



LETÍCIA APARECIDA DE CASTRO LARA

**QTLs DE FEIJÃO PARA RESISTÊNCIA AO
MOFO-BRANCO DE CULTIVARES
ADAPTADAS**

LAVRAS – MG

2013

LETÍCIA APARECIDA DE CASTRO LARA

**QTLs DE FEIJÃO PARA RESISTÊNCIA AO MOFO-BRANCO DE
CULTIVARES ADAPTADAS**

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

Orientador

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lara, Leticia Aparecida de Castro.

QTLs de feijão para resistência ao mofo-branco de cultivares adaptadas / Leticia Aparecida de Castro Lara. – Lavras: UFLA, 2013.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Melhoramento de plantas. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3. Ácido oxálico. 4. *Straw test*. 5. Marcadores moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

LETÍCIA APARECIDA DE CASTRO LARA

**QTLs DE FEIJÃO PARA RESISTÊNCIA AO MOFO-BRANCO DE
CULTIVARES ADAPTADAS**

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

APROVADA em 16 de julho de 2013.

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza	UFLA
Prof. Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Prof. Dr. Marcio Balestre	UFLA
Profa. Dra. Rafaela Priscila Antonio	UFERSA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

LAVRAS – MG

2013

A Deus e Nossa Senhora Aparecida, que guiam meus caminhos...

OFEREÇO

Aos meus pais, José Maurício e Liberaci, pelo amor e apoio incondicional;

Aos meus irmãos que tanto amo, Renato e Lais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por permitirem que mais esta etapa fosse concretizada e por se fazerem sempre presentes em minha vida;

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia, ao Laboratório de Genética Molecular, pela oportunidade de realização do mestrado e estrutura concedida para realização desse trabalho;

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro;

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos, pelos ensinamentos, e conhecimentos transmitidos para meu crescimento pessoal e profissional;

A todos os professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas, pelas excelentes aulas ministradas;

Às Professoras; Elaine Souza e Rafaela Antonio e ao Professor Marcio Balestre, pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições;

Ao Professor Marcio Balestre, pela ajuda nas análises genotípicas;

Ao Lamartine, por ser um amigo e um grande incentivador durante esse tempo;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular da UFLA; Igor, Filipe, Paulinho, Danuza, Lucas, Juliana Veloso, Juliana Andrade, Monik, Chadreque, Luis Fernando, Dyanna, Izabel, Héliida, Ana Carolina e Baiano. Sem a ajuda de vocês eu certamente não conseguiria!

Aos amigos do Programa de Genética e Melhoramento, em especial à Sussu, à Gaby, ao Marcinho e ao Kaio;

A todos os meus amigos (de Lavras, Divinópolis, Santo Antônio do Monte e São Tiago);

Às meninas da República Limão Doce (Iara, Leleca e Ariane);

À turma do 3º andar do “predinho” da caixa d’água azul;

À Evellyn, Joyce, Gi, Bruna, Gabriel e Márcia. Muito obrigada pela amizade e companheirismo!

Aos meus pais, José Maurício e Liberaci e aos meus irmãos Renato e Lais, pelo apoio incondicional durante todas as etapas na minha vida e por acreditarem em minha capacidade. Obrigada pelo exemplo de vida indispensável em minha formação!

E que tudo o que aprendi não seja obstáculo à humildade, mas sim incentivo para a realização de grandes sonhos.

"A cada dia Deus nos dá uma tela nova:
quem escolhe as cores somos nós."

Frei Clemente Kesselmeier

RESUMO

Os objetivos com este trabalho foram avaliar a reação de progênies de feijão, oriundas do cruzamento entre as linhagens CNFC 9506 e RP-2, por meio de dois testes comumente utilizados, o ácido oxálico e o *straw test*, bem como identificar marcadores SSR, AFLP e SRAP ligados à QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de resistência ao mofo-branco. Foi extraído o DNA de 186 plantas F₂ e dos genitores, para a avaliação molecular com primers SSRs, AFLPs e SRAPs polimórficos. Para análise no ácido oxálico foram realizados 15 experimentos, sendo avaliadas 186 progênies F_{2:4}, a geração F₁, a geração F₂, e como tratamentos comuns as linhagens CNFC 9506, RP-2 e G122. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em ambiente controlado. Para análise no *straw test* foram avaliadas 186 gerações F_{2:4} e dez linhagens, em delineamento de látice triplo, 14 x 14. As médias ajustadas das avaliações referentes à geração F_{2:4} foram utilizadas para identificação de QTLs pela análise Bayesiana *shrinkage*. Os valores das frequências fenotípicas foram submetidos ao teste χ^2 para verificar se houve segregação distorcida em relação à esperada. Observou-se a existência de diferenças significativas entre as progênies para reação ao mofo-branco tanto por meio do ácido oxálico quanto pelo *straw test*. Dentre os 59 marcadores utilizados, somente 13 segregaram como o esperado, quatro SSRs, seis AFLPs e três SRAPs. Na identificação de QTLs pelo método do ácido oxálico, 25 marcadores identificaram QTLs para resistência ao mofo-branco, sendo 16 SSRs, sete AFLPs e dois SRAPs. Na identificação de QTLs pelo método do *straw test*, 17 marcadores identificaram QTLs para resistência ao mofo-branco, sendo 13 SSRs e quatro AFLPs. Dentre os marcadores avaliados, 12 identificaram QTLs em ambos os métodos, sendo todos SSRs. A não coincidência de QTLs pode ser explicada pela baixa correlação genotípica entre as avaliações do ácido oxálico e do *straw test*. Neste trabalho, houve uma correspondência de apenas 40% dos marcadores entre os testes. No caso da resistência ao mofo-branco, a identificação de QTLs por diferentes marcadores é mais um indicativo de que há mecanismos diferentes de resistência envolvidos no controle da doença. Os marcadores BM184, BM211, PV-gaat001 são mais promissores para a SAM utilizando o método do ácido oxálico. Os marcadores ME1 e BM211 são mais promissores para a SAM utilizando o método do *straw test*. O marcador BM211 se destaca para a SAM, considerando ambos os métodos avaliados simultaneamente.

Palavras-chave: Melhoramento de Plantas. *Sclerotinia sclerotiorum*. Ácido Oxálico. *Straw test*. Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

The objectives of this work were to evaluate the reactions of been progenies derived from the cross between the CNFC 9506 and RP-2 lines, by means of two commonly used tests, the oxalic acid and the *straw test*, as well as identifying SSR, AFLP and SRAP markers linked to the QTLs (Quantitative Trait Loci) for white mold resistance. We extracted the DNA of 186 F₂ plants and from the parent plants in order to perform molecular evaluation with the polymorphous SSRs, AFLPs and SRAPs primers. For the analysis in oxalic acid we performed 15 experiments, evaluating 186 F_{2.4} progenies, generation F₁, generation F₂, using the CNFC 9506, RP-2 and G122 lines as common treatments. The experiments were conducted in a completely randomized design with three replicates in a controlled environment. For the *straw test* analysis we evaluated 186 F_{2.4} progenies and ten lines, in a 14 x 14 triple lattice design. The means adjusted from the evaluation regarding the F_{2.4} generation were used to identify the QTLs with the Bayesian *shrinkage* analysis. The phenotypic frequency values were submitted to the χ^2 test in order to verify the occurrence of a distorted segregation in relation to the expected. We observed significant differences between the progenies regarding the reaction to the white mold by means of the oxalic acid as well as by the *straw test*. Among the 59 markers used, only 13 segregated as expected; four SSRs, six AFLPs and three SRAPs. In the identification of QTLs by the oxalic acid method, 25 markers identified QTLs for resistance to white mold; 16 SSRs, seven AFLPs and two SRAPs. In the identification of QTLs by the *straw test*, 17 markers identified QTLs for resistance to white mold; 13 SSRs and four AFLPs. Among the evaluated markers, 12 identified QTLs in both methods, all SSRs. The non-coincidence of QTLs may be explained by the low genotypic correlation between the evaluations of the oxalic acid and the *straw test*. In this work, the correspondence of only 40% of the markers occurred between the tests. Considering the resistance to white mold, the identification of QTLs by different markers is one more indicative that there are different resistance mechanisms involved in controlling the disease. The BM184, BM211, PV-gaat001 markers are more promising to the SAM using the oxalic acid method. The ME1 and BM211 markers are more promising to the SAM using the *straw test*. The BM211 marker is highlighted for SAM, considering both the evaluated methods simultaneously.

Keywords: Plant breeding. *Sclerotinia sclerotiorum*. Oxalic acid. *Straw test*. Molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Identificação dos QTLs de resistência ao mofo-branco pelo método do ácido oxálico, por marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs utilizando procedimento bayesiano <i>shrinkage</i>	56
Figura 2	Efeito do QTL associado ao marcador, pelo método do ácido oxálico.....	57
Figura 3	Frequência de recombinação dos marcadores pelo método do ácido oxálico	58
Figura 4	Identificação dos QTLs de resistência ao mofo-branco por marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs utilizando procedimento bayesiano <i>shrinkage</i> , pelo método do <i>straw test</i>	64
Figura 5	Efeito do QTL associado ao marcador pelo método do <i>straw test</i>	65
Figura 6	Frequência de recombinação pelo método do <i>straw test</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo da análise de variância agrupada para reação de genótipos de feijão ao ácido oxálico e estimativas de média, coeficiente de variação (CV), acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}), herdabilidade no sentido amplo (h^2), com seus limites inferior (LI) e superior (LS) e ganho com a seleção das 15 melhores progênies (GS)47
Tabela 2	Resumo da análise de variância individual para reação de genótipos de feijão ao <i>straw test</i> e estimativas da média, eficiência relativa do látice (ER), coeficiente de variação (CV), acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}) e herdabilidade no sentido amplo (h^2), com seus limites inferior (LI) e superior (LS) e ganho com a seleção das 15 melhores progênies (GS)..... 50
Tabela 3	Nota das 15 melhores progênies selecionadas pelo ácido oxálico e pelo <i>straw test</i> 53
Tabela 4	Resumo dos dados para o ácido oxálico para distância entre marcador e QTL, posição dos marcadores nos gráficos, efeito do QTL associado ao marcador e suas respectivas magnitudes e herdabilidade do QTL 59
Tabela 5	Resumo dos dados para <i>straw test</i> para distância entre marcador e QTL, posição dos marcadores nas figuras, efeito do QTL associado ao marcador e suas respectivas magnitudes.....67
Tabela 6	Coincidência entre marcadores próximos a QTLs pela análise de <i>straw test</i> e pela análise do ácido oxálico 69

APÊNDICES

Tabela 1	Teste χ^2 para distorção de segregação para frequências genóticas de marcadores SSR.....	90
Tabela 2	Teste χ^2 para distorção de segregação para frequências fenóticas dos marcadores AFLP e SRAP	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Importância da cultura do feijoeiro	16
2.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
2.3	Avaliação para resistência pelo método do ácido oxálico	21
2.4	Avaliação para resistência pelo método do <i>straw test</i>	22
2.5	Resistência e controle genético	24
2.6	Marcadores moleculares.....	25
2.7	Identificação e mapeamento de QTLs.....	28
2.8	Análise Bayesiana <i>shrinkage</i>	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Local	33
3.2	Genótipos avaliados	33
3.3	Avaliação da reação ao ácido oxálico	34
3.4	Avaliação da reação ao <i>straw test</i>	35
3.5	Extração de DNA	36
3.6	Reações de SSR, AFLP e SRAP	38
3.7	Análises Estatísticas	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Avaliação fenotípica pelo ácido oxálico.....	47
4.2	Avaliação fenotípica pelo <i>straw test</i>	50
4.3	Segregação dos marcadores nas progênies	54
4.4	Identificação de QTLs pelo método do ácido oxálico.....	55
4.5	Identificação de QTLs pelo método do <i>straw test</i>	63
5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

Organismos fitopatogênicos são os grandes responsáveis por perdas significativas nas lavouras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), chegando muitas vezes a inviabilizar a cultura em determinadas regiões. Entre as doenças que mais tem limitado a obtenção de alta produtividade, destaca-se o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Esta doença pode causar perdas significativas em culturas de plantios irrigados economicamente importantes para o país, como feijão, girassol, soja e algodão.

S. sclerotiorum é um fungo fitopatogênico necrotrófico com ampla diversidade de plantas hospedeiras, atingindo mais de 408 espécies de plantas, e em especial as dicotiledôneas (BOLAND; HALL, 1994). O fungo desenvolve uma estrutura de resistência conhecida como escleródio, capaz de sobreviver por até onze anos no solo, até encontrar uma condição favorável, caracterizada por umidade alta, temperatura baixa e matéria orgânica em decomposição (SCHNEIDER; RUBENS; PONTE, 2012).

Sabe-se que a melhor forma de controle da doença no feijão é o uso de cultivares com algum nível de resistência genética. Esta medida é a mais indicada, pois evita ou reduz o uso de defensivos e é economicamente viável para o produtor. Porém, para o controle do mofo-branco, esta medida ainda não é eficiente, uma vez que não há disponibilidade de cultivares com nível satisfatório de resistência e adaptadas às condições brasileiras.

O controle genético da resistência é predominantemente aditivo e poligênico (ANTONIO, 2011; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010; DIAS, 2013). Alguns marcadores SCARs já foram desenvolvidos e alguns estão associados à QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que explicam parcelas significativas da variação fenotípica (ENDER; KELLY, 2005; MIKLAS et al., 2001; SOULE et al., 2011). No melhoramento, a identificação de marcadores

moleculares SSRs, AFLPs e SRAPs, associados aos alelos de resistência, podem auxiliar na seleção de genótipos com maior nível de resistência genética.

Dada a dificuldade da avaliação da resistência do feijão ao mofo-branco e da natureza poligênica do caráter, a identificação de QTLs de genitores adaptados pode contribuir de forma mais eficiente para a seleção assistida, especialmente para seleção em nível individual. Além disso, QTLs identificados em ambientes temperados têm exibido interação com os ambientes sul-americanos (CARNEIRO et al., 2011).

Devido à escassez de informações de cultivares resistentes para as condições brasileiras, torna-se importante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético. A obtenção de cultivares com algum nível de resistência e que apresentem boa adaptabilidade às regiões produtoras pode ser consideravelmente acelerado com o uso de marcadores moleculares.

Desta forma, com este trabalho objetivou-se avaliar a reação de progênies de feijão oriundas do cruzamento entre as linhagens adaptadas CNFC 9506 e RP-2, por meio da reação ao ácido oxálico e ao *straw test* e identificar QTLs para resistência ao mofo-branco, utilizando marcadores SSR, AFLP e SRAP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do feijoeiro

O feijão é um dos alimentos básicos dos brasileiros, sendo produzido durante todo o ano e comercializado por todo o território brasileiro. Seus grãos constituem uma das principais e mais acessíveis fontes de minerais, aminoácidos e fibras, estando presente, diariamente, na dieta da população. É consumido por diferentes classes sociais e utilizado como alimento fundamental em programas de combate a fome e desnutrição. Por essas razões, o país é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa e a maior parte da produção é destinada para consumo interno (UNIFEIJÃO, 2013).

O feijão é cultivado durante quase todos os meses do ano e a sua produção provém de quase todo o território nacional, sendo dividido em três safras. A primeira, também conhecida como safra das “águas” ocorre de agosto a dezembro; a segunda safra, ou safra da “seca” ocorre de janeiro a abril; e a terceira safra, a de “inverno”, é realizada de maio até julho ou agosto, dependendo do Estado (YOKOYAMA, 2002).

