

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA
DO FEIJOEIRO AO MOFO BRANCO E
SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES**

RAFAELA PRISCILA ANTONIO

2008

RAFAELA PRISCILA ANTONIO

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO AO MOFO BRANCO E SELEÇÃO
ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**

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
2008

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

Antonio, Rafaela Priscila.

Controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco e seleção assistida por marcadores moleculares / Rafaela Priscila Antonio. – Lavras : UFLA, 2008.

56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Ácido oxálico. 3. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6523

RAFAELA PRISCILA ANTONIO

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO AO MOFO BRANCO E SELEÇÃO
ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**

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 28 de fevereiro de 2008

Dra. Ângela de F. B. Abreu

EMBRAPA/ARROZ E FEIJÃO

Prof. Dr. Luiz Antônio A. Gomes

UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

(Orientador)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Rafael Antonio, por todo amor incondicional e carinho e aos meus irmãos, Daniel, Rudy, Rosy, Rosana e Fátima, por toda a ajuda e por todo o orgulho que sempre sentiram de mim.

OFEREÇO

A Jochen, por todo amor, apoio e paciência,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as boas oportunidades e amigos que me proporcionou.

A todos os que me incentivaram na realização deste trabalho, entre eles: minha mãe, Maria de Lourdes; meu pai, Rafael Antonio; meus irmãos e Jochen, meu namorado.

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

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

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

Ao Lamartine, por toda ajuda e todos os ensinamentos transmitidos.

A todos os amigos do GEN, principalmente Adriano e Flavinha, pelas dicas, ajuda e amizade.

Aos amigos Andressa, Jeanne, Letícia, Juliana, Mariney, Raoni e Ranoel, por todo apoio e amizade que fizeram a diferença nesses anos de convivência em Lavras.

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

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

A todos que, embora não citados, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Mofo Branco.....	3
2.1.1 Taxonomia, Identificação e Sintomatologia	3
2.1.2 Procedimentos para avaliação da reação do feijoeiro ao mofo branco	6
2.2 Estimativas de parâmetros genéticos do feijoeiro para a reação ao mofo branco.....	14
2.3 Melhoramento pelo método dos retrocruzamentos.....	15
2.4 Marcadores genéticos	18
2.4.1 Seleção assistida por marcadores para resistência ao mofo branco	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Local.....	23
3.2 Cruzamentos e retrocruzamentos.....	23
3.3 Reação das populações ao mofo branco por meio da solução de ácido oxálico	24
3.4 Análise de variância e estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos.....	25
3.4.1 Obtenção de variâncias em plantas individuais	25
3.4.2 Obtenção de variâncias entre e dentro de famílias $F_{2:3}$	20
3.4.3 Estimativas dos componentes de média e de variâncias	20
3.5 Extração de DNA.....	33
3.6 Processo de Amplificação de DNA e eletroforese.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Uso de médias e variâncias em plantas individuais	35
4.2 Avaliação das famílias segregantes ($F_{2:3}$)	41
4.3 Uso do SCAR Phs para seleção de plantas com o QTL para resistência ao mofo branco	42
5 CONCLUSÕES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

ANTONIO, Rafaela Priscila. **Controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco e seleção assistida por marcadores moleculares.** LAVRAS: UFLA, 2008. 56p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*

O uso de cultivares geneticamente resistentes é o melhor método para diminuir os riscos de epidemias e prejuízos por mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary). Como as fontes mais conhecidas de resistência não são adaptadas, há a necessidade de se conhecer o controle genético da reação do feijoeiro ao mofo branco, para orientar mais eficientemente o melhoramento. Além disso, nas avaliações de campo para reação ao mofo branco, há um confundimento entre os mecanismos de resistência, além dos fatores ambientais e os mecanismos de escape. Dessa forma, a utilização de métodos indiretos, que não utilizem o patógeno para a medição da doença, deve ser preferida. Os objetivos para a realização deste estudo foram identificar o controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco por meio indireto, pela reação ao ácido oxálico, e promover seleção precoce com marcador molecular ligado a QTL de resistência à doença, em uma população de retrocruzamento. Para isso, foi utilizada a descendência do cruzamento VC3 (suscetível) x G122 (resistente). O caráter foi avaliado por meio de uma chave descritiva de notas, após tratamento com ácido oxálico. As avaliações foram realizadas em plantas individuais e em famílias. No primeiro caso, as plantas das populações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 e dentro de famílias $F_{2,3}$ foram avaliadas em um experimento inteiramente casualizado com duas repetições. No segundo caso, foram obtidas variâncias entre famílias $F_{2,3}$ e adotou-se o delineamento em blocos casualizados com duas repetições, com médias de famílias ajustadas às testemunhas (genitores). Paralelamente, a geração F_1RC_1 (F_1 x VC3) foi avaliada para resistência ao mofo branco, por meio do SCAR Phs desenvolvido especificamente para esse tipo de resistência. Foram obtidas 53 plantas provenientes do F_1RC_1 . Destas, somente as plantas com a marca foram selecionadas para o próximo retrocruzamento. O método do ácido oxálico foi eficiente para detectar diferenças genotípicas entre cultivares. Constatou-se que houve predomínio dos efeitos aditivos e o controle genético foi caracterizado por dominância parcial ($d/a=0,47$). Os resultados obtidos revelaram também que apenas um gene de resistência está envolvido, embora o

* Comitê Orientador: João Bosco dos Santos (Orientador), Ângela de Fátima Barbosa Abreu - EMBRAPA/Arroz e feijão, Luiz Antonio A. Gomes - UFLA.

caráter seja altamente influenciado pelo ambiente. A herdabilidade no sentido amplo, no âmbito de médias de famílias (0,47), foi superior à obtida em plantas individuais (0,33), indicando que a seleção deve ser mais eficiente com base em avaliações de média de progênies. O marcador foi eficiente em identificar as plantas portadoras do QTL na população RC₁.

ABSTRACT

ANTONIO, Rafaela Priscila. **Genetic Control of the resistance of common bean to white mold and molecular marker-assisted selection.** LAVRAS: UFLA, 2008. 56p. (Dissertation – Master in Plant Genetics and Breeding Program)*

The use of genetically resistant cultivars is the most efficient method to diminish risks of epidemics and damage by white mold (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) by Bary). As the best known sources of resistance are not adapted it is necessary to do the backcross using elite lines. So the breeding will be easy if we understand the genetic control of the reaction of the common bean to white mold. Besides, evaluations of resistance to white mold in the field are hindered by environmental conditions and avoidance mechanisms that confound the expression and detection of physiological resistance mechanisms. The use of indirect methods that do not use the pathogen to cause disease are preferred. The objectives of this study were to identify the genetic control of the resistance of common bean to white mold through the reaction of seedling without roots to oxalic acid, and promote early selection with molecular marker linked to QTL of resistance to the disease in a backcrossed population. The line VC3 (susceptible) and G122 (resistant) were crossed and the F_1 , F_2 , F_3 and F_1RC_1 were used. The reaction to white mold was indirectly evaluated by means of a visual score given after treatment of the seedling with oxalic acid. The evaluations were done both on individual plants and on families. In the former case, the plants of the populations P_1 , P_2 , F_1 , F_2 and within F_3 family were evaluated in a completely random design with two replications. In the second case, variances among $F_{2:3}$ families were estimated. The randomized complete block design was adopted with two replications, and the family means were adjusted based on the parents performance. Additionally the F_1RC_1 ($F_1 \times VC3$) was evaluated for resistance to white mold by means of the SCAR Phs developed specifically for this type of resistance. Fifty three F_1RC_1 plants were obtained, and only the plants with the marker were selected for the next backcross. The oxalic acid test was efficient to detect genetic differences among genotypes. It was found that there was a predominance of the additive effects characterized by partial dominance ($d/a = 0.47$). Only one resistance gene is involved in the control of the trait although it

* Guidance Committee: João Bosco dos Santos - UFLA (Major Professor), Ângela de Fátima Barbosa Abreu - EMBRAPA/Arroz e feijão, Luiz Antonio A. Gomes - UFLA.

is highly influenced by the environment. Estimates of the broad-sense heritability at the level of family means (0.47) was higher than the estimates based on individual plants (0.33) indicating that selection should be done using means of progenies. The marker was efficient in identifying the plants that have the QTL in the RC₁ population.

1 INTRODUÇÃO

O mofo branco do feijoeiro (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) é uma doença severa, principalmente no cultivo de inverno sob irrigação, em especial por pivô central. Nas áreas contaminadas, as condições de clima favoráveis ao seu desenvolvimento são alta umidade e temperaturas amenas. Nessa situação, uma lavoura de feijão pode sofrer, em média, perdas de 30% ou mais, podendo chegar a 100% em períodos chuvosos e quando medidas preventivas não são tomadas (Oliveira, 2005).

Diversos procedimentos de controle foram propostos para limitar os prejuízos por mofo branco, mas, neste momento, o uso de cultivares geneticamente resistentes é o melhor método para diminuir os riscos de epidemias (Castaño, 2001). Entretanto, ele é de difícil utilização, uma vez que a maioria das cultivares disponíveis no mercado é altamente suscetível. As fontes de resistência genética ao patógeno estão restritas a algumas cultivares exóticas e não adaptadas ao Brasil, as quais, embora com potencial de uso nos programas de melhoramento, não apresentam possibilidades de utilização direta pelos produtores.

Para o melhoramento do feijão, evidentemente, não basta transferir alelos de resistência, pois é também necessário que a cultivar seja superior em vários caracteres agronômicos. Algumas características, como cor, tamanho e brilho do grão, podem determinar o seu consumo, enquanto a cor do halo pode também influenciar na comercialização. Os grãos menores, com 23g a 25g e opacos são mais aceitos do que os que apresentam brilho (Aidar, 2003). O porte ereto, além de facilitar os tratos culturais, também contribui para evitar o mofo branco. Além do porte, há informações sobre a resistência da planta, também

conhecida como resistência fisiológica e que tem natureza poligênica (Miklas et al., 2001).

Como as fontes mais conhecidas de resistência não são adaptadas, há a necessidade de se conhecer o controle genético da reação do feijoeiro ao mofo branco, para orientar mais eficientemente o melhoramento. De posse dessa informação, o melhoramento poderá ser mais eficientemente planejado, bem como há a possibilidade de identificação de marcadores de DNA para auxiliarem na seleção. Isso porque a avaliação da reação do feijoeiro a patógenos do solo é complexa. Assim, os processos de melhoramento para a resistência são dificultados por condições ambientais que confundem a expressão e a detecção de mecanismos de resistência fisiológica em campo, pois dependem do estágio de desenvolvimento da planta, que é afetado por vários fatores, como temperatura, umidade e nutrição.

