleção recorrente para resistência à mancha angular. As linhagens BRSMG-Madrepérola, BRSMG-Majestoso, BRSMG-Talismã e Carioca MG foram utilizadas como testemunhas (Apêndice-Tabela 1A).

2.2 Isolados, mistura e preparo das suspensões

Foram utilizados dois isolados de *P. griseola* de alta agressividade e esporulação, pertencentes às raças 63-63 e 63-23, coletados em diferentes locais no ano de 2011, no estado de Minas Gerais e pertencentes à micoteca do laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, DBI-UFLA. O inóculo de cada isolado foi produzido individualmente. Para obtenção de esporos, os isolados de *P. griseola* foram cultivados em meio folha-dextrose-ágar e mantidos a temperatura de 24°C na incubadora (B.O.D), por um período de 7 a 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, o inóculo foi preparado pela adição de 5-10 mL de água destilada estéril em cada placa e raspagem da superfície da cultura com o auxílio de um pincel, para a liberação dos conídios. A suspensão de conídios foi obtida pela filtragem, através de uma camada de gaze, para a remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer para padronizar a concentração de inóculo para 2×10^4 conídios/mL. Posteriormente, foram misturadas as suspensões de conídios de ambos os isolados do patógeno na proporção de 1:1.

2.3 Fenotipagem em casa de vegetação

2.3.1 Fenotipagem no estádio V2

Para a avaliação da severidade da mancha angular das linhagens foi conduzido um experimento em delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com três repetições. As linhagens de feijoeiro foram plantadas em bandejas de poliestireno, sendo a parcela constituída por uma linha com nove plantas. Após oito dias do plantio, as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de conídios na concentração de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL, utilizando a metodologia proposta por Pereira et al. (2011). Após 15 dias da realização da inoculação, a severidade da doença foi avaliada utilizando uma escala com nove graus de severidade proposta por Librelon et al. (2015): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 1.5% de lesões; 3 - presença de até 4% de lesões foliares; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 7% da área foliar; 5 - presença de várias lesões cobrindo 7.1-16% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões cobrindo entre 16.1-26% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões cobrindo entre 26.1- 32% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões que cobrem entre 32.1-38% da área foliar; e 9 - sintomas severos da doença com lesões cobrindo entre 26.1- 32% da área foliar.

2.3.2 Fenotipagem no estádioV3

Para a avaliação da severidade da mancha angular das linhagens foi conduzido um experimento em delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com três repetições. A parcela foi constituída por um vaso, contendo 3 kg de solo, no qual foram semeadas quatro sementes. As suspensões de esporos foram inoculadas após a expansão completa das folhas trifolioladas das plantas, sendo pulverizadas em ambas as faces das folhas até o ponto de escorrimento. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, com umidade relativa de 80%, temperatura em torno de 24°C, por 15 dias até o momento das avaliações. A severidade da doença foi avaliada utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por Van Schoonhoven; Pastor Corrales (1987): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta.

2.4 Fenotipagem em campo

As linhagens foram semeadas em 2014 na safra da seca (semadura em fevereiro). O delineamento foi o de látice triplo 12x12, e as parcelas de duas linhas de 1 metro. A cultura foi submetida à irrigação duas vezes por semana. Nos experimentos de campo foram realizadas três inoculações artificiais aos 25, 30 e 40 dias com auxílio de uma bomba costal. O inóculo do patógeno foi obtido de forma idêntica à mencionada no Item 2.2. A severidade da mancha angular nas parcelas do campo foi avaliada 33 dias após o florescimento (estádio R7) (REZENDE et al., 2014) utilizando a escala de Van Schoonhoven; Pastor-Corrales (1987) com modificações.

2.5 Análise dos dados

Foram utilizados dois critérios diferentes para a avaliação da reação das linhagens nos ambientes. No primeiro, as linhagens foram classificadas de acordo com Van Schoonhoven; Pastor-Corrales (1987), sendo as plantas que apresentaram graus 1 a 3 consideradas resistentes, e as com grau 3,1 ou maior, suscetíveis.

Para a comparação entre os ambientes, foi estimado o índice de coincidência entre as linhagens, sendo consideradas coincidentes as linhagens que não apresentaram mudança na sua classificação da reação (resistente ou suscetível), independente do ambiente ou estágio de avaliação.

O segundo critério para avaliação das linhagens quanto à resistência foi a utilização de análise conjunta das três estratégias de avaliação. Devido a heterogeneidade de variâncias residuais entre os ambientes, utilizou-se a abordagem de modelos mistos, sendo que as estimativas dos componentes de variância foram obtidas pelo *Restricted Maximum Likelihood* (REML) e a predição dos valores genotípicos obtidos pelo *Best Linear Unbiased Prediction* (BLUP), de acordo com Resende et al. (2002). As análises foram realizadas usando o programa computacional R (R CORE TEAM, 2015). Para realizar as análises individuais em cada ambiente, foi utilizado um modelo genotípico univariado, onde: $y = Bi + Zg + e$, onde, y , i , g e e são os vetores dos dados, os efeitos de blocos e genótipos, e os erros, respectivamente (aleatórios); e B e Z são as matrizes de incidência associadas aos vetores de efeitos i e g , respectivamente. Assumiu-se natureza aleatória para os efeitos de blocos, genótipos e os erros, resultando nas seguintes pressuposições:

$$i | \hat{\sigma}_i^2 \sim N(0, I\hat{\sigma}_i^2)$$

$$g | \hat{\sigma}_g^2, \sim N(0, I\hat{\sigma}_g^2)$$

$$e | \hat{\sigma}_e^2 \sim N(0, I\hat{\sigma}_e^2)$$

Para realizar a análise conjunta foi utilizado um modelo genotípico univariado, onde: $y = Bi + Xb + Zg + Wf + e$, onde y , i , b , g , f e e são os vetores dos dados, efeito de blocos, efeitos de experimentos, genótipos, e interação genótipos x experimentos e os erros; e B , X , Z e W são as matrizes de incidência associadas aos vetores de efeitos i , b , g e f , respectivamente. Todos os efeitos foram considerados aleatórios, exceto o de experimentos. As seguintes pressuposições e estruturas de covariância foram utilizadas:

$$i | \hat{\sigma}_i^2 \sim N(0, I\hat{\sigma}_i^2)$$

$$y | b, V \sim N(Xb, V)$$

$$g | \hat{\sigma}_g^2, \sim N(0, I\hat{\sigma}_g^2)$$

$$f | \hat{\sigma}_{ge}^2 \sim N(0, I\hat{\sigma}_{ge}^2)$$

$$e | \hat{\sigma}_e^2 \sim N(0, D\hat{\sigma}_e^2)$$

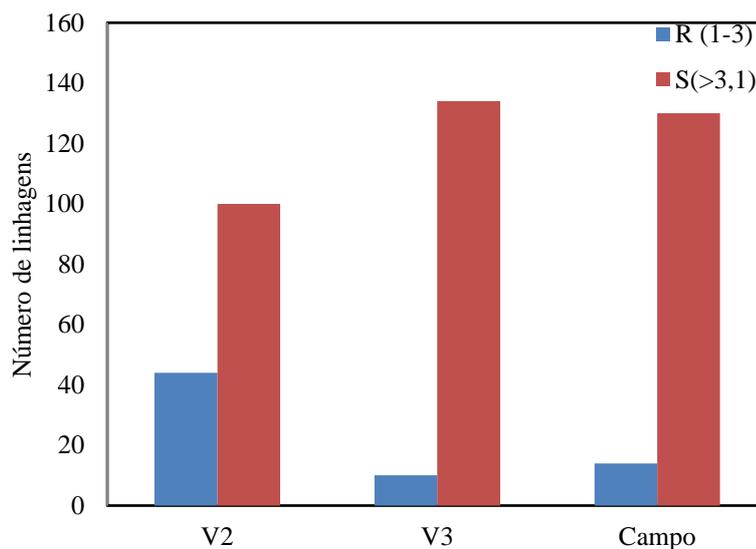
Na análise conjunta, as variâncias dos erros entre os experimentos foram consideradas heterogêneas e não correlacionadas (matriz diagonal). A acurácia e o coeficiente de variação genotípica foram estimados de acordo com Chiorato et al. (2008). Foram consideradas resistentes 20% das linhagens que apresentaram os menores valores genotípicos preditos (médias BLUP). As correlações genéticas entre os ambientes foram estimadas a partir dos valores genotípicos preditos em cada experimento, utilizando coeficientes de correlação de Pearson (Steel et al., 1997).

3 RESULTADOS

3.1 Resistência genética das linhagens de feijoeiro à *P. griseola* nos estádios V2, V3 e no campo

O número de linhagens resistentes nos estádios V2, V3 e campo foram de 44 (31%), 10 (7%) e 14 (10%) respectivamente (Figura 1; Apêndice - Tabela 1A).

Figura 1-Reação das linhagens nos diferentes ambientes e estádios de avaliação (R) Resistente; (S) Suscetível.



Considerando os experimentos nos diferentes ambientes e estádios de avaliação, o coeficiente de coincidência entre as linhagens, ou seja, linhagens que não apresentaram alteração do fenótipo (resistente ou suscetível) foi de 63%. As estimativas dos índices de

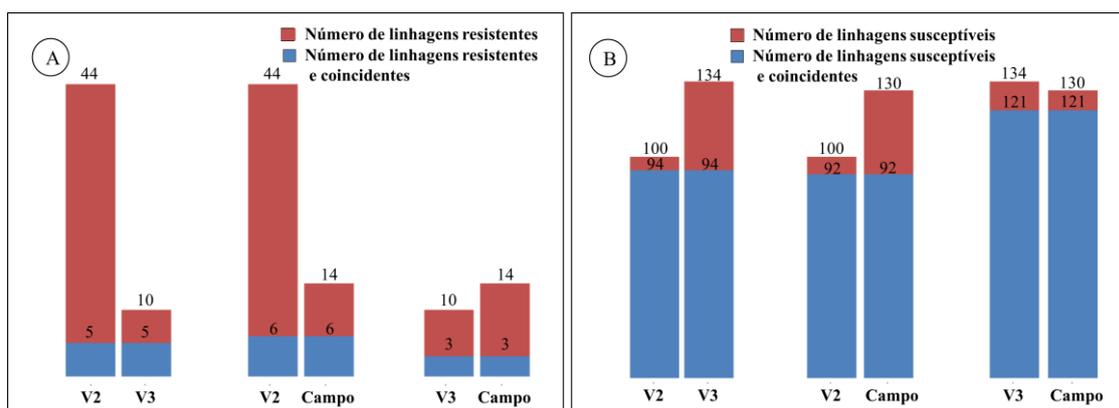
coincidência V2-V3, V2-campo e V3-campo foram de 68%, 69% e 88%, respectivamente. As linhagens que apresentaram reação de resistência em mais de um estádio ou ambiente estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 Número de linhagens resistentes em cada estádio/ambiente de avaliação (diagonal); Número de linhagens resistentes coincidentes nos diferentes estádios/ambientes (acima da diagonal) e nome dessas linhagens (abaixo da diagonal).

	V2	V3	Campo
V2	44	5	6
V3	MAIX-4; CXII-15; MAIV-15.524; VC-28; PT-65	10	3
Campo	MAI-18.13; MAVIII-128;MAII-10; MAVII-244;MAVIII-89;PT65	PT-65;MAIV-8.102; MAIV-15.204	14

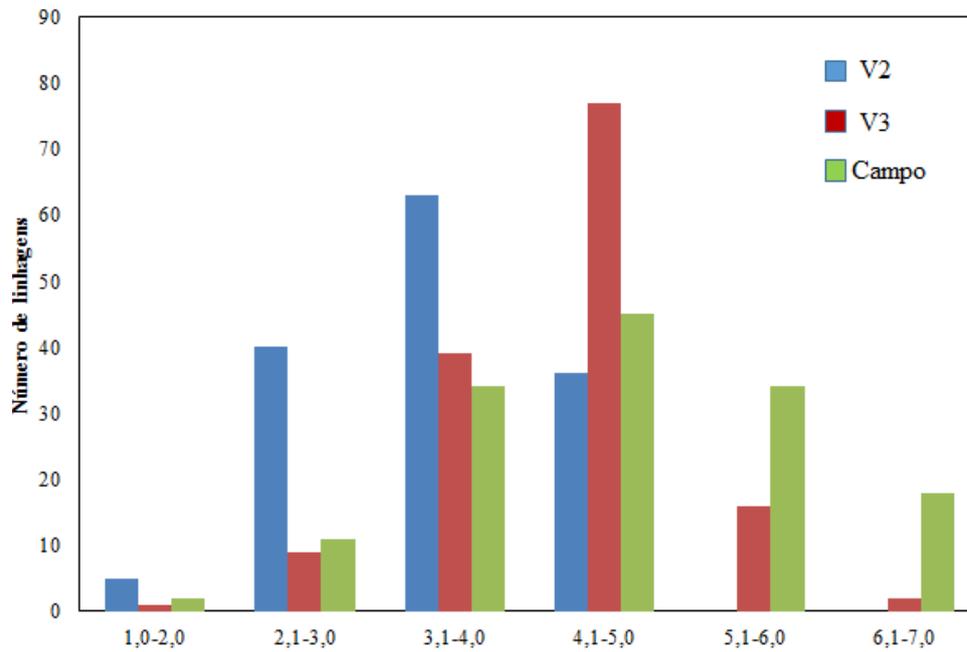
Considerando a reação das linhagens nos diferentes estádios/ambientes é possível observar uma maior coincidência das linhagens que apresentaram reação de suscetibilidade (Figura 2).

