

**PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA
AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DO FEIJOEIRO
AO MOFO BRANCO**

THAIS PAULA DE SOUZA

2009

THAIS PAULA DE SOUZA

**PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA
AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DO FEIJOEIRO AO
MOFO BRANCO**

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

Orientador

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2009

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

Souza, Thais Paula de.

Procedimentos experimentais para avaliação da reação do feijoeiro
ao mofo branco / Thais Paula de Souza. – Lavras : UFLA, 2009.

25 p. : il.

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

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Ácido oxálico. 2. Tamanho ótimo da parcela . 3. Número
ideal de repetições;. 4. Gerações de repicagem. 5. Mofo branco . I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6528

THAIS PAULA DE SOUZA

**PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA
AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DO FEIJOEIRO AO
MOFO BRANCO**

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

APROVADA em 03 de julho de 2009

Prof. Daniel Furtado Ferreira

UFLA

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Prof. João Bosco dos Santos

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

À deus, por estar ao meu lado todo tempo;

Aos meus pais, Aldo e Zuleida, pelo amor e apoio incondicionais;

Ao meu irmão Tiago pela compreensão;

Aos amigos e parentes pelo carinho.

DEDICO

**À todas as pessoas que através de palavras, atos, gestos e orações têm
contribuído para meu crescimento.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser presença constante em minha vida.

Aos meus pais e ao meu irmão pela compreensão nos momentos que estive ausente, por todo amor, carinho, paciência e dedicação que sempre tiveram comigo.

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

Ao Lamartine, por ter sido muito mais que um amigo, sempre me ajudando e ensinando.

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

Aos amigos que na verdade se tornaram minha família em Lavras, Joyce, Luciene, Ester, Alexa, Vívian, Márcio, Natália, Carolina, Fernanda, Amanda, Rafaela, Emiliano, pelos momentos inesquecíveis e pelas melhores risadas.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular da UFLA, Flávia, Karla, Monik, Igor, Paulo e Natália por toda a ajuda e amizade proporcionada.

À todos os amigos da Genética, em especial Guilherme, Fernando, Ranoel, Cristiane, Quélen, Gheysa e Lidiane pela agradável convivência e amizade.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todos os ensinamentos e amizade.

Ao professor Daniel Furtado Ferreira, pela imensa ajuda na parte de estatística.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pela paciência e ajuda na realização deste trabalho, especialmente Elaine, Heloiza, Rafaela, Irondina e Léo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	10
4 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
ANEXOS.....	22

RESUMO

SOUZA, Thais Paula de. **Procedimentos experimentais para avaliação da reação do feijoeiro ao mofo branco**. 2009. 25p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os objetivos do trabalho foram determinar o tamanho ótimo da parcela e o número ideal de repetições em experimentos que utilizem solução de ácido oxálico como método indireto para discriminar genótipos com resistência fisiológica do feijoeiro ao mofo branco. Além disso, verificar se as sucessivas gerações de multiplicação de *Sclerotinia sclerotiorum*, em meio de batata, dextrose e ágar, mudam a agressividade do fungo. Oito genótipos de feijão foram avaliados em quatro experimentos com ácido oxálico ao longo do ano. Cada parcela foi representada por uma planta, repetida 30 vezes sob delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram utilizados para estimar o tamanho ótimo de oito plantas por parcela, utilizando o método da máxima curvatura do coeficiente de variação. Para estimar o número ideal de pelo menos quatro repetições por experimento, o método de reamostragem de Monte Carlo foi simulado 3000 vezes. Após dez gerações de repicagem da *S. sclerotiorum*, a agressividade reduziu após a segunda geração, sugerindo apenas duas gerações a partir do escleródio, para a obtenção do inóculo, sem a perder agressividade.

*Comitê Orientador: João Bosco dos Santos - UFLA (Orientador), Daniel Furtado Ferreira - UFLA e Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

ABSTRACT

SOUZA, Thais Paula de. **Experimental procedures for evaluating the common bean reaction to white mold**. 2009. 25p. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The present study was carried out to determine the optimal plot size and the ideal number of repetitions in experiments using an oxalic acid solution as a method to discriminate genotypes with physiological resistance to white mold in the common bean. In addition, it was also verified if successive generations of *S. sclerotiorum* multiplication, in potato dextrose agar, change the aggressiveness of the fungus. Eight common bean genotypes were evaluated in four oxalic acid experiments, in different periods, throughout the year. Each plot was represented by one plant and replicated 30 times using a completely randomized design. The data collected determined the ideal size of each plot to be that of eight plants, using the method of maximum curvature of the coefficient of variation. To estimate the ideal number to be at least four replications per experiment, 3000 simulations were sampled using the Monte Carlo method. After ten generations replicating the *S. sclerotiorum in vitro* the aggressiveness reduced after the second generation, suggesting that only two generations be used based on sclerotium for obtaining the inoculums without losing aggressiveness.

*Guidance Committee: João Bosco dos Santos - UFLA (Major Professor), Daniel Furtado Ferreira – UFLA and Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A resistência fisiológica ao mofo branco, incitada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é de difícil avaliação em campo devido a variações nas condições ambientais, na arquitetura e dossel da planta, a práticas de manejo e distribuição do patógeno no solo que influenciam na reação à doença (Kolkman & Kelly, 2002; Steadman et al., 2003). Por essas razões vêm sendo utilizados métodos de detecção indireta da resistência fisiológica, em casa de vegetação (Petzoldt & Dickson, 1996; Kolkman & Kelly, 2000; Steadman & Eskridge, 2002). Tais métodos têm mostrado serem eficientes, de fácil condução, confiáveis, reprodutíveis, além de permitir testar um grande número de genótipos sem, contudo, contaminar o campo (Singh & Terán, 2008).