Existem vários métodos para detectar a resistência fisiológica ao mofo branco em feijão (Hunter et al., 1981; Miklas et al., 1992a; Miklas et al., 1992b; Petzold & Dickson, 1996; Stadman et al., 1997). A maioria desses testes usa um número limitado de genótipos e depende do micélio fúngico em procedimento de screening (Kolkman & Kelly, 2000), variabilidade de virulência entre isolados (Miklas et al., 1992a; Pratt & Row, 1995) e sensibilidade do patógeno a altas temperaturas (Boland & Hall, 1987). Todos esses fatores limitam os métodos de screening em casa de vegetação usando o patógeno. Dessa forma, a utilização de métodos indiretos, que não utilizem o patógeno para medição da doença, deve ser preferida.

Diante do exposto, o presente estudo foi realizado com os objetivos de identificar o controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco por meio indireto pela reação ao ácido oxálico e promover seleção precoce com marcador molecular ligado a QTL de resistência à doença, em uma população de retrocruzamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mofo branco

2.1.1 Taxonomia, identificação e sintomatologia

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um dos mais devastadores e importantes patógenos de plantas (Bolton et al., 2006). Mais de 60 nomes diferentes são usados para se referir às doenças causadas por este fungo patogênico (Purdy, 1979), sendo mofo branco o mais comum.

Este patógeno tem um círculo de hospedeiros que abrange, pelo menos, 408 espécies e 278 gêneros de plantas (Boland & Hall, 1994). Representa uma ameaça a culturas dicotiledôneas, como girassol, soja, feijão, amendoim, ervilha, lentilhas e diversos produtos hortícolas, mas também espécies de monocotiledôneas, como cebola e tulipas (Boland & Hall, 1994) e plantas daninhas, como picão, carrapicho, mentrasto, caruru e vassoura, entre outras, o que dificulta sobremaneira a sua erradicação em áreas contaminadas (Abreu, 2005).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia* (Bolton et al., 2006). São patógenos que formam estruturas de resistência conhecidas como escleródios, as quais garantem a sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis (Oliveira, 2007). Os escleródios sobrevivem no solo até oito anos e podem variar drasticamente em tamanho e forma, dependendo da cultura. Em feijão, por exemplo, são globosos e de 2-10 mm de diâmetro. Estes podem germinar formando apotécios (germinação carpogênica) ou micélios (germinação miceliogênica). Dos apotécios são liberados os ascósporos. A germinação carpogênica do escleródio é considerada,

por muitos autores, como a principal responsável pelas epidemias em campo (Karl et al., 1997).

Cada apotécio pode produzir cerca de 30 milhões de ascósporos e um único escleródio pode produzir de 5 a 6 apotécios. Alta umidade (16 a 72 horas de umidade contínua) e temperaturas de 49° a 59°F (9° a 15°C) favorecem a produção de apotécios. Como ascósporos germinam e colonizam tecidos senescentes e mortos, flores senescentes são freqüentemente fontes de novas infecções. Ocasionalmente, podem se originar antes do florescimento, devido ao micélio do solo que fica em contato direto com injúrias em tecidos do caule (Davis, 1999).

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

A infecção ocorre, geralmente, na junção do pecíolo com a haste, aproximadamente 10 a 15 cm acima da linha do solo, onde flores, pétalas e folhas desprendidas geralmente ficam retidas (Oliveira, 2007). Os tecidos infectados apresentam inicialmente lesões encharcadas que se espalham rapidamente para as hastes e ramos. Rapidamente, as lesões são cobertas por micélio branco de aspecto cotonoso, bem característico da doença. O micélio branco, em alguns pontos, vai escurecendo até atingir coloração preta, formando os escleródios, que apresentam formato irregular, tendendo a ser achatados e podem ser produzidos interna ou externamente aos tecidos do hospedeiro. Variam de branco até preto, à medida que atingem a maturação. Os escleródios

que são produzidos internamente no hospedeiro geralmente são maiores, podendo até atingir alguns centímetros de comprimento (Cardoso, 1994). Quando a lesão circunda a haste, a parte aérea da planta sofre murcha e morte de folhas. Em folhas e pecíolos, os sintomas ocorrem sob alta umidade relativa e são caracterizados por apodrecimento total das folhas, com presença de micélio branco e escleródios. Segundo Kolkman & Kelly (2000), o ácido oxálico também provoca sintomas de murcha em plantas infectados por *S. sclerotiorum*. Em frutos, observa-se podridão mole aquosa com produção de micélio branco e escleródios (Bolton et al., 2006).

A invasão de tecidos de plantas saudáveis requer secreções fúngicas de ácido oxálico, que são a causa provável da lesão formada antes da invasão de hifas fúngicas (Lumsden & Dow, 1973). Fungos isolados hipovirulentos produzem menos micélio e ácido oxálico, em comparação com isolados virulentos (Zhou & Boland, 1999).

O ácido oxálico demonstrou ser um importante fator de patogenicidade quando mutantes de *S. sclerotiorum* deficientes na produção de ácido oxálico foram usados (Godoy et al., 1990). Resistência de campo em alguns genótipos tem sido correlacionada com resistência a ácido oxálico em laboratório (Wegulo et al., 1998). Ele é supressor da explosão oxidativa em plantas hospedeiras, desativando, assim, um dos maiores sistemas de resistência da planta (Cessna et al., 2000). O ácido oxálico também favorece a degradação da parede celular vegetal pela mudança do pH dos tecidos infectados próximo à otimização das enzimas degradantes, tais como a poligalacturonase (Bateman & Beer, 1965; Maxwell & Lumsden, 1970; Marciano et al., 1983). Além disso, remove íons de cálcio vinculados às pectinas, que expõem paredes de células hospedeiras a enzimas catabólicas de origem fúngica (Bateman & Beer, 1965).

Segundo Guimarães & Stotz (2004) e Kolkman & Kelly (2000), o ácido oxálico causa sintomas de ressecamento foliar por perturbação das funções das

células guarda, que alteram a osmorregulação dessas células e interfere com ácido abscísico (ABA), induzindo o fechamento estomático.

2.1.2 Procedimentos para avaliação da reação do feijoeiro ao mofo branco

2.1.2.1 Método de inoculação utilizando discos de BDA contendo micélio do fungo

Neste método, os escleródios são submetidos à assepsia (3 minutos em álcool a 50% e 3 minutos em hipoclorito de sódio a 1%) e são depositados no centro das placas de Petri contendo meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA) mais 1% de sulfato de estreptomicina. Essas placas são colocadas em câmara incubadora por sete dias, a 22°C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Discos contendo micélio são retirados da borda das colônias com o auxílio de um furador de rolhas de 0,7 mm de diâmetro e inoculados nas plântulas de forma invertida, ou seja, a superfície que continha o micélio é colocada em contato com a plântula.

A inoculação da planta pode ocorrer de três formas: nas folhas primárias, nas axilas das folhas primárias ou no caule principal cortado (método do *cut stem*). No método do caule cortado (*cut stem*), a haste principal da planta é cortada horizontalmente com uma lâmina estéril 0,5 cm, acima do quarto ou quinto entrenó, quando as plantas têm cinco semanas de idade (podendo variar com a cultura) (Vuong et al., 2004). No caso da inoculação das folhas e axilas das folhas, a inoculação é feita no estádio R6. Após a inoculação, as plântulas são transferidas para uma câmara de nevoeiro com umidade aproximada de 100%, temperatura de 21±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Ali permanecem por 48 horas, para o método de inoculação das folhas e 96 horas, para o método de inoculação das axilas das folhas, quando se procede a avaliação. Para a avaliação de plântulas inoculadas nas folhas, mede-se o

comprimento das lesões a partir do ponto de inoculação, com auxílio de um paquímetro. Para a avaliação das plântulas inoculadas nas axilas das folhas primárias, são atribuídas notas, variando de 1 a 9, em que: 1 = ausência de sintomas na plântula; 2 = início do desenvolvimento de uma lesão circular; 3 = lesão de até 1,0 cm de comprimento; 4 = lesão entre 1,0 e 1,5 cm de comprimento; 5 = lesão maior que 1,5 cm de comprimento; 6 = lesões na haste, presença de micélio e murcha de uma das folhas; 7 = lesões na haste e presença de micélio e murcha de ambas as folhas; 8 = plântula com sintoma de murcha geral, devido ao intenso desenvolvimento micelial e 9 = plântula morta (Toledo-Souza & Costa, 2003). No método do caule cortado, o comprimento da lesão (cm) é avaliado diariamente em cada planta, até 14 dias de idade (Vuong et al., 2004).

Em um experimento no qual foram avaliadas soja, feijão e girassol em campo e casa de vegetação utilizando o método do caule cortado (cut stem) (Vuong et al., 2004), 15 cultivares de soja obtiveram coeficientes de correlação significativos, entre campo e casa de vegetação, de 0,53 a 0,79. Além da soja, dois outros experimentos foram realizados com feijoeiro e girassol. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) de comprimento de lesão entre 14 genótipos de feijoeiro e girassol. As correlações entre casa de vegetação e avaliações de campo em feijoeiro e girassol foram de 0,74 e 0,50 ($P < 0,05$), respectivamente. Em síntese, as avaliações pelo método do caule cortado podem ser comparadas favoravelmente com avaliações de doença em campo de soja, feijão, e girassol. Em outro experimento, Miklas et. al. (1992a) encontraram correlação moderadamente alta ($r = 0,68$, $P < 0,02$) entre resistência fisiológica em laboratório e campo, com plantas de 28 dias de idade.

Toledo-Souza & Costa (2003) compararam métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro. Nesse experimento, o método de inoculação da axila da folha mostrou maior severidade de doença do que o método de inoculação da

folha, que apresentou uma menor severidade de doença e não discriminou genótipos, mas foi eficiente em diferenciar isolados. No entanto, o método de inoculação da axila discriminou tanto os genótipos quanto os isolados.