Figura 2: **A)** Número de linhagens resistentes e coincidência das linhagens resistentes, considerando os experimentos dois a dois; **B)** Número de linhagens suscetíveis e coincidência das linhagens suscetíveis, considerando os experimentos dois a dois.



A partir dos resultados obtidos das notas médias para reação das linhagens de feijoeiro à *P. griseola*, observa-se maior frequência de notas de 3,1 a 4 para o estádio V2, no entanto, para o estádio V3 e campo, houve predomínio de notas entre 4,1 a 5. (Figura 3).

Figura 3- Frequência das linhagens conforme a amplitude da nota (1-9) para a severidade da mancha angular avaliadas nos diferentes estádios/ambientes de avaliação.



3.2 Resistência genética das linhagens à *P. griseola* na média dos estádios/ambientes de avaliação.

Os resultados referentes às estimativas dos componentes de variância e os parâmetros genéticos, para os três estádios/ambientes (V2, V3 e campo) e para a análise conjunta, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos para a reação de linhagens do feijoeiro à *P. griseola* nos diferentes estádios/ambientes e na análise conjunta dos estádios/ambientes.

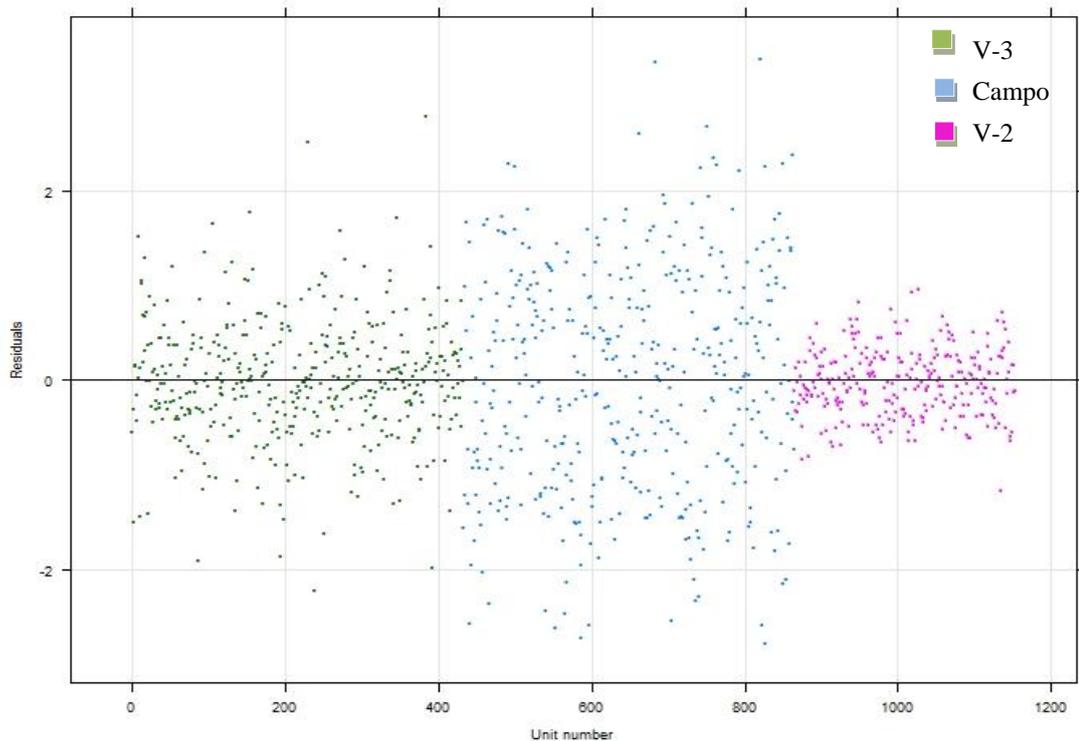
Estimativas	V2	V3	Campo	Conjunta
$\hat{r}_{g\hat{g}}$	90,91%	83,50%	78,70%	-
$\hat{\sigma}_g^2$	0,48*	0,42*	0,79*	0,23*
$\hat{\sigma}_f^2$	-	-	-	0,27*
$\hat{\sigma}_e^2$	0,20	0,54	1,46	-
CV_g (%)	20,10	14,60	19,30	-
Média ¹	3,45	4,44	4,61	-
Variação ¹	2,0- 5,0	1,6- 7,0	1,7- 6,7	-
Testemunhas				
BRSMG Talismã ¹	3,9	4,4	5,3	-
BRSMG Majestoso	3,8	4,7	4,7	-
Carioca MG	4,4	4,3	5,3	-
BRSMG Madrepérola	4,2	4,6	4,7	-
Correlação genética				
	V2	V3	Campo	
V2	-	0,40	0,25	
V3		-	0,27	

¹Média e amplitude de variação considerando as notas para severidade da mancha angular; $\hat{r}_{g\hat{g}}$: acurácia da predição de valores genotípicos; $\hat{\sigma}_g^2$: variância genotípica; $\hat{\sigma}_f^2$: variância da interação linhagens por estádios/ambientes; $\hat{\sigma}_e^2$: variância ambiental; CV_g : coeficiente de variação genotípica; *significativo a 5% de probabilidade pelo teste de χ^2 ;

Verifica-se, pelas estimativas dos coeficientes de variação genotípica (CV_g) e dos componentes de variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), que há variabilidade genética entre as linhagens avaliadas em todos os experimentos (Tabela 2). Desta forma é possível afirmar que houve ocorrência de diferentes níveis de reação das linhagens, em todos os experimentos e na análise conjunta, quando inoculadas com a mistura de isolados de *P. griseola*.

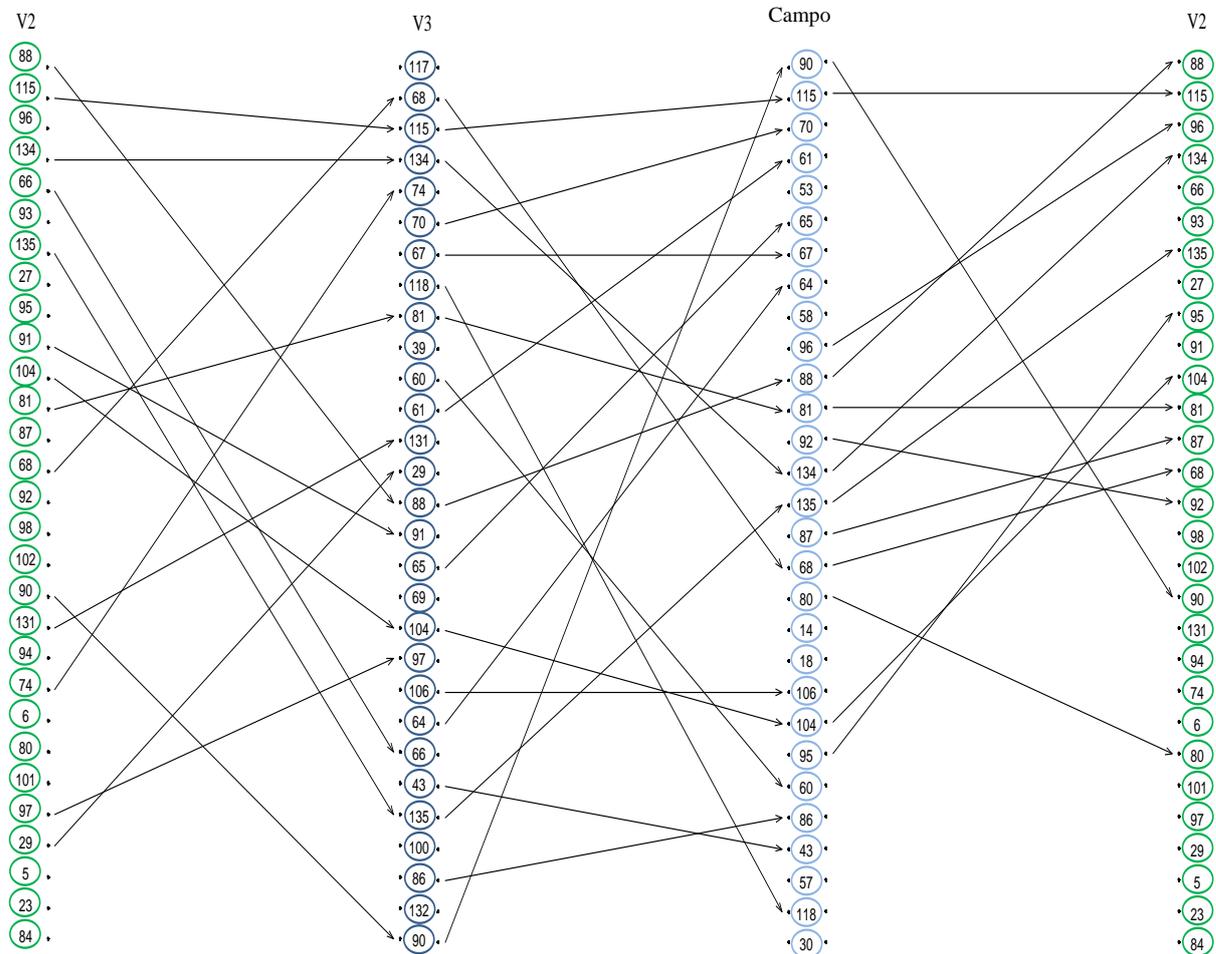
Pela distribuição dos resíduos das avaliações, verifica-se que maior precisão foi observada em casa de vegetação (estádios V2 e V3) quando comparada ao experimento em condições de campo (Figura 4). Essa maior precisão pode ser confirmada pelas estimativas de acurácia (Tabela 2).

Figura 4- Distribuição dos erros associados às observações em cada um dos estádios/ambientes de avaliação.



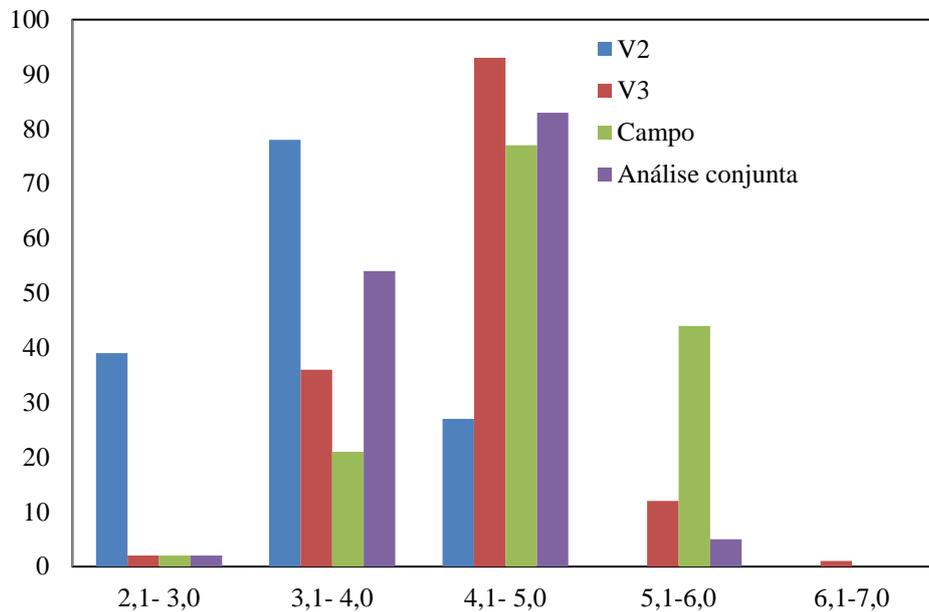
Considerando a análise conjunta envolvendo todos os estádios/ambientes é possível observar que as estimativas dos componentes de variância associados ao efeito de linhagens (σ_g^2) e a interação genótipos x ambientes ($\hat{\sigma}_{fg}^2 = 0.27$) foram significativas (Tabela 2). A significância da interação indica que, em média, a reação das linhagens à mistura de isolados de *P. griseola* não foi coincidente nos diferentes ambientes de avaliação. Isto pode ser confirmado pelas estimativas de correlação genética que foram de baixa a média magnitude (Tabela 2). Considerando a classificação dos valores genotípicos preditos de cada ambiente, é possível verificar a mudança no ordenamento das linhagens, evidenciando a ocorrência da interação genótipos x estádios/ambiente do tipo simples e complexa (Figura 5).