Segundo dados divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), a produção nacional do feijão para primeira e segunda safra está sofrendo um decréscimo devido principalmente aos problemas relacionados às doenças e às condições climáticas desfavoráveis. Em contrapartida, há uma boa perspectiva quanto às culturas como soja e milho, devido à maior estabilidade e liquidez. Para a terceira safra, há um aumento na produtividade devido ao plantio irrigado e a alta tecnologia em estados como Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais.

Em Minas Gerais, apenas 10% da área utilizada para o plantio é cultivada com sementes fiscalizadas (SENA et al., 2008). A falta do uso de

sementes fiscalizadas ocasiona a disseminação de patógenos por meio das sementes contaminadas, pois estão associadas à agentes fitopatogênicos, tanto os fúngicos quanto os bacterianos (VALENTINI et al., 2010).

Dentre as principais doenças que acometem o feijoeiro destaca-se, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, (Sacc. & Magnus) Scrib., a mancha angular causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, e o mofo-branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, considerado atualmente um patógeno de grande importância econômica para a cultura. Essas doenças constituem os principais estresses bióticos que afetam o feijoeiro, contribuindo para redução na produtividade (MIKLAS, 2006).

2.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary tem despertado grande interesse na área agrícola, pois é o responsável pela ocorrência de significativas perdas em colheitas de vários países (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009). Este fungo é responsável por até 100% de perda em algumas culturas, com uma variação de 1 a 50% dependendo da cultura e da severidade da infecção, a qual está amplamente relacionada às condições ambientais. Infecções graves em campo podem perdurar por anos e causar diminuição de 30% a 80% na produção de culturas plantadas em regiões irrigadas (SCHWARTZ et al., 1987).

O fungo pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia*. Ataca mais de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas hospedeiras, sendo uma ameaça tanto para dicotiledôneas, tais como girassol, soja, amendoim e feijão, como também para monocotiledôneas, tais como cebola e tulipa (BOLAND; HALL, 1994). Mais de 60 nomes têm sido utilizados para se referir a este patógeno.

Dentre eles pode-se citar podridão da cabeça, podridão aquosa, podridão da haste e, o mais comum, mofo-branco (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Este patógeno está disseminado por diversos países em todo o mundo (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006) e seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas com temperaturas amenas, associado à alta umidade relativa do ar. Porém, para que o fungo possa se desenvolver e provocar uma epidemia é necessário que a umidade do solo, adequada para o seu desenvolvimento, se mantenha por certo período de tempo, variando em função do local e do tipo de solo (NAPOLEÃO et al., 2005).

O mofo-branco, quando em ambiente desfavorável, é capaz de produzir estruturas de resistência conhecidas como escleródio, responsáveis por possibilitar sua sobrevivência no solo por até onze anos (SCHNEIDER; RUBENS; PONTE, 2012). Além disso, este patógeno também pode resistir no solo como micélio ativo em tecido vivo ou morto (ADAMS; AYERS, 1979; KIMATI et al., 2005).

Os escleródios são altamente resistentes a substâncias químicas, calor seco com temperaturas de até 600 °C, e congelamento (SCHNEIDER; RUBENS; PONTE, 2012). Apresentam formato irregular, variando de um a vários milímetros de diâmetro e comprimento (KIMATI et al., 2005). A princípio apresentam coloração branca, e posteriormente, tornam-se negros e duros. O escleródio é composto por três camadas: uma parede grossa rica em melanina, responsável pela sua coloração negra; uma parede fina, chamada de córtex; e a medula branca, que é o micélio dormente do fungo, rico em carboidratos e proteínas (LE TOURNEAU, 1979; ROCHA, 2007).

Os escleródios são geralmente produzidos depois que o crescimento micelial se depara com um ambiente cujos nutrientes são limitantes (CHRITIAS; LOCKWOOD, 1973). Sua sobrevivência e germinação são afetadas pela umidade e temperatura, posição e longevidade no solo, morfologia, presença de

gases ou elementos químicos no solo, atividades de microorganismos e nutrição, entre outros fatores (ABREU, 2011). A umidade elevada do solo tende a promover a sua germinação, com temperatura entre 6° e 30 °C, embora a temperatura ótima seja de 10 °C.

Os escleródios podem germinar de forma carpogênica ou miceliogênica, dependendo das condições ambientais. Pela germinação miceliogênica, há produção de hifas a partir de micrósoros presentes nos escleródios, que atacam diretamente os tecidos da planta (BARDIN; HUANG, 2001). O micélio pode infectar diretamente os tecidos da raiz (LE TOURNEAU, 1979) ou penetrar na cutícula da planta hospedeira utilizando enzimas ou mecanismos de força via apressórios, a menos que a penetração seja por meio dos estômatos (LUMSDEN, 1979).

Na germinação carpogênica, há produção de apotécios (órgãos de reprodução sexuada), que darão origem aos ascósporos. Estes quando maduros são ejetados para o meio ambiente, infectando a planta acima da linha do solo (BARDIN; HUANG, 2001). A umidade do solo é um fator crítico na produção de apotécios e é uma das principais razões para que as doenças iniciadas por ascósporos sejam associadas a eventos de irrigação e períodos de muita chuva (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém as infecções iniciam-se com maior frequência a partir das inflorescências e das axilas das folhas e ramos laterais (KIMATI et al., 2005). A fase mais vulnerável da planta vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens (SAGATA, 2010).

A doença é caracterizada pela maceração tecidual de aspecto úmido nas plantas parasitadas, apresentando um emaranhado de hifas brancas no local da lesão (MOURA, 2008). Esta lesão se expande rapidamente para o pecíolo e caule. Os caules primeiramente formam lesões escuras, que normalmente se

desenvolvem em tecidos necróticos e, posteriormente, surgem as manchas de micélio branco com aspecto cotonoso (ABREU, 2011).

A doença progride nos caules principais, ocasionando murcha da planta. À medida que a doença progride, os tecidos infectados tornam-se esbranquiçados e geralmente são degradados, deixando apenas os tecidos vasculares (ABREU, 2011). Depois de instalada no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para plantas adjacentes por meio do contato planta a planta (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Porém, o auge da disseminação ocorre após o florescimento, quando as flores caem, uma vez que, por ser uma importante fonte primária de energia, servem de alimento para o fungo iniciar a infecção (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2005).

Pesquisas sobre os mecanismos moleculares da patogenicidade de *S. sclerotiorum* concentraram-se em enzimas que degradam a parede celular e produzem ácido oxálico. Este ácido penetra no tecido ao redor da lesão, atuando diretamente no organismo do hospedeiro. Seus principais modos de ação são: 1) Diminuição do pH de aproximadamente 6,8 para 4,0, o que potencializa a ação da enzima pectolítica (LUMSDEN, 1979); sendo que essas condições ácidas são diretamente tóxicas para as plantas (FAVARON; SELLA; OVIDIO, 2004); 2) Quelação da parede celular por íons cálcio (FAVARON; SELLA; OVIDIO, 2004); 3) Supressão da explosão oxidativa (CESSNA et al., 2000); 4) Interferência na produção de ácido abscísico, desregulando as células guarda dos estômatos e provocando murcha das folhas (GUIMARÃES; STOTZ, 2004); e 5) Produção de endopoligalacturonase, provocando um enfraquecimento dos tecidos vegetais e facilitando o crescimento do fungo (ROLLINS; DICKMAN, 2001).

A produção de ácido oxálico é, portanto, o fator primordial no processo de infecção de *S. sclerotiorum* (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2005; GUIMARÃES; STOTZ, 2004). Estudos demonstraram que mutantes incapazes

de produzir ácido oxálico não produzem escleródios *in vitro* e não são patogênicos às plantas (DICKMAN; MITRA, 1992; GODOY et al., 1990).

2.3 Avaliação para resistência pelo método do ácido oxálico

A resistência ao mofo-branco é um caráter quantitativo, sendo necessário quantificar a doença para distinguir os genótipos (LU, 2003). Há várias metodologias propostas para avaliar a resistência do feijão ao mofo-branco. Uma delas é a avaliação da doença por intermédio de um método indireto, em que as cultivares/progênes são avaliadas considerando-se a reação ao ácido oxálico (ANTONIO et al., 2008; KOLKMAN; KELLY, 2003). Este método baseia-se na reação da planta quando colocada em solução de ácido oxálico, sem a raiz. Uma vantagem deste processo é a identificação da resistência fisiológica sem a interferência de outros mecanismos de resistência.

O teste de reação ao ácido oxálico é muito utilizado, pois permite a discriminação rápida dos genótipos (GONÇALVES; SANTOS, 2010). Kolkeman e Kelly (2000) discutem as vantagens de se utilizar esse teste, destacando: 1) a grande utilidade para determinar a resistência fisiológica para experimentos realizados em casa de vegetação; 2) os germoplasmas fotossensíveis não adaptados podem ser testados para a resistência fisiológica já que as plantas são testadas na fase de plântula e, portanto, não são influenciados por caracteres reprodutivos (florescimento); 3) um grande número de linhas pode ser avaliado em um período de tempo relativamente curto; 4) a inoculação das mudas cortadas em uma solução comum de oxalato reduz a variabilidade que pode ser observada quando se utiliza micélio de *S. sclerotiorum*; 5) a variabilidade inerente a um único isolado para o teste é reduzido.

Nesse método, utiliza-se plântulas de feijão cortadas na base do caule, com cerca de 20 dias de idade (emergência da segunda folha trifoliolada), que

são imersas em uma solução de ácido oxálico 20 mM, pH 4,0. Após um curto período de tempo (de 12 a 20 horas), as plântulas são avaliadas para sintomas de murcha em uma chave descritiva proposta por Kolkman e Kelly (2000), que varia de 1 (ausência de folhas murchas) a 6 (planta completamente murcha).

2.4 Avaliação para resistência pelo método do *straw test*

Existem diversas metodologias artificiais de avaliação por meio da inoculação do patógeno (TOLÊDO-SOUZA; COSTA, 2003). A maioria destes testes depende do micélio fúngico nas avaliações, que são influenciados pela variabilidade dos isolados e sensibilidade do patógeno a altas temperaturas (ABREU, 2011). Abreu (2011), avaliando 50 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em vários locais de Minas Gerais, observou que esta população mostrou ampla variabilidade genética para as características morfológicas, fisiológicas e moleculares avaliadas. A mesma autora observou um comportamento diferente entre 15 linhagens de feijão frente a cinco isolados, concluindo assim que estes isolados apresentaram níveis diferentes de agressividade.

Segundo Souza (2009), em virtude da falta de consideração com a variabilidade do patógeno, é observada a ocorrência de vários problemas relacionados com a avaliação, afetando assim sua confiabilidade. Dessa forma, quando se utiliza de micélio fúngico, é importante avaliar se há variação na agressividade do isolado, após sucessivas repicagens para assegurar uma correta avaliação do nível de resistência dos genótipos. De acordo com Souza (2009), a prática adotada usualmente de duas repicagens a partir do escleródio, corresponde ao inóculo com maior agressividade.

Dentre os métodos existentes, maior destaque será dado ao *straw test*. Este método é o mais simples para a avaliação da resistência fisiológica. Auxilia

na identificação, caracterização e seleção de genótipos resistentes ao mofo-branco, sendo o mais utilizado nos programas de melhoramento (TERÁN; SINGH, 2008).

O *straw test*, ou teste do canudo, foi descrito por Petzoldt e Dickson (1996). Estes autores relatam que plantas susceptíveis são descartadas e as resistentes seguem o desenvolvimento. Algumas plantas mais tarde morrem, mostrando um baixo nível de tolerância. No entanto, somente as plantas resistentes sobrevivem, produzindo uma colheita normal de sementes (PETZOLDT; DICKSON, 1996). Este teste foi, posteriormente, modificado por Terán et al. (2006) e atualmente é um dos métodos mais utilizados na detecção de resistência ao mofo-branco (ABREU, 2011; ANTONIO, 2011; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010; CARVALHO, 2011; GENCHEV; KIRYAKOV, 2002; GILMORE; MYERS, 2000, 2004; LIMA, 2010; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; SCHWARTZ et al., 2004, 2006).

O *straw test* consiste na inoculação das plantas com auxílio de ponteiras plásticas de micropipeta contendo o micélio do fungo. Para a obtenção dos micélios, o fungo é multiplicado em laboratório em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar). Ponteiras plásticas de micropipeta são usadas para cortar o disco de BDA, de modo que o micélio fique em contato com o ápice cortado da planta. As inoculações são realizadas de três a cinco semanas após a semeadura. Oito dias após a inoculação é feita a avaliação da reação da planta à *S. sclerotiorum* por meio de uma escala diagramática, que varia de 1 (planta sem sintoma) a 9 (morte da planta) (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2008).

Este método possui uma grande vantagem em relação aos demais testes, pois é um método não destrutivo, o que permite o avanço do programa de melhoramento para a obtenção de progênies resistentes. Porém, como o *straw test* é um componente da resistência no campo, tanto a resistência fisiológica

quanto mecanismos de escapes das plantas contribuem para reduzir a doença e devem ser considerados (MIKLAS et al., 2001).

Trabalhando com ambas as metodologias acima discutidas (ácido oxálico e *straw test*), Carvalho (2011) concluiu que estas devem ser empregadas simultaneamente, pois permitem selecionar progênies portadoras de diferentes mecanismos de resistência ao mofo-branco, uma vez que em seu trabalho, elas foram eficientes em discriminar os genótipos, fornecendo resultados distintos.

2.5 Resistência e controle genético

Atualmente não existe um método de controle completo para *S. sclerotiorum*. Um plano de manejo integrado é composto por modificações culturais, aplicação de fungicida e uso de cultivares resistentes. Destes, a medida mais indicada e econômica para o manejo da doença atualmente é o uso de cultivares resistentes. No entanto, essa resistência está restrita a algumas cultivares de feijão branco de origem mesoamericana e de origem andina (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2005), e que não são diretamente utilizadas pelos produtores. Algumas linhagens e cultivares adaptadas às condições do Centro-Oeste e Sudeste do Brasil possuem resistência parcial (GONÇALVES; SANTOS, 2010).

O controle genético da resistência é predominantemente aditivo (ANTONIO, 2008; CARNEIRO, 2009; DIAS, 2013) do tipo poligênico, com herdabilidade de magnitude baixa a moderada (ANTONIO, 2011; CARNEIRO; SANTOS; LEITE, 2010; ENDER; KELLY, 2005; KOLKMAN; KELLY, 2000, 2003; MIKLAS et al., 2001; SILVA; SANTOS; ABREU, 2005; SOULE et al., 2011). Carneiro (2009) observou que o controle genético é caracterizado por efeito aditivo. Ressalta-se, portanto, a importância de identificar cultivares

resistentes a este patógeno e com boa adaptação às condições climáticas brasileiras.

A introgressão de alelos de resistência em cultivares elites via melhoramento convencional pode levar, dependendo da cultura, muitos anos. Esse processo pode ser consideravelmente acelerado com o uso de marcadores de DNA. Seu uso torna possível a triagem molecular de populações segregantes para o fenótipo resistência à doença, sendo, portanto, de suma importância para o melhoramento genético de plantas.

2.6 Marcadores moleculares

Para a maior parte das espécies comerciais, um grande número de alelos de resistência tem sido isolado e os marcadores moleculares têm conquistado grande importância na seleção assistida, por facilitar a introdução desses alelos de resistência em plantas comerciais (ANTONIO, 2011). A tecnologia dos marcadores de DNA pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, bem como para a geração e o desenvolvimento de produtos melhorados (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Marcadores genéticos são quaisquer características herdáveis que permitem distinguir indivíduos geneticamente diferentes e mapear seus genes. Para ser um marcador, é necessário que ele esteja intimamente ligado ao alelo de interesse, sendo a eficiência máxima quando o valor de herdabilidade é igual a 1,0 (o marcador se constitui no próprio alelo de interesse) (RAMALHO et al., 2012). Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética em plantas.