2.1.2.2 Teste do canudo (*straw test*)

O *straw test*, ou teste do canudo, foi descrito por Petzoldt & Dickson (1996). Neste teste, as plantas são inoculadas de três a cinco semanas após a semeadura. Os inóculos são crescidos em placas de BDA, a 23°C, fornecendo um crescimento uniforme. Para seguir um ativo crescimento, é necessário repicar o fungo duas vezes e a inoculação deve ser realizada três dias após a repicagem. A placa pronta tem crescimento demasiado com aparência de algodão, mas não iniciou a formação de escleródios. Canudos de plástico (6mm de diâmetro) são cortados, com 3 cm de comprimento; uma extremidade é grampeada e a outra é deixada aberta para cortar o disco de ágar da placa. O micélio do disco de ágar fica em contato com o ápice cortado da planta. Oito dias depois, são realizadas as avaliações segundo a escala de resistência ao mofo branco seguinte:

1. nenhum sinal da doença, mas caule infectado próximo à inoculação com o ágar, enquanto o canudo foi removido para inspeção;
3. invasão do caule por diversas polegadas ou o primeiro nó, mas não além;
5. invasão passada do primeiro nó, mas progredindo devagar;
7. invasão do segundo nó ou além, mas não colapso total da planta;
9. colapso total da planta.

Neste teste, as plantas susceptíveis são descartadas e as remanescentes seguem o desenvolvimento. Algumas plantas morrem depois, mostrando alguma tolerância, mas menos que outras. As plantas resistentes podem produzir uma colheita normal de sementes (Petzoldt & Dickson, 1996).

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

Geralmente, linhagens com conhecida resistência de campo a mofo branco têm, consistentemente, pontuações inferiores a 5 em teste do canudo (Miklas et al., 1998) e são identificadas como potenciais fontes de resistência fisiológicas, porque pontuação inferior a 5 representa elevados níveis de restrição de desenvolvimento de lesões (Petzoldt & Dickson, 1996). Nesse trabalho (Miklas et al., 1999), houve exceções, como os feijões resistentes em campo “Bunsi” (Ex Rico) e G122, que obtiveram pontuações superiores a 5 nos testes de canudo em casa de vegetação.

É provável que o teste do canudo apenas mensure um único componente (resistência fisiológica de tecidos da haste e entrenós à invasão do patógeno) de um complexo de fatores, incluindo mecanismos para evitar doenças, que contribuem para a resistência de campo. O *straw test* também foi utilizado para detectar um QTL do G122 no grupo de ligação B7 e exibiu grande efeito, explicando de 42% a 64% da variação na reação (para as duas populações de feijão utilizadas). O QTL do grupo de ligação B7 apresentou menor efeito no campo, 17% e 12% em parte, por causa da má pressão de doença (Miklas, 2006).

2.1.2.3 Reação do feijoeiro ao patógeno em avaliações no campo

Nesse caso, o campo pode ser infestado seguindo qualquer metodologia já citada (método de inoculação utilizando discos de BDA contendo micélio do fungo, método do canudo ou *straw test*) ou, ainda, utilizar campos com histórico

de infestação com o patógeno ou sementes de espécies infectadas com o patógeno. As plantas são avaliadas, de acordo com Grau et al. (1982), aproximadamente, no estágio R7 (Fehr et al., 1971), quando ocorre o amarelecimento das vagens e 50% das folhas estão amarelas. As plantas são individualmente classificadas para a doença em uma escala de 0 a 3, com 0 = sem sintomas; 1 = lesões apenas na lateral de ramos; 2 = lesões na haste principal, mas pouco ou nenhum efeito sobre enchimento das vagens e 3 = lesões na haste principal, resultando na morte de plantas e pobre enchimento de vagens. O índice de severidade de doença (ISD) é calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{ISD} = \sum (\text{nota} \times \text{frequência}) \times 100 / \text{n.º total de plantas} \times \text{nota da escala}$$

Em uma variação dessa metodologia, a avaliação de doença é realizada nos estádios de enchimento de grãos e maturação fisiológica (R8 e R9), utilizando uma escala de 1 a 9, na qual: 1 = nenhum sintoma visível, 3 = aproximadamente 5% a 10% da área da planta com sintomas; 5 = aproximadamente 20 a 30% da área da planta com sintomas; 7 = aproximadamente 40% a 60% da área da planta com sintomas e 9 = mais de 80% da área da planta com sintomas (Van Schoonhoven & Pastor-Corrales, 1987).

Nesse método, fatores ambientais são limitantes, pois o desenvolvimento do patógeno em campo é dependente de condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, como alta umidade e temperaturas amenas. Em genótipos de soja avaliados para susceptibilidade a mofo branco, em dois locais nos EUA (East Lansing e Zilwaukee), nos anos 1994 a 1996, por Kim et al. (1999), foram encontradas variações entre épocas de avaliação de doença. Nesse estudo, em todos os 18 genótipos avaliados, que eram comuns a todos os três anos, a média de ISD variou entre um mínimo de 2,1, para East Lansing, em

1995, para uma alta de 49,9, em Zilwaukeeel, em 1994. A condição meteorológica desses anos variou, o que foi uma causa provável de variação na ISD entre ambientes, de quente e seco (em 1995) a úmida e fria (em 1994), provocando baixos e elevados valores de ISD. Níveis de infecção variaram de 100% de plantas infectadas a 0% em uma distância de 1 m. Em outro trabalho, Kim et al. (2000) encontraram efeito significativo para ambiente e interação genótipos x ambientes, em avaliações de campo para mofo branco, demonstrando grande efeito do ambiente nessas avaliações.

2.1.2.4 Metodologia de estudo utilizando a medição indireta da reação do feijoeiro ao ácido oxálico

Neste método, as sementes são plantadas em bandejas com substrato em casa de vegetação. Com 20 dias de idade (emergência da segunda folha trifoliolar), são cortadas na base do caule, à tarde, para evitar que murchem, devido às altas taxas de transpiração durante as horas mais quentes do dia. Uma espuma é colocada ao redor da base da planta, que é posta em um isopor perfurado, que fica flutuando em recipientes plásticos. Cada recipiente contém uma solução de 20mM de ácido oxálico e água destilada que foi previamente ajustada para pH 4,0 com NaOH. As plantas são avaliadas para sintomas de murcha de 12 a 15 horas depois de expostas à solução de ácido oxálico. É utilizada uma escala de 1 a 6 para mensurar o murchamento, em que 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 (Kolkman & Kelly 2000).

Neste estudo, Kolkman & Kelly (2000) observaram que as avaliações com ácido oxálico foram correlacionadas com as taxas de índice de severidade ($r= 0,58^{**}$) e incidência de doença ($r = 0,58^{**}$) em campo para mofo branco e

negativamente correlacionadas com o rendimento ($r = -0,50^{**}$). Estes mesmos autores constataram que o teste com ácido oxálico é um método eficiente para detectar indiretamente a resistência fisiológica ao mofo branco em feijoeiro.

O ácido oxálico (ácido etanodióico) é um ácido sólido cristalino (ácido dicarboxílico) de fórmula molecular $H_2C_2O_4$ ou, mais precisamente, $HOOC-COOH$. É um ácido orgânico saturado, de cadeia normal e relativamente forte, sendo 10.000 vezes mais forte que o ácido acético. Comercialmente, a forma mais usual é a diidratada, de fórmula molecular $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$. É um metabólico tóxico produzido por uma larga variedade de microrganismos (Hodgkinson, 1977; Nakagawa et al., 1999).

A presença de ácido oxálico foi descrita pela primeira vez por de Bary (1886). Diversos estudos têm mostrado o relacionamento entre ácido oxálico produzido por *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary e patogenicidade (Pierson, 1992; Ferrar & Walker, 1993). As provas para esse relacionamento são baseadas na recuperação de concentrações milimolares de ácido oxálico em tecidos infectados (Marciano et al., 1983; Godoy et al., 1990) e na injeção manual de ácido oxálico, ou de cultura filtrada contendo oxalato, em plantas e na observação da evolução dos sintomas (Noyes & Hancock, 1981). Essas provas foram reforçadas pela observação de que mutantes de *Sclerotinia* que são deficientes na capacidade de sintetizar oxalato não são patogênicos, enquanto estirpes que possuem capacidade normal de biossíntese de oxalato apresentam virulência (Godoy et al., 1990). A principal, se não a única, diferença entre essas estirpes é a sua capacidade de sintetizar e secretar ácido oxálico (Godoy et al., 1990). A resistência a oxalato pode ser um importante componente de resistência fisiológica, já que tem sido demonstrado que a resistência ao oxalato está correlacionada com a resistência a mofo branco em campo (Tu, 1985; Kolkman & Kelly, 2000).

O micélio do mofo branco exsuda grande soma de ácido oxálico durante a infecção dos tecidos da planta (Maxwell & Lumsden, 1970). O oxalato foi identificado como um modo primário de patogênese de *S. sclerotiorum* (Godoy et al., 1990). As evidências, que demonstram que o oxalato pode aumentar a virulência de *S. sclerotiorum*, são: 1. várias enzimas fúngicas secretadas durante a invasão de tecidos vegetais (por exemplo, poligalacturonase) têm máxima atividade em um baixo pH (4,0); esse exsudado de oxalato poderia ajudar *S. sclerotiorum* pela passagem do pH apoplástico a um valor ótimo para as funções das enzimas degradantes das paredes celulares em plantas (Bateman & Beer 1965; Marciano et al., 1983); 2. o oxalato pode ser diretamente tóxico para plantas hospedeiras, presumivelmente devido à sua acidez; a secreção de oxalato pode enfraquecer a planta, facilitando a invasão (Noyes & Hancock, 1981); 3. finalmente, a quelação da parede celular Ca^{2+} por ânions de oxalato pode tanto comprometer a função do Ca^{2+} , dependendo das respostas de defesa e enfraquecer a parede celular vegetal (Bateman & Beer, 1965).

Diferenças de resistência a oxalato têm sido identificadas em testes com folhas de girassol (Noyes & Hancock, 1981), em teste de germinação em alfafa e trevo encarnado (*Trifolium incarnatum*) (Rowe, 1993), em teste do caule cortado em soja (Wegulo et al., 1998) e no teste da folha em brássicas transgênicas (Thompson et al., 1995). O feijão comum também tem mostrado diferenças genotípicas em resposta a oxalato. A absorção de ácido oxálico por pecíolos de folhas primárias incisadas da cultivar resistente Bunsí (também conhecida por Ex Rico 23) mostrou ser mais lenta que em duas cultivares suscetíveis, Kentwood e Seafaresr (Tu, 1985). Cultivares que foram mais susceptíveis a mofo branco exibiram maiores danos nas estruturas das membranas plasmáticas e cloroplastos que cultivares resistentes, quando expostas à solução de ácido oxálico (Tu, 1989).