Figura 5 – Classificação dos valores genotípicos preditos da severidade da mancha angular do feijoeiro, considerando 29 genótipos mais resistentes em cada ambiente/estádio. Os números na figura correspondem às linhagens descritas no Apêndice-Tabela 1A



A partir dos resultados obtidos na análise utilizando a abordagem de modelos mistos, observa-se maior frequência das estimativas dos valores genotípicos preditos de 3,1 a 4 para o estádio V2, no entanto, para o estádio V3, campo e análise conjunta, as estimativas foram de 4,1 a 5 (Figura 6). Considerando ainda a análise conjunta, é possível verificar que entre as 29 linhagens mais resistentes (menores médias BLUP), 72% são provenientes do programa de seleção recorrente para resistência a mancha angular (Apêndice- Tabela 2A).

Figura 6 - Distribuição de frequências dos valores genotípicos preditos para reação das linhagens de feijoeiro à *P. griseola*, avaliadas nos ambientes/estádios de avaliação.



4 DISCUSSÃO

A fenotipagem precisa da severidade da mancha angular é importante na identificação de novas fontes de resistência, na seleção de progênies nos programas de melhoramento, bem como, na identificação de locos de resistência e marcadores moleculares associados a esses, visando à seleção assistida por marcadores (OBLESSUC et al., 2012; REZENDE et al., 2014). Na fenotipagem existem várias opções, entre elas, a avaliação em condições controladas ou no campo e em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Um questionamento que surge é se o desempenho será coincidente pelas diferentes metodologias, que foi o objetivo desse trabalho.

Houve diferença significativa para severidade da mancha angular entre os genótipos considerando os diferentes estádios/ambientes de avaliação (Tabela 3). Nesse caso é interessante observar a acurácia (\hat{r}_{gg}), que é uma das formas de avaliar a precisão com que foi conduzido o experimento e/ou realizadas as avaliações. Como pode ser observado na Figura 4 de distribuição dos resíduos, as avaliações em casa de vegetação (estádios V2 e V3) apresentaram uma maior precisão (maior \hat{r}_{gg}) quando comparado ao experimento em condições de campo. Resultados semelhantes foram obtidos por Librelon et al. (2016) e Leite et al. (2015)

avaliando progênies de feijoeiro para resistência à *P. griseola* e mofo branco (*S. sclerotiorum*), respectivamente, no campo e em casa de vegetação.

Essa maior precisão experimental se deve, principalmente, as condições de temperatura e umidade que foram rigorosamente controladas na casa de vegetação, proporcionando condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Outro aspecto importante para explicar a maior estimativa da acurácia em casa de vegetação é a presença apenas da mistura das duas raças que foram inoculadas, garantindo maior uniformidade das notas nas diferentes parcelas de um mesmo tratamento. Já no campo, apesar das inoculações artificiais, a distribuição do inóculo não é tão uniforme como em casa de vegetação e as condições ambientais podem não ser favoráveis. Além disso, com a ocorrência natural do patógeno, podem aparecer outras raças com distribuição desigual entre parcelas de um mesmo tratamento, contribuindo para uma menor acurácia.

Foram utilizadas testemunhas comuns aos três experimentos. A linhagem Carioca MG apresentou reação de suscetibilidade em todas as avaliações, indicando a ocorrência de condições favoráveis para o progresso da doença (Tabela 2). Essa linhagem, desde o início do programa de seleção recorrente da UFLA, tem sido utilizada como testemunha suscetível à mancha angular (ARANTES et al., 2010; REZENDE et al., 2014). As linhagens BRSMG-Madrepérola, e BRSMG-Majestoso também se mostraram suscetíveis em todos os experimentos, corroborando com os dados existentes na literatura (PEREIRA et al., 2015). A cultivar BRSMG-Talismã tem sido relatada na literatura como moderadamente resistente a *P. griseola*, apresentando notas médias entre 3.1 a 6 no campo, de forma similar ao obtido neste trabalho (FARIA et al., 2004).

Foi realizada a comparação entre o critério proposto por Pastor-Corrales; Jara (1995), que considera como resistentes linhagens com notas de 1 a 3 e a análise conjunta da reação das linhagens nos três estádios/ambientes de avaliação. Considerando cada um dos experimentos, verificou-se alta concordância entre as linhagens resistentes utilizando a classificação obtida a partir do primeiro critério e a abordagem de modelos mistos, para todos os estádios/ambientes de avaliação. A abordagem de modelos mistos, utilizada nesse trabalho, tem sido cada vez mais empregada no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua flexibilidade e robustez (PIEPHO et al., 2008). Em virtude da heterogeneidade dos erros dos diferentes experimentos, especialmente a ocorrência de erros menores nos experimentos em casa de vegetação, ajustou-se um modelo misto que acomodasse essa situação.

Houve um efeito pronunciado da interação linhagens x estádios/ambientes de avaliação, uma vez que o componente de variância associado ($\hat{\sigma}_f^2 = 0.27$) foi maior que a estimativa da variância genética entre as linhagens ($\hat{\sigma}_g^2 = 0.23$). A partir desse desdobramento do componente da interação da análise conjunta envolvendo os três estádios/ambientes, verifica-se que a interação foi mais acentuada envolvendo o experimento de campo. Assim é possível inferir que o campo contribuiu mais para a interação em relação aos experimentos realizados em casa de vegetação. Em estudos realizados no patossistema *P. griseola*-feijoeiro verificou-se a predominância da resistência horizontal (PEREIRA et al., 2015), sendo então essa resistência controlada por vários genes, a expressão desses genes pode variar entre os ambientes. Assim, indivíduos de genótipos diferentes podem diferir no comportamento em função do ambiente, contribuindo para a interação (FALCONER; MACKAY, 1996). Assim, as baixas correlações genéticas entre os ambientes (Tabela 3) indicam que alguns genes atuam no campo e outros na casa de vegetação e/ou possuem níveis de expressão diferentes, contribuindo para a interação (FALCONER; MACKAY, 1996; RAMALHO et al., 2012).

Uma possível explicação para a expressão diferencial de genes em ambientes diferentes é a ocorrência de eventos epigenéticos. Assim, diferentes condições de estresse, bióticos e abióticos, tais como, temperaturas elevadas e ocorrência de outros patógenos, podem provocar ativação de elementos transponíveis ou induzir o aparecimento de diferentes marcas epigenéticas. Essas marcas são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, no entanto, não envolvem mudanças na sequência de DNA do organismo, contribuindo para a expressão de genes diferentes sob diferentes condições de estresse (BOYKO AND KOVALCHUK, 2011; REBOLLO et al., 2012; BRESSAN et al., 2014; GAO et al., 2014). Metilações no DNA de regiões do genoma associadas a genes de defesa em tomate e arroz têm sido relatadas na literatura (MANSON et al. 2008; SHA et al. 2005). Nesses trabalhos foi constatado um maior número de metilações no DNA de plantas adultas infectadas do que em plântulas. Dessa forma, a fenotipagem no campo torna-se de grande importância, pois as diferentes condições ambientais permitem que diferentes mecanismos de resposta a estresses sejam ativados.

Alguns outros fatores podem explicar a alta magnitude da interação linhagens x estádios/ambientes, por exemplo, a possível existência de outras raças no campo, devido à ocorrência natural do patógeno. A safra da seca é favorável para o desenvolvimento da doença e dispersão do patógeno, que ocorre principalmente por meio da dispersão dos conídios pelo vento (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997). Além disso, as condições ambientais de temperatura e umidade são diferentes no campo. Resultados semelhantes foram obtidos por

Oblessuc et al., (2012) que avaliaram uma população de linhagens recombinantes (RILs) em campo (apenas ocorrência natural do patógeno) e em casa de vegetação. Foram mapeados vários QTLs em diferentes grupos de ligação. Porém, entre os QTLs identificados, apenas um mostrou efeito importante em ambos os ambientes, sendo que a baixa correlação entre notas de campo e casa de vegetação foi devido principalmente à interação genótipos x ambientes. Deve ser ressaltado que no presente trabalho foram realizadas inoculações artificiais no campo, sendo que neste caso deveria ser esperado uma menor interação linhagens x ambientes em relação ao estudo realizado por Oblessuc et al., (2012) no entanto, a interação foi de alta magnitude.

Houve maior severidade da mancha angular e maior número de linhagens suscetíveis no campo, quando comparado aos experimentos em casa de vegetação. A avaliação no campo foi mais tardia (estádio R7), o que pode ter contribuído para o aumento da severidade da doença. O período mais adequado para avaliação da severidade da mancha angular em campo foi estudada por Rezende et al. (2014). Os autores observaram um aumento das notas médias das linhagens ao longo das épocas de avaliação. O período mais adequado para avaliação da doença foi 33 dias após o florescimento, possibilitando maior discriminação entre as linhagens.

Houve um alto índice de coincidência para reação das linhagens no estádio V3 e campo (88.19%), no entanto, apenas três linhagens apresentaram-se resistentes em ambos os ambientes. Em ambas as fases de avaliação, as plantas apresentam a chamada resistência de “planta adulta” sendo este tipo de resistência principalmente horizontal, conforme já descrito (BARCELLOS et al., 2000; COSTA et al 2006). A “resistência parcial” ou resistência horizontal atua retardando a infecção, crescimento e reprodução do patógeno em plantas adultas, mas não em plântulas (COSTA et al., 2006).

No presente estudo, algumas linhagens como, por exemplo, a MAX-2 e VC 15, apresentaram reação de resistência na casa de vegetação e foram suscetíveis no campo. Resultados semelhantes têm sido observados na avaliação da reação de progênies de feijoeiro a *P. griseola* (LIBRELON et al., 2016) e de trigo à *Pyricularia grisea* (CRUZ et al., 2010). De acordo com Bonmam (1992), essas diferenças podem ser atribuídas, entre outras causas, à presença no campo, de raças do patógeno que não foram inoculadas em casa de vegetação, conforme comentado anteriormente. Resposta similar na avaliação de ambos os ambientes também tem sido relatado (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

Reação de suscetibilidade na casa de vegetação e reação de resistência no campo também foi observada para cinco linhagens. Segundo Marshall; Shaner (1992), a maioria dos genes que confere resistência a plântulas podem ser expressos durante todo o ciclo da planta.

No entanto, outros genes são expressos somente no estágio de planta adulta, como no patossistema *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* -trigo (BARCELLOS et al., 1997).

Vários estudos de mapeamento genético já foram realizados para identificar QTLs relacionados à mancha angular (MAHUKU et al., 2009; OBLESSUC et al. 2013; KELLER et al., 2015; PERGEGUINI et al., 2016). Em todos esses trabalhos de mapeamento a fenotipagem dos indivíduos é realizada apenas em condições controladas (casa de vegetação). Assim é preciso verificar se estes QTLs identificados em condições controladas apresentam comportamento coincidente no campo. Em avaliações de linhagens pertencentes a banco de germoplasma do feijoeiro, já foram identificadas várias fontes de resistência à mancha angular (MAHUKU et al., 2003; PÁDUA et al., 2016). De forma semelhante ao procedimento para identificação de QTLs, essas avaliações são realizadas apenas em condições controladas, com inoculação de uma ou poucas raças do patógeno. Desta forma é preciso verificar se as linhagens resistentes em condições controladas possuem também um nível razoável de resistência no campo. Nas avaliações em condições controladas podem estar sendo selecionados, principalmente, genótipos com resistência vertical, uma vez que neste caso a avaliação é realizada utilizando uma ou poucas raças. Já para as avaliações em campo as linhagens resistentes selecionadas apresentam principalmente a resistência horizontal, pois são resistentes às várias raças existentes no campo (WANJAU et al., 2016).

A seleção recorrente é um acúmulo de vantagens, ou seja, um acúmulo de alelos favoráveis oriundos de genitores diferentes (RESENDE et al., 2014). Esse método tem sido utilizado com sucesso para a seleção de progênies resistentes à *P. griseola* (AMARO et al., 2007). Um ponto interessante que pode ser observado é que entre as linhagens mais resistentes do campo foi observado que a maioria foi proveniente desse programa de seleção recorrente para mancha angular (75%), semelhante ao experimento em casa de vegetação (EstádioV3- 50%; EstádioV2- 59%). Uma das fases do programa de seleção recorrente é a avaliação das progênies para seleção das mais resistentes. No caso deste programa, a avaliação da doença para seleção das progênies é realizada no campo, na safra da seca quando as condições são favoráveis para o desenvolvimento da doença (AMARO et al., 2007). Por isso o desempenho das linhagens do programa de seleção recorrente foi melhor no campo, uma vez que foram selecionadas por vários ciclos neste ambiente. Considerando a análise conjunta utilizando a abordagem de modelos mistos, 72% das linhagens resistentes são provenientes do programa de seleção recorrente para mancha angular. As linhagens provenientes deste programa, de um modo geral, apresentaram um bom nível de resistência a *P. griseola* independente do ambiente de avaliação, corroborando com dados existentes na literatura (ARANTES; ABREU;

RAMALHO, 2010; MODA-CIRINO et al., 2012; REZENDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; LIBRELON et al., 2016).