Entre as vantagens dos marcadores moleculares, Faleiro (2007) cita a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de

detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos.

Devido à maior variabilidade dos marcadores de DNA, sendo estes os mais utilizados para marcar alelos de interesse, houve o desenvolvimento de dezenas de procedimentos alternativos para o seu uso. Dentre os marcadores mais utilizados, destacam-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), SRAP (*Sequence-Related Amplified*), EST (*Expressed Sequence Tags*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), e DAiT (*Diversity Array Technology*) (ANTONIO, 2011; SCHLÖTTERER, 2004). Neste trabalho, porém, maior destaque será dado aos SSRs, AFLPs e SRAPs.

Os SSRs ou marcadores microssatélites, baseiam-se na presença, em genomas eucarióticos, de várias classes de sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. O polimorfismo alélico ocorre em um loco SSR devido às mudanças no número de repetições (SALLES, 2003).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (BORÉM; CAIXETA, 2009). O polimorfismo encontrado e os tamanhos dos fragmentos devem-se ao número diferente de repetições dos microssatélites (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Os SSRs possuem inúmeras vantagens, como serem amplificados via PCR (*Polimerase Chain Reaction*), serem codominantes, e estarem distribuídos por todo o genoma. Juntas, essas características fazem com que o microssatélite seja um dos melhores marcadores genéticos para fins de mapeamento (OLIVEIRA et al., 2006). Este marcador tem sido utilizado em estudos evolutivos, teste de paternidade, estudo de genética de populações, proteção de

cultivares, análise gênica e de locos quantitativos (QTLs), identificação de genótipos e seleção assistida (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando este marcador molecular. Antonio (2011) identificou e mapeou marcadores moleculares do tipo microsatélite (SSR) ligados a QTLs de resistência do feijoeiro ao mofo-branco, destacando-se quatro (BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9) que foram estáveis. Lara (2011), trabalhando também com feijão, identificou sete marcadores SSR ligados a QTLs que explicaram 27,38% da variação da resistência à *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

A técnica de AFLP normalmente permite a análise de um grande número de locos polimórficos, tendo assim um enorme potencial em identificar variabilidade genética. Esta técnica não exige o emprego de iniciadores espécie-específicos, não demandando então um conhecimento prévio do genoma da espécie estudada (VIEIRA et al., 2006). Os AFLPs baseiam-se em PCR e amplificam fragmentos produzidos por enzimas de restrição e por adaptadores oligonucleotídeos de poucas bases nucleotídicas (VOS et al., 1995). Este marcador é dominante e possui alta confiabilidade dos resultados (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012). Esta alta reprodutibilidade e a alta taxa de fragmentos amplificados fazem com que seja um dos marcadores mais utilizados atualmente, sendo muito importante no mapeamento genético.

No contexto do feijão comum, os AFLPs têm sido úteis para determinar a direção do fluxo gênico e comparar diferenças espaciais entre germoplasma silvestre e domesticado (PAPA; GEPTS, 2003). Também tem sido reportado seu uso para mapeamento de QTLs (GARCIA et al., 2006; MIKLAS et al., 2001; MORAES, 2005). Garcia et al. (2006) utilizaram marcadores RFLP, SSR e AFLP para o desenvolvimento de um mapa genético integrado para cana-de-açúcar. De 23 combinações de primers AFLPs selecionados, obteve-se 2502 marcadores (uma média de 109 marcadores por combinação) e destes, 304 foram

polimórficos entre os pais. Os marcadores mapeados consistiram-se de 57 RFLPs, 64 SSRs e 236 AFLPs, sendo atribuídos a 131 grupos de co-segregação.

A técnica do SRAP tem sido reconhecida como uma ferramenta útil para a caracterização e para o mapeamento genético, sendo viável seu uso para a seleção assistida por marcadores (LÓPEZ ANIDO et al., 2010). Esta se baseia na amplificação por dois iniciadores, possui repetibilidade e está destinada à amplificação de fragmentos de estrutura de leitura aberta (ORFs) (ESPÓSITO et al., 2011).

Segundo Espósito et al. (2011), os marcadores SRAPs foram eficientes tanto para a diferenciação varietal como intravarietal e permitiram a identificação precoce de materiais úteis em programas de melhoramento de alcachofra. Trabalhando com feijão, Soule et al. (2011) mapeou 56 marcadores SRAPs em quatro grupos de ligação, utilizando a população RILs Benton/VA19. Dentre os quatro grupos de ligação, dois estavam integrados com os grupos 1 e 8 do mapa integrado, os quais contém QTLs que conferem resistência parcial ao mofo-branco.

2.7 Identificação e mapeamento de QTLs

A abundância de marcadores de DNA permite que todo genoma seja marcado, possibilitando, teoricamente, a detecção e caracterização de todos os genes de interesse. Esses genes podem expressar caracteres quantitativos ou caracteres qualitativos. Diz-se que o caráter é qualitativo quando o efeito de substituição alélica for grande em relação à variação fenotípica total. Já o caráter quantitativo refere-se a uma pequena razão entre o efeito da substituição e a variação fenotípica (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012).

O controle genético da variação quantitativa envolve muitos locos, os quais possuem efeitos variados sobre a característica controlada. O termo

poligenes foi utilizado por Mather (1941) para definir genes de pequeno efeito ou “genes menores”, e o termo oligogenes designado aos genes de grande efeito ou “genes maiores”. Porém, independente da magnitude de seu efeito, Geldermann (1975) sugeriu o termo QTL (*Quantitative Trait Loci*) para designar locos controladores de características quantitativas.

A variação genética de locos individuais é tão pequena que estes não podem ser estudados separadamente, mas coletivamente por meio de semelhanças fenotípicas entre indivíduos relacionados (LYNCH; WALSH, 1998). Desta forma acredita-se que as variações genéticas da maioria dos caracteres quantitativos sejam controladas por poucos locos de grande efeito e muitos locos de pequeno efeito (XU, 2003).

A eficiência na detecção e localização de QTLs depende da magnitude de seu efeito, da herdabilidade da característica, das interações entre os genes, do tipo e tamanho da população segregante utilizada nas análises, do tamanho do genoma, da frequência de recombinação entre o QTL e o marcador, da saturação do mapa e da eficiência da avaliação fenotípica (BORÉM; CAIXETA, 2009). O genótipo do QTL não é observável, porém, pode ser predito com base nas marcas que o flanqueiam.

Segundo Toledo et al. (2008), para realizar o mapeamento são necessárias informações do caráter quantitativo de interesse e dados de marcadores moleculares. Após a obtenção desses dados, deve-se: 1) distribuir os marcadores utilizados em grupos, chamados grupos de ligação; 2) ordená-los no grupo; e 3) dentro de cada grupo estimar a distância entre os marcadores adjacentes ou marcadores flanqueados. Um mapa é considerado completo quando o número de grupos de ligações (GLs) obtidos for igual ao número de cromossomos da espécie, ou quando todos os marcadores genéticos estiverem ligados, sugerindo assim que todas as regiões do genoma estejam representadas (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000).

Para a obtenção do mapeamento, é necessária uma população que apresente variabilidade genética e elevado desequilíbrio de ligação. Pressume-se que os caracteres mapeados distribuem-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana, o qual pode ser verificado por meio do teste do Qui-quadrado (χ^2) (BEARZOTI, 2000). Esta segregação mendeliana não é observada quando os locos apresentam distorção de segregação. Segundo Liu (1998), os locos que apresentam distorção de segregação afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos. Porém, apesar de a distorção de segregação de marcadores afetar a detecção de QTLs, ela é prejudicial apenas para mapeamento de QTLs pouco informativos e com efeito de dominância, não interferindo e agregando informações genéticas importantes para o mapeamento de QTLs com efeito aditivo (OLIVEIRA et al., 2004; SHIZHONG; ZHIQIU, 2009; XU, 2008).

Tem sido detectado QTLs para resistência ao mofo-branco nos 11 grupos de ligação do feijão (SABURIDO, 2011). Park et al. (2001) detectaram nove QTLs ligados a marcadores RAPD em uma população de RILs (*Recombinant Inbred Lines*), com os genitores PC-50/XAN159. Estes QTLs estão situados nos GLs 3, 4, 6 e 10, sendo o QTL localizado no grupo 4 o que explica a maior parte da variação da resistência. Miklas et al. (2001) identificaram na população RIL A55/G122, o gene *Phs* (faseolina) ligado a um QTL maior no GL 7, e outro QTL, atribuído ao gene *fin*, no GL 2, responsável pelo hábito de crescimento determinado. Soule et al. (2011) detectaram dois QTLs associados à resistência ao mofo-branco na população RIL Benton/VA19 e sete QTLs na RIL Raven/19365-31.

Diversos modelos que incluem múltiplos QTLs foram desenvolvidos, sendo o foco dos estudos de mapeamento de QTLs (BALL, 2001; GORING; TERWILLIGER; BLANGERO, 2001; KAO; ZENG; TEASDALE, 1999; SEN; CHURCHILL, 2001; SILLANPAA; CORANDER, 2002; YI; XU, 2001). De

acordo com Satagopan et al. (1996), quando apenas um modelo final é considerado, há tendenciosidades na estimativa dos efeitos genéticos. Desta forma, o método Bayesiano deve ser utilizado a fim de reduzir estas tendenciosidades, pois considera vários modelos. Xu (2003) cita que uma das propriedades favoráveis da análise Bayesiana é a capacidade para lidar com um grande número de efeitos do modelo.

2.8 Análise Bayesiana *shrinkage*

A abordagem Bayesiana permite grande flexibilidade de análise em modelos complexos e também em situações onde o número de parâmetros a ser estimados (número de marcadores e intervalos) é maior que o número de observações (XU, 2003).

O modelo Bayesiano descrito por Xu (2003) como mapeamento seletivo de múltiplos intervalos difere do modelo de regressão usual quanto ao efeito de cada QTL que é associado com um determinado marcador, assumindo-se uma distribuição normal com média zero e variância individual. Um resultado encontrado por Xu (2003) na análise Bayesiana de múltiplos intervalos é que marcadores de grandes efeitos nas análises por marcas individuais mantêm seus grandes efeitos na análise Bayesiana, enquanto que marcadores com pequenos efeitos na regressão têm sido “encolhidos” nas análises Bayesianas.

Este fator de encolhimento refere-se à penalização de cada possível QTL pela razão da sua variância com a variância residual. Assim, de acordo com a descrição de Balestre (2012): aqueles QTLs de pequeno efeito e baixa variância têm esses efeitos “encolhidos” a valores próximos a zero, pois são penalizados pela variância residual do modelo. Por outro lado, aqueles QTLs de grande efeito tendem a apresentar destacada variância e são menos penalizados pela variância residual.

A partir do trabalho de Xu (2003), Wang et al. (2005) apresentaram a técnica de mapeamento de múltiplos intervalos utilizando análise Bayesiana *shrinkage*. Nesta análise, o fator de encolhimento varia entre os diferentes efeitos. Este novo método *shrinkage* força intervalos de marcadores que não contêm QTLs ter efeitos estimados próximos de zero, enquanto que intervalos contendo QTLs não sofrem nenhum encolhimento nos efeitos estimados.

Uma boa propriedade da análise *shrinkage*, de acordo com Che e Xu (2010), é que se pode estimar QTLs de efeitos pequenos, como os que explicam 2% da variação fenotípica para um tamanho de 300 a 500 indivíduos analisados. Nesta análise também há uma baixa taxa de falsos positivos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento para verificar a reação das linhagens ao ácido oxálico foi conduzido em casa de vegetação, do Departamento de Biologia, Setor de Genética, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os experimentos de campo (*straw test*) foram conduzidos na área experimental da UFLA, no município de Lavras, que se situa na região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21°14' de latitude Sul e 45° de longitude Oeste.

As reações de PCR, utilizando marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular, no Departamento de Biologia (DBI), na UFLA.

3.2 Genótipos avaliados

Foram cruzadas as linhagens CNFC 9506 e RP-2. Esses genitores são respectivamente suscetíveis e parcialmente resistentes ao mofo-branco, com base na reação ao ácido oxálico, recebendo nota 4,83 para CNFC 9506 e 1,97 para RP-2 no trabalho desenvolvido por Gonçalves e Santos (2010).

A linhagem CNFC 9506 foi desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão e a linhagem RP-2 pela UFLA. Ambas apresentam porte ereto e grãos do tipo carioca. A produtividade média (kg/ha⁻¹) tem sido maior para a linhagem RP-2 e a estimativa de ecovalência (W_i^2 %) maior para linhagem CNFC 9506, com base em análise conjunta dos ensaios em Lavras e Viçosa, MG, nos biênios 2002/2003, 2005/2006 e 2007/2008 (SILVA et al., 2011).

A partir do cruzamento dos parentais, foram obtidas as gerações F_1 , F_2 e as progênies $F_{2:3}$ e $F_{2:4}$ em condições de campo. Foram utilizadas as gerações F_1 , F_2 e $F_{2:4}$, juntamente com os genitores e mais 8 linhagens para condução do experimento do ácido oxálico e o do *straw test*. As linhagens avaliadas foram Corujinha, G122, CNFC 10720, CNFC 10722, M20, Ex-Rico, Small White e Talismã.

3.3 Avaliação da reação ao ácido oxálico

Foram avaliadas 186 progênies $F_{2:4}$, os genitores CNFC 9506 e RP-2, e a linhagem G122. A linhagem G122 é uma conhecida fonte de resistência ao mofo-branco e se apresentou moderadamente resistente de acordo com Gonçalves e Santos (2010). Cada progênie e as três linhagens foram avaliadas em uma parcela com 10 plantas. No experimento, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Inicialmente, foram semeadas 60 sementes de cada tratamento, em bandeja de isopor contendo substrato Plantmax e selecionadas as 30 plantas mais uniformes para instalação do experimento. Para isso foram utilizadas plantas com idade aproximada de 21 dias, idade na qual surgiu a segunda folha trifoliolada. Devido à limitação de espaço, foram realizados quinze experimentos, sendo avaliadas 13 progênies $F_{2:4}$ em quatorze experimentos e no quinto experimento, avaliou-se 4 progênies $F_{2:4}$, a F_1 e a F_2 . Além desses genótipos, foram utilizados o CNFC 9506, o RP-2 e o G122 como tratamento comum em cada experimento.

Os experimentos foram conduzidos em solução de ácido oxálico, conforme sugerido por Kolkman e Kelly (2000), com algumas modificações. Eles foram montados em ambientes com temperatura controlada (22 °C a 24 °C) e as plantas foram acondicionadas a este ambiente algumas horas antes de serem

cortadas. As plantas foram cortadas na base do caule, à tarde, sendo a parte inferior do caule imersa em solução de ácido oxálico 20 mM e mantida em recipiente plástico, por um período de 21 horas em ambiente protegido. A solução teve pH 4,0, ajustada com hidróxido de sódio (NaOH). O controle sem ácido oxálico foi realizado em recipiente com água destilada e pH 4,0, contendo as testemunhas.

Após 21 horas de exposição, foi realizada a avaliação dos genótipos quanto à reação ao ácido oxálico, utilizando a chave descritiva de notas proposta por Kolkman e Kelly (2000), sendo: 1: ausência de folhas murchas; 2: uma folha unifoliolada ou uma folha trifoliolada murcha; 3: duas folhas murchas; 4: três ou mais folhas murchas; 5: pecíolos murchos; 6: planta completamente murcha.

Os sintomas de murcha abrangem desde o enrolamento da ponta da folha à perda total de turgidez da folha inteira e da planta.