2.2 Estimativas de parâmetros genéticos do feijoeiro para a reação ao mofo branco

Resistência a mofo branco em feijão tem herança complexa e é composta de resistência fisiológica e mecanismos de escape (Fuller et al., 1984; Miklas et al., 1992b; Miklas et al., 2001; Park et al., 2001; Kolkman & Kelly, 2002). Progressos em melhoramento para a resistência ao mofo branco têm sido dificultados pela limitada expressão e detecção de resistência fisiológica em campo, bem como pela influência do ambiente na variabilidade dos mecanismos de escape. Dessa forma, a avaliação da natureza e da magnitude dos efeitos gênicos, que controlam os caracteres quantitativos associados com a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*, é de grande importância para o melhorista que busca incorporar alelos de resistência em cultivares de feijão. É fundamental investigar, na fração genética, quais as proporções que podem ser atribuídas aos efeitos gênicos aditivos, dominantes e epistáticos. Essas avaliações estão intimamente relacionadas com os objetivos do melhoramento genético (Cruz & Regazzi, 2001).

As metodologias utilizadas para estudo dos caracteres quantitativos resumem-se ao uso dos componentes de médias e componentes de variância. A utilização da variância, uma estatística de segunda ordem, em vez de média, é preferida porque esta última pode, algumas vezes, não representar realmente o que está ocorrendo. Utilizando-se as médias, o que se obtém no final é uma soma algébrica de cada um dos locos individualmente e pode ocorrer, por exemplo, que os genes dominantes estejam presentes, mas atuando em sentidos opostos nos vários locos, o que produziria um efeito final nulo ou pequeno, resultando, evidentemente, em uma idéia errônea do que realmente ocorre. O uso da variância elimina esta desvantagem porque, como os efeitos individuais de cada loco são elevados ao quadrado, não há possibilidade de se cancelarem.

Além disso, a variância tem outras vantagens, como permitir a obtenção de estimativas de herdabilidade e predições do ganho esperado com a seleção, o que não é possível com médias (Ramalho et al., 1993).

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

2.3 Melhoramento pelo método dos retrocruzamentos

O método do retrocruzamento é muito utilizado em introgressão de alelos de interesse de germoplasma exótico, resistência às doenças, síntese de populações e formação de isolinhas, sendo pioneiro na incorporação de caracteres provenientes de plantas transgênicas em genótipos superiores. É um método utilizado freqüentemente, com o objetivo de transferir pequenas porções genômicas de genótipos não adaptados ou espécies selvagens para genótipos elite, deficientes nestes aspectos. Essas porções genômicas, normalmente, são caracteres de controle qualitativo, como resistência a pragas e a moléstias

(Lorencetti, 2006). Seu uso pode ser eficiente, pois reduz o arraste de alelos indesejáveis (*linkage drag*) durante o processo de transferência de alelos de resistência a partir de genótipos exóticos.

O uso concomitante de marcadores moleculares, particularmente aqueles que flanqueiam o alelo de resistência, pode diminuir consideravelmente esse efeito. Especialmente, se esses marcadores forem fortemente ligados aos alelos de resistência, poderão ser utilizados na seleção assistida por marcadores moleculares (SMM), particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento. Nas etapas finais, as inoculações ou a exposição da planta ao patógeno em condições de campo são imprescindíveis para confirmar a seleção indireta feita inicialmente por meio dos marcadores.

Finalmente, os marcadores moleculares podem ser usados no processo de retrocruzamento para facilitar/acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente. Neste caso, é definido um *fingerprint* molecular do recorrente e este é comparado com aqueles obtidos das linhagens criadas ao longo do processo de melhoramento. Somente aquelas linhagens que carregam o alelo de resistência e que possuem um *fingerprint* semelhante ao do genitor recorrente são utilizadas nos próximos ciclos de retrocruzamento (Alzate-Marin et al., 1999; Faleiro et al., 2001).

Pelo retrocruzamento, características com alta herdabilidade, controladas por um ou poucos genes, são mais facilmente transferidas. A transferência de alelos dominantes é realizada mais diretamente que a de alelos recessivos. Se o alelo em transferência for recessivo, a autofecundação nas gerações ímpares torna-se essencial para a sua manifestação fenotípica e a seleção. No caso da transferência de caracteres quantitativos, o método necessita da manipulação de grandes populações e a seleção inicia-se logo na primeira geração (Borém, 2005).

Na ausência de seleção e ligação, a percentagem média de alelos do parental recorrente cresce a cada retrocruzamento, em metade da percentagem do germoplasma do parental não recorrente, que estava presente na geração anterior ao retrocruzamento (Hagiwara et al., 2001). Essa percentagem de recuperação do genoma do genitor recorrente (GR) é dada pela expressão $\%GR=100[1-(0,5)^n]$ em que n é o número de retrocruzamentos (Openshaw et al., 1994). No entanto, essa expressão ignora o fenômeno conhecido por arraste ou retenção, devido à ligação (*linkage drag*) (Brinkman & Frey, 1977), o que significa arrastamento de alelos do genoma doador para o genoma receptor. Assim, as novas linhagens formadas pelo retrocruzamento diferem não somente no gene de introgressão, mas também nos outros genes ligados a ele (Stam & Zeven, 1981).

A porcentagem de alelos do recorrente em cada geração de retrocruzamentos é um valor médio das plantas daquela geração. No retrocruzamento 1, por exemplo, esperam-se, em média, 75% de alelos do recorrente, entretanto, há a possibilidade de se obter plantas com 50% a 100% de alelos do recorrente (Benchinol et al., 2005). Assim, para reduzir o número de retrocruzamentos requeridos para recuperar o genoma dos indivíduos com maior proporção do genoma recorrente, são utilizados os marcadores moleculares para auxiliar a identificação das plantas mais semelhantes ao recorrente (Alzate-Marin et al., 1999; Faleiro et al., 2001).

Seguindo esta metodologia, Alzate-Marin et al. (2005) conseguiram obter, em três gerações de retrocruzamento, isolinhas com características fenotípicas e genotípicas altamente similares às da cultivar recorrente. O uso desse procedimento é de grande vantagem, já que, normalmente, realizam-se de cinco a seis retrocruzamentos para se obter um alto grau de recuperação do genitor recorrente.

A utilização do retrocruzamento possui algumas vantagens, como a possibilidade de condução do método fora do ambiente a que o genitor recorrente está adaptado; ótima previsibilidade do resultado; uso de cultivar já conhecida e confere características de excelência a genótipos já excepcionais. No entanto, dependendo do tempo gasto, o genitor recorrente pode se tornar ultrapassado, comprometendo o sucesso da nova versão da cultivar (Fehr, 1987). Assim, deve-se selecionar maior número de plantas semelhantes ao genitor recorrente e avaliar mais progênies com base em caracteres agrônômicos, quando se tem a chance de seleção de recombinantes superiores.

2.4 Marcadores genéticos

Os marcadores genéticos funcionam como etiquetas que identificam os genes envolvidos na herança de características de importância econômica e são repassados para o próximo descendente (Ciência e Cultura, 2002).

Os marcadores genéticos podem ser morfológicos e moleculares. Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudo de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. Entretanto, eles ocorrem em um número muito reduzido para funcionar como marcadores (Hagiwara et al., 2001).

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”. Por marcador molecular, define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma) (Borba, 2002).

Algumas das vantagens de marcadores moleculares sobre marcadores morfológicos são:

1) muito esforço e planejamento são necessários para se construir um mapa a partir de marcadores morfológicos, uma vez que um número reduzido de marcadores por linhagem restringe a cobertura do genoma. Por outro lado, um grande número de locos de marcadores moleculares pode ter seus alelos estudados em populações segregantes de cruzamentos específicos;

2) marcadores moleculares são, em geral, neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrófico, enquanto os morfológicos, muitas vezes, coíbem ou restringem o desenvolvimento normal da planta (albinos, mutantes clorofílicos) e seu controle genético pode afetar, ou ser afetado, por genes que controlam outros caracteres, dificultando a caracterização dos genótipos;

3) em geral, os marcadores moleculares são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco. Já os marcadores morfológicos são, em sua maioria, dominantes ou recessivos (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Além desses aspectos, os marcadores morfológicos apresentam, ainda, a desvantagem de serem somente identificados, na maioria dos casos, no âmbito de planta adulta. Entretanto, os moleculares podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que quantidade suficiente de DNA possa ser obtida. A identificação de genótipos em estágios iniciais de desenvolvimento da planta abre a possibilidade de acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados, reduzindo o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento, o que aumenta, consideravelmente, a eficiência do programa (Borém & Caixeta, 2006).

Os marcadores de maior utilização são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*) (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

2.4.1 Seleção assistida por marcadores para resistência ao mofo branco

O uso de seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) baseia-se no princípio de que, se um gene ou conjunto de genes está associado a um marcador molecular de fácil identificação, então, a seleção para este marcador será mais eficiente do que para a própria característica (Hayward et al., 1994). A SAMM consiste de dois passos principais: identificação de associações entre locos marcadores e QTLs e o uso destas associações para o desenvolvimento de populações melhoradas (Dudley, 1993). Entretanto, ela deve ser encarada como uma ferramenta auxiliar e não substituta dos métodos tradicionais de melhoramento (Lande & Thompson, 1990).

No processo de transferência de alelos de resistência, o uso de marcadores moleculares de DNA pode ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se estritamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAMM), particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento. Nas etapas finais, as inoculações ou exposição da planta ao patógeno em condições de campo são imprescindíveis para confirmar a seleção indireta feita inicialmente por meio dos marcadores. Os marcadores moleculares são úteis, também, se levarmos em conta que, durante o melhoramento, via de regra, são monitorados diversos tipos de genes e não somente aqueles envolvidos com a resistência. Nesse contexto, é interessante dispor de uma ferramenta de seleção que possa ser utilizada de modo direto pela simples análise da presença ou ausência de uma seqüência de DNA nas folhas das plantas que estão sendo melhoradas (Alzate-Marin, 2005).