A avaliação no estádio V2 possibilita selecionar maior número de linhagens e, por isso, pode ser considerada uma seleção moderada (Figura 1). Em bancos de germoplasma há um grande número de acessos para serem caracterizados. Sendo assim, em um primeiro momento, seria viável a avaliação no estádio V2, uma vez que se a avaliação for realizada nesta fase há uma economia de tempo, além de menor quantidade de inóculo necessário para a inoculação (LIBRELON et al., 2015). Desta forma seria feita uma pré-seleção, descartando os genótipos mais suscetíveis no estádio V2 e em um segundo momento, seria feita uma avaliação mais criteriosa, utilizando avaliação no estádio V3 e se possível, avaliação em campo.

Outra vantagem da inoculação no estádio V2 é possibilitar a avaliação de um grande número de genótipos, principalmente nas fases iniciais de programas de melhoramento, quando há grande variabilidade na população que está sendo selecionada. Porém, nos casos em que se necessita de maior precisão nas comparações, como por exemplo nas fases finais dos programas de melhoramento, seria recomendada a fenotipagem utilizando mais de um método. Avaliações em condições de campo são importantes, pois na casa de vegetação se inocula geralmente apenas uma ou poucas raças, enquanto no campo com a ocorrência natural do patógeno, pode haver maior pressão de seleção devido à existência de inúmeras raças do patógeno. Esse fato pode ser comprovado com base nos resultados obtidos no presente trabalho, em que o maior número de indivíduos suscetíveis e as maiores notas para a doença foram relatados no campo.

Os resultados do presente trabalho mostram que não existe uma fenotipagem da severidade da mancha angular do feijoeiro mais eficiente ou superior, os resultados são complementares. A reação de linhagens de feijoeiro a *P. griseola* pode diferir, nos diferentes ambientes e metodologias de fenotipagem, sendo este um complicador para os programas de melhoramento convencional bem como, com emprego da seleção assistida por marcadores. Todas as metodologias de fenotipagem são importantes para a identificação de fontes de resistência para mancha angular e, se possível, devem ser utilizadas simultaneamente para maior confiabilidade na seleção. Portanto, a melhor estratégia para fenotipagem seria a avaliação utilizando mais de uma metodologia sempre que possível. Desta forma, os genótipos que seriam selecionados como resistentes para serem utilizados em programas de melhoramento seriam aqueles com maior nível de resistência em todos os estádios/ambientes de avaliação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, G. B.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 584-588, 2007.
- ARANTES, L.O.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.10, p. 232-237, Abr. 2010.
- BALBI, B. P. et al. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 52, p.56-57, 2009.
- BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B; ROELFS, A. P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): dirabilidade da resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, p.101-111, 1997.
- BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A.P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Inheritance of Adult Plant Leaf Rust Resistance in the Brazilian Wheat Cultivar Toropi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 90-93, Jan. 2000.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits**. Woodbury: Stemma Press, 2010. 390 p.
- BONMAN, J. M. Durable resistance to rice blast disease-environmental influences. **Euphytica**, Wageningen, v. 63, n. 1, p. 115-123, Jan. 1992.
- BOREL, J. C. et al. Genetic control of the angular leaf spot reaction in common bean leaves and pods. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 661-664, Nov./Dec. 2011.
- BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Genome instability and epigenetic modification - heritable responses to environmental stress? **Current Opinion in Plant Biology**, Alexandria, v. 14, n. 3, p. 260-266, June 2011.
- BRESSAN, R.A., et al. "Epigenetics Connects the Genome to Its Environment." **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 38, p. 69-142, Nov. 2014.
- CHATAIKA, B. Y. E. et al. Performance of parental genotypes and inheritance of Angular Leaf Spot (*Phaeosariopsis griseola*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v.9, n. 28, p. 4398-4406, 2010.
- CHIORATO, A. F. et al. Prediction of Genotypic Values and Estimation of Genetic Parameters in Common Bean. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 465-472, 2008.

COSTA, I. F. D. et al. Resistance of six soybean cultivars to *Colletotrichum truncatum* (Schwein) in two phenologic stages. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1684-1688, 2006.

FALCONER, D. S.; Mackay, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1996. 463 p.

FARIA, L.C et al. **BRSMG Talismã: Uma nova opção de cultivar de feijoeiro comum com grão carioca para o estado do Paraná**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2004. 4 p.

FERNANDEZ, F.; GEPTS. P.; LOPES, M. **Etapas de desarrollo de la planta de frijol comum**. Cali: Centro Nacional de Agricultura Tropical, 1982. 26 p.

GAO, D. et al. Annotation and sequence diversity of transposable elements in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 5, p. 339, July 2014.

JARA, C et al. **Virulence diversity of *Pseudocercospora griseola* and its implication for breeding Common bean for resistance to angular leaf spot**. Cali: CIAT, 2015. 1p.

KELLER, B. et al. Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 5, p. 813-826, May 2015.

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

LIBRELON, S. S. et al. Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. **Australasian Plant Pathology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 385–395, July 2015.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, Aug. 1997.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of quantitative traits**. Sinauer Associates, Sunderland, 1998. 980 p.

MAHUKU. G. S. et al. Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 57-71, June 2011.

MAHUKU, G. S. et al. Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, n. 3, p. 303–313, Apr. 2003.

MAHUKU. G. S.; IGLESIAS. A. M.; JARA. C. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, n. 3, p. 381-396, June 2009.

- MASON, G et al. Potentiality of methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) in identifying genes involved in tomato response to tomato yellow leaf curl Sardinia virus. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 26, n. 3, p. 156-173, Sept. 2008.
- MODA-CIRINO et al. **Mancha angular. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: Epamig, 2012. 78 p.
- OBLESSUC, P.R. et al. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 10, p. 2451–2465, Oct. 2013.
- OBLESSUC, P. R. et al. Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. **BMC Genetics**, Amsterdam, v. 13, n.1, p. 50, June 2012.
- PÁDUA, P. F. et al. Identification of common bean resistant sources to angular leaf spot disease in a brazilian germplasm collection. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 59, p.115-116, 2016.
- PEREIRA, R.; ABREU, M. J.; SOUZA, E.A.; Alternative method to assess the reaction of common bean lines to *Pseudocercospora griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 54, p. 104-105, 2011.
- PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 5044-5053, May 2015.
- PEREIRA, R. et al. Evaluation of resistance in common bean genotypes to the causal agent of angular leaf spot. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 56, p.33-34, 2013.
- PERSEGUINI, et al. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plos one**, San Francisco, v. 11, n. 3, p.1-16, 2016.
- PIEPHO, H.P. et al. BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. **Euphytica**, Wageningen, v. 161, n.1, p. 209-228, May 2008.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de 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, p. 23-29, July 2005.
- RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da Genética Quantitativa no Melhoramento de Plantas Autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012. 522 p.
- RAMALHO, M.A.P.; FURTADO, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: Editora UFLA, 2012. 328 p.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2015.

REBOLLO, R.; ROMANISH, M.T; MAGER, D.L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. **Annual Review Genetics**, Berlin, v. 46, p. 21-42, Aug. 2012.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Editora Embrapa-SCT, 2002. 975 p.

REZENDE, B. A. et al. Severity Evaluation Methods in Common Bean Recurrent Selection Programme for Resistance to Angular Leaf Spot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 643–649, Feb. 2014.

RODRIGUEZ, I. J. et al. Resistance of common bean breeding lines to *Phaeoisariopsis griseola* isolates from Honduras. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 57, p. 215-216, 2014.

SANGLARD, D.A. et al. An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *Pseudocercospora griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 52, p. 62-63, 2009.

SHA, A.H. et al. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 273, n. 6, p. 484-490, July 2005.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill Book, 1997. 666p.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT: Cali, 1987.

WANJAU, B. N. N. et al. Development of a breeding method for durable resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 208, n. 1, p. 91-100, Mar. 2016.

Tabela 1A- Notas médias para reação das linhagens de feijoeiro à *P. griseola* nos diferentes estádios/ambientes de avaliação.

Número	Linhagem	V2	V3	Campo
1	BRS Valente	2,8 R*	4,5 S	5,7 S
2	BRS Timbó	4,0 S	5,4 S	4,0 S
3	BRS Ametista	4,3 S	4,1 S	4,0 S
4	BRS Campeiro	4,2 S	5,5 S	5,3 S
5	BRS Esplendor	2,5 R	4,9 S	6,0 S
6	BRS Esteio	2,4 R	4,3 S	6,0 S
7	BRS Vereda	4,0 S	4,9 S	3,7 S
8	BRS Cometa	4,9 S	3,7 S	4,0 S
9	BRS Estilo	4,0 S	4,6 S	4,7 S
10	BRS Notável	4,3 S	5,3 S	4,0 S
11	CNFP MG 11-18	3,4 S	4,6 S	5,3 S
12	CNFC 10108	4,7 S	4,6 S	5,5 S
13	CNFC 10429	4,4 S	5,0 S	3,7 S
14	CNFC 10432	4,5 S	4,9 S	2,5 R
15	CNFC 11-07	4,4 S	4,0 S	5,0 S
16	CNFC 11946	5,0 S	4,4 S	6,3 S
17	CNFC 11965	3,6 S	5,2 S	5,3 S
18	CNFCMG 11-08	3,0 R	4,2 S	3,3 S
19	CNFCMG 11-13	4,0 S	4,2 S	5,7 S
20	CNFJ 15288	3,7 S	4,5 S	4,3 S
21	CNFP MG 11-08	3,6 S	4,3 S	5,0 S
22	CNFP11978	3,2 S	4,5 S	4,7 S
23	CNFPMG -1106	2,6 R	4,8 S	5,7 S
24	CNFPMG -11-21	3,0 R	4,7 S	4,7 S
25	CNFRX 15 275	4,2 S	4,5 S	5,7 S
26	CVIII 6	3,8 S	4,3 S	5,0 S
27	CVIII 2	2,0 R	4,7 S	4,5 S
28	CVIII 5	4,3 S	5,3 S	3,5 S
29	CXI 1	2,7 R	3,3 S	4,3 S
30	CXI 18	4,3 S	4,7 S	3,0 R
31	CXI 7	3,8 S	3,7 S	5,7 S
32	Carioca	4,4 S	4,6 S	5,3 S
33	Carioca MG	4,4 S	4,7 S	5,0 S
34	CNFCMG-11-06	3,8 S	4,1 S	4,3 S
35	CXI-26	3,7 S	4,4 S	5,7 S
36	CXII 19	4,4 S	4,2 S	5,7 S
37	CXII-1	4,4 S	4,7 S	6,0 S
38	CXII-13	4,0 S	4,2 S	6,0 S
39	CXII-15	2,8 R	2,9 R	6,0 S
40	CXII-23	4,1 S	4,4 S	6,3 S
41	CXII-6	4,1 S	4,6 S	5,0 S
42	CXII-8	3,9 S	4,2 S	6,7 S
43	CXII 16	3,4 S	3,6 S	3,7 S
44	E 09/10-8	3,9 S	4,3 S	4,7 S
45	E09/ 10-27	3,9 S	4,7 S	5,0 S

46	E09/ 10-5	4,2 S	4,3 S	5,3 S
47	E09/10-28	3,3 S	4,1 S	5,3 S
48	E09/10-7	3,9 S	4,4 S	6,0 S
49	EMB9	4,1 S	4,7 S	4,0 S
50	IPR Uirapuru	3,4 S	5,0 S	3,0 R
51	BRSMG Madrepérola	4,2 S	4,4 S	4,7 S
52	MAI- 2.5	4,7 S	7,0 S	4,5 S
53	MAI-18.13	2,7 R	4,7 S	2,0 R
54	MAI-2.10	4,0 S	4,7 S	5,0 S
55	MAI-6.10	4,0 S	4,9 S	4,0 S
56	MAI-8.9	3,4 S	4,5 S	4,0 S
57	MAII- 22	3,2 S	5,0 S	3,3 S
58	MAII-10	3,0 R	4,0 S	2,7 R
59	MAII-16	3,1 S	4,4 S	5,0 S
60	MAII-8	3,7 S	3,0 R	3,7 S
61	MAIII-16.155	3,0 R	3,3 S	2,5 R
62	MAIII-16.159	5,0 S	3,8 S	4,0 S
63	MAIII-17.159	4,2 S	4,3 S	4,0 S
64	MAIII-17.185	3,2 S	3,6 S	2,7 R
65	MAIII-9.91	3,3 S	3,4 S	2,5 R
66	MAIV-15.203	2,0 R	3,7 S	4,7 S
67	MAIV-15.204	3,8 S	2,7 R	2,7 R
68	MAIV-15.524	2,5 R	2,3 R	4,0 S
69	MAIV-18.259	2,8 R	3,4 S	4,7 S
70	MAIV-8.102	3,3 S	2,7 R	2,3 R
71	MAIX 10	2,9 R	4,4 S	4,7 S
72	MAIX 12	3,6 S	3,9 S	5,0 S
73	MAIX 14	3,1 S	3,9 S	5,0 S
74	MAIX-4	2,6 R	2,7 R	4,7 S
75	MAIX-5	2,9 R	3,8 S	4,0 S
76	BRSMG Majestoso	3,8 S	5,5 S	4,3 S
77	MAV-1.7	3,8 S	4,5 S	4,0 S
78	MAV-14.206	3,4 S	5,0 S	5,0 S
79	MAV-3.36	3,3 S	4,3 S	3,7 S
80	MAV-5.60	2,5 R	5,3 S	3,0 R
81	MAV-7.85	2,3 R	3,1 S	3,3 S
82	MAVI -21	4,3 S	5,3 S	3,7 S
83	MAVI-20	3,6 S	3,8 S	5,7 S
84	MAVI-24	2,7 R	3,8 S	4,0 S
85	MAVI-39	2,9 R	3,8 S	5,0 S
86	MAVI-60	3,2 S	3,7 S	3,7 S
87	MAVII 129	2,3 R	4,3 S	3,3 S
88	MAVII-127	2,0 R	3,5 S	3,3 S
89	MAVII-2	3,6 S	4,3 S	4,0 S
90	MAVII-244	2,5 R	4,0 S	1,7 R
91	MAVII-92	2,2 R	3,4 S	5,0 S
92	MAVIII-128	2,4 R	4,1 S	3,0 R
93	MAVIII-34	2,0 R	4,0 S	5,0 S
94	MAVIII-5	2,4 R	4,7 S	5,0 S