Estudos evidenciam a secreção de ácido oxálico pelo fungo durante a infecção do tecido vegetal (Cessna et al., 2000; Guimarães & Henrik, 2004; Chipps et al., 2005). O ácido oxálico é fator de virulência primária, que diminui o pH dos tecidos infectados, ocasionando como principal sintoma um murchamento na planta. Segundo Cessna et al. (2000), o ácido oxálico é um fator importante para determinar as diferenças de resistência de espécies de *Phaseolus* à *S. sclerotiorum*. Kolkman & Kelly (2000) propuseram um método de seleção indireta por meio da reação do feijoeiro ao ácido oxálico. Esse método tem sido bastante empregado, e consiste no uso de uma solução de ácido oxálico, para a determinação da resistência fisiológica. As vantagens desse teste é que permite avaliar um grande número de genótipos sem a interferência de outros mecanismos de resistência (Antonio et al., 2008). Não há relatos, contudo, sobre o tamanho ótimo de parcelas e o número de

repetições, que devem ser utilizadas neste tipo de experimento para avaliar os genótipos de feijão com maior eficiência. O que se tem utilizado em outros trabalhos, para determinar o tamanho ótimo de parcelas e repetições, são testes de uniformidade, pelos quais são calculadas as variâncias e os coeficientes de variação das diferentes dimensões das parcelas. Diferentes metodologias são encontradas na literatura para determinar tamanho ótimo de parcelas e o número de repetições (Viana et al., 2002; Lopes et al., 2005; Martin et al., 2005; Paranaíba, 2007; Donato et al., 2008; Henriques Neto et al., 2009). Diante de tantas alternativas fica difícil escolher o melhor método a utilizar. Dentre eles, o método da curvatura máxima do coeficiente de variação (CMCV) proposto por Paranaíba (2007), é uma boa opção uma vez que é um método simples e prático. O ponto de curvatura máximo é obtido a partir de parâmetros de fácil estimativa. Esse método apresenta como vantagens ser desnecessário agrupar as unidades experimentais básicas e a independência de critérios pessoais e do ajuste de modelos de regressão não linear (Paranaíba, 2007).

Outra questão importante é avaliar se há variação na agressividade do isolado, após sucessivas repicagens para assegurar uma correta avaliação do nível de resistência dos genótipos. Problemas relacionados com avaliação e melhoramento para resistência podem ser em parte causados em virtude da falta de consideração com a variabilidade da agressividade do patógeno. Variabilidade na agressividade de isolados de diferentes locais, foram encontradas por Kull et al. (2004). Pratt & Row (1995) não encontraram efeitos significativos da interação genótipos x isolados, ou seja, o genótipo foi infectado igualmente pelos diferentes isolados. Não foram encontrados relatos de

trabalhos avaliando variação na agressividade em um mesmo isolado derivado de sucessivas repicagens *in vitro*. Essa informação é relevante, quando se necessita fazer a avaliação de genótipos por meio da inoculação de micélio, como no procedimento do straw teste (Petzoldt & Dickson, 1996). Por esse método as plantas têm a haste de seu ramo principal cortada e são inoculadas com ponteiras contendo meio de cultura com micélio. Esse método é adequado para uso no melhoramento de plantas, nos estudos de seleção, avaliação de germoplasma e desenvolvimento de cultivares (Singh & Terán, 2008). O straw teste também foi utilizado em trabalhos com girassol (Vuong et al., 2004), soja (Auclair et al., 2004) e, principalmente, em feijão (Miklas et al., 2000; Chipps et al., 2005; Terán et al., 2006; Chung et al., 2008).

O melhoramento para resistência é a melhor forma de controle de doenças em plantas, quando se tem germoplasma com fontes de resistência. As poucas fontes de resistência em feijão conhecidas são de grãos brancos vindos do Canadá e algumas linhagens de origem andina e que, embora tenham um potencial uso nos programas de melhoramento, não são adaptados e não apresentam boa aceitação pelo consumidor brasileiro. Os produtores de feijão, logo, não encontram no mercado, material resistente ao mofo branco e que tenham características agrônômicas desejáveis (Oliveira, 2005; Antonio et al., 2008).

Diante dos fatos apresentados, por meio deste trabalho os objetivos foram determinar o tamanho ótimo da parcela e o número de repetições, em experimentos que utilizem solução de ácido oxálico como método para discriminar genótipos, com resistência fisiológica do feijoeiro ao mofo branco. Visando ainda, avaliar se há diferença na

agressividade de *S. sclerotiorum* com o avanço das gerações de repicagem do fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos tanto para o teste com ácido oxálico, como para determinar a agressividade do fungo, foram realizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Para o teste com ácido oxálico foram conduzidos quatro experimentos no ano de 2008, realizados em janeiro, maio, setembro e novembro, cujas temperaturas médias no dia da avaliação foram respectivamente: 25°C, 19°C, 27°C e 29°C. Em cada experimento foram utilizadas oito cultivares, sendo duas fontes de resistência (G122 e Ex Rico), duas linhagens suscetíveis (M20 e VC3) e quatro cultivares atualmente recomendadas (Pérola, Valente, Radiante e Majestoso).