O uso de marcadores moleculares é também justificado em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração. É o caso da resistência a nematóides, que é determinada pelo exame direto de cistos na raiz. Resistência a nematóide foi uma das primeiras características associadas a um marcador molecular (Rick & Fobes, 1974). Outra aplicação bastante concreta dos marcadores na seleção

assistida é durante o processo de piramidação de alelos de resistência. Essa é uma estratégia que vem sendo considerada como forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro (Borém & Caixeta, 2006). No entanto, na prática, é um processo extremamente difícil e trabalhoso, principalmente pela dificuldade em se identificar, de modo preciso, os sintomas de resistência após múltiplas inoculações (Ferreira, 1999). Marcadores moleculares ligados aos alelos a serem piramidados podem ser monitorados ao longo do processo de piramidação, constituindo uma ferramenta de seleção indireta, evitando as dificuldades inerentes ao processo de seleção via análise de sintomas.

Desde que ligações entre caracteres não são incomuns, tanto atração quanto repulsão foram relatadas entre marcadores associados a caracteres de resistência a doença em feijão (Haley et al., 1994). Localizado no grupo de ligação B7, em uma região que inclui os locos Phs e Asp, codificadores da proteína faseolina, o gene que condiciona brilho nas sementes é um QTL ou gene de efeito maior para resistência ao crestamento bacteriano comum (CBB), causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Miklas et al., 1996; Miklas et al., 2000).

Recentemente, QTL para resistência ao mofo branco (Miklas et al., 2001) e *Macrophomina* (Miklas et al., 1998) também foram identificados na mesma região geral. O grupo de ligação B7 também foi identificado como o local para resistência a mofo branco em duas outras populações puras recombinantes e geneticamente distintas (Park et al., 2001; Kolkman & Kelly, 2003). Estas ligações podem representar a primeira visualização de clusters gênicos de resistência em feijão (Geffroy et al., 1999; Geffroy et al., 2000; Miklas et al., 2000), como tem sido observado em outras culturas (Tamulonis et al., 1997). Como a resistência a mofo branco é condicionada por QTL, aparentemente representado por um gene de grande efeito, uma seleção assistida

por marcadores num programa de retrocruzamentos pode ser a forma mais eficaz de combinar as características de resistência fisiológica com a resistência conferida pelo gene.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido na área experimental e as análises com o SCAR Phs foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG, localizada na região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21°14'S de latitude e 45°00'W de longitude.

3.2 Cruzamentos e retrocruzamentos

Foi realizado o seguinte cruzamento: VC3 (recorrente) x G122. A cultivar VC3 está em fase final de avaliação para lançamento como cultivar. Ela é proveniente do programa de melhoramento de feijão da UFV, é do tipo Carioca com tipo de grãos superior ao das cultivares atualmente em uso, hábito de crescimento tipo III, resistente a algumas raças de *C. lindemuthianum* e alta produtividade. A linhagem G122 possui hábito de crescimento determinado (tipo I), tem origem andina com sementes alongadas tipo rajado de fundo bege e listras vinho (Singh, 1982). A linhagem G122 tem exibido resistência de campo ao mofo branco (Steadman, 1997; Steadman et al., 1999). Essa resistência de campo da linhagem G122, provavelmente, resulta da resistência fisiológica (Miklas, 2001).

Além da resistência ao mofo branco, a linhagem G122, coletada na Índia como PI 163120, é também conhecida como 'Jatu Rong' e exibe tolerância ao calor (Shonnard & Gepts, 1994). Infelizmente, ela possui várias características agrônômicas desfavoráveis, além de não ser adaptada às condições de cultivo do

estado de Minas Gerais. Porém, é considerada a fonte de resistência mais eficiente disponível, além do fato de não haver fontes adaptadas ao Brasil.

As sementes da geração F_1 , obtidas em casa de vegetação, foram semeadas para a obtenção das sementes F_2 visando obter plantas F_2 , que deram origem a famílias $F_{2,3}$. Simultaneamente, foram realizados retrocruzamentos da F_1 com o genitor recorrente (VC3) e os descendentes foram avaliados para resistência ao mofo branco, por meio do SCAR Phs desenvolvido especificamente para esse tipo de resistência (Miklas, 2005).

3.3 Reação das populações ao mofo branco por meio da solução de ácido oxálico

Foram utilizadas 80 plantas de cada genitor, 20 plantas da F_1 , 300 plantas F_2 , F_3 e 133 famílias $F_{2,3}$, totalizando 2.093 plantas. F_1 e F_2 foram avaliadas em parcelas de 10 plantas no delineamento inteiramente casualizado com duas repetições. No caso da F_2 , foram utilizadas 15 parcelas por repetição. Devido à limitação de espaço, as famílias $F_{2,3}$ foram avaliadas em oito etapas, seguindo-se os mesmos procedimentos experimentais da F_1 e F_2 . Em cada etapa, foram adicionados os dois genitores, como testemunhas comuns, cada um em duas parcelas de cinco plantas.

O experimento foi conduzido na solução de ácido oxálico, conforme sugerido por Kolkman & Kelly (2000), com algumas modificações. Para isso, foram utilizadas plantas de 20 a 28 dias de idade (quando já tinham a folha trifoliolada), que foram cortadas na base do colo do caule, à tarde, sendo a parte inferior do caule imersa em solução de ácido oxálico 20 mM (MERCK: cód. 1.00495.1000/lote 1.00495.1000) e mantida em recipiente plástico, por um período de 16 a 22 horas em ambiente protegido. A solução foi preparada com pH 4, ajustando-se com hidróxido de sódio (NaOH). O controle sem ácido

oxálico foi feito em recipiente com água destilada, no qual eram colocados os genitores.

A reação de cada planta foi determinada por meio da seguinte chave descritiva (Kolkman e Kelly 2000): 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. Estimou-se também a média de cada família $F_{2,3}$, P_1 , P_2 , F_1 e F_2 .

3.4 Análise de variância e estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos

3.4.1 Obtenção de variâncias em plantas individuais

As análises com plantas individuais foram realizadas com as seguintes populações F_1 , F_2 e os dois genitores (Tabela 1). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com duas repetições. O resultado foi obtido com a execução do procedimento PROC GLM do programa SAS (SAS Institute, 1995).

TABELA 1 Esquema da análise de variância adotada na avaliação do caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico em plantas individuais.

FV	GL	QM
Entre repetições	r-1	Q1
Entre plant./rep.	r(k-1)	Q2
Populações		Variâncias
P₁	gl₁	$\hat{\sigma}_{P_1}^2$
P₂	gl₂	$\hat{\sigma}_{P_2}^2$
F₁	gl₃	$\hat{\sigma}_{F_1}^2$
F₂	gl₄	$\hat{\sigma}_{F_2}^2$

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

$\hat{\sigma}_{P_1}^2$, $\hat{\sigma}_{P_2}^2$, $\hat{\sigma}_{F_1}^2$ e $\hat{\sigma}_{F_2}^2$: variância fenotípica dentro do genitor 1 e 2, F_1 e F_2 , respectivamente;

gl₁, gl₂, gl₃ e gl₄; graus de liberdade associados ao genitor 1 e 2, F_1 e F_2 , respectivamente.

3.4.2 Obtenção de variâncias entre e dentro de famílias F_{2:3}

A partir das variâncias dentro de cada parcela foi possível estimar a variância média dentro, a variância dentro foi estimada dessa forma, devido ao número de plantas não ser constante dentro de cada parcela. Utilizou-se a seguinte expressão proposta por Ramalho et al. (2005):

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

em que:

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

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

n: número de parcelas;

r: número de repetições.

Para estimativa da variância entre médias de famílias F_{2:3}, inicialmente, foi utilizado o delineamento de blocos aumentados com duas repetições. As médias foram ajustadas às testemunhas utilizadas em cada avaliação, já que não foi possível avaliar todas as famílias F_{2:3} de uma única vez. Posteriormente, realizou-se a análise de variâncias, utilizando-se das médias ajustadas por parcela e o delineamento em blocos casualizados com duas repetições

3.4.3 Estimativas dos componentes de média e de variância

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

Para a estimativa dos componentes de média foram utilizados os dados médios das populações F₁, F₂, F₃ e dos dois genitores. Considerou-se o modelo aditivo e dominante sem epistasia, conforme a seguinte equação:

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

Em que:

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

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

\hat{m} : estimador da média;

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

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

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

$$\begin{vmatrix} \mathbf{n}_1 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{n}_2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{n}_3 & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{n}_4 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{n}_5 \end{vmatrix}$$

N =

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

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

$$\begin{array}{|ccccc|} \hline \hat{\sigma}_{P_1}^2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \hat{\sigma}_{P_2}^2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \hat{\sigma}_{F_1}^2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \hat{\sigma}_{F_2}^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \hat{\sigma}_{F_3}^2 \\ \hline \end{array}$$

S =

Y: vetor dos valores médios observados, dado por:

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

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

$$C = \begin{vmatrix} \mathbf{1} & \mathbf{1} & \mathbf{0} \\ \mathbf{1} & \mathbf{-1} & \mathbf{0} \\ \mathbf{1} & \mathbf{0} & \mathbf{1} \\ \mathbf{1} & \mathbf{0} & \mathbf{1/2} \\ \mathbf{1} & \mathbf{0} & \mathbf{1/4} \end{vmatrix}$$

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

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

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

C é a matriz do modelo:

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

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

$$N = \begin{vmatrix} \mathbf{gl}_1 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{gl}_2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{gl}_3 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{gl}_4 & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{gl}_5 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{gl}_6 \end{vmatrix}$$

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

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

Em que:

p: número total de parcelas;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Em que :

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

Q_1 e Q_2 : já definidos acima.

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

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

$$k = \frac{(\bar{C}_1 - \bar{C}_2)^2}{8\hat{\sigma}_{F2}^2 - \hat{\sigma}_e^2}$$

Em que:

\bar{c}_1 : média do genitor 1;

\bar{c}_2 : média do genitor 2;

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

σ_E^2 : variância ambiental.

3.5 Extração de DNA

De cada uma das 53 plantas do F_1RC_1 obtidas e também dos dois genitores foram extraídos o DNA, de acordo com o procedimento descrito por Nienhuis et al. (1995) com algumas modificações.