3.4 Avaliação da reação ao *straw test*

A avaliação das progênies F_{2,4} foi realizada em campo. O experimento foi conduzido em delineamento de látice triplo, 14x14, sendo a parcela representada por uma linha de um metro e inoculada 10 plantas por parcela. Foram avaliados 196 tratamentos, sendo dez testemunhas (CNFC 9506, RP-2, Corujinha, G122, CNFC 10720, CNFC 10722, M20, Ex-Rico, Small White e Talismã) e 186 progênies.

Inicialmente utilizaram-se escleródios esterilizados para obtenção do micélio. O fungo *S. sclerotiorum* foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), adicionado de cloranfenicol, na proporção de uma gota do antibiótico/100 ml de meio BDA e mantido em BOD, a 20±3 °C, por três dias e fotoperíodo de 12 horas. O inóculo foi multiplicado duas vezes, a fim de obter maior uniformidade. Três dias após a segunda multiplicação, foram

utilizadas ponteiras tipo eppendorf com disco de ágar contendo micélio para inocular plantas com, aproximadamente, 28 dias de idade. Para a inoculação, eliminou-se o ápice do caule principal da planta, cortando a 2,5 cm do nó, o qual ficou em contato com o micélio na ponteira.

Oito dias após a inoculação foi realizada a avaliação da resistência do feijão ao mofo-branco por meio de uma escala diagramática (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2008), sendo: 1: sem infecção no caule ou ramo ao lado do ágar; 2: invasão do primeiro internódio menor do que 2,5 cm; 3: invasão do primeiro internódio maior do que 2,5 cm sem atingir o primeiro nó; 4: infecção no caule ou ramo até atingir o primeiro nó sem ultrapassá-lo; 5: infecção ultrapassa o primeiro nó e invade o segundo internódio, porém, invasão menor que 2,5 cm; 6: invasão do segundo internódio maior que 2,5 cm, porém sem atingir o segundo nó; 7: infecção no caule atinge o segundo nó, sem ultrapassá-lo; 8: infecção ultrapassa o segundo nó e invade o terceiro internódio, porém, invasão menor que 2,5 cm; 9: invasão do terceiro internódio maior que 2,5 cm levando a planta à morte.

3.5 Extração de DNA

Foram realizadas extrações de DNA dos genitores, CNFC 9506 e RP-2, e das 186 progênies F_2 de acordo com os procedimentos utilizados por Rodrigues e Santos (2006).

As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10 ml de tampão de extração a 65 °C em um almofariz. O tampão é composto de 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4M NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidona) e a ele foi adicionado 30 µl de β-mercaptoetanol. Em seguida, o material macerado foi depositado em tubo de centrifuga, incubado por

cerca de 30 minutos em banho-maria a 65 °C e homogeneizado a cada 10 minutos.

A primeira extração de DNA foi realizada com a adição de clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 em um volume de 10 ml. Durante essa extração, as fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Em seguida os ácidos nucleicos foram precipitados, em uma mistura de 30 ml de álcool 95%: acetato de amônia 7,5 M (6:1), por 24 horas no freezer, a -20 °C. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente para secagem. Quando secos, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1 mM TRIS 0.1 mM EDTA).

Para a segunda extração de DNA misturou-se fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) e, por centrifugação, separou-se a fase orgânica da aquosa, coletando-se o sobrenadante. À fase aquosa, em um novo tubo eppendorf, foi acrescentado clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 em um volume de 10 ml, centrifugado e coletado o sobrenadante. O sobrenadante foi então depositado em outro tubo eppendorf e precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3 M: etanol 95% (1:20), por pelo menos uma hora no freezer, a -20 °C. Após a precipitação, o tubo foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente para secagem. Os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE e quantificado em gel de agarose 1% em eletroforese horizontal utilizando-se marcadores de DNA com concentrações conhecidas. O material quantificado foi então diluído em água pura para a concentração de 10ng/μL para ser utilizado nas reações de PCR.

3.6 Reações de SSR, AFLP e SRAP

Previamente foram utilizados primers aleatórios de SSRs, AFLPs e SRAPs e selecionados aqueles polimórficos entre os genitores. Foram selecionados 17 SSRs, 31 AFLPs e 11 SRAPs. Estes primers foram utilizados para genotipar a população F₂ de 189 plantas.

Para cada reação de SSR foram utilizados 2,5 µl de DNA (25 ng), 0,65 µl de dntp (contendo 25 µM de cada um dos dntps e 12,5 mM de MgCl₂), 0,6 µl de taq DNA polimerase (1U), 1,0 µl tampão (composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 µg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10 mM de tartrazine), 2,5 µl de primer (0,5 µM de Forward e 0,5 µM de Reverse) e 4,75 µl de água pura. O volume final para cada reação foi de 12 µl. As reações envolveram 32 ciclos, constituídos por desnaturação do DNA, anelamento do primer e elongação (RODRIGUES, 2004).

Para cada reação de SRAP, reagentes similares aos do SSR foram utilizados, porém em quantidades diferentes. Utilizou-se 5 µl de DNA (50 ng), 1 µl de tampão (composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 µg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10 mM de tartrazine), 0,65 µl de dntp (contendo 25 µM de cada um dos dntps, e 25 mM de MgCl₂), 2 µl de cada primer (0,5 µM de Forward e 0,5 µM de Reverse), 0,6 µl de taq DNA polimerase (1U) e 5,75 de água pura. O volume final para cada reação foi de 17 µl. As reações corresponderam há 2 minutos a 94 °C, 5 ciclos (cada um constituído por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 35 °C e 1 minuto a 72 °C), 30 ciclos (cada um constituído por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C) e 10 minutos a 72 °C.

A reação de AFLP é composta por cinco etapas: digestão do DNA, preparo de adaptadores, ligação de adaptadores, pré-amplificação e amplificação seletiva. Na digestão do DNA, foram utilizados 10 µl de DNA (25 ng/µl), 2 µl de

Buffer 4 (10X), 0,2 µl de BSA (100X), 0,3 µl de EcoR I – HF (20 U/µl), 0,6 µl de Mse I (10 U/µl) e 6,9 µl de água pura. A reação foi incubada a 37 °C por 4 horas e posteriormente as enzimas foram inativadas a 65 °C por 20 minutos.

O preparo de adaptadores foi constituído de duas fases. A primeira é a preparação do adaptador EcoR I – HF, na qual foram utilizados 10 µl de adaptador EcoR I F (100 µM), 10 µl de adaptador EcoR I R (100 µM) e 180 µl de água pura. A segunda fase é a preparação do adaptador Mse I, na qual foram utilizados 10 µl de adaptador Mse I F (100 µM), 10 µl de adaptador Mse R (100 µM) e 180 µl de água pura. Estas soluções foram incubadas a 65 °C por 10 minutos, 37 °C por 10 minutos e 25 °C por 10 minutos e posteriormente estocada a -20 °C.

Na etapa de ligação dos adaptadores foi produzido uma mistura de ligação contendo 2 µl de tampão ligase (10X Buffer), 1 µl de adaptador EcoR I (5 µM), 1 µl de adaptador Mse I (50 µM), 0,17 µl de T4 DNA ligase (400 U/ µl) e 15,83 µl de água pura. O volume final da mistura de ligação para cada reação de digestão foi de 20 µl. As reações foram incubadas durante a noite a 16 °C e posteriormente a enzima inativada a 65 °C por 20 minutos. As reações foram estocadas a -20 °C.

Na pré-amplificação, foram utilizados 3 µl de tampão (5X Colorless GoTaq), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,2 µl de dNTP (2,5 mM), 0,4 µl de primer E+N (5 µM), 0,4 µl de primer M+N (5 µM), 0,6 µl de Taq DNA polimerase (5 U/ µl), 4 µl de DNA D+L (DNA diluído + ligado) e 4,4 µl de água pura. As reações de PCR corresponderam há 2 minutos a 94 °C, 26 ciclos (cada constituído por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C e 1 minuto a 72 °C), e 5 minutos a 72 °C. O volume de cada reação foi diluído 10X, sendo adicionados 135 µl de água pura e estocado à -20 °C.

Na amplificação seletiva, foram utilizados 3 µl de tampão (5X Colorless GoTaq), 0,9 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,2 µl de dNTP (25 mM), 0,4 µl de primer

E+NNN (5 µM), 0,4 µl de primer M+NNN (5 µM), 0,6 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/ µl), 3 µl de DNA (diluído 10X) e 5,5 de água pura. O volume final para cada reação foi de 15 µl. As reações de PCR corresponderam há 2 minutos a 94 °C, 12 ciclos (cada um constituído por 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C, 1 minuto a 72 °C), 23 ciclos (cada um constituído por 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 1 minuto a 72 °C), e 5 minutos a 72 °C. As reações, posteriormente foram estocadas a -20 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante, corado em nitrato de prata e fotografado com câmera digital.

Os genótipos dos marcadores SSRs foram identificados com notas -1, 0 e 1 para os genótipos de menor número de pares de bases, heterozigoto e genótipo de maior número de pares de bases, respectivamente. Os marcadores AFLPs e SRAPs foram identificados com notas 0 e 1, representando ausência e presença da banda, respectivamente.

3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram feitas de acordo com Ramalho, Ferreira e Oliveira (2012). Para proceder às análises de variância, foi utilizada uma única nota por parcela, obtida a partir da média das notas atribuídas em 10 plantas, para ambos os experimentos.

A característica avaliada nos experimentos do ácido oxálico foi submetida às análises de variância individual e agrupada. Segue-se o modelo estatístico da análise individual:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} : observação referente à progênie i na repetição j ;
 μ : efeito fixo da média geral do ensaio;
 p_i : efeito aleatório da progênie i ;
 e_{ij} : efeito aleatório associado ao erro experimental, da progênie i , na repetição j , com média zero e variância σ^2 comum.

Para a análise estatística agrupada, empregando os genitores e a linhagem G122 como tratamentos comuns, utilizou-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + s_k + ps_{i:k} + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} : observação referente à progênie i na repetição j e experimento k ;
 μ : efeito fixo da média geral do ensaio;
 p_i : efeito aleatório da progênie i ;
 s_k : efeito aleatório do experimento k ;
 $ps_{i:k}$: efeito aleatório da interação progênie i e experimento k (sendo i para tratamentos regulares e i' para os tratamentos comuns);
 e_{ijk} : efeito aleatório associado ao erro experimental, da progênie i , na repetição j e no experimento k , com média zero e variância σ^2 comum.

Neste modelo, o efeito da interação $ps_{i:k}$ (efeito aleatório da interação tratamento comum com experimento k) foi retirado da anava, pois seu efeito foi pequeno na discriminação dos tratamentos.

As notas obtidas pelo *straw test* também foram submetidas à análise de variância. Segue-se o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + r_j + b_{k(j)} + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação referente à progênie i na repetição j e bloco k ;
 μ : efeito fixo da média geral do ensaio;
 p_i : efeito aleatório da progênie i ;
 r_j : efeito aleatório da repetição j ;
 $b_{k(j)}$: efeito aleatório do bloco k , na repetição j ;
 e_{ijk} : efeito aleatório do erro experimental associado à progênie i , na repetição j e bloco k , com média zero e variância σ^2 comum.

As análises de variâncias foram realizadas utilizando o comando GLM (Generalized Linear Model) do programa SAS® 9.1 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2007).

As estimativas de herdabilidade (h_a^2) com seus respectivos limites de confiança foram obtidas por meio das expressões:

$$h_a^2 = \sigma_G^2 / \sigma_F^2$$

Em que:

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo;

σ_G^2 : variância genética;

σ_F^2 : variância fenotípica.

$$LI = \left\{ 1 - \left[\frac{(QMTrat)}{(QMErro)} \times F_{1-\alpha/2, v1, v2} \right]^2 \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\frac{(QMTrat)}{(QMErro)} \times F_{\alpha/2, v1, v2} \right]^2 \right\}$$

Em que:

$F_{\alpha/2}$ e $F_{1-\alpha/2}$: quantis superiores tabelados da distribuição F, com v_1 e v_2 graus de liberdade, sendo $\alpha = 0,05$;

v_1 e v_2 : graus de liberdade associados ao QMTrat e QMErro, respectivamente.

Em cada experimento foi estimada a acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}) pela expressão de Resende e Duarte (2007):

$$\hat{r}_{gg} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

Em que:

F: valor do teste F de Snedecor para o efeito de tratamentos da análise de variância.

Foi também estimado o coeficiente de variação (CV) pela expressão:

$$CV = \frac{\sqrt{QMErro}}{\bar{X}} \times 100$$

Em que:

\bar{X} : média geral do experimento.

A estimativa do ganho com a seleção (GS) das 15 melhores progênies para análise no ácido oxálico e no *straw test* foi obtido por meio da expressão:

$$GS = (ds \times h^2) \times 100$$

Em que:

ds: diferencial de seleção, ou seja, a diferença entre a média das progênes selecionadas e a média geral do experimento;

h^2 : herdabilidade do caráter.

Foi também estimado o coeficiente de correlação de Spearman ($\hat{\rho}_s$) entre os métodos do ácido oxálico e do *straw test*, considerando as 186 progênes F_{2:4} avaliadas. Este coeficiente mede o grau de associação ou de relação linear entre as variáveis e é calculado pela expressão:

$$\hat{\rho}_s = 1 - \frac{6 \times \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Onde:

d_i : diferença entre as ordenações;

n: número de pares de ordenações.

Para amostras superiores a 10, segundo Siegel (1975), a significância de um valor obtido de $\hat{\rho}_s$ pode ser verificada por meio de t calculado pelo estimador apresentado a seguir:

$$t = \hat{\rho}_s \sqrt{\frac{n-2}{1 - \hat{\rho}_s^2}} \sim t_{n-2}$$

Onde:

t: estatística do teste;

$\hat{\rho}_s$: coeficiente de correlação de Spearman

n: número de pares de ordenações.

Para n grande ($n \geq 10$), a expressão acima tem distribuição t de Student com $n-2$ graus de liberdade.

O teste χ^2 foi realizado no programa GQMOL (SCHUSTER; CRUZ, 2008), com a correção de Bonferroni para verificar se os locos apresentam o padrão esperado de segregação mendeliana. Locos com o teste significativo ao nível de 5% de confiança foram considerados com distorção de segregação. Para marcadores codominantes a hipótese de segregação foi 1:2:1 e para marcadores dominantes a hipótese de segregação foi 3:1 e 1:3.

Os resultados médios das progênies $F_{2,4}$, no ácido e no *straw test*, foram utilizados juntamente com as bandas SSRs, AFLPs e SRAPs segregantes para identificação de QTLs de resistência ao mofo-branco. Para a análise Bayesiana *shrinkage*, construiu-se um programa apropriado – o qual utilizou o teste de Wald – no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

A estimativa do teste de Wald para a regressão logística é:

$$W_1 = \frac{\widehat{B}_1}{\widehat{DP}(\widehat{B}_1)}$$

Em que:

\widehat{B}_1 : estimativa de máxima verossimilhança do parâmetro;

$\widehat{DP}(\widehat{B}_1)$: estimativa de seu desvio padrão.

As distâncias obtidas entre marcador e QTL foram calculadas em centiMorgans (cM) com a função de Kosambi, que assume a presença de interferência nos eventos de recombinação (KOSAMBI, 1944; LIU, 1998). Desta forma, a fórmula utilizada foi:

$$X = \frac{1}{4} \times \ln \left[\frac{(1+2c)}{(1-2c)} \right]$$

Onde,

c = Frequência de recombinação.

Esta função é uma extensão da função de Haldane, sendo mais adequada que esta. Ela assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo decrescente para locos mais distantes, e iguais a zero para locos independentes (LIU, 1998; WEIR, 1996).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica pelo ácido oxálico

O resumo da análise de variância agrupada da reação ao ácido oxálico das progênies $F_{2,4}$ avaliadas encontra-se na Tabela 1. A interação experimentos com tratamentos comuns foi desconsiderada, pois seu efeito foi pequeno em comparação com o efeito de tratamentos.