As plantas com 21 dias tiveram seu sistema radicular eliminado. A parte aérea das plantas foi utilizada para a instalação do experimento, que foi realizado no fim da tarde, para evitar a alta transpiração que ocorre durante o dia. Foi utilizada uma solução de ácido oxálico a 20 mM e pH 4,0 (Kolkman & Kelly, 2000). Doze litros dessa solução foram colocados em cada bandeja de plástico, coberta por uma chapa de isopor de dois cm de espessura, com 45 perfurações uniformemente distribuídas. Cada planta teve, então, seu caule envolto por uma tira de espuma para fixá-la na perfuração da placa de isopor, tomando-se o cuidado de deixar 2,5 cm da parte inferior do caule imersa na solução por um período de 15 horas. A parcela foi representada por uma planta com 30 repetições, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado. A avaliação dos genótipos foi realizada de acordo com a chave descritiva proposta por Kolkman & Kelly (2000), onde: 1: ausência de folhas murchas; 2 : uma folha trifoliolada murcha ou as duas unifolioladas; 3 : duas folhas murchas; 4 : mais de duas folhas murchas; 5 : folhas e pecíolos murchos e 6 : planta completamente murcha.

Procederam-se às análises de variância individuais, conjunta e o teste de agrupamento de médias que foram feitos no software Sisvar (Ferreira, 1995). Para a reação do feijoeiro ao ácido oxálico, foi adotado o seguinte modelo para as análises de variância individuais em cada época:

$$y_{ij} = \mu + t_j + \bar{e}_{ij}$$

em que:

y_{ij} : é a reação do genótipo j na repetição i

μ : é o efeito fixo da média geral;

t_j : é o efeito dos genótipos j , onde $j = 1, 2, \dots, n$

\bar{e}_{ij} : é o erro experimental associado à observação y_{ij} .

Para análise conjunta, das épocas, adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ijl} = \mu + t_j + a_l + (ta)_{jl} + \bar{e}_{ijl}$$

em que:

y_{ijl} : é a reação do genótipo j na repetição i e na época l ;

μ : é o efeito fixo da média geral;

t_j : é o efeito dos genótipos j , onde $j = 1, 2, \dots, n$

a_l : é o efeito de época l , onde $l = 1, 2, \dots, a$

$(ta)_{jl}$: é a interação genótipos x épocas

\bar{e}_{ijl} : é o erro experimental associado à observação y_{ijl} .

O tamanho ótimo da parcela foi estimado pelo método da curvatura máxima do coeficiente de variação, proposto por Paranaíba (2007). Por esse método o coeficiente de variação (CV) com base em médias de parcelas de tamanho X é:

$$CV = \frac{100 \sqrt{(1-\hat{\rho}^2) S^2 / \bar{Z}^2}}{\sqrt{X}}$$

em que S^2 é a variância de parcela com uma planta, Z é a média geral de parcela com uma planta, X o tamanho da parcela e ρ é o coeficiente de autocorrelação espacial de primeira ordem, que foi considerado nulo pelo fato das cultivares terem sido colocadas em parcelas individuais.

O tamanho ótimo de parcela (X_0) foi determinado pelo ponto máximo da função de curvatura e é dado por:

$$\hat{X}_0 = \frac{10^3 \sqrt{2(1-\hat{\rho}^2) S^2 \bar{Z}}}{\bar{Z}}$$

O tamanho ótimo da parcela foi estimado por tratamento, em cada época, por experimento e, também, na análise conjunta.

Para ilustrar a identificação do tamanho ótimo da parcela, por tratamento, em cada época e também por experimento, foram estimados e plotados valores de CV com tamanho da parcela variando de uma a 15 plantas (X). Para isso foram utilizados os estimadores S^2 e Z , com $\rho=0$.

O número ideal de repetições, utilizando o tamanho ótimo da parcela, foi estimado por reamostragens, com reposição, por meio do método de Monte Carlo com base em uma amostra original de 30 dados por tratamento em cada época. As amostras de número de repetições variaram de duas a 10 por experimento. Para cada número de repetições foram realizadas 3000 reamostragens. Realizou-se a análise de variância de cada experimento e foram estimados os valores médios, mínimos e máximos dos coeficientes de variação

(CV) e F's, assim como as variâncias dos CV's. O método de Monte Carlo foi aplicado com o auxílio do software SAS ® (SAS Institute, 1995).

Para verificar o efeito de repicagens, in vitro, na agressividade do patógeno, os escleródios foram coletados na fazenda experimental Muquém em Ijací. Esses passaram por um processo de esterilização por dois minutos em cada uma das soluções, hipoclorito de sódio 50%, álcool etílico a 70% e água destilada. Após esse processo, três escleródios, foram colocados em placa de petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). A placa foi então colocada em câmara incubadora (BOD), sob temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um fotoperíodo de 12 horas, durante três dias, constituindo a primeira geração. Repicou-se então o meio dessa placa contendo micélio para uma nova placa de petri, a qual foi colocada em BOD, sob temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um fotoperíodo de 12 horas, durante três dias, constituindo a segunda geração. O processo foi repetido até a obtenção da décima geração. Em todas as repicagens foi tomada apenas uma amostra de $0,50\text{ cm}^2$ por placa, como inóculo para se obter a placa da geração seguinte. Para que todas as gerações fossem inoculadas na mesma época, foi sincronizada a obtenção das gerações todas de uma vez. Foram conduzidos dois experimentos no ano de 2009, um em janeiro e o segundo em maio. Os 10 tratamentos foram representados pelas gerações de repicagem.