Foram usadas amostras de cerca de 2 gramas de folhas jovens, trituradas com 10 ml de tampão de extração e 20 μ l de β -mercaptoetanol em um almofariz com nitrogênio líquido. O tampão de extração é constituído de 2% de CTAB, 100mM de TRIS (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O material triturado foi incubado por 30 minutos em tubos de centrífuga e colocados em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria, os ácidos nucléicos foram extraídos com 10 ml da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1). Durante o banho-maria, os tubos foram agitados levemente e, depois de centrifugados, para separar a fase orgânica da aquosa, foi coletado o sobrenadante, que contém os ácidos nucléicos. Estes foram precipitados pela adição de 30 ml da mistura de etanol 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e mantidos em um freezer, a -20°C, por uma noite. Após a precipitação, os ácidos nucléicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorf, centrifugados e secos. Em seguida, os ácidos nucléicos foram reidratados em tampão TE (1mM de TRIS e 0,1mM de EDTA).

Foi realizada a segunda extração com clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e os ácidos nucléicos do sobrenadante foram precipitados pela adição de, pelo

menos, três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M:etanol 95% (1:20). Os ácidos nucleicos precipitados foram reidratados em tampão TE e o DNA foi quantificado, usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO 100 e, posteriormente, diluído para a concentração de 10ng/ μ l, utilizado na reação com o SCAR.

3.6. Processo de amplificação de DNA e eletroforese

Cada reação com o SCAR Phs foi preparada em um volume de 12 μ l, misturando-se os seguintes reagentes com as respectivas concentrações (Nienhuis et al., 1995): 20ng de DNA genômico, 100 μ M de cada um dos disoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase, 2,25 μ l de *primer*, 1,00 μ l de tampão de reação (50mM tris pH 8,3; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM de KCl; 10 μ g de BSA; 0,25% de ficol 400; 10mM de tartazine) e água bidestilada até totalizar 12 μ l. As amplificações foram realizadas em tubos de 0,2 ml em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, por meio do seguinte programa: uma etapa de 2 minutos, a 94°C, para a desnaturação inicial; 15 segundos para desnaturação a 94°C ; 30 segundos para anelamento do *primer* a 37°C e 30 segundos para extensão a 72°C. Por fim, uma etapa de 2 minutos, a 72°C, para extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1%, em tampão TBE (0,045 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA), a 80V, por três horas e meia. Posteriormente, foram corados com brometo de etídio à concentração de 0,5 μ l/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados em câmera digital Kodak.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Uso de médias e variâncias em plantas individuais

O método do ácido oxálico foi eficiente para detectar diferenças genótípicas entre cultivares (resistente e suscetível) em resposta ao ácido oxálico (Tabela 2). Os dois genitores diferiram na expressão do caráter. A linhagem G122 recebeu, em média, nota 1,58 e a cultivar VC3 recebeu, em média, nota 3,14. Em experimento realizado por outros autores (Kolkman & Kelly, 2000), em ensaios com variações de temperatura, a linhagem G122 recebeu as seguintes notas: 3,13 (teste com temperaturas entre 24° a 40°C), 1,92 (teste com temperaturas entre 21,5° a 26°C) e 2,33 (teste com temperaturas entre 22,5° a 26,5°C), com média entre testes de 2,47. Essas diferenças entre os testes e as notas obtidas pelo presente estudo indicam a influência do ambiente que afeta a estimativa de resistência ao ácido oxálico, bem como a importância de incluir cultivares conhecidamente resistentes e suscetíveis como testemunhas em cada experimento. No trabalho realizado por esses autores, o controle do experimento não apresentou sintomas de murcha, indicando a importância do ácido oxálico no aparecimento de sintomas de murcha. O mesmo ocorreu no presente estudo, ou seja, o controle não apresentou nenhum sintoma.

TABELA 2 Resumo da análise de variâncias de notas do teste de ácido oxálico entre genótipos parentais.

FV	GL	QM
Entre	1	97,656**
Dentro	158	0,918
CV(%)		40,66%
Média		2,36

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

Kolkman & Kelly (2000) também observaram que resistência ao ácido oxálico é um mecanismo específico de resistência que pode trabalhar individualmente ou, mais provavelmente, em combinação com uma série de mecanismos de escape da planta ou mecanismos fisiológicos, para proporcionar níveis consistentes de resistência ao mofo branco.

O resumo da análise de variância das notas dadas ao caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico está apresentado na Tabela 3. O efeito das populações foi altamente significativo, evidenciando a existência de variabilidade genética entre populações ($P \leq 0,01$). Embora tenha sido detectada elevada diferença genética entre populações, nota-se um coeficiente de variação elevado (CV%), conseqüentemente, há a sensibilidade do caráter a vários fatores. Entre eles, estão, principalmente, os fatores que afetam o desenvolvimento das plantas jovens antes do tratamento com o ácido, bem como temperatura e adaptação dos genótipos. Kolkman & Kelly (2000) encontraram coeficientes de variação de 14,10 a 20,30, em trabalho realizado com ácido oxálico em estudos com feijão, em temperaturas controladas.

TABELA 3 Análise de variância de indivíduo, do caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico, nas gerações F₁ e F₂ do cruzamento G122 e VC3.

FV	GL	QM
Repetição	1	17,1125
Tratamento	3	20,0656**
Erro	3	2,2064
Dentro de P₁	78	0,5765
Dentro de P₂	78	1,1259
Dentro de F₁	18	0,1974
Dentro de F₂	298	1,1536
CV(%)		48,80
Média		2,23

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

As notas médias das populações avaliadas estão apresentadas na Tabela 4, assim como as estimativas dos componentes de média. Primeiramente, os dados se ajustaram ao modelo aditivo dominante, R^2 praticamente de 100%, embora o χ^2 tenha sido significativo. O genitor resistente foi utilizado como P_1 e o suscetível como P_2 e todas as estimativas foram diferentes de zero. Os efeitos aditivos apresentaram valores negativos e altamente significativos ($P \leq 0,01$). Sua magnitude foi duas vezes maior que os efeitos de dominância, sugerindo sua grande contribuição para a resistência ao ácido oxálico. Os efeitos gênicos de dominância, representados pelo componente d , que mede o desvio do heterozigoto em relação à média, foi significativamente diferente de zero e também teve valores negativos. Como seu valor foi negativo, os efeitos de dominância são no sentido de reduzir o murchamento causado pelo ácido oxálico. No entanto, este componente teve uma reduzida significância ($P \leq 0,05$). A sua contribuição para diminuir o murchamento e, dessa forma, pode ser considerada de menor importância que os efeitos aditivos. A média dos genitores é 2,36 (Tabela 2), nitidamente superior à média da F_1 . A média da F_2 é intermediária entre a média dos genitores e da F_1 , caracterizando a dominância parcial. As magnitudes dessas médias são compatíveis com o grau médio de dominância ($d/a = 0,47$). A predominância dos efeitos aditivos foi também certificada em colza e girassol, no controle do desenvolvimento da lesão na parte aérea provocada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Baldini et al., 2004; Zhao et al., 2004).

Em trabalho realizado com girassol utilizando micélio de *S. sclerotiorum* (Castaño et al., 2001), todas as estimativas foram significativamente diferentes de zero, o efeito aditivo ($a = -0,34 \pm 0,08$) foi negativo e altamente significativo. Os efeitos genéticos de dominância também foram negativos ($d = -0,39 \pm 0,23$), indicando que os efeitos de dominância são no sentido de reduzir as áreas lesionadas. Sua magnitude foi muito similar aos efeitos aditivos, no entanto, de

menor importância. Essa comparação mostra que a avaliação indireta por meio do ácido oxálico está de acordo com as avaliações feitas com micélio fúngico e que pode ser utilizada em avaliações de resistência a mofo branco. Os efeitos de dominância e suas interações epistáticas são de menor importância nas espécies autógamas (Brim & Cockerham, 1961). As técnicas de melhoramento que se beneficiam da alta variância aditiva e da interação aditiva x aditiva, para a obtenção de ganhos genéticos, são mais importantes no melhoramento do feijão, por ser esta uma espécie autógama. Como, neste trabalho, os efeitos aditivos foram significativos, os ganhos preditos para a resistência do feijoeiro ao ácido oxálico produzido pelo patógeno *S. sclerotiorum* poderão ser alcançados.

TABELA 4 Médias e variâncias das populações avaliadas e suas respectivas estimativas para o caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico obtidas do cruzamento G122 x VC3.

Médias			
Populações	Observada	Esperada	Variância
G122	1,58	1,40	0,5765
VC3	3,14	3,14	1,1259
F₁	1,25	1,40	0,2056
F₂	2,02	2,14	1,1283
F₃	2,52	2,51	0,9651
Componentes de médias			
	Estimativa	Erro padrão	Prob.> T
\hat{m}	2,88	0,08	0,0008
\hat{a}	-3,14	0,29	0,0085
\hat{d}	-1,48	0,20	0,0184
d/a	0,47		
χ^2	10,75		0,0046
R^2 (%)	99,94		-

Para as estimativas dos componentes de variância (Tabela 5), o ajuste ao modelo também foi bom (R^2 de 98,67); também aqui o χ^2 foi significativo. A variância de dominância foi de magnitude muito inferior à variância aditiva. A relação encontrada foi de 11 vezes, embora o erro associado à estimativa tenha sido muito superior, como geralmente ocorre com variâncias.

Especialmente neste estudo, a variância ambiental entre plantas foi muito elevada no genitor suscetível (VC3), salientando a sensibilidade do caráter ao ambiente. Depreende-se, assim, a dificuldade da seleção de plantas resistentes em populações segregantes. Assim, o melhorista deve optar pela avaliação de progênies com maior número de plantas, quando se espera maior ganho com a seleção.

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo e restrito foram de 0,33 e 0,30, respectivamente. Estas herdabilidades, embora de baixa magnitude, são suficientes para sugerir que a resistência pode ser efetivamente selecionada pelo método do ácido oxálico. Elas estiveram entre as reportadas por Kim (2000) que estimou a herdabilidade em populações derivadas de F_3 ($h_a^2 = 0,30$ a $0,71$) para índice de severidade de doença (ISD). Em três populações derivadas de linhagem andina (G122), estimativas h_r^2 para ISD variaram de 0,65 (Straw test) a 0,78 (teste de campo) (Miklas et al., 2001; Park et al., 2001), enquanto que as estimativas variaram de 0,62 (campo) a 0,73 (*straw test*), em uma população de feijão vagem (Miklas et al., 2003). A vasta gama de estimativas de herdabilidade para resistência ao mofo branco sugere que a herança ao caráter é influenciada pelo genótipo parental, pelos procedimentos empregados no teste, pela severidade de doença na avaliação, bem como a interação de fatores ambientais e agronômicos.