95	MAVIII-78	2,1 R	4,0 S	4,0 S
96	MAVIII-89	2,0 R	4,3 S	3,0 R
97	MAVIII-94	2,6 R	3,5 S	4,7 S
98	MAX -9	2,3 R	4,0 S	5,7 S
99	MAX-10	3,2 S	4,2 S	4,3 S
100	MAX-11	4,1 S	3,5 S	3,7 S
101	MAX-2	2,6 R	3,8 S	4,7 S
102	MAX-6	2,4 R	4,0 S	5,0 S
103	MAX-7	3,2 S	4,2 S	4,3 S
104	MAX-8	2,2 R	3,6 S	4,0 S
105	MB 89	4,2 S	5,5 S	6,7 S
106	MBC1 17/5	2,9 R	3,5 S	3,7 S
107	MBC1 35/12	3,5 S	3,9 S	4,0 S
108	MBC1-31/32	3,6 S	4,1 S	6,7 S
109	MBC1-36/8	3,3 S	4,9 S	4,3 S
110	MBCI 32/14	4,2 S	3,7 S	6,3 S
111	MBCO-22/3	2,9 R	4,2 S	4,0 S
112	Ouro Vermelho	2,7 R	5,4 S	6,3 S
113	Ouro Negro	3,9 S	4,6 S	5,7 S
114	BRSMG Pérola	4,1 S	4,6 S	6,0 S
115	PT 65	2,1 R	2,7 R	2,7 R
116	PT-68	4,0 S	4,1 S	4,0 S
117	Radiante	3,4 S	1,6 R	5,3 S
118	RC2 RAD 155	3,6 S	2,4 R	4,0 S
119	RPCVIII 13	4,4 S	3,9 S	4,7 S
120	RPCVIII 6	4,8 S	4,5 S	4,7 S
121	RPCVIII 7	3,7 S	4,6 S	4,3 S
122	RPCVIII-1	4,1 S	6,2 S	6,0 S
123	RPCVIII-4	4,1 S	5,5 S	6,3 S
124	RPCVIII-8	3,6 S	4,3 S	6,0 S
125	BRSMG Talismã	3,9 S	4,4 S	5,0 S
126	VC 17	3,9 S	4,8 S	5,0 S
127	VC 18	3,5 S	4,7 S	5,0 S
128	VC 19	4,0 S	4,6 S	4,0 S
129	VC 21	3,2 S	5,5 S	6,3 S
130	VC 22	4,4 S	4,7 S	4,7 S
131	VC 24	2,4 R	3,2 S	5,3 S
132	VC 25	3,2 S	3,5 S	6,3 S
133	VC 27	4,0 S	4,5 S	6,7 S
134	VC 28	2,1 R	2,7 R	3,7 S
135	VC20	2,1 R	3,8 S	3,3 S
136	VC23	5,0 S	5,2 S	6,3 S
137	VC-26	4,1 S	5,0 S	6,3 S
138	VP 30	3,7 S	4,4 S	4,0 S
139	VP 31	3,4 S	4,0 S	4,0 S
140	VR 14	3,6 S	4,8 S	3,5 S
141	VR 15	3,7 S	5,2 S	6,3 S
142	VR 16	3,7 S	5,6 S	6,0 S
143	VR 17	4,1 S	5,7 S	6,3 S

144	VR 18	2,8 R	4,6 S	4,3 S
-----	-------	-------	-------	-------

*Linhagens que apresentaram graus 1 a 3 consideradas resistentes (R), e as com grau 3,1 ou maior, suscetíveis(S).

Tabela 2A -Valores genotípicos preditos (médias BLUP) e reação das linhagens de feijoeiro à *P. griseola*, avaliadas nos ambientes/estágios de avaliação.

Number	Linhagem	V2	V3	Campo	Conjunta
1	BRS Valente	2,94 S*	4,49 S	4,97 S	4,14 S
2	BRS Timbó	3,89 S	5,08 S	4,60 S	4,52 S
3	BRS Ametista	4,10 S	4,23 S	4,48 S	4,27 S
4	BRS Campeiro	4,14 S	5,27 S	5,22 S	4,88 S
5	BRS Esplendor	2,77 R	4,67 S	5,11 S	4,18 S
6	BRS Esteio	2,66 R	4,24 S	5,00 S	3,97 S
7	BRS Vereda	3,89 S	4,70 S	4,40 R	4,33 S
8	BRS Cometa	4,55 S	4,04 S	4,53 S	4,38 S
9	BRS Estilo	3,87 S	4,58 S	4,77 S	4,41 S
10	BRS Notável	4,13 S	5,06 S	4,64 S	4,61 S
11	CNFP MG 11-18	3,41 S	4,52 S	4,94 S	4,29 S
12	CNFC 10108	4,50 S	4,69 S	5,31 S	4,83 S
13	CNFC 10429	4,22 S	4,86 S	4,49 R	4,52 S
14	CNFC 10432	4,25 S	4,74 S	3,95 R	4,32 S
15	CNFC 11-07	4,20 S	4,21 S	4,89 S	4,44 S
16	CNFC 11946	4,75 S	4,61 S	5,72 S	5,03 S
17	CNFC 11965	3,60 S	4,94 S	5,05 S	4,53 S
18	CNFCMG 11-08	3,05 S	4,16 S	4,00 R	3,74 S
19	CNFCMG 11-13	3,87 S	4,31 S	5,12 S	4,44 S
20	CNFJ 15288	3,65 S	4,49 S	4,58 S	4,24 S
21	CNFP MG 11-08	3,55 S	4,37 S	4,80 S	4,24 S
22	CNFP11978	3,26 S	4,39 S	4,62 S	4,09 S
23	CNFPMG -1106	2,80 R	4,61 S	4,97 S	4,13 S
24	CNFPMG -11-21	3,07 S	4,50 S	4,60 S	4,06 S
25	CNFRX 15 275	4,05 S	4,55 S	5,19 S	4,60 S
26	CVIII 6	3,74 S	4,38 S	4,84 S	4,32 S
27	CVIII 2	2,31 R	4,40 S	4,37 S	3,70 S
28	CVIII 5	4,12 S	5,15 S	4,40 R	4,56 S
29	CXI 1	2,75 R	3,54 R	4,23 S	3,51 R
30	CXI 18	4,10 S	4,62 S	4,16 R	4,29 S
31	CXI 7	3,69 S	4,03 S	5,03 S	4,25 S
32	Carioca	4,29 S	4,69 S	5,13 S	4,70 S
33	Carioca MG	3,09 S	4,55 S	4,75 S	4,13 S
34	CNFCMG-11-06	3,75 S	4,18 S	4,54 S	4,15 S
35	CXI-26	3,73 S	4,46 S	5,12 S	4,43 S
36	CXII 19	4,24 S	4,41 S	5,20 S	4,62 S

37	CXII-1	4,28 S	4,77 S	5,41 S	4,82 S
38	CXII-13	3,97 S	4,35 S	5,27 S	4,53 S
39	CXII-15	2,86 S	3,36 R	4,88 S	3,70 S
40	CXII-23	4,03 S	4,53 S	5,45 S	4,67 S
41	CXII-6	4,00 S	4,61 S	4,93 S	4,51 S
42	CXII-8	3,87 S	4,41 S	5,53 S	4,60 S
43	CXII 16	3,34 S	3,78 R	4,12 R	3,74 S
44	E 09/10-8	3,85 S	4,38 S	4,73 S	4,32 S
45	E09/ 10-27	3,84 S	4,62 S	4,90 S	4,45 S
46	E09/ 10-5	4,07 S	4,45 S	5,05 S	4,53 S
47	E09/10-28	3,34 S	4,20 S	4,86 S	4,14 S
48	E09/10-7	3,86 S	4,53 S	5,29 S	4,56 S
49	EMB9	3,93 S	4,58 S	4,51 S	4,34 S
50	IPR Uirapuru	3,37 S	4,71 S	4,17 R	4,08 S
51	BRSMG Madrepérola	4,06 S	4,48 S	4,78 S	4,44 S
52	MAI- 2.5	4,59 S	6,27 S	5,10 S	5,32 S
53	MAI-18.13	2,83 S	4,41 S	3,48 R	3,58 R
54	MAI-2.10	3,93 S	4,68 S	4,93 S	4,51 S
55	MAI-6.10	3,90 S	4,74 S	4,48 S	4,38 S
56	MAI-8.9	3,40 S	4,40 S	4,38 S	4,06 S
57	MAII- 22	3,25 S	4,69 S	4,14 R	4,03 S
58	MAII-10	3,05 S	3,96 S	3,70 R	3,57 R
59	MAII-16	3,19 S	4,34 S	4,73 S	4,09 S
60	MAII-8	3,58 S	3,40 R	4,09 R	3,69 S
61	MAIII-16.155	2,96 S	3,49 R	3,47 R	3,31 R
62	MAIII-16.159	4,64 S	4,11 S	4,56 S	4,44 S
63	MAIII-17.159	4,03 S	4,33 S	4,49 S	4,28 S
64	MAIII-17.185	3,11 S	3,70 R	3,66 R	3,49 R
65	MAIII-9.91	3,21 S	3,60 R	3,60 R	3,47 R
66	MAIV-15.203	2,26 R	3,74 R	4,30 S	3,43 R
67	MAIV-15.204	3,57 S	3,15 R	3,64 R	3,46 R
68	MAIV-15.524	2,52 R	2,79 R	3,91 S	3,07 R
69	MAIV-18.259	2,88 S	3,61 R	4,40 S	3,63 S
70	MAIV-8.102	3,13 S	3,11 R	3,42 R	3,22 R
71	MAIX 10	3,02 S	4,31 S	4,56 S	3,96 S
72	MAIX 12	3,60 S	4,03 S	4,74 S	4,12 S
73	MAIX 14	3,16 S	4,02 S	4,66 S	3,95 S
74	MAIX-4	2,64 R	3,08 R	4,25 S	3,32 R
75	MAIX-5	2,96 S	3,90 S	4,20 S	3,69 S
76	BRSMG Majestoso	3,75 S	5,13 S	4,72 S	4,53 S
77	MAV-1.7	3,72 S	4,44 S	4,45 S	4,20 S
78	MAV-14.206	3,46 S	4,79 S	4,86 S	4,37 S
79	MAV-3.36	3,30 S	4,26 S	4,20 R	3,92 S
80	MAV-5.60	2,70 R	4,80 S	3,92 R	3,81 S