A linhagem utilizada foi a M20 que é suscetível ao mofo branco. Para o crescimento das plantas, foram utilizados vasos de três litros, contendo terra e composto orgânico na proporção de 5:1, e foi feita adubação indicada para a cultura. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, nas quais cada parcela foi constituída de cinco vasos cada um com duas plantas e com 10 tratamentos.

O método utilizado, para avaliação da agressividade nas diferentes gerações de repicagem do fungo, foi o straw teste proposto por Petzoldt &

Dickson (1996), que consiste em cortar o ápice da haste principal e inoculá-lo com um canudo contendo o micélio. Neste experimento optou-se por utilizar ponteiros de plástico de micropipeta de 1mL. A inoculação foi realizada aos 21 dias após sementeira. Sete dias após a inoculação foi avaliada a reação do feijoeiro ao mofo branco, utilizando-se a escala diagramática adaptada por Terán et al. (2006). Os dados foram mensurados e realizadas as análises de variâncias individuais e conjunta, e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974), no software Sisvar. Para a geração de repicagem do fungo, foi adotado o seguinte modelo para as análises de variância individuais em cada época:

$$y_{ij} = \mu + t_j + \bar{e}_{ij}$$

em que:

y_{ij} : é a observação da geração j e repetição i ;

μ : é o efeito fixo da média geral;

t_j : é o efeito das gerações j , onde $j = 1, 2, \dots, n$

\bar{e}_{ij} : é o erro experimental associado à observação y_{ij} .

Para análise conjunta, das épocas, adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ijl} = \mu + t_j + a_l + (ta)_{jl} + \bar{e}_{ijl}$$

em que:

y_{ijl} : é a observação da geração j , na repetição i e no ambiente l ;

μ : é o efeito fixo da média geral;

t_j : é o efeito das gerações j , onde $j = 1, 2, \dots, n$

a_l : é o efeito de época l , onde $l = 1, 2, \dots, a$

$(ta)_{jl}$: é a interação gerações x épocas

\bar{e}_{ijl} : é o erro experimental associado à observação y_{ijl} .

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em alguns experimentos no melhoramento, como em feijão, é utilizada uma planta por parcela e um grande número de repetições (Mendes, 2009). Para avaliar a reação de genótipos de feijão ao mofo branco de forma indireta, por meio da reação ao ácido oxálico, também, utiliza-se parcela de uma única planta (Chung et al., 2008). Não há estudos, entretanto, sobre o tamanho ideal de parcela para esse tipo de avaliação.

Utilizando o método da curvatura máxima do coeficiente de variação (CMCV), proposto por Paranaíba (2007), o tamanho ótimo da parcela foi de oito plantas. Esse valor foi estimado para cada genótipo, nas diferentes épocas de condução do experimento (Tabela 1). Os tamanhos de parcelas estimados (X_0) variaram de 4,14 a 7,72 plantas, porém, optou-se pelo tamanho de oito plantas por parcela, no intuito de mais eficientemente avaliar todos os genótipos em qualquer época de condução do experimento (Tabela 1). As estimativas do tamanho ótimo de parcela resultaram em valores bem próximos para os oito genótipos estudados. De acordo com esse procedimento, o tamanho ótimo da parcela corresponde ao ponto de máxima curvatura da função, que explica a variação do CV com alteração do número de plantas por parcela (Figura 2).

TABELA 1 Estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0), por genótipo de feijão, para avaliação da reação ao ácido oxálico, em diferentes épocas do ano.

Genótipo	ExRico	G122	M20	VC3	Majestoso	Valente	Radiante	Pérola
1	6,12	6,20	5,02	5,89	6,12	5,91	6,12	4,14
2	6,37	6,73	5,65	5,49	5,03	7,72	5,43	6,01
3	5,59	7,43	6,87	5,90	6,92	6,99	6,48	6,11
4	6,89	6,21	6,87	5,04	6,16	5,51	6,87	5,63

Embora o método da curvatura máxima do coeficiente de variação tenha sido proposto para estimar o tamanho da parcela por tratamento, neste estudo, o mesmo foi utilizado para estimar o tamanho da parcela por época e na análise conjunta (Tabela 2). O tamanho ótimo da parcela estimado por época variou de 5,68 a 6,54 plantas. Para a análise conjunta, o valor estimado foi de 6,09 plantas, valor esse que corresponde às médias das épocas consideradas individualmente e nota-se que essa estimativa foi ligeiramente inferior a oito plantas por parcela (Figura 1). Esses resultados discordam ligeiramente dos tamanhos de parcelas utilizados por Kolkman & Kelly (2000), os quais utilizaram quatro ou cinco plantas por parcela, enquanto Antonio et al. (2008) utilizaram 10 plantas por parcela. O exemplo mais extremo foi o de Chung et al. (2008), que utilizaram apenas uma planta por parcela e três repetições.

TABELA 2 Estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0), por experimento de feijão, para avaliação da reação ao ácido oxálico, em diferentes épocas do ano.

Época	X_0
1	5,68
2	6,04
3	6,54
4	6,09
Conjunta	6,26

Parrella (2008), utilizando a CMCV, constatou que o método é coerente, pois forneceu estimativas similares a outro procedimento, o modelo linear segmentado com platô, para estimar tamanho ótimo da parcela.