Observou-se, também, que apenas um gene de resistência está envolvido. No entanto, segundo Ramalho et al. (1993), a determinação precisa do número

de genes é muito difícil de ser obtida, principalmente em função do efeito do ambiente na manifestação do caráter, como no presente estudo. Por essa razão, o que se procura é uma estimativa aproximada desse número. A identificação de um QTL de efeito relativamente grande (em torno de 37%), detectado por Miklas et al. (2001), está de acordo com essa estimativa. No entanto, sabe-se que o controle genético ao mofo branco, em campo, é qualitativo e muito influenciado pelo ambiente (Castaño et al., 1993), ainda que, em campo, haja combinação de um grande número de mecanismos de escape agrônômicos, bem como genéticos e não devidos ao ácido oxálico, relacionados à defesa da planta à *S. sclerotiorum*.

TABELA 5 Estimativas dos componentes de variância do caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico obtidas do cruzamento G122 x VC3, a partir dos dados de plantas individuais.

Componentes de variâncias					
Parâmetros	Estimativas	Erro	LI¹	LS²	Prob.> T
$\hat{\sigma}_A^2$	0,3474	0,2169	0,2904	0,4231	0,2505
$\hat{\sigma}_D^2$	0,0300	0,4983	0,0268	0,0340	0,9574
$\hat{\sigma}_e^2$	0,7763	0,1908	0,6763	0,9004	0,0555
$\hat{\sigma}_b^2$	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-
χ^2	16,73				0,0002
R^2 (%)	98,67				

LI¹: Limite inferior; LS²: Limite superior; $\hat{\sigma}_A^2$: Variância genética dos efeitos aditivos; $\hat{\sigma}_D^2$: Variância genética dos efeitos de dominância; $\hat{\sigma}_e^2$: Variância ambiental; $\hat{\sigma}_b^2$: Variância ambiental entre médias de famílias F_{2,3}.

4.2 Avaliação das famílias segregantes (F_{2,3})

A análise de variância das notas dadas ao caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico, das famílias F_{2,3}, está apresentada na Tabela 6. O coeficiente de variação (CV%) foi de 25,18%, bem menor que as estimativas obtidas com plantas individuais (Tabela 2 e 3) e semelhantes aos encontrados por Kolkman e Kelly (2000). Em princípio, esse resultado evidencia a maior eficiência na avaliação, considerando média de progênies.

Foi possível detectar diferença genética significativa entre famílias (P≤0,01). A herdabilidade no sentido amplo, para médias de famílias, foi de 0,47, com intervalo de confiança de 0,26 a 0,64, superior à obtida em plantas individuais (0,33). Em trabalho semelhante com linhagens derivadas de F₃ do cruzamento entre as cultivares Bunsí (Ex Rico 23) x Newport e Huron x Newport, Kolkman & Kelly (2003) encontraram estimativas de herdabilidade para resistência ao ácido oxálico de 0,19 (intervalo de confiança: 0 a 0,37) consideradas baixas por esses autores a 0,56 (intervalo de confiança: 0,18 a 0,73) consideradas moderadas, para as populações respectivamente.

TABELA 6 Análise de variância do caráter reação do feijoeiro ao ácido oxálico, obtida nas avaliações de famílias F_{2,3} do cruzamento G122 x VC3.

F.V.	GL	QM
Repetição	1	0,1504
Progênies	132	0,8069**
Resíduo	132	0,4241
Total	265	-
Média		2,59
C.V.(%)		25,18
Estimativas de parâmetros		
Var. fenotípica		0,4035
Var. ambiental		0,2121
Var. genotípica		0,1914
Herdabilidade amplo		0,4744

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

Embora as estimativas de herdabilidade para resistência fisiológica tenham sido geralmente de baixa a moderada (Miklas et al., 2001; Park et al., 2001), a seleção de genótipos resistentes, como ao ácido oxálico, é importante para garantir o ganho genético livre de outros fatores, que se espera em avaliações de campo e que também contribuem para a resistência, como o porte arbustivo. Em avaliações de campo, Miklas et al. (1992a) encontraram, em populações derivadas de Ex Rico 23, estimativas de herdabilidade de magnitude moderada a alta ($h_a^2 = 0,58$ a $0,77$). Segundo os autores, a amplitude dessas estimativas foi influenciada pelo genótipo parental e pelas interações entre fatores ambientais e agronômicos. Como a resistência ao mofo branco é altamente influenciada pelo ambiente, várias avaliações em diferentes localizações são recomendadas para garantir diferenciações entre linhagens mais eficazes em populações segregantes.

4.3 Uso do SCAR Phs para a seleção de plantas com o QTL para resistência ao mofo branco

O marcador foi eficiente em identificar as plantas possivelmente portadoras do QTL na população RC₁. Entre as 53 plantas RC₁, somente 26 ($\chi^2 = 0,02$; P = 0,89) foram selecionadas pelo SCAR, por possuírem a banda para resistência ao mofo branco. As plantas selecionadas foram as de nº. 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 39, 40, 41, 45, 49, 50 e 53 (Figura 1). As plantas sem a banda do G122 que não foram selecionadas, provavelmente, não possuem o QTL. A banda derivada do genitor resistente G122 possui cerca de 285 pb e explica 38% da variação fenotípica para resistência ao mofo branco, baseado no teste do canudo (*straw test*) (Miklas et al., 2001; Miklas, 2007). Essa banda foi amplificada pelo par de *primer* Phs (SCAR), cuja seqüência é: 5' AGCATATTCTAGAGGCCTCC3' e

5'GCTCAGTTCCTCAATCTGTT3'. Esse *primer* amplifica parte do alelo para faseolina T presente em feijão de origem andina (Kami et al., 1995), como é o caso do G122. O alelo da faseolina T está mapeado no grupo de ligação B7 de *P. vulgaris* (Freyre et al., 1998).

O QTL identificado pelo SCAR Phs condiciona resistência fisiológica (Miklas et al., 2001) e, provavelmente, é também a resistência exibida pelo G122 ao ácido oxálico. Em avaliações realizadas por Miklas (2007), com o teste do canudo em casa de vegetação, o QTL explicou 52% da variação fenotípica e apenas 10 %, em média, em quatro avaliações de campo.

Além dessa resistência, o hábito determinado do G122 condicionado pelo alelo *fin* explicou 34% da variação fenotípica para resistência de campo em *S. sclerotiorum*. Esse alelo está localizado no grupo de ligação B1 de *P. vulgares* e, segundo Miklas et al. (2001), as resistências condicionadas pelo hábito determinado e pelo QTL identificado pelo SCAR Phs devem ter efeitos independentes. Entretanto, no campo, não foi notado efeito completamente aditivo das duas fontes de resistência, embora não tenha sido detectada interação das mesmas. Os autores advertem que, nas avaliações de campo, a menor quantidade de doença nas plantas de hábito determinado ocorreu devido às plantas terem menor desenvolvimento e, conseqüentemente, menor produção de grãos. Por isso, sugerem que, na seleção, devem ser consideradas não só a resistência como também a maior produção.

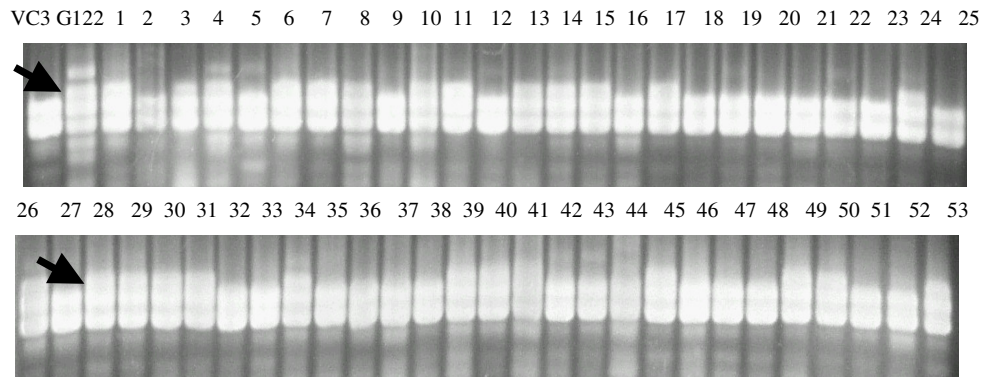


FIGURA 1 - Análise de eletroforese dos produtos de amplificação dos DNAs da F_1RC_1 com o SCAR Phs. A seta indica o marcador do genitor resistente G122. As canaletas correspondem a: VC3 genitor recorrente, G122 genitor doador e (1 a 25) plantas F1RC1.

5 CONCLUSÕES

O controle genético foi caracterizado por dominância parcial, com predomínio dos efeitos aditivos. Pelo menos um gene de resistência está envolvido, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente.

A herdabilidade no sentido amplo, ao nível de médias de famílias, foi superior à obtida ao nível de plantas individuais, evidenciando que a seleção deve ser mais eficiente com base em avaliações de média de progênie.

O marcador foi eficiente em identificar as plantas possivelmente portadoras do QTL na população RC₁.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. de F. B. Cultivo do feijão da primeira e segunda safra na região Sul de Minas Gerais. **Sistemas de Produção**, Santo Antônio de Goiás, n. 6, dez. 2005. Disponível em: <<http://sistemaproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/doencas.htm>>. Acessado em: 15 out. 2007.

AIDAR, H. Cultivo do feijoeiro comum. **Sistemas de Produção**, **Sistemas de Produção**, Santo Antônio de Goiás, n. 2, jan. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acessado em: 2 de agosto de 2007.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul./ago. 2005.

ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M. R.; DIAS, I. S. N. Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares visando acelerar a introgressão de genes de resistência à antracnose do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1999, Salvador. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA/CNPAF-APA, 1999. p. 62-64, 1999.

BALDINI, M.; VISCHI, M.; TURI, M.; DI BERNARDO, N.; RARANCIUC, S.; ECHEVERRIA, M.; CASTAÑO, F.; VANNOZZI, G. P.; OLIVIERI, A. M. Evaluation of genetic for *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary resistance in a F₂ population from a cross between susceptible and resistant sunflower. **Helia**, Helsinki, v. 27, n. 40, p. 159-170, 2004.