Tabela 1 Resumo da análise de variância agrupada para reação de genótipos de feijão ao ácido oxálico e estimativas de média, coeficiente de variação (CV), acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}), herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), com seus limites inferior (LI) e superior (LS) e ganho com a seleção das 15 melhores progênies (GS)

FV	GL	QM
Experimentos	14	1,1259**
Tratamentos	190	0,3968**
Erro	487	0,1109
Média		2,40
CV (%)		13,88
\hat{r}_{gg} (%)		84,89
h_a^2 %		72,06
$(h_{LI}^2 - h_{LS}^2)$ (%)		(64,33 – 77,82)
GS%		-27,1

** Significativo a 1% de probabilidade

Pode-se observar diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os experimentos. A significância entre os experimentos pode ter sido encontrada devido à desuniformidade entre as plantas dos diferentes experimentos, uma vez

que plantas crescem de formas diferentes dependendo da época. Com a finalidade de reduzir estas diferenças, os experimentos foram sequenciais, sendo realizados no período de Setembro a Novembro, e conduzidos em ambientes com temperatura controlada. No entanto, dentro de cada experimento houve menor problema de desuniformidade, uma vez que se realizou a escolha de plantas mais uniformes.

Observa-se também a existência de diferenças significativas ($P < 0,001$) entre as progênies, comprovando a existência de variabilidade genética e possível sucesso com a seleção de genótipos resistentes ao mofo-branco pela análise de absorção ao ácido oxálico.

A partir do valor do coeficiente de variação (13,88%), pode-se associar uma boa precisão do experimento. Valor semelhante é encontrado na literatura (DIAS, 2013; GONÇALVES, 2012; KOLKMAN; KELLY, 2000). Kolkman e Kelly (2000) encontraram CV de 14,10% a 20,30% em trabalhos realizados em temperaturas controladas com o método do ácido oxálico. Dias (2013), também trabalhando com o método do ácido oxálico, encontrou um CV de 5,80% na análise de planta individual em experimento contendo os genitores, F_1 e F_2 e de 10,52% na análise agrupada para média de $F_{2:4}$.

Estudos demonstram que há restrições para o uso do CV para se avaliar a precisão experimental, pois ele é muito influenciado pela média (CARGNELUTTI FILLO; STORK, 2007; RESENDE; DUARTE, 2007). Por esta razão utilizou-se também a acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}), que correlaciona o valor genotípico verdadeiro do tratamento genético com o predito a partir da informação fenotípica obtida nos experimentos e pode variar de 0 a 1 (0 a 100%). O valor da acurácia seletiva foi de 84,89%, podendo assim associar a uma alta precisão do experimento, de acordo com Resende e Duarte (2007).

A herdabilidade reflete a proporção da variação fenotípica devido às causas genéticas (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012). No presente estudo, a h^2 foi de 72,06%, indicando boas chances de sucesso com a seleção.

Os genitores CNFC 9506 e RP-2 obtiveram notas similares na avaliação pelo ácido oxálico, de 2,28 e 2,33, respectivamente. Porém, observaram-se indivíduos com fenótipos mais extremos nas progênies, caracterizando uma segregação transgressiva. Desta forma, pode-se inferir que ambos os genitores possuem alelos de resistência à *S. sclerotiorum*, porém, fixados em locos diferentes. A nota dessas progênies variou de 1,09 a 3,27, com média de 2,40. Foram selecionadas as 15 progênies mais resistentes, sendo a média destas de 1,49. Foi estimado o ganho com a seleção destas progênies, que foi de -27,10%, indicando a alta eficiência do método para a seleção. Este valor é negativo, pois a seleção foi no sentido de reduzir a intensidade de murcha, sendo notas menores as almejadas.

Na análise do controle genético, a variância genética em nível de planta foi encoberta pela variância ambiental dentro das parcelas, não sendo possível, portanto, isolar os componentes de variâncias genéticas dentro de parcelas F_2 e $F_{2:4}$. Desta forma, a análise por planta não é eficiente quando os genitores não possuem respostas muito contrastantes na avaliação da característica de interesse. Isto pode ser devido também ao caráter analisado ser consideravelmente influenciado por efeitos não genéticos (ANTONIO et al., 2008).

4.2 Avaliação fenotípica pelo *straw test*

O resumo da análise de variância, relativo às notas da reação das progênes à *S. sclerotiorum* pelo método do *straw test* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Resumo da análise de variância individual para reação de genótipos de feijão ao *straw test* e estimativas da média, eficiência relativa do látice (ER), coeficiente de variação (CV), acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}) e herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), com seus limites inferior (LI) e superior (LS) e ganho com a seleção das 15 melhores progênes (GS)

Fontes de Variação	GL	QM
Repetições	2	0,4976
Blocos (Repetições)	39	0,5600**
Tratamentos (Aj.)	195	0,3564**
Erro	348	0,2125
Média		4,00
ER		108,77
CV (%)		11,52
\hat{r}_{gg} (%)		63,54
h_a^2 (%)		40,38
$(h_{LI}^2 - h_{LS}^2)$ (%)		(23,21 – 53,29)
GS (%)		-5,80

** Significativo a 1% de probabilidade

Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,001$) podem ser observadas na Tabela 2. Parte desta significância se deve às elevadas diferenças entre as dez linhagens também avaliadas. A acurácia seletiva foi moderada, com

valor de 63,54% e o CV foi considerado baixo, com valor de 11,52%, de acordo com dados encontrados na literatura para avaliação no *straw test* (ALVES, 2012; ANTONIO, 2011). A partir da eficiência relativa do látice, pode-se concluir que o delineamento de blocos incompletos foi 8,77% superior para controlar a variação do que o delineamento de blocos completos casualizados.

A estimativa de herdabilidade assumiu valor baixo, de 40,38%. Porém, como os limites inferior e superior de herdabilidade foram positivos (Tabela 2), pode-se ter maior confiança desta estimativa como indicadora de sucesso com a seleção. Park et al. (2001) encontraram estimativas de herdabilidade de 24% e 23% em duas avaliações pelo método do *straw test*, sendo considerado estes valores baixos. Miklas et al. (2001), porém, encontraram valores de 75% e 76% também pelo *straw test*, sendo estes valores considerados relativamente altos.

Os genitores CNFC 9506 e RP-2 obtiveram notas similares na avaliação pelo *straw test*, de 3,89 e 4,18, respectivamente. Vale ressaltar que nesta avaliação o genitor CNFC 9506 obteve menor nota, comportando assim como genitor moderadamente resistente, e o genitor RP-2 obteve maior nota, comportando como genitor suscetível. A nota das progênes variou de 2,80 a 5,31, com média de 4,00. Foram selecionadas as 15 progênes mais resistentes, sendo a média destas de 3,37. Foi estimado o ganho com a seleção destas progênes, que foi de -5,80%, indicando uma boa eficiência do método para a seleção. Porém este ganho com a seleção foi menor que o obtido pelo método do ácido oxálico, pois se detectou menor variabilidade entre as progênes pelo *straw test*. O valor do ganho com a seleção foi negativo, pois a seleção foi no sentido de reduzir a severidade da doença, sendo notas menores as almejadas.

Observando as progênes selecionadas pelo ácido oxálico e pelo *straw test*, pode-se verificar que há uma correspondência de apenas 20% das progênes (Tabela 3). Assim, as três progênes mais favoráveis para esses dois mecanismos

de avaliação da resistência (reação ao ácido oxálico e ao *straw test*) são 42, 70 e 149.

Tabela 3 Nota das 15 melhores progênies selecionadas pelo ácido oxálico e pelo *straw test*

Ácido oxálico	<i>Straw test</i>
12	6
22	21
29	42
37	46
42	70
50	101
66	103
70	125
73	133
95	134
147	142
149	149
161	164
175	167
189	169

Foi estimado o valor da correlação de Spearman entre as notas das progênies para os diferentes métodos, sendo este valor igual a 14,31%. Como se considerou todas as 186 progênies $F_{2,4}$ avaliadas, houve um ajustamento para verificar a significância do estimador.

No estudo realizado por Alves (2012), a correlação entre a resistência ao mofo-branco pelo *straw test* com a resistência ao mofo-branco pelo ácido oxálico, foi não significativa, podendo indicar mecanismos diferentes de resistência envolvidos no controle da doença. Neste estudo, porém, o valor da correlação de Spearman, apesar de baixo, foi significativo. Desta forma, pode-se supor que apesar de mecanismos diferentes estarem envolvidos no controle da doença, há a possibilidade de terem também mecanismos comuns para ambos os métodos. Assim, é possível obter genótipos que associem mecanismos de resistência para os dois métodos.

4.3 Segregação dos marcadores nas progênies

Inicialmente 700 marcadores SSR foram analisados com a finalidade de detectar polimorfismo nos genitores. Destes, apenas 17 marcadores foram polimórficos. Este baixo índice de polimorfismo ocorreu, pois, ambos os genitores são bem adaptados, sendo pouco contrastantes para resistência ao mofo-branco. Posteriormente, foram analisadas nove combinações de AFLP e dez combinações de SRAP, sendo selecionadas seis combinações de AFLP, gerando um total de 31 marcadores, e duas combinações de SRAP, gerando no total 11 marcadores. Este maior índice de polimorfismo é característica de ambos marcadores AFLP e SRAP, gerando grande número de bandas polimórficas.

Os valores das frequências fenotípicas foram submetidos ao teste χ^2 para verificar se houve segregação distorcida em relação à esperada. Os resultados da segregação dos marcadores codominantes e dominantes estão representados nas Tabelas 1A e 2A, respectivamente.

Dentre os 59 marcadores utilizados, somente 13 segregaram como o esperado, 4 SSRs (BM184, BM187, PVESTBR_185, BMc83), 6 AFLPs (EAAG/MCAG₁₄₁, EAGA/MCAG₂₂₄, EAGA/MCAG₁₈₆, EACC/MCAT₃₅₅, EACA/MCAT₅₃₇, EACA/MCAT₂₂₄) e 3 SRAPs (Me9F/Em7R₇₀₀, Me10F/Em1R₄₇₃, Me10F/Em1R₁₈₅). Desta forma, 13 SSRs, 25 AFLPs e 8 SRAPs mostraram distorção de segregação mendeliana significativa ($p < 0,05$).

A distorção de segregação é um fenômeno comum em mapas genéticos e sua ocorrência varia muito em função do tipo de população e dos marcadores moleculares utilizados (SONG; SUN; ZHANG, 2006). A utilização de um grande número de plantas dentro da população (de 50 a 250 indivíduos) e de genitores contrastantes é recomendada para evitar a distorção de segregação por acaso (COLLARD et al., 2005; MOHAN et al., 1997). Neste trabalho, a

população é derivada de 186 plantas F_2 , estando, portanto, dentro do intervalo recomendado. Porém, os genitores não se mostraram muito contrastantes nas avaliações do *straw test* e do ácido oxálico.

O alto nível de distorção encontrado neste trabalho também tem sido reportado frequentemente na literatura (ANTONIO, 2011; BLAIR et al., 2003, 2010; GALEANO et al., 2009; GARCIA et al., 2011; GRISI et al., 2007; SABURIDO, 2011; ZIMMERMAN, 2010). No trabalho desenvolvido por Zimmerman (2010), observou-se que de 112 marcadores polimórficos analisados em populações avançadas de retrocruzamentos de feijão para avaliação de resistência ao mofo-branco, apenas nove obtiveram segregação como o esperado. O autor relata que esta distorção de segregação manifestou-se como uma super-representação de heterozigotos e sub-representação dos alelos doadores homozigotos. Neste trabalho, porém, observou-se um predomínio na super-representação de um dos homozigotos na distorção.

É importante salientar que quando o desvio de segregação não é muito pronunciado, ou quando o marcador está intimamente ligado ao QTL, a identificação feita pelo marcador não é prejudicada (XU, 2008). Além disso, a distorção de segregação dos marcadores não os exclui de serem potencialmente informativos para a detecção de recombinantes (SABURIDO, 2011), sendo desta forma, incluídos na análise para identificação de QTLs. Segundo Shizhong e Zhiqiu (2009), o uso destes marcadores pode incrementar a saturação do mapa e aumentar o poder de mapear QTLs.

4.4 Identificação de QTLs pelo método do ácido oxálico

A detecção de QTLs associados à resistência ao mofo-branco pela avaliação no ácido oxálico pode ser visualizada pela Figura 1 e Tabela 4. Na ordenada está disposta a escala dos valores do teste de Wald. Na abscissa está a

representação dos marcadores, sendo de 1 a 17 os marcadores SSRs, de 18 a 48 os AFLPs e de 49 a 59 os SRAPs.

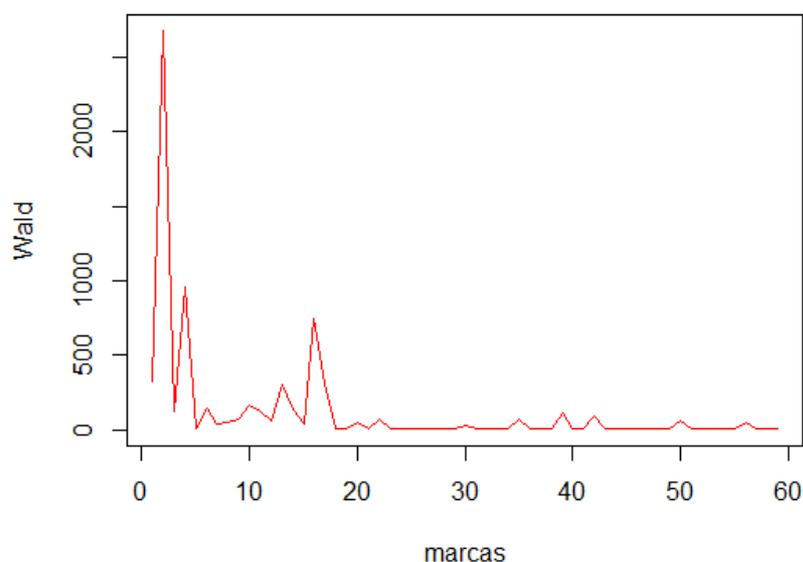


Figura 1 Identificação dos QTLs de resistência ao mofo-branco pelo método do ácido oxálico, por marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs utilizando procedimento bayesiano *shrinkage*.

Para o teste do ácido oxálico, 25 marcadores identificaram QTLs para resistência ao mofo-branco, sendo 16 SSRs (BM184, BM187, BM211, BMd42a, BM165, BM212, PV188, PV74, PVESTBR_185, PVESTBR_204, PVESTBR_42, PV-gaat001, ATA244, ME1, BMc94, BMc83), sete AFLPs (EAGG/MCAG₂₅₂, EAAG/MCAG₄₄₇, EAAG/MCAG₃₉₈, EAGA/MCAG₁₈₆, EACC/MCAT₂₈₂, EACA/MCAT₇₀₀ e EACA/MCAT₄₄₇) e dois SRAPs (Me9F/Em7R₇₀₀ e Me9F/Em7R₁₇₃). Destes, apenas o BM187, o BMd42a e o BMc94 estão associados à QTLs altamente significativos.

O efeito dos QTLs para expressão da resistência ao mofo-branco está representado na Figura 2. Na ordenada está disposto o efeito, variando de -0,2 (contribui para aumentar a resistência) a 0,3 (contribui para reduzir a resistência). Como notas menores referem-se a plantas mais resistentes, QTLs com efeitos negativos são os almejados. Na abscissa está a representação dos marcadores.