Além do tamanho da parcela, outro fator experimental fundamental é o número de repetições. Considerando o tamanho ótimo da parcela com oito plantas, os resultados dos CVs das análises de variâncias mostraram que as estimativas médias variaram muito pouco entre os diferentes números de repetições e são bem similares aos encontrados nas análises individuais, confirmando a consistência da simulação (Tabela 3). Entretanto, a partir de quatro repetições, as variâncias dos CVs reduziram com menor intensidade. Observa-se, principalmente, que quase a totalidade das análises de variâncias simuladas identificaram diferenças genéticas entre os genótipos de feijão, como era esperado, pois foram utilizados genótipos diferentes quanto a reação à *S. sclerotiorum*. Além disso, essas diferenças foram detectadas nas diferentes épocas do ano. Na época 2, no entanto, ocorreu maior número de resultados que não detectaram diferenças significativas entre os genótipos. Provavelmente ocorreu, que as plantas, em virtude da menor temperatura nessa época, desenvolveram-se relativamente menos do que as plantas em outras épocas, tornando-se mais sensíveis ao ácido oxálico. Os resultados dos CVs e Fs permitem inferir que a partir de quatro repetições, consegue-se, mais eficientemente, avaliar a reação de genótipos de feijão em solução de ácido oxálico (Tabela 3). As diferenças genéticas entre genótipos, quanto à reação ao ácido oxálico, obtidas neste trabalho, corroboram com os resultados encontrados por Kolkman & Kelly (2000) e Antonio et al. (2008), os quais utilizaram experimentos semelhantes em número de plantas por parcela e repetições.

A heterogeneidade genética dos genótipos avaliados foi detectada nas quatro épocas, e, principalmente, na análise de variância conjunta (Tabela 4). Entre os genótipos destacaram-se as fontes de resistência G122 e Ex Rico, bem como, as cultivares atualmente em uso, Radiante, Majestoso e Valente (Tabela 5). Apesar de Oliveira (2005) afirmar que não há resistência ao mofo branco nas cultivares brasileiras, a verificação dessas cultivares com resistência fisiológica,

embora de baixo nível, é importante para ser utilizada no melhoramento, porque essas cultivares já são adaptadas e com boas características agronômicas. Os genótipos M20 e VC3, usados como testemunhas suscetíveis, comportaram-se como esperado.

TABELA 4 Resumo da análise de variância conjunta da reação do feijoeiro ao ácido oxálico nas diferentes épocas de avaliação.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Épocas	3	114,140**
Genótipo	7	11,5375**
Épocas x Genótipos	21	2,9117**
Erro médio	928	0,7668

** significativo ao nível de 1% de probabilidade, CV = 35,05.

Nota-se que a interação genótipos por épocas foi altamente significativa, indicando a princípio, que as reações das cultivares não foram concordantes nas diferentes épocas. A classificação média das cultivares por época é similar às médias das épocas, portanto, a interação se deveu principalmente às diferenças de variabilidade das reações das cultivares nas diferentes épocas. Observa-se que o efeito de época foi altamente significativo e, no caso, o fator ambiental principal determinante foram as diferenças de temperaturas durante os experimentos. Em acordo com esses resultados, Kolkman & Kelly (2000) também verificaram que maiores temperaturas durante o experimento levam à maior intensidade de murcha dos genótipos com diferentes níveis de resistência. Entretanto, mesmo temperaturas até 10°C durante a conclusão do experimento, não afetam a reação diferencial dos genótipos ao ácido oxálico. Outros fatores importantes são as diferenças de adaptação dos genótipos e as baixas temperaturas que afetam o desenvolvimento das plantas até aos 21 dias, tornando-as ligeiramente mais sensível ao ácido oxálico (Antonio et al., 2008). Esse conjunto de fatores explica, pelo menos em parte, a forte interação

detectada. Porém, dado o tipo de interação, que não alterou a classificação dos genótipos, infere-se que a reação do feijoeiro ao ácido oxálico pode ser avaliada nas diferentes épocas do ano.

TABELA 5 Reação dos genótipos de feijão ao ácido oxálico.

Genótipos	Época 1	Época 2	Época 3	Época 4	Conjunta
Pérola	1,93c	3,53b	2,66c	3,13b	2,81c
VC3	1,83c	3,20b	2,40b	3,10b	2,74c
M20	1,90c	3,50b	3,06c	3,73c	2,77c
Valente	1,56b	3,23b	2,43b	3,13b	2,54b
Majestoso	1,50b	3,43b	2,36b	2,20a	2,60b
Radiante	1,20a	3,24b	1,80a	2,20a	2,40b
G122	1,46b	2,70a	2,20b	2,26a	1,95a
Ex Rico	1,20a	2,60b	2,40b	2,62a	2,15a

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Entre os métodos de avaliação da resistência fisiológica de genótipos de feijão à *S. sclerotiorum*, o da inoculação de micélio (straw test) é um dos mais utilizados (Singh & Terán, 2008). Para produzir inóculo com micélio, geralmente, realizam-se de uma a duas repicagens, a partir do micélio produzido do escleródio em meio BDA. Esse processo demanda grande quantidade de escleródios e seria simplificado, se maior número de repicagens pudessem ser realizadas sem alterar a agressividade do inóculo. No teste de agressividade nas diferentes gerações de repicagem detectaram-se diferenças significativas entre as gerações ($P \leq 5\%$) (Tabela 6). Essas diferenças foram confirmadas pelo teste de agrupamento de médias (Tabela 7). Infere-se, portanto, que a prática adotada usualmente que são de duas repicagens, a partir do escleródio, corresponde ao inóculo com maior agressividade. Assim, infelizmente é necessário utilizar maior número de escleródios para se obter o inóculo, para assegurar maior nível de agressividade e discriminar eficientemente os níveis de resistência do feijão.