BARY, A. de. Ueber einige Sclerotinien and Sclerotien-krankheiten. **Botanische Zeitung**, v. 44, p. 377-474, 1886.

BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase uring pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, n.2, p.204-211, Feb. 1965.

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

- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 9, n. 3, p. 218–224, Sept. 1987.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 1-16, Jan. 2006.
- BORBA, V. S. **Marcadores Moleculares**: classificação e aplicação. Trabalhos 2002. <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>>. Acessado em: 04 dez. 2007.
- BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: JARD, 2006. 384 p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa, MG : UFV, 2005. p. 243 – 264.
- BRIM, C. A.; COCKERHAM, C. C. Inheritance of quantitative characters in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 1, n. 3, p. 187-190, May/June 1961.
- BRINKMAN, M. A.; FREY, K. J. Yield component analysis of oat isolines that produce different grain yields. **Crop Science**, Madison, v. 17, n.1, p. 165-168, Jan./Feb. 1977.
- CARDOSO, J. E. Mofo branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 111-122.
- CASTAÑO, F.; VEAR, F.; LABROUHE, D. T. de. The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* measured by mycelium infections combined with ascospore tests. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 373–380, 2001.
- CASTAÑO, F.; VEAR, F.; TOURVIEILLE, D. Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. **Euphytica**, Dordrecht, v. 68, n. 1-2, p. 85-98, 1993.

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.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa, MG: UFV, 2001. 390 p.

DAVIES, J. M. L.; GLADDERS, P.; YOUNG, C.; DYER, C.; HIRON, L.; LOCKE, T.; LOCKLEY, D.; OTTWAY, C.; SMITH, J.; THORPE, G.; WATLING, M. Petal culturing to forecast *Sclerotinia* stem rot in winter oilseed rape: 1993–1998. **Aspects of Applied Biology**, New Jersey, v. 56, n. 2, p. 129–134, 1999.

DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 3, p. 660–668, May/June 1993.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; CARVALHO, G. A.; PAULA JUNIOR, T. J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular marker-assisted backcrossing. **Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 44, p. 109–110, 2001.

FEHR, W. R. **Principles of Cultivar Development**: theory and technique. New York: Macmillan, 1987. v. 1.

FEHR W. R.; CAVINESS C. E.; BURMOOD D. T.; PENNINGTON J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 4, p. 929–931, July/Aug. 1971.

FERRAR, P. H.; WALKER, J. R. L. O – Diphenol oxidase inhibition – an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 43, n. 6, p. 415–422, Dec. 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 28, n. 166, nov. 1995.

FERREIRA, C. F.; BOREM, A.; BARROS, E. G.; CARVALHO, G. A.; MOREIRA, M. A.; SILVA, N. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene

de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 247-252, fev. 1999 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid = S0006-87051999000200004 &lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 04 fev. 2008.

FERREIRA, D. F.; ZAMBALDE, A. L. Simplificação de algumas técnicas especiais da experimentação agropecuária no MAPGEN e softwares correlatos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFORMÁTICA, 1997, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Informática, 1997. p. 285-291.

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

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

GEFFROY, V.; SICARD, D.; OLIVEIRA, J. C. F. de; SÉVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 12, n. 9, p. 774–782, Sept. 1999.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; DE OLIVEIRA, J.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; THOQUET, P.; GEPTS, P.; LANGIN, T. and DRON, M. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of QTL with genes involved in specific resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 3, p. 287–296, Mar. 2000.

GODOY, G.; STEADMAN, J. R.; DICKMAN, M. B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, n. 3, p. 179–191, Sept. 1990.

GRAU, C. R.; RADKE, V. L.; GILLESPIE, F. L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, n. 5, p. 506–508, May 1982.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 3703–3711, May, 2004.

HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B. dos; CARMO, S. L. M. do. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 335-362, Oct./Dec. 2001.

HAYWARD, M. D.; McADAM, N. J.; JONES, J. G.; EVANS, C.; EVANS, G. M.; FORSTER, J. W.; USTIN, A.; HOSSAIN, K. G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J. K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, Dordrecht, v. 77, n.3, p.269-75, 1994.

HALL, R.; PHILLIPS, L. G. Field evaluation of the straw test for assessing resistance of dry bean to white mold. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 41, n. 2, p. 171–172, 1998.

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

HALEY, S. D.; AFANADOR, L.; KELLY, J. D. Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 2, p. 157–160, Feb. 1994.

HODGKINSON, A. Oxalic Acid in Biology and Medicine. **JSTOR: The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 53, n.4, p. 503-504, 1977.

HUNTER, J. E.; DICKSON, M. H.; CIGNA, J. A. Limited-term inoculation: a method to screen bean plants for partial resistance to white mold. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 4, p. 414-417, Apr. 1981.

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

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

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

KIM, H. S.; SNELLER, C. H.; DIERS, B. W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 1, p. 64-68, Jun./Feb. 1999.

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

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

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

KOLKMAN, J. M.; KELLY, 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./Feb. 2000.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Baltimore, v. 124, n. 3, p. 743-56, Mar. 1990.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VALERIO, P.; HARTWIG, I.; MARCHIORO, V. S. M.; VIEIRA, E. A. Backcross as a strategy to identify genotypes and develop promising oat segregating populations. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-478200600040012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 dez. 2007.

LUMSDEN, R. D.; DOW, R. L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 6, p. 708–715, June 1973.

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

MARCIANO, P.; DI LENNA, P.; MAGRO, P. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 22, n. 3, p. 339–345, 1983.

MARCADORES genéticos evitam surpresas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 54, n. 1, 2002. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252002000100004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 nov. 2007.

MAXWELL, D. P.; LUMSDEN, R. D. Oxalic acid production by *S. sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 11, p. 1395–1398, Nov. 1970.

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

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

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

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

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

- MIKLAS, P. N.; LARSEN, R. C.; RILEY, R.; KELLY, J. D. Potential marker-assisted selection for *bc-1²* resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 116, n. 3, p. 211–219, 2000.
- MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; HANNAN, R.; DICKSON, M. H. Using a subsample of the core collection to identify new sources of resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 569–573, Mar./Apr. 1999.
- MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; KELLY, J. D.; SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. Registration of four white mold resistant dry bean germplasm lines: I9365-3, I9365-5, I9365-31, and 92BG-7. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 6, p. 1728, Nov./Dec. 1998.
- MIKLAS, P. N.; JOHNSON, E; STONE, V. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 5, p. 1344-1351, Sept./Oct. 1996.
- MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; NELSON, B. D. Screening for Partial Physiological Resistance to White Mold in Dry Bean Using Excised Stems. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 2, p. 321-327, Mar. 1992a.
- MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; SECOR, G. A.; MCCLEAN, P. E. Use of pathogen filtrate to differentiate physiological resistance of dry bean to white mold disease. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 2, p. 310–312, Mar./Apr. 1992b.
- NAKAGAWA Y.; SHIMAZU K.; EBIHARA, M.; NAKAGAWA, K. *Aspergillus niger* pneumonia with fatal pulmonary oxalosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 5, n. 2, p. 97–100, 1999.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, Mar. 1995.
- NOYES, R. D.; HANCOCK, J. G. Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 18, n. 2, p. 123–132, 1981.

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

OLIVEIRA, J. R. de. Podridões de sementes, tombamentos, podridões de raízes e colo. **Wiki – Main**, São Paulo. Disponível em: <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r783101411.html>>. Acessado em: 15 jun. 2007.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.). **Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Data**. Corvallis: Oregon State University, 1994.

PARK, S. O.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R.; SKROCH, P. W. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**, Madison, v.41, n. 4, p. 1253-1262, July/Aug. 2001.

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

PIERSON, P. E.; RHODES, L. H. Effect of culture medium on the production of oxalic acid by *Sclerotinia trifoliorum*. **Mycologia**, New York, v. 84, n. 3, p. 467-469, May/June 1992.

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

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

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

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

RICK, C. M.; FOBES, J. F. Association of aeun allozyme with nematode resistance. **Reporter Tomato Genetic**, New York, v. 25, n. 5, p. 25-27, 1974.

ROWE, D. E. Oxalic acid effects in exudates of *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* and potential use in selection. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1146–1149, Nov./Dec. 1993.

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

SINGH, S. P. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 25, p. 92–95, 1982.

SHONNARD, G. C.; GEPTS, P. Genetics of heat tolerance during reproductive development in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 2, p. 1168–1175, Mar./Apr. 1994.

SOUZA, T. P. de; CARNEIRO, F. F.; ANTONIO, R. P.; SANTOS, J. B. dos. Modo de infecção do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em folha de feijão. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2007, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007.

STAM, P.; ZEVEN, A. C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. **Euphytica**, Dordrecht, v. 30, n.2, p. 227-238, 1981.

STEADMAN, J. R. 1996 White mold (*Sclerotinia*) of bean nursery summary. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 40, p.142, 1997

STEADMAN, J.R.; RAND, R.E.; JAMES, R.V.; STEVENSON, R.W.; KOLKMAN, J.M.; KELLY, J.D.; MYERS, J.R.; MAINZ, R.. Bean white mold nursery. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 49–50, 1999.

TAMULONIS, J. P.; LUZZI, B. M.; HUSSEY, R. S.; PARROT, W. A.; BOERMA, H. R. DNA markers analysis of loci conferring resistance to peanut root- knot nematode in soybean. **Theoretical and applied Genetics**, Berlin, v. 95, n.4, p. 664-670, Sept. 1997.

THOMPSON, C.; DUNWELL, J. M.; JOHNSTONE, C. E.; LAY, V.; RAY, J.; SCHMITT, M.; WATSON, H.; NESBET, G. Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. **Euphytica**, Dordrecht, v. 85, n. 1/3, p. 169–172, 1995.

TOLÊDO-SOUZA, E. D. de; COSTA, J. L. da S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 2, p. 57-63, jul./dez. 2003.

TU, J. C. Oxalic acid induced cytological alterations differ in beans tolerant or susceptible to white mould. **New Phytologist**, Cambridge, v. 112, n. 4, p. 519–525, Aug. 1989.

TU, J. C. Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. **Plant Physiology and Plant**, v. 26, p. 111–117, 1985.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR CORRALES, M. A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali: CIAT, 1987. 53 p.

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/June 2004.

WEGULO, S. N.; YANG, X. B.; MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1264–1270, Oct. 1998.

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

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

ZHOU, T.; BOLAND, G. J. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 21, n. 2, p. 93–99, Mar. 1999.