81	MAV-7.85	2,43 R	3,34 R	3,73 R	3,17 R
82	MAVI -21	4,15 S	5,02 S	4,51 R	4,56 S
83	MAVI-20	3,54 S	4,04 S	5,00 S	4,19 S
84	MAVI-24	2,81 R	3,90 S	4,17 S	3,63 S
85	MAVI-39	3,00 S	3,94 S	4,61 S	3,85 S
86	MAVI-60	3,19 S	3,82 R	4,10 R	3,70 S
87	MAVII 129	2,49 R	4,14 S	3,89 R	3,51 R
88	MAVII-127	2,21 R	3,54 R	3,73 R	3,16 R
89	MAVII-2	3,59 S	4,31 S	4,40 S	4,10 S
90	MAVII-244	2,58 R	3,85 S	3,13 R	3,18 R
91	MAVII-92	2,38 R	3,58 R	4,43 S	3,46 R
92	MAVIII-128	2,55 R	3,97 S	3,74 R	3,42 R
93	MAVIII-34	2,29 R	3,96 S	4,48 S	3,58 R
94	MAVIII-5	2,61 R	4,49 S	4,65 S	3,92 S
95	MAVIII-78	2,34 R	3,93 S	4,09 S	3,45 R
96	MAVIII-89	2,24 R	4,10 S	3,71 R	3,35 R
97	MAVIII-94	2,73 R	3,67 R	4,38 S	3,59 R
98	MAX -9	2,55 R	4,03 S	4,81 S	3,80 S
99	MAX-10	3,19 S	4,16 S	4,43 S	3,93 S
100	MAX-11	3,89 S	3,81 R	4,23 R	3,98 S
101	MAX-2	2,70 R	3,85 S	4,41 S	3,65 S
102	MAX-6	2,57 R	4,00 S	4,54 S	3,70 S
103	MAX-7	3,20 S	4,18 S	4,43 S	3,94 S
104	MAX-8	2,39 R	3,65 R	4,05 S	3,36 R
105	MB 89	4,18 S	5,30 S	5,76 S	5,08 S
106	MBC1 17/5	2,94 S	3,68 R	4,02 R	3,54 R
107	MBC1 35/12	3,41 S	4,01 S	4,31 S	3,91 S
108	MBC1-31/32	3,66 S	4,29 S	5,47 S	4,47 S
109	MBC1-36/8	3,31 S	4,66 S	4,55 S	4,17 S
110	MBCI 32/14	4,07 S	4,02 R	5,36 S	4,48 S
111	MBCO-22/3	3,03 S	4,16 S	4,26 S	3,81 S
112	Ouro Vermelho	2,94 S	5,09 S	5,35 S	4,46 S
113	Ouro Negro	3,82 S	4,57 S	5,15 S	4,52 S
114	BRSMG Pérola	4,03 S	4,64 S	5,34 S	4,67 S
115	PT 65	2,22 R	3,01 R	3,36 R	2,86 R
116	PT-68	3,86 S	4,20 S	4,43 S	4,16 S
117	Radiante	3,25 S	2,60 R	4,54 S	3,46 R
118	RC2 RAD 155	3,42 S	3,16 R	4,15 S	3,58 R
119	RPCVIII 13	4,15 S	4,13 S	4,74 S	4,34 S
120	RPCVIII 6	4,50 S	4,60 S	4,89 S	4,66 S
121	RPCVIII 7	3,66 S	4,51 S	4,58 S	4,25 S
122	RPCVIII-1	4,13 S	5,81 S	5,58 S	5,17 S
123	RPCVIII-4	4,09 S	5,24 S	5,60 S	4,98 S
124	RPCVIII-8	3,58 S	4,40 S	5,21 S	4,39 S

125	Talismã	3,82 S	4,41 S	4,86 S	4,36 S
126	VC 17	3,85 S	4,69 S	4,92 S	4,49 S
127	VC 18	3,52 S	4,57 S	4,83 S	4,31 S
128	VC 19	3,84 S	4,52 S	4,49 S	4,28 S
129	VC 21	3,34 S	5,17 S	5,44 S	4,65 S
130	VC 22	4,23 S	4,71 S	4,86 S	4,60 S
131	VC 24	2,58 R	3,50 R	4,58 R	3,55 R
132	VC 25	3,22 S	3,82 S	5,16 R	4,07 S
133	VC 27	3,93 S	4,59 S	5,58 S	4,70 S
134	VC 28	2,25 R	3,02 R	3,77 R	3,01 R
135	VC20	2,31 R	3,78 S	3,79 R	3,29 R
136	VC23	4,79 S	5,17 S	5,72 S	5,23 S
137	VC-26	4,02 S	4,92 S	5,53 S	4,82 S
138	VP 30	3,64 S	4,38 S	4,42 S	4,14 S
139	VP 31	3,37 S	4,06 S	4,31 S	3,91 S
140	VR 14	3,56 S	4,59 S	4,30 R	4,15 S
141	VR 15	3,76 S	5,04 S	5,50 S	4,76 S
142	VR 16	3,73 S	5,28 S	5,41 S	4,81 S
143	VR 17	4,11 S	5,45 S	5,64 S	5,07 S
144	VR 18	2,94 S	4,41 S	4,43 S	3,93 S

* Foram consideradas resistentes (R), 20% das linhagens que apresentaram os menores valores genotípicos preditos (médias BLUP); S – suscetível.

CAPÍTULO 3

MISTURA DE RAÇAS DE *Pseudocercospora griseola* PARA A AVALIAÇÃO DA REAÇÃO À MANCHA ANGULAR DO FEIJOEIRO

RESUMO

O fungo *Pseudocercospora griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, apresenta ampla variabilidade patogênica, o que tem dificultado o desenvolvimento de cultivares resistentes. O uso de mistura de diferentes raças do patógeno para a avaliação da reação à mancha angular pode ser uma estratégia viável para a seleção de linhagens com maior espectro de resistência. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do uso de mistura de isolados para a avaliação da severidade da doença, a partir da comparação da agressividade entre isolados/mistura. A comparação entre os isolados e a mistura foi realizada por meio da avaliação da severidade da doença, utilizando-se uma escala de notas e o percentual da área foliar lesionada (%AFL). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo utilizados dois isolados das raças 63-63, um da raça 63-23 e a respectiva mistura, inoculados em seis linhagens de feijoeiro. Na comparação dos isolados e da mistura, verificou-se que a escala de notas foi mais eficiente em relação a %AFL para distinção da agressividade. A mistura de raças de *P. griseola* foi eficiente na avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro, apresentando maior agressividade em relação às raças inoculadas individualmente.

ABSTRACT

Pseudocercospora griseola is the causal agent of angular leaf spot in common bean, presents wide pathogenic variability, which difficult development of resistant cultivars. The use of mixture of different *P. griseola* pathogenic races to evaluate angular leaf spot can be a viable strategy to select common bean lines with a greater resistance spectrum. Objective of this study was to verify efficiency in using mixture of *P. griseola* strains to evaluate disease severity by comparing aggressiveness among strains/mixture. Comparison between individual strains and mixture strains was performed by assessing of disease severity using score scale and percentage of leaf area with symptoms (%LAS). Experiments were carried out in greenhouse, using three strains of races 63-63, 63-23 and its respective mixture, inoculated in six common bean lines. In comparison between individual strains and mixture strains, it was verified that score scale was more efficient than %LAS to distinguish aggressiveness. Mixture of *P. griseola* races was efficient to evaluate angular leaf spot severity, presenting greater aggressiveness compared with the races individually inoculated.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em países tropicais e subtropicais, constituindo uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, especialmente para a população de baixa renda (SILVA et al., 2010). O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores e consumidores desta leguminosa (FAO, 2015). Vários fatores podem afetar a produtividade do feijoeiro, entre estes se destaca a ocorrência de doenças. A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc) Crus & U. Brown, é uma das principais doenças que acometem a cultura (SANGLARD et al. 2006; SINGH; SCHWARTZ 2010; PEREIRA et al. 2015), sendo os sintomas visíveis principalmente nas folhas e vagens, onde o patógeno induz a desfolha prematura e provoca a depreciação na qualidade dos grãos (MAHUKU et al. 2009; MAHUKU et al., 2011; BOREL et al. 2011).

O controle da mancha angular por meio da utilização de cultivares resistentes vem se destacando por apresentar grande potencial em minimizar os custos de produção além de diminuir os danos causados ao ambiente (SINGH et al., 2010). Entretanto, a grande variabilidade patogênica de *P. griseola* tem dificultado a obtenção de cultivares com resistência efetiva e durável (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2015; JARA et al., 2015). Isolados de *P. griseola* diferem na capacidade de infectar cultivares de feijão, mesmo quando estes são pertencentes a uma mesma raça. A variação na agressividade de isolados tem sido verificada em isolados pertencentes à raça 63-63, quando inoculados em diferentes grupos de cultivares de feijão (PEREIRA et al., 2015; SANGLARD et al., 2015). Além disso, diferenças entre isolados também têm sido observadas para características morfológicas e fisiológicas (LIBRELON et al., 2015).

A avaliação da reação de linhagens e progênies de feijoeiro à *P. griseola* tem sido realizada por meio da inoculação artificial de isolados monospóricos utilizando as raças mais frequentes (BALBI et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2014; PÁDUA et al. 2016). No entanto, quando o número de raças é elevado, torna-se necessária grande quantidade de sementes, o que pode inviabilizar a avaliação das progênies em um programa de melhoramento. Além disso, a inoculação de apenas uma ou poucas raças pode explicar a dificuldade dos melhoristas em obter cultivares com resistência durável que seja efetiva em diferentes locais (CHILIPA et al., 2016). Desta forma, uma alternativa é o uso de mistura de isolados das diferentes raças do patógeno. Estudos utilizando mistura de isolados têm sido realizados em algumas oportunidades, sendo a agressividade da mistura em relação aos isolados monospóricos variável entre os diferentes

patossistemas (MEBRATE; COOKE 2001; OHE; MIEDANER 2010; CHILIPA et al., 2016; WANJAU et al., 2016; FALLEIROS 2016).

A avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro em casa de vegetação tem sido realizada utilizando escalas diagramáticas no estágio V2 (LIBRELON et al., 2015; LIBRELON et al., 2015; FURTADO et al., 2016) e V3 (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR CORRALES 1987; PEREIRA et al., 2015; SANGLARD et al., 2015; WANJAU et al., 2016). A determinação do percentual da área foliar lesionada (%AFL), por meio de programas computacionais (VALE et al., 2003), também tem sido utilizada com sucesso em algumas oportunidades (PARRELA et al., 2013; REZENDE et al., 2014). Estes autores enfatizam que o método apresenta alta precisão, permitindo maior distinção entre diferenças pequenas nos níveis de agressividade.

Existem metodologias que permitem avaliar a agressividade de diferentes isolados do patógeno, além de informar sobre a resistência vertical e horizontal do hospedeiro. Entre estas se destaca o método proposto por Melo; Santos (1999) que tem sido utilizado com resultados promissores em diferentes patossistemas (DAVIDE; SOUZA 2009; BUIATE et al. 2010; SILVA et al., 2014; PEREIRA et al. 2015; ABREU et al., 2016).

Relatos na literatura sobre a eficiência da utilização de mistura de raças na avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro são escassos e não há informações sobre a agressividade de isolados de *P. griseola* quando utilizados em mistura. Neste trabalho, a comparação da agressividade dos isolados/mistura de *P. griseola* foi avaliada e suas implicações no melhoramento visando resistência durável à *P. griseola* são discutidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados, mistura e preparo das suspensões

Foram utilizados dois isolados pertencentes à raça 63-63 e um da raça 63-23, coletados em diferentes locais no ano de 2011, no estado de Minas Gerais, Brasil pertencentes à micoteca do laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, DBI-UFLA (Tabela 1). Estes isolados foram utilizados devido a elevada frequência em campos experimentais e alta agressividade (Pereira et al., 2015).

Tabela 1 Descrição dos isolados de *Pseudocercospora griseola* utilizados.

Isolados	Cultivar hospedeira	Procedência	Raça
Psg-5	Carioca	Viçosa	63-23
Psg-3	BRSMG Talismã	Patos de Minas	63-63
Psg-4	BRSMG Madrepérola	Lavras	63-63
Mistura	-	-	63-23, 63-63

Inóculo de cada isolado foi produzido individualmente. Para obtenção de esporos, os isolados de *P. griseola* foram cultivados em meio folha-dextrose-ágar e mantidos a temperatura de 24°C na incubadora (B.O.D), por um período de 7 a 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, o inóculo foi preparado pela adição de 5-10 ml de água destilada estéril em cada placa e procedendo a raspagem da superfície da cultura com o auxílio de um pincel, para a liberação dos conídios. A suspensão de conídios foi obtida pela filtragem, através de uma camada de gaze, para a remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer para padronizar a concentração de inóculo para 2×10^4 conídios/mL e misturadas na proporção de 1:1:1 quando necessário.

2.2 Testes de patogenicidade

As inoculações de cada isolado e da mistura foram realizadas em seis linhagens do feijoeiro que apresentam diferentes níveis de resistência a mancha angular; Ouro Negro, BRSMG Madrepérola, MAIX-5, BRSMG Talismã, MAIX-12 e Carioca MG. Para cada isolado individualmente e para a mistura foram conduzidos experimentos em blocos casualizados (DBC), com três repetições. A parcela foi constituída por um vaso, contendo 3 kg de solo, no qual foram semeadas quatro sementes. As suspensões de esporos foram inoculadas após a expansão completa das folhas trifolioladas das plantas, sendo pulverizadas em ambas as faces das folhas até o ponto de escoamento. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, com umidade relativa de 80%, temperatura em torno de 24°C, por 15 dias até o momento das avaliações. A severidade da doença foi avaliada utilizando dois procedimentos distintos. O primeiro procedimento foi a avaliação visual, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por Van Schoonhoven; Pastor Corrales (1987): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20-

25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. O segundo procedimento foi a avaliação do percentual da área foliar lesionada (%AFL). Para avaliação da área foliar infectada ao nível de plantas utilizou-se o procedimento preconizado por Mullan; Garcia (2011). Os dois primeiros trifólios de cada planta com lesões, foram digitalizados por meio de *scanner* e as imagens salvas em computador. Deve ser ressaltado que as folhas digitalizadas foram as mesmas avaliadas pela escala de notas. Após a obtenção das fotografias, essas foram analisadas no programa *Adobe® Photoshop® 6.0*, visando à quantificação do percentual de área coberta pelas lesões. Esse percentual foi obtido por meio da razão entre pixels amarronzados capturados, que são as regiões infectadas pela mancha angular, e pixels totais. Ressalta-se, também, que as fotos foram obtidas na resolução 5184 x 2912, garantindo a qualidade da imagem.