TABELA 6 Resumo da análise de variância conjunta da reação de agressividade em diferentes épocas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Épocas	1	73,726**
Gerações	9	0,8835*
Épocas x Gerações	9	0,6398 ^{NS}
Erro médio	40	0,3273

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{NS} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, CV = 14,16.

TABELA 7 Teste de médias da análise conjunta para agressividade.

Gerações	Nota
2	4,77 a
6	4,38 a
1	4,33 a
10	4,11 b
5	4,08 b
4	3,94 b
3	3,89 b
9	3,70 b
7	3,64 b
8	3,50 b

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knot.

Vale ressaltar que, na obtenção das 10 gerações, o fungo foi multiplicado por via assexuada. Para a primeira geração foram colocados três escleródios por placa de petri contendo BDA os quais podem ter contribuído para gerar variação. Como foi tomada apenas uma pequena amostra de micélio para se obter a geração seguinte, a chance de selecionar novos variantes é muito reduzida, especialmente considerando o principal sistema de multiplicação por via assexuada. Aparentemente, surgiram variantes genéticas mais adaptadas ao meio de cultura, ou ainda há a possibilidade do patógeno ter se adaptado ao meio

artificial contendo todos os nutrientes e reprimido alelos para agressividade. Estudos semelhantes a este, não foram encontrados na literatura. Em trabalhos com isolados coletados em uma mesma área, entretanto, assim como com isolados coletados em diferentes áreas, observaram-se diferenças na agressividade (Pratt, 1995; Kull et al., 2004). Assim, de acordo com os resultados obtidos, é recomendável que a obtenção do inóculo seja feita com apenas duas gerações de multiplicação do fungo a partir de escleródios.

4 CONCLUSÕES

O tamanho ótimo da parcela, em avaliações de genótipos de feijão para resistência fisiológica, com o uso do ácido oxálico, é de oito plantas e o número ideal de repetições é pelo menos quatro.

Recomenda-se até duas repicagens de isolado de *S. sclerotiorum* em meio BDA, nas condições utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO, R.P.; SANTOS, J.B.; SOUZA, T.P.; CARNEIRO, F.F. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.7, n.3, p.733-740, Aug. 2008.

AUCLAIR, J.; BOLAND, G.J.; KOHN, L.M.; RAJCAN, I. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, Quebec, v.88, n.8, p.891-895, Aug. 2004.

CESSNA, S.G.; SEARS, V.E.; DICKMAN, M.B.; LOW, P.S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, n.11, p.2191-2199, Nov. 2000.

CHIPPS, T.J.; GILMORE, B.; MYERS, J.R.; STOTZ, H.U. Relationship between oxalate, oxalate oxidase activity, oxalate sensitivity, and white mold susceptibility in *Phaseolus coccineus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.95, n.3, p.292-299, Mar. 2005.

CHUNG, Y.S.; SASS, M.E.; NIENHUIS, J. Validation of rapid markers for white mold resistance in two snap bean populations based on field and greenhouse evaluations. **Crop Science**, Madison, v.48, n.6, p.2265-2273, Nov. 2008.

DONATO, S.L.R.; SIQUEIRA, D.L.; SILVA, S.O.; CECON, P.R.; SILVA, J.A.; SALOMÃO, L.C.C. Estimativas de tamanho de parcelas para avaliação de descritores fenotípicos em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.43, n.8, p.957-969, ago. 2008.

FERREIRA, D.F. **SISVAR para Windows 4.3**. Lavras, MG: UFLA/DEX, 2003. Software.

GUIMARÃES, R.L.; HENRIK, U.S. Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Washington, DC, v.136, n.2, p.3703-3711, Feb. 2004.

HENRIQUES NETO, D.; SEDIYAMA, T.; SOUZA, M.A.; LEITE, L.F.C.; BLANCO, F.F. Tamanho de parcela para avaliação da produção em trito irrigado, sob dois sistemas de plantio. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.1, p.86-93, jan./mar. 2009.

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

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

KULL, L.S.; PEDERSEN, W.L.; PALMQUIST, D.; HARTMAN, G.L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Quebec, v.88, n.4, p.325-332, Apr. 2004.

LOPES, S.J.; STORCK, L.; LÚCIO, A.D.C.; LORENTZ, L.H.; LOVATO, C.; DIAS, V. de O. Tamanho de parcela para produtividade de grãos de sorgo granífero em diferentes densidades de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.40, n.6, p.525-530, June 2005.

MARTIN, T.N.; DUTRA, L.M.C.; JAUER, A.; STORCK, L.; UHRY, L.Z.D.; SANTI, A.L.; STEFANELO, C.; LUCCA FILHO, O.A. Tamanho ótimo de parcela e número de repetições em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.271-276, mar./abr. 2005.

MENDES, F.F. **Estratégia de seleção de plantas eretas de feijão tipo carioca**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Field and straw test reaction to white mold in a RIL population (A55/G122). **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.43, p.76-77, 2000.