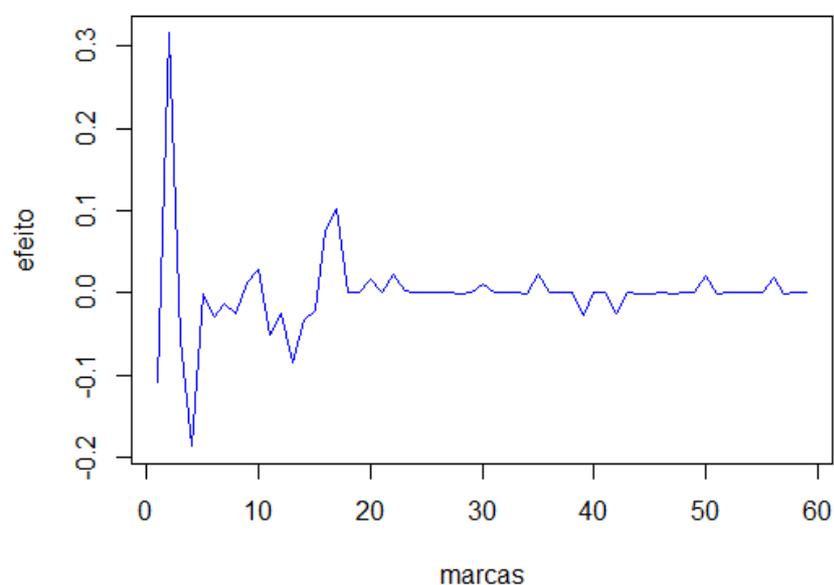


Figura 2 Efeito do QTL associado ao marcador, pelo método do ácido oxálico

Dentre os 25 marcadores, 13 estão ligados à QTLs com efeitos em aumentar a resistência ao mofo-branco. Estes marcadores são: BM184, BM211, BMd42a, BM165, BM212, PV188, PVESTBR_204, PVESTBR_42, PV-gaat001, ATA244, ME1, MCAT/EACA₇₀₀, MCAT/EACA₄₄₇. Destes, apenas dois estão relacionados à QTLs altamente significativos (BM187 e BMd42a).

A frequência de recombinação do QTL com o marcador está representada na Figura 3 e Tabela 4. Na ordenada está disposta a frequência de recombinação e na abscissa está a representação dos marcadores.

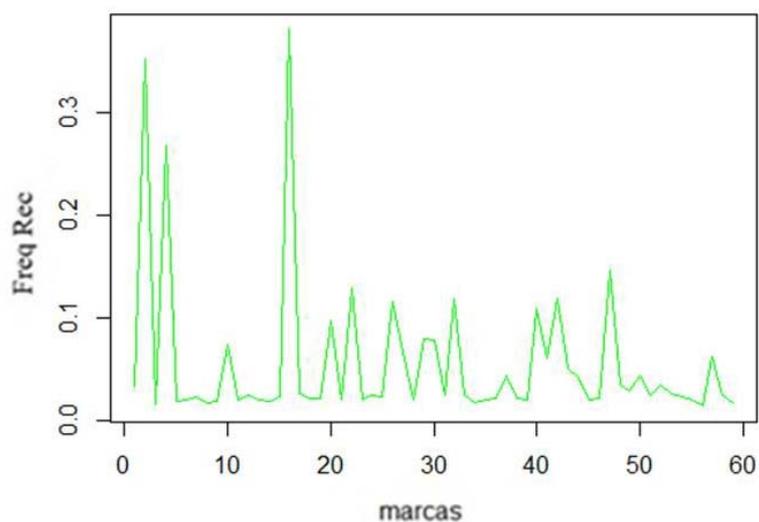


Figura 3 Frequência de recombinação dos marcadores pelo método do ácido oxálico

Pode-se observar que os marcadores BM187, BMd42a e BMc94 segregam quase que independentemente dos QTLs a eles associados, pois possuem uma alta frequência de recombinação (de 26,84% a 38,12%) (Tabela 4, Figura 3).

O resumo dos dados de distância, em cM, entre marcador e o QTL, da posição do marcador no gráfico e do efeito e herdabilidade do QTL associado à resistência ao mofo-branco pela avaliação no ácido oxálico encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 Resumo dos dados para o ácido oxálico para distância entre marcador e QTL, posição dos marcadores nos gráficos, efeito do QTL associado ao marcador e suas respectivas magnitudes e herdabilidade do QTL

Marcador	Posição	FR ^a (%)	Distância ^b	Efeito	Wald ^c	Herd ^d (%)
BM184	1	3,34	3,34	0,108	322,43	54,85
BM187	2	35,24	43,84	-0,316	2676,59	85,87
BM211	3	1,61	1,61	0,058	118,5	75,99
BMd42a	4	26,84	29,98	0,187	954,82	66,65
BM165	6	2,07	2,07	0,029	142,89	2,55
BM212	7	2,36	2,36	0,013	38,43	0,02
PV188	8	1,74	1,74	0,025	47,97	37,48
PV74	9	1,91	1,91	-0,012	64,8	54,27
PVESTBR_185	10	7,48	7,54	-0,029	162,55	72,25
PVESTBR_204	11	2,05	2,05	0,051	117,69	66,95
PVESTBR_42	12	2,43	2,43	0,026	61,65	47,83
PV-gaat001	13	2,13	2,13	0,085	301,62	82,86
ATA244	14	1,87	1,87	0,033	135,58	1,01
ME1	15	2,29	2,29	0,022	42,67	0,55
BMc94	16	38,12	50,1	-0,074	745,2	83,8
BMc83	17	2,61	2,61	-0,103	310,87	79,08
EAGG/MCAG ₂₅₂	20	9,77	9,9	-0,017	43,35	0,45
EAAG/MCAG ₄₄₇	22	12,92	13,22	-0,022	69,14	2,03
EAAG/MCAG ₃₉₈	23	2,01	2,01	-0,002	6,58	4,02
EAGA/MCAG ₁₈₆	30	7,82	7,88	-0,011	22,39	8,27
EACC/MCAT ₂₈₂	35	2,13	2,13	-0,022	72,36	2,62
EACA/MCAT ₇₀₀	39	2,04	2,04	0,028	112,73	3,27
EACA/MCAT ₄₄₇	42	11,87	12,1	0,024	90,94	1,34
Me9F/Em7R ₇₀₀	50	4,32	4,33	-0,02	60,09	0,82
Me9F/Em7R ₁₇₃	56	1,42	1,42	-0,018	49,23	2,4

^a Frequência de recombinação; ^b Distância, em cM, do marcador para o QTL; ^c Valor do teste de Wald; ^d Herdabilidade do QTL; + Aumentar a resistência; - Reduzir a resistência

Dentre os marcadores microssatélites avaliados, apenas o marcador PVM02TC116 não identificou QTL para resistência ao mofo-branco pelo teste do ácido oxálico.

O marcador BM184 foi inicialmente mapeado no GL 11 (BLAIR et al., 2003, 2008). Porém, Maxwell et al. (2007) o identificou no GL 9, ligado ao QTL WM9.1^{GC}, avaliando a população RIL G122/CO72548. Este QTL confere resistência parcial na avaliação ao *straw test* (13%) (SOULE et al., 2011). Este marcador também está relacionado à QTLs para dias para o florescimento, vagens por planta e peso de 100 sementes (BLAIR; IRIARTE; BEEBE, 2006). Neste trabalho, o marcador BM184 segregou na proporção mendeliana esperada e identificou um QTL com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco pelo método do ácido oxálico, estando a uma distância de 3,34 cM do QTL. O QTL identificado possui uma herdabilidade moderada, de 54,85%. Esta herdabilidade mede a confiabilidade da seleção assistida por marcadores (SAM), uma vez que determina a porcentagem de variação genética que será herdada.

O marcador BM187 foi mapeado no GL 6, no qual foi identificado até o momento apenas um QTL para resistência ao mofo-branco, o WM6.1^{B60,R31}, sendo primeiro identificado na população RIL Benton/NY6020-4 (MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003) e posteriormente, na população RIL Raven/I9365-31 (SOULE et al., 2011). Este mesmo marcador segundo Blair, Iriarte e Beebe (2006), flanqueia QTLs para dias para o florescimento, altura da planta, largura da planta, número de sementes por planta e para o gene V, referente à cor da flor. Neste trabalho, o marcador BM187 segregou na proporção mendeliana esperada e identificou o QTL mais significativo, no entanto se encontra longe deste, a 43,84 cM. Este QTL possui alta herdabilidade, com 85,87%, porém, seu efeito é no sentido em reduzir a resistência ao mofo-branco.

O marcador BM211 foi localizado separando dois QTLs no GL 8 (MAXWELL et al., 2007; PARK et al., 2001). Este grupo de ligação contém

quatro QTLs para resistência ao mofo-branco já identificados. Os QTLs WM8.1^{PX,GC} e WM8.2^{PX} foram descobertos primeiramente por Park et al. (2001) em populações RIL PC-50/XAN-159, tendo associação de 9% para incidência em campo e 24% para *straw test*, e posteriormente observado por Maxwell et al. (2007) em populações RIL G122/CO72548. Os outros dois QTLs descritos e citados por Soule et al. (2011) são WM8.3^{B60,GC,BV} e WM8.4^{BR,GC,R31}. Porém o marcador BM211 não foi significativo no trabalho de Zimmerman (2010), o qual utilizou duas populações de retrocruzamentos interespecíficas, não identificando assim nenhum dos quatro QTLs presentes no grupo de ligação. Grisi et al. (2007) identificaram também o marcador BM165 no GL 8, associado a um dos quatro QTLs para resistência ao mofo-branco. Neste trabalho, os marcadores BM211 e BM165 se encontraram perto a QTLs, com 1,61 cM e 2,07 cM, respectivamente. A herdabilidade do QTL ligado ao marcador BM211 é alta, de 75,99%, e do QTL ligado ao marcador BM165 é baixa, de 2,55%. Ambos QTLs possuem efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco. No entanto, apenas o marcador BM211 identifica um QTL altamente herdável, sendo este promissor para a SAM.

O marcador PV-gaat001, está ligado a um QTL no sentido de aumentar a resistência ao mofo-branco. Este marcador foi inicialmente mapeado por Yu et al. (2000) em duas populações RILs, DOR364/G19833 e BAT93/JaloEEP558 no GL 4, e tem sido frequentemente reportado na literatura (BLAIR et al., 2003, 2008; MIKLAS et al., 2013; MKWAILA et al., 2011; SOULE et al., 2011). No grupo de ligação em que ele se encontra, há dois QTLs, o WM4.1^{PX} e o WM4.2^{R31}, identificados por Park et al. (2001) e Soule et al. (2011), respectivamente. O PV-gaat001 foi eficiente em identificar um QTL, pelo método do ácido oxálico, estando a 2,13 cM de distância do QTL. Este QTL possui uma alta herdabilidade (82,86%), sendo promissor para a SAM.

O marcador ME1 foi inicialmente marcado no GL 1 por Blair et al. (2008) e posteriormente, foi reportado no GL 9, estando presente no mapa de ligação publicado por Blair et al. (2010) e Galeano et al. (2009). Neste trabalho, o ME1 se encontra próximo a um QTL (2,29 cM) pela avaliação no ácido oxálico, tendo este QTL um efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco, porém com baixa herdabilidade (0,55%).

Os marcadores BMd42a, BM212 e ATA244 que foram avaliados neste trabalho têm aparecido na literatura no GL 10 (FREYRE et al., 1998; GRISI et al., 2007; MIKLAS et al., 2013). Todos identificaram QTLs com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco pelo método do ácido oxálico. Destes, apenas o marcador BMd42a encontra-se a uma distância maior do QTL (29,98 cM), tendo este uma herdabilidade moderada (66,65%). Os marcadores BM212 e ATA244, apesar de estarem perto dos QTLs identificados (2,36 cM e 1,87 cM, respectivamente), eles não são promissores para a SAM, pois os QTLs identificados possuem baixa herdabilidade (0,02% e 1,01%, respectivamente). Segundo Blair, Iriarte e Beebe (2006), o marcador BM212 está próximo também de um QTL para peso de 100 sementes.

Os marcadores PVM02TC116 e PVESTBR_42 aparecem no mapa de ligação para a população F₂ do cruzamento M20/Ex Rico23 publicado por Antonio (2011), nos GL 1 e 2, respectivamente. Destes dois grupos de ligação, apenas o GL 2 pode ser associado ao mapa de consenso do feijoeiro (FREYRE et al., 1998), supondo ser uma junção dos GL B2 e B5. O marcador PVM02TC116 apesar de polimórfico, foi não significativo à identificação de QTLs. Já o marcador PVESTBR_42, identificou um QTL com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco, com 2,43 cM de distância. Este QTL possui uma herdabilidade moderada, de 47,83%. Segundo Antonio (2011), o marcador PVESTBR_42 flanqueia os QTLs WM2.2 e WM2.3, sendo identificado um total de quatro QTLs neste grupo de ligação.

Os marcadores PV188, PV74, PVESTBR_185, PVESTBR_204, BMc94 e BMc83 foram significativos na identificação de QTLs de resistência ao mofo-branco pelo método do ácido oxálico. Destes, o BMc94, apesar de identificar um QTL altamente significativo e com alta herdabilidade (83,8%), segrega independentemente deste QTL, tendo uma distância de 50,10 cM, não sendo, portanto, eficiente para a SAM. Os marcadores PVESTBR_185 e BMc83 identificam QTLs no sentido de reduzir a resistência ao mofo-branco, estando relativamente perto destes (7,54 cM e 2,61 cM, respectivamente), tendo estes QTLs, alta herdabilidade (72,25% e 79,08%, respectivamente). Estes marcadores, juntamente com os AFLPs EAGG/MCAG₂₅₂, EAAG/MCAG₄₄₇, EAAG/MCAG₃₉₈, EAGA/MCAG₁₈₆, EACC/MCAT₂₈₂, EACA/MCAT₇₀₀, EACA/MCAT₄₄₇, e os SRAPs Me9F/Em7R₇₀₀, Me9F/Em7R₁₇₃ não têm sido reportados na literatura. Vale ressaltar que todos os marcadores AFLPs e SRAPs identificaram QTLs de baixa herdabilidade, não sendo, portanto, eficientes para a SAM na avaliação pelo método de absorção do ácido oxálico.

4.5 Identificação de QTLs pelo método do *straw test*

A detecção de QTLs associados à resistência ao mofo-branco pela avaliação no *straw test* pode ser visualizada pela Figura 4 e Tabela 5. Na ordenada está disposta a escala dos valores do teste de Wald e na abscissa está a representação dos marcadores.

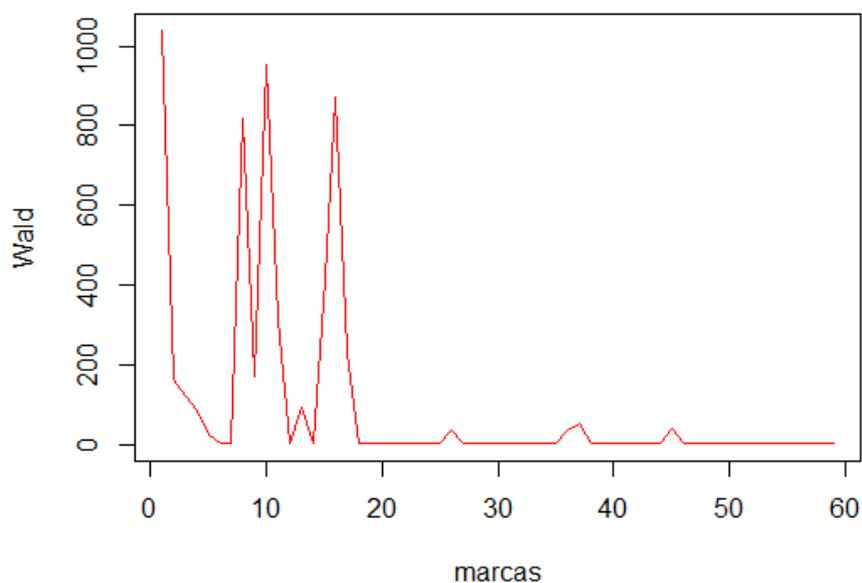


Figura 4 Identificação dos QTLs de resistência ao mofo-branco por marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs utilizando procedimento bayesiano *shrinkage*, pelo método do *straw test*

Dentre os 59 marcadores utilizados, 17 identificaram QTLs para resistência ao mofo-branco, sendo 13 SSRs (BM184, BM187, BM211, BMd42a, PVM02TC116, PV188, PV74, PVESTBR_185, PVESTBR_204, PV-gaat001, ME1, BMc94 e BMc83) e quatro AFLPs (EAAG/MCAG₂₂₄, EACC/MCAT₁₄₁, EACC/MCAT₁₂₆ e EACA/MCAT₁₄₈). Destes, apenas o BM184, o PV188, o PVESTBR_185 e o BMc94 estão associados à QTLs altamente significativos.