2.3 Análise dos dados

As análises de variância individuais das notas médias e %AFL foram obtidas separadamente por isolado e por mistura, sendo posteriormente realizadas as análises conjuntas. Para atender os pressupostos da análise de variância, homogeneidade de variância dos erros, os dados de %AFL foram transformados para arco seno \sqrt{x} . As variáveis significativas no teste F, tiveram as médias comparadas pelo teste de Scott Knott (1974), a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados obtidos da análise conjunta foi realizada a análise do dialelo parcial (MELO; SANTOS 1999) para a obtenção das estimativas da capacidade geral de reação (CGR), capacidade geral de agressividade (CGA) e capacidade específica de interação (CEI), por meio do modelo IV de Griffing (1956), utilizando o programa estatístico SAS® (SAS INSTITUTE 2000).

As análises dialélicas foram realizadas conforme o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + r_i + a_j + s_{ij} + e_{ij}$$

Em que y_{ij} severidade da doença exibida pelo hospedeiro i quando inoculado com o isolado/mistura j ; r_i efeito da capacidade geral de reação do hospedeiro i (CGR); a_j efeito da capacidade geral de agressividade do isolado/mistura j (CGA); s_{ij} efeito da capacidade específica de reação do hospedeiro i inoculado com o isolado/mistura j (CEI); e_{ij} erro experimental médio. As estimativas da capacidade geral de reação, da capacidade geral de

agressividade e da capacidade específica da interação foram testadas pelo teste de t Student ao nível de 1 e 5% de probabilidade, segundo as expressões apresentadas por Ramalho et al. (1993).

Foram estimadas as correlações de Spearman entre as notas médias e a %AFL das linhagens, e também das estimativas de CGR entre essas características. Posteriormente foram estimadas as correlações de Spearman entre as notas médias e a porcentagem de área foliar dos isolados/mistura e também das estimativas de CGA entre essas características. A hipótese de que o coeficiente de correlação Spearman é igual à zero ($H_0: 0$) foi avaliada pelo teste t. As análises foram realizadas usando o programa computacional GENES (CRUZ, 1997).

3 RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos nas análises de variância individuais, constatou-se diferença significativa ($P < 0,01$) entre as cultivares para a severidade da mancha angular, considerando o uso de escala descritiva e a % de AFL, para todos os isolados e para a mistura. As notas médias da severidade da mancha angular considerando o uso da escala descritiva variaram de 3,8 (Psg-5) a 4,3 (mistura) e o coeficiente de variação experimental (CV) de 9,1 (mistura) a 12,2% (Psg-1). Considerando a %AFL, as médias variaram de 3,0 (Psg-2 e Psg-3) a 5,4% (Psg-1) e o CV de 22 (Psg-1) a 37% (Psg-3) (Tabela 2).

TABELA 2 Resumo da análise de variância individual para a severidade da mancha angular do feijoeiro nas linhagens considerando escala descritiva e a porcentagem da área foliar com sintomas (%AFL).

FV	Severidade mancha angular-Escala descritiva			
	QM			
	Psg-3	Psg-4	Psg- 5	Mistura
Linhasgens	4,35**	3,20**	2,74**	3,76**
Erro	0,27	0,20	0,22	0,15
CV(%)	12,2	11,6	11,6	9,1
Média	4,2	4,0	3,8	4,3
FV	Severidade mancha angular-% LAS			
	QM			
	Psg-3	Psg-4	Psg- 5	Mistura
Linhasgens	77,64**	36,47**	29,31**	63,98**
Erro	6,65	8,25	10,89	8,58
CV(%)	22,5	32,4	37,3	30,1
Média (%)	5,4	3,0	3,0	3,8

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

A análise de variância conjunta foi realizada a partir das estimativas obtidas das análises individuais para cada isolado e a mistura de *P. griseola*. Verificou-se que os efeitos das cultivares e dos isolados foram estatisticamente significativos ($P < 0,01$) (Tabela 3).

TABELA 3 Resumo da análise conjunta para os dados de severidade da mancha angular do feijoeiro nas linhagens utilizando escala descritiva e porcentagem da área foliar com sintomas (% AFL).

FV	GL	QM	
		Escala descritiva	%AFL
Linhagens (L)	5	13,25**	168,66**
Isolados (I)	3	0,97**	26,86**
L X I	15	0,26	12,91
Erro	40	0,21	8,59
Média		4,09	3,8
C.V(%)		11,2	30,2
Amplitude		2,2 - 5,5	0,4 - 9,6

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

A diferença significativa entre os isolados/mistura sugere a ocorrência de diferentes níveis de agressividade. Já a diferença significativa entre as linhagens indica a ocorrência de diferentes níveis de reação quando inoculadas com os diferentes isolados/mistura. As notas médias da severidade da mancha angular variaram de 2,2 a 5,5. As médias da %AFL variaram de 0,4 a 9,6%.

O isolado Psg-3 e a mistura apresentaram a mesma agressividade pelo teste de médias da avaliação utilizando a escala descritiva. O isolado Psg-3 apresentou maior agressividade para a %AFL (Tabela 4).

TABELA 4 Estimativas da capacidade geral de agressividade (g_i) e notas médias dos isolados/mistura de *P. griseola*, utilizando escala descritiva e a porcentagem de área foliar lesionada (% AFL).

Isolado	Escala descritiva		%AFL	
	Média	g_i	Média	g_i
Psg-3 (63-63 ¹)	4,22 A ²	0,13	5,35 A	1,72**
Psg-5 (63-23)	4,01 B	-0,07	3,01 B	-0,85
Psg-4 (63-63)	3,80 B	-0,28**	2,96 B	-0,88
Mistura	4,33 A	0,24**	3,74 B	0,01

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste de t; ¹denominação da raça

²Médias com a mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os dados obtidos na análise conjunta foram utilizados para realizar a análise dialélica. Todas as fontes de variação foram significativas ($P < 0,01$), exceto a Capacidade Específica de Interação (CEI). Analisando os desdobramentos para a fonte de variação cruzamentos para a severidade à mancha angular utilizando escala descritiva e % de AFL, observa-se que 90,6% e 75,5% da soma de quadrados totais da variação observada foram devidos à capacidade geral de reação (CGR), respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5 Resumo da análise de variância do esquema de dialelo parcial para severidade da mancha angular nas linhagens utilizando escala descritiva e porcentagem da área foliar com sintomas (% AFL).

FV	GL	QM	
		Escala descritiva	%ALS
CGR	5	13,25**	168,66**
CGA	3	0,96**	26,86**
CEI	15	0,27	12,91
Erro	40	0,21	8,59

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

As linhagens diferiram quanto às estimativas da capacidade geral de reação (CGR), sendo significativas para todas, com exceção da BRSMG-Talismã. As linhagens MAIX-5 (-1,71) e MAIX-12 (-0,64) apresentaram-se entre as mais resistentes. Já as linhagens Ouro Negro (0,74), BRSMG-Madrepérola (0,96) e Carioca-MG (0,83) foram as mais suscetíveis, ou seja, apresentaram as maiores estimativas para a capacidade geral de reação (g_i). Os resultados obtidos a partir do teste de médias corroboraram com os resultados das estimativas de CGR das linhagens (Tabelas 6).

TABELA 6 Estimativas da capacidade geral de reação (g_i) e notas médias para a severidade da mancha angular nas linhagens utilizando a escala descritiva e porcentagem de área foliar lesionada (%AFL).

Linhagens	Escala descritiva		%AFL	
	Média	g_i	Média	G_i
MAIX-5	2,38 A ¹	-1,71**	0,65 A	-5,56**
MAIX-12	3,45 B	-0,64**	1,57 A	-3,44**
BRSMG-Talismã	3,91 C	-0,17	4,58 B	1,38
Ouro Negro	4,83 D	0,74**	4,26 B	1,58*
Carioca-MG	4,92 D	0,83**	6,83 C	4,59**
BRSMG-Madrepérola	5,05 D	0,96**	4,75 B	1,45*

** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

¹Médias com a mesma letra pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5%.

As estimativas da capacidade geral de agressividade (CGA) obtidas indicam diferenças na agressividade entre os isolados/mistura (Tabela 4). Considerando a avaliação da severidade da doença utilizando a escala descritiva, verifica-se que a mistura apresentou a maior agressividade (0,24), seguida por Psg-3 (0,13). Na avaliação da severidade da mancha angular utilizando a %AFL, observou-se o contrário, ou seja, o isolado Psg-3 foi o mais agressivo (1,72). A menor estimativa para agressividade foi obtida para o isolado Psg-4 para ambas as avaliações.

As estimativas das correlações de Spearman entre as notas médias e a porcentagem de área foliar lesionada das linhagens, e também das estimativas de CGR entre essas características foram significativas, de 0,88 e 0,77, respectivamente. As estimativas das correlações de Spearman entre as notas médias e a porcentagem de área foliar dos isolados/mistura e também das estimativas de CGA entre essas características foram não significativas de 0,80.

4 DISCUSSÃO

Informações sobre a agressividade dos isolados/mistura são importantes, não apenas para o conhecimento da variabilidade do patógeno, mas também para auxiliar o melhorista na obtenção de cultivares com resistência durável que seja efetiva em diferentes locais (CHILIPA et al., 2016). Além disso, a avaliação da reação de linhagens e progênies de feijoeiro à *P. griseola* por meio da inoculação artificial utilizando mistura das raças mais prevalentes pode viabilizar a avaliação das progênies em um programa de melhoramento quanto à reação a mais de um isolado/ raça. Este é o primeiro relato da ocorrência de variação patogênica considerando isolados monospóricos e mistura de raças no patossistema *P. griseola*-feijoeiro.

O coeficiente de variação experimental (CV) é uma das formas de avaliar a precisão com que foi conduzido o experimento e/ou realizadas as avaliações. O CV considerando a avaliação a partir do %AFL foi de elevada magnitude (30,2%) quando comparado às estimativas obtidas com a escala descritiva (11,0%). De forma semelhante ao presente trabalho, Rezende et al.(2014) e Parrela et al. (2013) verificaram altas magnitudes do CV para %AFL em experimentos de campo, variando de 25,3 a 65,6% e 22,9 a 45,7%, respectivamente. Ao transformar os valores obtidos com a escala descritiva para %AFL, houve mudança considerável do CV sem que ocorresse alteração na interpretação da análise de variância. Isto comprova a influência da média e do erro sobre o CV conforme também verificado por Rezende et al. (2014).

Na comparação dos métodos utilizados para a avaliar a severidade da mancha angular no feijoeiro, foram obtidas as estimativas das correlações de Spearman entre os resultados obtidos. A correlação entre as características notas e %AFL foram de alta magnitude e significativas, indicando que os dois métodos forneceram informações semelhantes. Resultados similares foram obtidos neste patossistema, em condições de campo (PARRELA, et al., 2013; REZENDE et al., 2014). No entanto, considerando a viabilidade prática dos dois métodos, pode-se inferir que o uso da escala descritiva é mais adequado.

A partir dos resultados obtidos na análise conjunta para avaliação da escala descritiva, verificou-se que a interação foi não significativa (Tabela 3), sendo o comportamento das linhagens coincidente quando inoculadas com os diferentes isolados/ mistura. A partir do teste de médias é possível verificar que o isolado Psg-3 e a mistura apresentaram a mesma agressividade (Tabela 4). Com relação à análise dialélica, as estimativas da capacidade geral de agressividade (CGA) mostram a diferença significativa entre os isolados/mistura, quando inoculados no grupo de linhagens de feijoeiro avaliadas, sendo que a mistura apresentou maior agressividade (Tabela 5). Portanto, pode-se considerar que a análise dialélica possui maior poder de discriminação para avaliação da interação entre o patógeno e o hospedeiro quando comparado ao teste de médias Scott-Knott.

A maior agressividade apresentada pela mistura pode ser devida a um efeito sinérgico entre estas, como já verificado no patossistema *Colletotrichum lindemuthianum*-feijoeiro (CHILIPA; LUNGU; TEMBO 2016; FALLEIROS 2016). A raça 63-63 de *P. griseola* quebra a resistência de todas as linhagens do conjunto de diferenciadoras e por isso possui todos os fatores de virulência andinos e mesoamericanos (PEREIRA et al., 2015). Já a raça 63-23 possui todos os fatores de virulência, a exceção dos fatores 2³ e 2⁵ mesoamericanos. Considerando os fatores de virulência, a mistura possui todos os fatores de 2⁰ a 2⁵ andinos e 2⁰, 2¹, 2² e 2⁴ mesoamericanos em maior proporção uma vez que todas as raças avaliadas possuem esses fatores. Portanto, os fatores de virulência 2³ e 2⁵ mesoamericanos ausentes na raça 63-23, estão em menor proporção na mistura. Este fato pode justificar a maior agressividade da mistura ou efeito sinérgico, com relação ao isolado 63-23 e o comportamento parecido com o isolado mais agressivo Psg-3.