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

PARANAIBA, P.F. **Proposição e avaliação de métodos para estimar o tamanho ótimo de parcelas experimentais**. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PARRELLA, R.A. da C. **Alternativas para avaliação de severidade da macha-angular no feijoeiro comum**. 2008. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

PRATT, R.G.; ROW, D.E. Comparative pathogenicity of isolates *Sclerotinia trifoliorum* and *Sclerotinia sclerotiorum* on alfalfa cultivars. **Plant Disease**, Quebec, v.79, n.5, p.474-477, May 1995.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**: changes and enhancements, release. Version 6.11. Cary, 1995. Software.

SCOTT, A.J.; KNOT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, DC, v.30, n.2, p.507-512, 1974.

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

STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M. Comparison of screening methods for and identification of sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.45, p.158-159, 2002.

STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M.; POWERS, K.; KUROWSKI, C.; MAINZ, R.; KELLY, J.; GRIFFITHS, P.; GRAFTON, K.; MYERS, J.; MIKLAS, P.; KMIECIK, K. Identification of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse tests at multiple locations. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.46, p.225-226, 2003.

TERÁN, H.; LEMA, M.; SCHWARTZ, H.F.; DUNCAN, R.; SINGH, S.P. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.49, p.115-116, 2006.

VIANA, A.E.S.; SEDIYAMA, T.; CECON, P.R.; LOPES, S.C.; SEDIYAMA, M.A.N. Estimativas de tamanho de parcela em experimentos com mandioca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.20, n.1, p.58-63, mar. 2002.

VUONG, T.D.; HOFFMAN, D.D.; DIERS, B.W.; MILLER, J.F.; STEADMAN, J.R.; HARTMAN, G.L. Evaluation of soybean, Dry bean, and sunflower for resistance to sclerotinia sclerotiorum. **Crop Science**, Madison, v.44, n.3, p.777-783, May 2004.

ANEXO

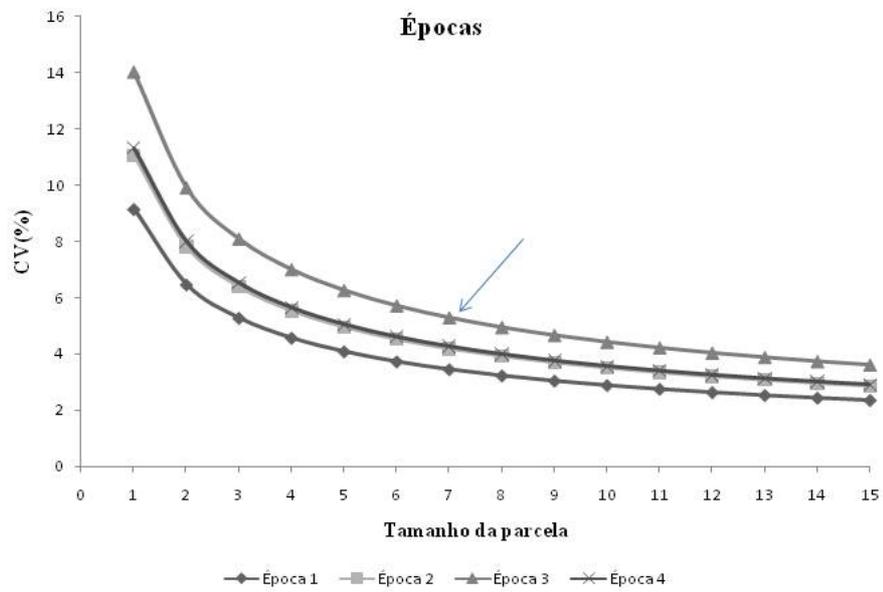


FIGURA 1 Relação entre o coeficiente de variação (CV) em % e o tamanho de parcela. A seta indica o tamanho ótimo da parcela (X_0), para cada uma das épocas de avaliação do experimento.