O efeito dos QTLs para expressão da resistência ao mofo-branco está representado na Figura 5. Na ordenada está disposto o efeito, variando de -0,2 (contribui para aumentar a resistência) a 0,2 (contribui para reduzir a resistência). Na abscissa está a representação dos marcadores.

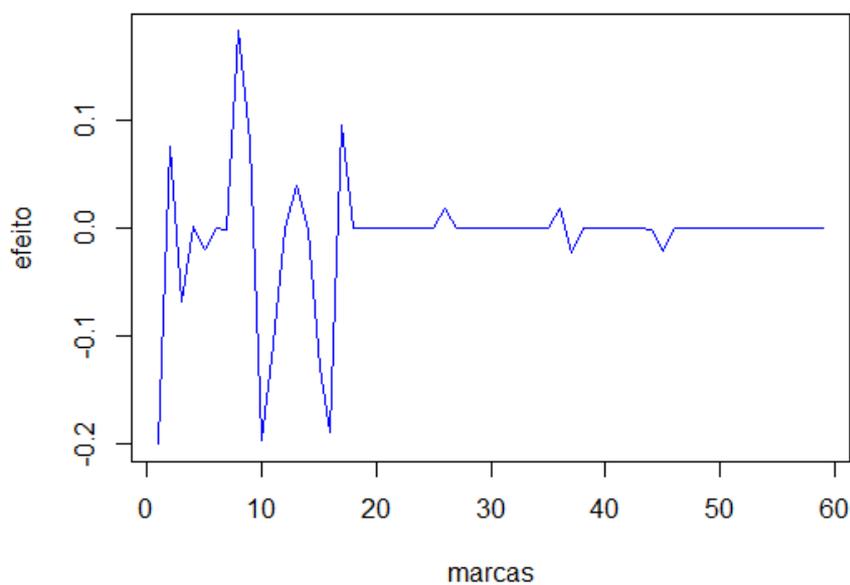


Figura 5 Efeito do QTL associado ao marcador pelo método do *straw test*

Dentre os 17 marcadores, nove estão ligados à QTLs com efeitos em aumentar a resistência ao mofo-branco. Estes QTLs são: BM184, BM211, PVM02TC116, PVESTBR_185, PVESTBR_204, ME1, BMc94, EACC/MCAT₁₂₆, EACA/MCAT₁₄₈. Destes, apenas três estão relacionados à QTLs altamente significativos (BM184, PVESTBR-185 e BMc94).

A frequência de recombinação do QTL com o marcador está representada na Figura 6 e Tabela 5. Na ordenada está disposta a frequência de recombinação e na abscissa está a representação dos marcadores.

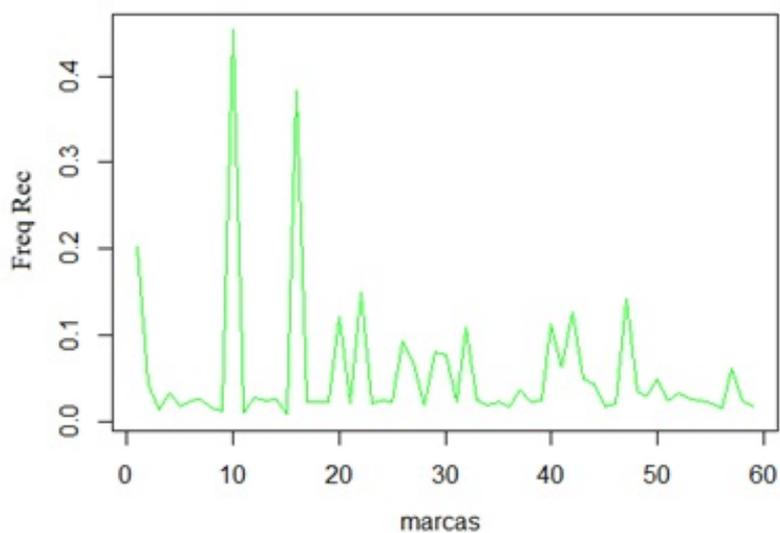


Figura 6 Frequência de recombinação pelo método do *straw test*

Pode-se observar que os marcadores BM184, PVESTBR_185 e BMc94 segregam quase que independentemente dos QTLs a eles associados, pois possuem uma alta frequência de recombinação (de 20,29% a 45,31%), não sendo portanto, considerados eficientes para serem utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM).

O resumo dos dados de distância, em cM, entre marcador e o QTL, da posição do marcador na figura e do efeito e herdabilidade do QTL associado à resistência ao mofo-branco pela avaliação no *straw test* encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 Resumo dos dados para *straw test* para distância entre marcador e QTL, posição dos marcadores nas figuras, efeito do QTL associado ao marcador e suas respectivas magnitudes

Marcador	Posição	FR ^a (%)	Distância ^b	Efeito	Wald ^c	Herd ^d (%)
BM184	1	20,29	21,53	0,2	1038,04	84,48
BM187	2	4,47	4,49	-0,077	164,57	49,7
BM211	3	1,45	1,45	0,068	120,37	76,93
BMd42a	4	3,32	3,32	-0,003	84,46	3,01
PVM02TC116	5	1,7	1,7	0,02	25,24	2,57
PV188	8	1,59	1,59	-0,184	819,59	3,74
PV74	9	1,21	1,21	-0,081	171,98	0,87
PVESTBR_185	10	45,32	75,33	0,197	952,96	75,71
PVESTBR_204	11	1,08	1,08	0,108	313,72	3,39
PV-gaat001	13	2,41	2,41	-0,04	93,98	0,12
ME1	15	0,82	0,82	0,129	416,94	71,37
BMc94	16	38,39	50,76	0,189	873,32	84,94
BMc83	17	2,24	2,24	-0,096	230,64	57,92
EAAG/MCAG ₂₂₄	26	9,42	9,54	-0,019	37,03	77,51
EACC/MCAT ₁₄₁	36	1,8	1,8	-0,019	35,74	0,39
EACC/MCAT ₁₂₆	37	3,68	3,69	0,022	52,11	2,01
EACA/MCAT ₁₄₈	45	1,8	1,8	0,021	41,08	4,92

^a Frequência de recombinação; ^b Distância, em cM, do marcador para o QTL; ^c Valor do teste de Wald; ^d Herdabilidade do QTL; + Aumentar a resistência; - Reduzir a resistência

Neste trabalho os marcadores SRAPs não foram eficientes em identificar QTLs para resistência ao mofo-branco pelo método do *straw test*. Porém, sua eficiência tem sido relatada na literatura. Soule et al. (2011) detectaram dois QTLs associados à resistência ao mofo-branco na população RIL Benton/VA19 e sete QTLs na RIL Raven/I9365-31, acrescentando informação aos mapas genéticos do feijão já publicados. Um dos QTLs detectados se encontra ligado ao marcador SCAR Sme1Em5, derivado de um marcador SRAP e está localizado no GL 2.

O marcador BM184, pelo *straw test*, identificou um QTL altamente significativo, com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco, porém está relativamente distante do QTL (21,53 cM). Este QTL identificado possui alta herdabilidade, de 84,48%.

O marcador ME1 e PVESTBR_204 são os que se encontram mais próximos à QTLs – com 0,82 cM e 1,08 cM, respectivamente – pela avaliação no *straw test*, tendo estes QTLs efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco. Porém, o QTL identificado por PVESTBR_204 possui uma baixa herdabilidade (3,39%), não sendo promissor para a SAM. Já o marcador ME1 se mostrou promissor para a SAM para resistência ao mofo-branco pelo *straw test*, pois o QTL identificado possui uma alta herdabilidade (71,37%), e está intimamente ligado ao marcador.

Os marcadores PVESTBR_185 e BMc94 identificaram QTLs altamente significativos e com alta herdabilidade (75,71% e 84,94%, respectivamente), porém segregam independentemente do QTL – com 75,33 cM e 50,76 cM, respectivamente –, não sendo, portanto, eficientes para a SAM.

O marcador BM211 identificou um QTL com alta herdabilidade (76,93%), tendo este QTL um efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco pelo *straw test*. Este marcador de se encontra próximo ao QTL, a 1,45 cM, e pode ser considerado promissor para a SAM.

Os marcadores BM187, BMc83 e EAAG/MCAG₂₂₄, apesar de identificar QTLs com herdabilidade de moderada à alta magnitude, estes QTLs possuem o efeito em reduzir a resistência ao mofo-branco. Os demais marcadores identificaram QTLs de baixa herdabilidade, não sendo, portanto, eficientes.

No teste do ácido oxálico houve maior significância de marcadores SSRs, AFLPs e SRAPs.

Pode-se observar, pela Tabela 6, que 12 marcadores que identificaram QTLs pelo ácido oxálico, também identificaram pela análise do *straw test*, sendo todos SSRs (BM184, BM187, BM211, BMd42a, PV188, PV74, PVESTBR_185, PVESTBR_204, PV-gaat001, ME1, BMc94 e BMc83). Destes, seis não estão mapeados (PV188, PV74, PVESTBR_185, PVESTBR_204, BMc94 e BMc83) e cinco estão relacionados à QTLs com mudança no efeito de expressão para os diferentes métodos (BMd42A, PV188, PVESTBR_185, PV-gaat001 e BMc94).

Tabela 6 Coincidência entre marcadores próximos a QTLs pela análise de *straw test* e pela análise do ácido oxálico

Marcador	GL	<i>Straw test</i>				Ácido Oxálico			
		Wald ^a	D ^b	Herd ^c	E ^d	Wald ^a	D ^b	Herd ^c	E ^d
BM184	9	1038,04	21,53	54,85	+	322,43	3,34	84,48	+
BM187	6	164,57	4,49	85,87	-	2676,59	43,84	49,7	-
BM211	8	120,37	1,45	75,99	+	118,5	1,61	76,93	+
BMd42a	10	84,46	3,32	66,65	-	954,82	29,98	3,01	+
PV188	desc	819,59	1,59	37,48	-	47,97	1,74	3,74	+
PV74	desc	171,98	1,21	54,27	-	64,8	1,91	0,87	-
PVESTBR_185	desc	952,96	75,33	72,25	+	162,55	7,54	75,71	-
PVESTBR_204	desc	313,72	1,08	66,95	+	117,69	2,05	3,39	+
PV-gaat001	4	93,98	2,41	82,86	-	301,62	2,13	0,12	+
ME1	9	416,94	0,82	0,55	+	42,67	2,29	71,37	+
BMc94	desc	873,32	50,76	83,8	+	745,2	50,1	84,94	-
BMc83	desc	230,64	2,24	79,08	-	310,87	2,61	57,92	-

^a Magnitude do QTL pelo teste de Wald; ^b Distância, em cM, do marcador para o QTL; ^c Herdabilidade do QTL; ^d Efeito do QTL; + Aumentar a resistência; - Reduzir a resistência; ^{desc} desconhecido

A não coincidência de QTLs pode ser explicada pela baixa correlação genotípica entre as avaliações do ácido oxálico e do *straw test*. Neste trabalho, houve uma correspondência de apenas 40% dos marcadores entre o teste do

ácido oxálico e do *straw test*. Peterson et al. (1991) relatam que algumas características correlacionadas podem demonstrar os mesmos marcadores associados. No caso da resistência ao mofo-branco, a identificação de QTLs por diferentes marcadores é mais um indicativo de que há mecanismos diferentes de resistência envolvidos no controle da doença.

Na Tabela 6 há marcadores identificando QTLs diferentes em cada tipo de análise e alguns destes QTLs possuem uma inversão no efeito para a resistência ao mofo-branco.

Ambos os marcadores BM184 e ME1 encontram-se no GL 9. Os QTLs identificados por estes dois marcadores pelo *straw test* possuem maior significância pelo teste de Wald e menor herdabilidade do que os QTLs identificados por estes mesmos marcadores no ácido oxálico. Pode-se observar que o marcador BM184 se encontra longe do QTL pelo *straw test*, com 21,53 cM, porém se encontra próximo do QTL pelo ácido oxálico, com 3,34 cM. Relação inversa ocorre com o marcador BM187, o qual se encontra em outro GL (GL 6). Este marcador identifica um QTL de significância moderada pelo teste de Wald no *straw test*, com 85,87% de herdabilidade e estando o marcador a 4,49 cM do QTL, e identifica o QTL de maior significância no ácido oxálico, porém com 49,7% de herdabilidade e estando o marcador a 43,84 cM do QTL.

Os marcadores BMd42a, PV188, PVESTBR_185, PV-gaat001 e BMc94 possuem sentidos contrários de resistência entre os testes avaliados. O marcador BMd42a identifica um QTL com efeito em reduzir a resistência e se encontra a 3,32 cM, pelo *straw test*. Este mesmo marcador identifica um QTL com efeito em aumentar a resistência, porém se encontra a 29,98 cM pelo ácido oxálico. Relação inversa ocorre com o marcador PVESTBR_185, sendo que no *straw test* ele segrega independentemente do QTL e no ácido oxálico ele se encontra a 7,54 cM.

O marcador BM211 identifica QTLs com efeitos em aumentar a resistência ao mofo-branco em ambos os testes, estando próximo à QTLs de alta herdabilidade. Este marcador, portanto, torna-se eficiente para a SAM.

Os marcadores BM211 e BMc94 identificaram QTLs com a mesma distância e tendo, os QTLs, a mesma herdabilidade para ambos os testes. Esta ocorrência pode sugerir a presença também de QTLs pleiotrópicos. Isto corrobora com a correlação feita entre o método do ácido oxálico e o do *straw test*, que apesar de baixa, foi significativa. Porém, a comprovação desta hipótese somente é possível com o mapeamento destes QTLs e análise da população com maior número de marcadores, não sendo, portanto, conclusiva neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

É possível selecionar progênies que possuem resistência parcial ou fisiológica ao mofo-branco tanto por meio do ácido oxálico quanto pelo *straw test*.

No caso da resistência ao mofo-branco, a identificação de QTLs por diferentes marcadores é mais um indicativo de que há mecanismos diferentes de resistência envolvidos no controle da doença.

Os marcadores BM184, BM211, PV-gaat001 estão próximos a QTLs com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco e de alta herdabilidade na análise com o ácido oxálico, sendo assim mais promissores para a SAM.

Os marcadores ME1 e BM211 estão próximos a QTLs, pelo método do *straw test*, com efeito em aumentar a resistência ao mofo-branco e de alta herdabilidade, sendo assim mais promissores para a SAM.

O marcador BM211 é o mais promissor para a seleção de genótipos resistentes ao mofo-branco pela SAM, considerando ambos os métodos de avaliação da resistência.

REFERÊNCIAS

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

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, 1979.