Outra possível explicação seria que a agressividade elevada exibida pela mistura pode ser devido ao fato de que a resistência nas cultivares testadas ser controlada pelo efeito aditivo de vários genes. Neste caso, os diferentes genes para a agressividade presentes em cada isolado podem superar os vários genes do hospedeiro para resistência e, conseqüentemente, causar mais sintomas da doença (MEBRATE; COOKE 2001). De forma análoga ao presente trabalho, nos

patossistemas *Stagonospora nodorum*-trigo e *Fusarium graminearum*-trigo, verificou-se uma maior severidade da doença quando se utilizou a mistura de isolados ou o isolado mais agressivo (MEBRATE; COOKE 2001; OHE; MIEDANER 2010).

A alta variabilidade patogênica de *P. griseola* tem sido observada em várias oportunidades, sendo constatada a predominância de isolados da raça 63.63 e a presença de variação dentro de uma mesma raça (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2015; JARA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). Além disso, diferenças entre isolados, coletados em uma pequena área geográfica, também têm sido observadas para características morfológicas, fisiológicas e culturais (LIBRELON et al., 2015). Desta forma, as avaliações utilizando misturas de raças diferentes ou até mesmo da mesma raça podem se aproximar mais da população do patógeno que ocorre naturalmente nos campos experimentais. Em casa de vegetação geralmente se inocula apenas uma ou poucas raças, enquanto no campo com a ocorrência natural do patógeno, pode haver maior pressão de seleção devido à existência de inúmeras raças do patógeno. Esse fato pode ser comprovado com base nos resultados obtidos no presente trabalho, em que o maior nível de agressividade foi observado pela mistura. Além disso, nas avaliações utilizando apenas uma raça específica podem estar sendo selecionados, principalmente, genótipos com resistência vertical, que apresenta pouca durabilidade nos programas de melhoramento (LIBRELON, 2016). Já para as avaliações utilizando misturas, as linhagens resistentes selecionadas apresentam principalmente a resistência horizontal, pois são resistentes às várias raças existentes na mistura, semelhante ao que ocorre no campo (NG'AYU-WANJAU, 2016).

Além do maior nível de agressividade da mistura em relação à raças/isolados individuais, ela pode ser mais eficiente na seleção de progênies com diferentes níveis de resistência uma vez que a mistura reúne maior número de alelos de virulência. Desta forma, é importante realizar um monitoramento constante da população do patógeno a fim de conhecer sobre a frequência e agressividade das raças existentes no campo. A partir destas informações é possível utilizar os isolados de maior prevalência no campo e que apresentem maior número de alelos de virulência para compor a mistura utilizada na inoculação.

A resistência durável apresenta a propriedade de redução da esporulação do patógeno, apesar de ocorrer o processo de infecção (PARLEVLIET 1985). Assim para a obtenção da resistência horizontal, a seleção contra os genes de grande efeito pode ser realizada com a eliminação das plantas com resistência completa. Para avaliação da reação deve ser utilizada uma mistura de raças sendo selecionados principalmente genes de pequeno efeito, conforme já constatado em diversas oportunidades (PARLEVLIET 1983; PARLEVLIET; VAN OMMEREN 1988; WANJAU et al., 2016). A sua utilização tem sido recomendada para

obtenção de cultivares nos programas de melhoramento (VAN DER PLANK 1968; ROBINSON 1980) e recentemente tem sido explorada no patossistema *P. griseola*-feijoeiro (WANJAU et al., 2016).

A significância da capacidade geral de reação (CGR) (Tabela 5), caracteriza a predominância da resistência genética horizontal (PARLEVLIEET 1981). No estudo do controle genético da resistência à mancha angular tem sido relatada a presença de resistência vertical (CHATAIKA et al. 2010; VIDIGAL et al. 2010; BOREL et al. 2011) e resistência horizontal (AMARO et al. 2007; ARANTES 2009; MAHUKU et al. 2009; OBLESSUC et al. 2012; PERSEGUINI et al., 2015; PEREIRA et al., 2015), sendo que esta última é o principal componente da resistência neste patossistema. A existência de dois tipos de resistência são reconhecidas em diversos patossistemas (VANDERPLANK 1963).

As linhagens MAIX-9 e MAIX-12 apresentaram as menores notas médias e estimativas de CGR para severidade da doença considerando as duas metodologias de avaliação (Tabela 3 e 4). Estas linhagens são provenientes de um programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular (AMARO et al., 2007). Neste programa a avaliação das progênes, isto é, a fenotipagem da severidade da mancha angular das plantas tem sido realizada no campo após o florescimento, a partir da ocorrência natural do patógeno e avaliação da doença por meio de escala de notas. Ao longo de 16 ciclos de seleção, várias linhagens deste programa têm-se mostrado resistentes à mancha angular (AMARO et al. 2007; ARANTES et al., 2010; REZENDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Portanto, o maior indicativo de que a mistura é importante na seleção de linhagens com resistência durável, são as linhagens do programa de seleção recorrente que tem fixado regiões genômicas responsáveis pela resistência horizontal, uma vez que são selecionadas a partir da mistura de raças existentes no campo. Desta forma, as linhagens MAIX-9 e MAIX-12 apresentaram principalmente resistência horizontal uma vez que foram resistentes à mistura. A cultivar Ouro Negro tem sido relatada como uma fonte de resistência e, no entanto, apresentou reação de suscetibilidade a todos os isolados/mistura, indicando que a população do patógeno tem sido alterada (SILVA et al., 2008; BALBI et al., 2009).

Outra metodologia que tem sido proposta é o uso da inoculação artificial e a avaliação precoce no programa de seleção recorrente visando resistência à mancha angular, que permite a redução no tempo de cada ciclo. Neste caso as inoculações artificiais foram realizadas em casa de vegetação utilizando apenas a raça 63-63. Contudo, como apresentado pelos resultados obtidos, o uso de mistura poderá aumentar a eficiência na seleção de plantas resistentes em casa de vegetação (LIBRELON et al., 2016).

A mistura de raças de *P. griseola* foi eficiente na avaliação da severidade da mancha angular do feijoeiro, apresentando maior agressividade em relação às raças inoculadas individualmente. Portanto, o uso de mistura é uma estratégia eficiente para seleção de genótipos de feijoeiro com maior espectro de resistência à mancha angular, sendo importante o conhecimento da variabilidade do patógeno para a escolha das raças/isolados que vão compor a mistura. A severidade utilizando a escala descritiva é o método mais indicado para avaliar a mancha angular do feijoeiro, devido, principalmente, a sua praticidade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, G. B.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 584-588, 2007.
- ARANTES, L.O.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.10, p. 232-237, Apr. 2010.
- BALBI, B. P. et al. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 52, p.56-57, 2009.
- BOREL, J. C. et al. Genetic control of the angular leaf spot reaction in common bean leaves and pods. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 661-664, Nov./Dec. 2011.
- BUIATE, E. A. S. et al. Evaluation of resistance in sorghum genotypes to the causal agent of anthracnose. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 10, n. 10, p. 166-172, Jun. 2010.
- CHATAIKA, B. Y. E. et al. Performance of parental genotypes and inheritance of Angular Leaf Spot (*Phaeosariopsis griseola*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v.9, n. 28, p. 4398-4406, 2010.
- CHILIPA, L. N. K.; LUNGU, D. M.; TEMBO, L. Multiple race inoculation as an option in breeding for resistance to *C. lindemuthianum* in common beans. **Journal of Agriculture and Crops**, Rahim Yar Khan, v. 2, n. 5, p. 45-50, May 2016.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 390 p.
- 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**, Viçosa, v.9, n.1, p.23-30, Mar. 2009.

FALLEIROS, M. O. **Uso de mistura de raças de *C. lindemuthianum* na avaliação da antracnose no feijoeiro.** 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

FAO. **Undernourishment Around the World: Counting the Hungry: Latest Estimates.** Disponível em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp.htm>. Acesso em: 2 maio 2015.

JARA, C et al. **Virulence diversity of *Pseudocercospora griseola* and its implication for breeding Common bean for resistance to angular leaf spot.** Cali: CIAT, 2015. 1p.

LIBRELON, S. S.; GOMES, L. B. W.; SOUZA, E. A. Investigating phenotypic variability and sensitivity in vitro to the fungicides of *Pseudocercospora griseola* strains. In: BIENNIAL BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE MEETING, 2015, Niagara Falls-Canadá. **Anais...** Canadá: BIC, 2015. 1 CD-ROM.

MAHUKU, G. S. et al. Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 28, n.1, p. 57-71, June 2011.

MAHUKU. G. S.; IGLESIAS. A. M.; JARA. C. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, n. 3, p. 381-396, June 2009.

MEBRATE, S. A.; COOKE, B. M. Response of wheat cultivars to infection by *Stagonospora nodorum* isolates/mixture on detached and intact seedling leaves. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, n. 2, p. 263–268, Nov. 2001.

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.

MULLAN, D.; GARCIA, M. B. Crop ground cover. In: PASK, A. et al. (Ed.). **Physiological breeding II: a field guide to wheat phenotyping.** Ciudad del México: International Maize and Wheat Improvement Center, 2011. p. 46-53.

OBLESSUC, P. R. et al. Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. **BMC Genetics**, Amsterdam, v. 13, n.1, p. 50, June 2012.

OHE, C. V AND MIEDANER T. Competitive aggressiveness in binary mixtures of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. **Journal Phytopathology**, Oxford, v. 159, n. 6, p. 401–410, Dec. 2011.

PÁDUA, P. F. et al. Identification of common bean resistant sources to angular leaf spot disease in a brazilian germplasm collection. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 59, p.115-116, 2016.

- PARLEVLIET, J. E. Disease resistance in plants and its consequences for plant breeding. In: FREY, K. J. (Ed.). **Plant breeding II**. Iowa: The Iowa State University, 1981.
- PARLEVLIET, J.E. Resistance of the non-race-specific type. In: ROELFS, A.P.; BUSHNELL, W.R. (Ed.). **The cereal rusts**. New York: Academic Press, 1985.
- PARLEVLIET, J.E.; VAN OMMEREN, A. Accumulation of partial resistance in barley to barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. **Euphytica**, Wageningen, v. 37, n. 3, p. 261–274, Apr. 1988.
- PARRELLA, R. A. C. et al. Evaluation efficiency of severity of angular leaf spot in common bean based on diseased and healthy leaf area. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 13, n. 3, p. 178-184, Oct. 2013.
- PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 5044-5053, May 2015.
- PEREIRA, R. et al. Evaluation of resistance in common bean genotypes to the causal agent of angular leaf spot. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.56, p. 33-34, 2013.
- PERSEGUINI, et al. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plos one**, San Francisco, v. 11, n. 3, p.1-16, 2016.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; SANTOS, J.B. Impact of angular leaf spot on grain yield of common bean lines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 50, p. 97-98, 2007.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; AND ZIMMERMANN MJO. **Genética Quantitativa em Plantas Autógamas: Aplicações ao Melhoramento do Feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993.
- REZENDE, B. A. et al. Severity Evaluation Methods in Common Bean Recurrent Selection Programme for Resistance to Angular Leaf Spot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 643–649, Feb. 2014.
- ROBINSON, R.A. New concepts in breeding for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 18:189–210, 1980.
- RODRIGUEZ, I. J. et al. Resistance of common bean breeding lines to *Phaeoisariopsis griseola* isolates from Honduras. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 57, p.215-216, 2014.
- SANGLARD, D. A. et al. Severity levels of angular leaf spot in common bean cultivars and elite lines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 58, p. 28-29, 2015.

- SANGLARD, D. M. et al. Pyramiding angular leaf spot resistance genes in a “carioca type” common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 49, p. 197-198, 2006.
- SARTORATO, A. Common bean genotypes resistant to angular leaf spot, rust and anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 50, p. 103-104, 2007.
- SAS INSTITUTE . **SAS language and procedures: usage**. Version 8.1. Cary, 2000. 1 CD ROM.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SILVA, C. A. et al. Genetic variability for protein and mineral content in common bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p.92-93, 2010.
- SILVA, K. J. D. et al. Anastomosis groups and molecular variation in *Pseudocercospora griseola*. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 7436-7445, July 2015.
- SILVA, K. J. D. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 10, p. 602-606, May 2008.
- SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, Nov. 2014.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2200-2223, Mar. 2010.
- VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968.
- VANDERPLANK, J.E. **Plant disease: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.
- VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. Quant: a software for plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch: University Christchurch, 2003. p. 105. Abstract.
- VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT, Cali, 1987.
- VIDIGAL, P.S. et al. Molecular markers linked to angular leaf spot resistant genes in common bean accessions from eastern Africa and Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 92-93, 2010.

WANJAU, B. N. N. et al. Development of a breeding method for durable resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 208, n. 1, p. 91-100, Mar. 2016.