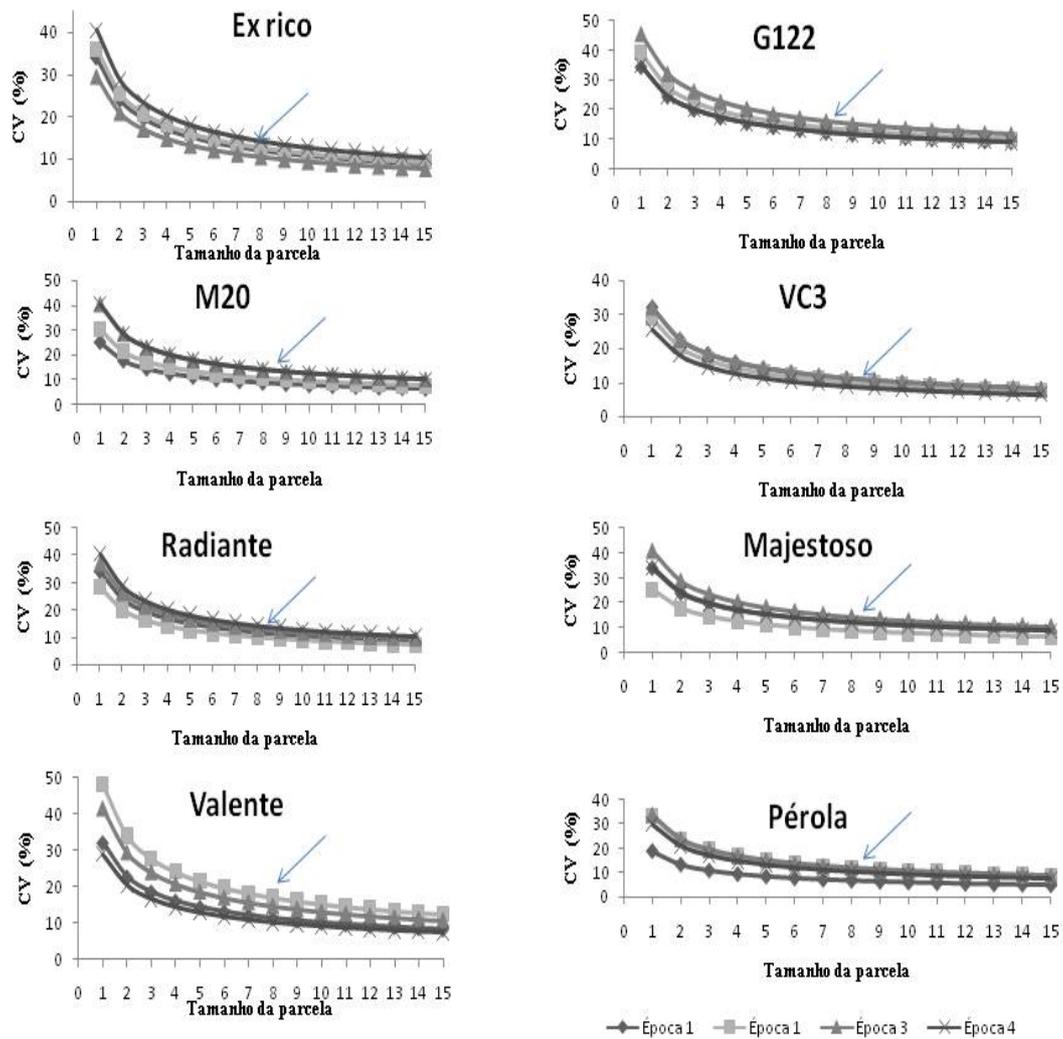


FIGURA 2 Relação entre o coeficiente de variação (CV) em % e o tamanho de parcela. A seta indica o tamanho ótimo da parcela (X_0), para cada genótipo em cada uma das épocas de avaliação do experimento.

TABELA 3 Estimativas dos coeficientes de variação (CV) e dos valores de F, médios, mínimos e máximos e as variâncias do CV, considerando 3000 reamostragens por meio do método Monte Carlo.

N rep.	Época 3							Época 4						
	CV	CV min.	CV max.	S ²	F	F min.	F max.	CV	CV min.	CV max.	S ²	F	F min.	F max.
2	36,85	27,07	46,37	7,16	3,48	0,88	10,04	33,03	25,15	42,23	6,73	7,44	1,24	26,87
3	36,83	28,85	44,24	4,66	4,78	1,26	12,05	33,05	27,03	40,66	4,47	10,51	2,42	27,35
4	36,85	30,08	43,15	3,45	6,09	2,42*	12,84	33,02	27,12	40,27	3,37	13,59	5,01*	28,9
5	36,86	31,24	42,2	2,74	7,4	3,33*	13,89	33,02	27,84	38,73	2,59	16,67	5,82*	37,29
6	36,89	31,06	42,0	2,27	8,72	3,91*	16,32	33,02	28,09	38,46	2,11	19,75	8,07*	39,96
7	36,88	31,98	41,72	1,92	10,02	4,76*	17,15	33,02	28,88	37,77	1,82	22,86	10,32*	41,49
8	36,89	32,73	41,02	1,65	11,33	5,7*	19,52	33,03	28,85	37,41	1,59	25,99	12,27*	48,66
9	36,90	32,61	40,95	1,49	12,66	6,29*	20,75	33,04	28,71	37,37	1,42	29,03	13,81*	52,66
10	36,90	32,91	40,51	1,35	13,98	7,9*	23,14	33,04	28,68	37,21	1,29	32,13	16,97*	56,78

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade. ...Continua...

TABELA 3, Cont. Estimativas dos coeficientes de variação (CV) e dos valores de F, médios, mínimos e máximos e as variâncias do CV, considerando 3000 reamostragens por meio do método Monte Carlo.

N rep.	Época 1							Época 2						
	CV	CV min.	CV max.	S ²	F	F min.	F max.	CV	CV min.	CV max.	S ²	F	F min.	F max.
2	29,74	25,19	34,24	2,07	7,36	2,73*	20,89	32,67	26,89	39,20	3,12	2,91	0,24	11,69
3	29,74	24,92	33,37	1,27	10,47	4,85*	28,01	32,67	27,33	37,97	1,96	3,78	0,56	14,72
4	29,75	26,29	32,74	0,92	13,54	6,37*	26,42	32,68	28,75	37,16	1,43	4,73	0,64	12,99
5	29,76	26,14	32,46	0,71	16,64	7,98*	31,45	32,69	28,84	37,31	1,15	5,66	1,05	15,43
6	29,76	26,42	32,34	0,61	19,73	10,37*	37,92	32,68	29,28	36,42	0,96	6,59	0,92	17,74
7	29,75	26,72	32,18	0,53	22,87	13,2*	39,27	32,68	29,08	36,01	0,81	7,52	1,35	19,05
8	29,74	27,46	32,13	0,46	26,01	16,35*	43,6	32,68	30,01	35,79	0,69	8,43	1,79	19,25
9	29,74	27,18	32,02	0,41	29,11	19,33*	48,7	32,68	30,0	35,46	0,61	9,34	2,37*	21,45
10	29,74	27,69	31,66	0,36	32,2	20,43*	52,45	32,68	30,08	35,13	0,54	10,26	2,27*	21,49

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.