ALVES, F. C. **Seleção de progênies de feijão com grão tipo “carioca”, porte arbustivo e resistência ao mofo branco**. 2012. 71 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ANTONIO, R. P. **Controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco e seleção assistida por marcadores moleculares**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

_____. **Identificação de QTLs de resistência ao mofo branco e de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em feijoeiro**. 2011. 155 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ANTONIO, R. P. et al. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 733-740, May/June 2008.

BALESTRE, M. **Mapeamento bayesiano de múltiplos caracteres: efeitos pleiotrópicos no estudo da herança dos componentes da produção em milho**. 2012. 89 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BALL, R. D. Bayesian methods for quantitative trait loci mapping based on model selection: approximate analysis using the Bayesian information criterion. **Genetics**, Austin, v. 159, n. 3, p. 1351-1364, Nov. 2001.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 23, n. 1, p. 88-98, 2001.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2000. p. 63-223.

BLAIR, M. W. et al. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 1, p. 91-103, Dec. 2008.

_____. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 8, p. 1362-1374, Nov. 2003.

_____. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 1059-1070, Oct. 2010.

BLAIR, M. W.; IRIARTE, G.; BEEBE, S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1149-1163, Apr. 2006.

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

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

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

CABI DATABASES. **Dictionary of the Fungi**. Disponível em: <<http://www.speciesfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=191471>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 17-24, jan. 2007.

CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e uso do retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

CARNEIRO, F. F.; SANTOS, J. B.; LEITE, M. E. Marker-assisted backcrossing using microsatellites and validation of *SCAR Phs* marker for resistance to white mold in common bean. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 12, n. 6, p. 9, 2010.

CARVALHO, R. S. B. **Reação de progênies de feijão tipo carioca ao mofo branco**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CESSNA, S. G. et al. 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.

CHE, X.; XU, S. Significance test and genome selection in bayesian *shrinkage* analysis. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 10, p. 1-11, Mar. 2010.

CHRISTIAS, C.; LOCKWOOD, J. L. Conversion of mycelia constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient deprived conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 602-605, 1973.

COLLARD, B. C. Y. et al. Introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, n. 1, p. 169-196, Jan. 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2010/2011: décimo primeiro levantamento**. Brasília, 2013. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portuges_agosto_2013_port.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2013.

DIAS, J. A. **Controle genético da reação do feijoeiro ao mofo branco por meio da resistência ao ácido oxálico**. 2013. 42 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

DICKMAN, M. B.; MITRA, A. Arabidopsis thaliana as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 255-263, 1992.

DURMAN, S. B.; MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. M. Variation in oxalic acid production and mycelia compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 12, p. 2180-2184, 2005.

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

ESPÓSITO, M. A. et al. Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares SRAP para diferenciar variedades de *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, Cuyo, v. 43, n. 2, p. 35-45, 2011.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares**. Planaltina: EMBRAPA, 2007. 102 p.

FAVARON, F.; SELLA, L.; OVIDIO, R. d'. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 12, p. 1402-1409, 2004.

FREYRE, R. et al. 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.

GALEANO, C. H. et al. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 629-630, Dec. 2009.

GARCIA, A. A. F. et al. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 2, p. 298-314, 2006.

GARCIA, R. A. V. et al. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC Genetics**, London, v. 12, n. 41, p. 1-7, May 2011.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 46, n. 7, p. 319-330, 1975.

GENCHEV, D.; KIRYAKOV, I. Inheritance of resistance to white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) in A195 (*Phaseolus vulgaris* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 8, n. 2/3, p. 181-187, 2002.

GILMORE, B.; MYERS, J. R. Examining the *Phaseolus coccineus* collection for white mold resistance. **Hortscience**, Alexandria, v. 35, n. 6, p. 399-400, 2000.

_____. Preliminary molecular marker map for *Phaseolus coccineus*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 47, n. 47, p. 87-88, 2004.

GODOY, G. et al. 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, 1990.

GONÇALVES, P. R. C. **Reação de progênies de feijão derivadas de seleção recorrente para mofo branco, ao ácido oxálico**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

GORING, H. H. H.; TERWILLIGER, J. D.; BLANGERO, J. Large upward bias in estimation of locus-specific effects from genome-wide scans. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 69, n. 6, p. 1357-1369, Dec. 2001.

GRISI, M. C. M. et al. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population BAT93/JALO EEP558. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 691-706, Sept. 2007.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, p. 3703-3711, Nov. 2004.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. D. Multiple interval mapping for quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Austin, v. 152, n. 3, p. 1203-1216, July 1999.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 580 p.

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

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

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, maio/jun. 2000.

LARA, L. A. C. **Identificação de QTLs de feijão para resistência à *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. 2011. 50 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

LIMA, I. A. **Seleção de progênies de feijoeiro tipo carioca em populações de retrocruzamento para resistência ao mofo branco, antracnose e mancha angular**. 2010. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

LIU, H. B. **Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC, 1998. 611 p.

LÓPEZ ANIDO, F. et al. Differential expression: of the genetic variance in F2 populations of reciprocal crosses of artichoke. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 679-685, 2010.

LU, G. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 509-516, 2003.

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

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

MATHER, K. Variation and selection of polygenetic characters. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 41, n. 2/3, p. 159-193, 1941.

MAXWELL, J. J. et al. Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2285-2294, Nov./Dec. 2007.

MIKLAS, P. N. Potential marker-assisted selection for resistance to white mold in pinto and great northern bean. **National Sclerotinia Initiative Annual Meeting**, Minneapolis, v. 5, p. 18-20, Jan. 2006.

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, 2003.

MIKLAS, P. N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 525-543, Mar. 2013.

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

MKWAILA, W. et al. Identification of QTL for agronomic traits and resistance to white mold in wild and landrace germplasm of common bean. **Plant Breeding**, Berlin, v. 130, n. 6, p. 665-672, Dec. 2011.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, n. 2, p. 87-103, Apr. 1997.

MORAES, M. C. **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 141 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MOURA, A. L. D. **Efeito da cafeína sobre a regulação da expressão gênica de poligalacturonases em *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

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

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Integrated genetic map of citrus base on RAPD markers. **Fruits**, Montpellier, v. 60, n. 3, p. 187-193, 2005.

OLIVEIRA, R. P. et al. Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 741-746, Sept. 2004.

PAPA, R.; GEPTS, P. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 239-250, Jan. 2003.

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

PETERSON, A. H. et al. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, Bethesda, v. 127, n. 1, p. 181-197, Jan. 1991.

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.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

RAMALHO, M. A. P. et al. (Ed.). **Genética na agropecuária**. 5. ed. rev. Lavras: UFLA, 2012. 565 p.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2012. 305 p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.

ROCHA, R. P. **Manejo da podridão de *Sclerotinia (Sclerotinia sclerotiorum)* e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

RODRIGUES, T. B. **Efeito da seleção natural em alelos microssatélites (SSR) do feijoeiro e associação com QTLs de caracteres agrônômicos**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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

ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 75-81, 2001.

SABURIDO, M. S. **Recombinantes naturales del acervo genético Mesoamericano y su implicación en la evolución y genética de la especie *Phaseolus vulgaris* L.** 2011. 325 p. Tesis (Doctora em Biología) - Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2011.

SAGATA, É. **Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SALLES, G. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites**. São Paulo: EMBRAPA, 2003. 11 p.

SATAGOPAN, J. M. et al. Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov chain Monte Carlo. **Genetics**, Austin, v. 144, n. 2, p. 805-816, Oct. 1996.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.

SCHNEIDER, L.; RUBENS, C. A.; PONTE, E. M. D. Podridão-branca-da-haste. In: SCHNEIDER, L. et al. (Ed.). **Fitopatologia.net**: herbário virtual. Porto Alegre: UFRGS, 2012. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=255>>. Acesso em: 31 jan. 2012.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. ed. rev. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.

SCHWARTZ, H. F. et al. Field measurement of white effects upon dry beans with genetic resistance or upright plant architecture. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 699-702, 1987.

_____. Inheritance of white mold resistance in *Phaseolus vulgaris* x *P. coccineus* crosses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 9, p. 1167-1170, 2006.

_____. Inheritance of white mold resistance in the interspecific crosses of pinot cultivars Othello and UI 320 and *Phaseolus coccineus* L. accessions PI433246 and PI439534. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 47, p. 249-280, 2004.

SEN, S.; CHURCHILL, G. A. A statistical framework for quantitative trait mapping. **Genetics**, Austin, v. 159, n. 1, p. 371-387, Sept. 2001.

SENA, M. R. et al. Envolvimento de agricultores no processo seletivo de novas linhagens de feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 407-412, abr. 2008.

SHIZHONG, X.; ZHIQIU, H. Mapping quantitative trait loci using distorted markers. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2009, p. 1-11, 2009.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**: para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350 p.

SILLANPAA, M. J.; CORANDER, J. Model choice in gene mapping: what and why. **Trends in Genetics**, London, v. 159, n. 6, p. 371-387, June 2002.

SILVA, A. P.; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 487-496, June 2009.

SILVA, C. A. et al. Implicações da origem das linhagens de feijoeiro na magnitude da interação com ambientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 720-728, jul. 2011.

SILVA, M. G. de M.; SANTOS, J. B. dos; ABREU, A. de F. B. Identificação de famílias de feijão com resistência múltipla a antracnose e mancha angular. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: UFG, 2005. p. 482-485.

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

SONG, X. L.; SUN, X. Z.; ZHANG, T. Z. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 163-169, 2006.

SOULE, M. et al. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and 19365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 123-139, 2011.

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

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS® statistical package**. Cary, 2007. Software.

TERÁN, H. et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 49, p. 115-116, 2006.

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

TOLEDO, E. R. et al. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 107-114, 2008.

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

UNIFEIJÃO. **Fonte de proteínas**. Disponível em: <http://www.unifeijao.com.br/feijao_do_brasil/doencas_brasil.php>. Acesso em: 7 jul. 2013.

VALENTINI, G. et al. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Revista Biotemas**, Lages, v. 23, n. 4, p. 1-8, dez. 2010.

VIEIRA, E. A. et al. **Mapeamento genético de caracteres quantitativos e sua interação com o ambiente**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2006. 28 p. (Documentos, 170).

VOS, H. P. R. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Sept. 1995.

WANG, H. et al. Bayesian *shrinkage* estimation of quantitative trait loci parameters. **Genetics**, Austin, v. 170, n. 1, p. 465-480, May 2005.

WEIR, B. **Genetic data analysis**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447 p.

XU, S. Estimating polygenic effects using markers of the entire genome. **Genetics**, Austin, v. 163, n. 2, p. 789-801, Feb. 2003.

XU, S. QTL mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, Baltimore, v. 180, n. 4, p. 2201-2208, Dec. 2008.

YI, N.; XU, S. Bayesian mapping of quantitative trait loci under complicated mating designs. **Genetics**, Austin, v. 157, n. 4, p. 1759-1771, Apr. 2001.

YOKOYAMA, L. P. **Tendências de mercado e alternativas de comercialização do feijão**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, 43).

YU, K. et al. Integrating of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, Cary, v. 91, n. 6, p. 429-434, 2000.

ZIMMERMAN, S. J. **Transfer, characterization and mapping of white mold resistance in an advanced backcross interspecific population between *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus***. 2010. 208 p. Thesis (Master of Science in Horticulture) - Oregon State University, Corvallis, 2010.

APÊNDICES

Tabela 1 Teste χ^2 para distorção de segregação para frequências genóticas de marcadores SSR

Primer	Frequência Genotípica Observada				χ^2
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	-	
BM184	49	100	37	0	2,60 ^{ns}
BM187	50	91	45	0	0,36 ^{ns}
BM211	43	41	86	16	67,31*
BMd42a	18	54	101	13	104,06*
PVM02TC116	95	27	63	1	103,83*
BM165	108	33	36	9	128,19*
BM212	14	41	131	0	205,34*
PV188	113	28	39	6	146,27*
PV74	84	38	53	11	66,99*
PVESTBR_185	48	91	47	0	0,10 ^{ns}
PVESTBR_204	16	53	117	0	144,10*
PVESTBR_42	31	43	112	0	124,31*
PV-gaat001	24	48	108	6	117,60*
ATA244	111	37	33	5	130,48*
ME1	23	42	119	2	154,52*
BMc94	26	152	0	8	96,79*
BMc83	55	86	43	2	2,35 ^{ns}

* Significativo a 95% confiança pelo teste do χ^2 ; ^{ns} Não significativo; - Dado perdido

Tabela 2 Teste χ^2 para distorção de segregação para frequências fenotípicas dos marcadores AFLP e SRAP

Primer	Frequência Genotípica Observada			
	A ¹ ₋	A ² A ²	-	χ^2
EAGG/MCAG ₃₅₅	113	73	0	20,14*
EAGG/MCAG ₂₈₂	74	112	0	21,68*
EAGG/MCAG ₂₅₂	162	24	0	14,52*
EAGG/MCAG ₂₀₉	116	70	0	15,83*
EAAG/MCAG ₄₄₇	19	166	1	21,41*
EAAG/MCAG ₃₉₈	119	66	1	11,24*
EAAG/MCAG ₃₅₅	101	84	1	41,08*
EAAG/MCAG ₃₀₀	112	73	1	20,63*
EAAG/MCAG ₂₂₄	160	25	1	13,02*
EAAG/MCAG ₁₄₁	42	143	1	0,52 ^{ns}
EAGA/MCAG ₄₄₇	124	61	1	6,27*
EAGA/MCAG ₂₂₄	35	150	1	3,65 ^{ns}
EAGA/MCAG ₁₈₆	36	149	1	3,03 ^{ns}
EACC/MCAG ₂₈₂	108	77	1	27,26*
EACC/MCAG ₁₇₈	25	160	1	13,02*
EACC/MCAT ₆₅₀	101	84	1	41,08*
EACC/MCAT ₃₅₅	50	135	1	0,40 ^{ns}
EACC/MCAT ₂₈₂	73	112	1	20,63*
EACC/MCAT ₁₄₁	67	118	1	12,41*
EACC/MCAT ₁₂₆	60	125	1	5,45*
EACC/MCAT ₁₁₂	69	116	1	14,92*
EACA/MCAT ₇₀₀	106	79	1	30,92*
EACA/MCAT ₆₃₀	160	26	0	12,05*
EACA/MCAT ₅₃₇	139	47	0	0,01 ^{ns}
EACA/MCAT ₄₄₇	164	21	1	18,38*
EACA/MCAT ₂₂₄	54	132	0	1,61 ^{ns}
EACA/MCAT ₁₅₈	120	65	1	10,13*

“Tabela 2, conclusão”

Primer	Frequência Genotípica Observada			
	A ¹ ₋	A ² A ²	-	χ^2
EACA/MCAT ₁₄₈	118	68	0	13,25*
EACA/MCAT ₁₄₁	118	68	0	13,25*
EACA/MCAT ₁₁₂	17	168	1	24,66*
EACA/MCAT ₈₉	74	112	0	21,68*
Me9F/Em7R ₁₀₀₀	88	98	0	49,38*
Me9F/Em7R ₇₀₀	54	132	0	1,61 ^{ns}
Me9F/Em7R ₄₄₇	100	86	0	44,74*
Me9F/Em7R ₃₄₅	76	110	0	24,95*
Me9F/Em7R ₂₂₄	99	87	0	47,03*
Me9F/Em7R ₂₀₉	82	104	0	36,14*
Me9F/Em7R ₁₇₈	118	68	0	13,25*
Me9F/Em7R ₁₇₃	157	29	0	8,78*
Me10F/Em1R ₄₇₃	141	45	0	0,06 ^{ns}
Me10F/Em1R ₂₅₀	103	82	1	36,84*
Me10F/Em1R ₁₈₅	148	38	0	2,07 ^{ns}

* Significativo a 95% confiança pelo teste do χ^2 ; ^{ns} Não significativo; - Dado perdido