

EDER JORGE DE OLIVEIRA

**Seleção de Linhagens de Feijoeiro Resistentes à Mancha-angular Assistida
por Marcadores Moleculares e Identificação de Novas Fontes de Resistência**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

EDER JORGE DE OLIVEIRA

**Seleção de Linhagens de Feijoeiro Resistentes à Mancha-angular Assistida
por Marcadores Moleculares e Identificação de Novas Fontes de Resistência**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 8 de julho de 2002.

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin
(Conselheira)

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Aluízio Borém de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, Adahil (*in memoriam*) e Maria Aparecida

Aos meus irmãos, Gil, Ilma, Ivone, José Rubens e João César

À Gilmara A. Fachardo

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir minha existência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pela concessão da bolsa.

Ao Professor Alúzio Borém, pela orientação e preocupação com o desenvolvimento da pesquisa.

À Pesquisadora Ana Lilia Alzate-Marin, pela amizade, confiança, sugestões, pelo apoio e incentivo na realização do trabalho.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira pelo incentivo, dedicação e incansável luta pela continuidade da pesquisa.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelo apoio e valiosas sugestões na publicação dos trabalhos.

Aos professores José Eustáquio de Souza Carneiro e Cosme Damião Cruz pelas valiosas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores das disciplinas cursadas na Universidade Federal de Viçosa.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Feijão, Eveline, Lucianne, Samir, Carlos, Marcelo, Simoni, Cristiano, Gal, Raquel, Luciana e Giordani. Aos colegas do BIOMOL e Laboratório de Proteína, Rita, Klever, Thiago, Fábio, Márcia, Taís, Vagner, Gerardo, Vilmar, Chico, Newton, João Paulo e Naldo pelo convívio.

Aos funcionários Aloisio, Glaucia, Fausto, pelo apoio na condução do trabalho. Em especial a José Pinto Rosa que muito ajudou na realização dos trabalhos em casa-de-vegetação.

À Gilmara que com paciência e carinho soube entender minhas decisões e administrar o tempo. Aos seus pais e irmãos pela motivação.

Aos meus amigos da república em Viçosa (Ítalo, Guilherme, João Paulo, André e Santiago) e da república em Lavras (Alysson, Gustavo, Vladimir, Ebert e Guillermo).

À Secretaria de Genética e Melhoramento, nas pessoas de Rita, Conceição, Sr. Paulo, que muito me ajudaram ao longo do curso.

Ao Professor Paulo Sávio Lopes coordenador do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Aos amigos do curso que com grande amizade e companheirismo tornaram muito agradável o convívio em Viçosa.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

EDER JORGE DE OLIVEIRA, filho de Adahil de Oliveira (*in memorian*) e Maria Aparecida de Oliveira, nasceu em Pará de Minas, Minas Gerais, em 23 de abril de 1977.

De 1992 a 1994, cursou o segundo grau na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF/UFV, colando grau como Técnico em Agropecuária em janeiro de 1995.

Em agosto de 1995, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), colando grau em julho de 2000.

Em agosto de 2000, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Genética Molecular e Melhoramento Vegetal, defendendo tese em 8 de julho de 2002.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Importância da Mancha-angular.....	5
3.2. O fungo <i>Phaeoisariopsis griseola</i> (Sintomatologia e epidemiologia).....	6
3.3. Manejo da mancha-angular e medidas de controle	7
3.4. Variabilidade do patógeno.....	8
3.5. Fontes de resistência à <i>P. griseola</i>	10
3.6. Herança da resistência à <i>P. griseola</i>	12
3.7. Melhoramento Genético e Piramidação de genes de resistência.....	13
3.8. Marcadores moleculares.....	15
3.8.1. Marcadores RAPD no melhoramento visando resistência a patógenos.....	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À MANCHA- ANGULAR	
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Material genético e cruzamentos.....	33
2.2. Raças e preparo do inóculo.....	35
2.3. Inoculação e avaliação.....	36

2.4. Condições de amplificação do DNA pela técnica de RAPD e SCAR.....	36
2.5. Análise da segregação dos genes de resistência.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1. Obtenção das linhagens RC ₂ F ₃ – Rudá x México 54.....	39
3.2. Obtenção das linhagens RC ₁ F ₃ – Rudá x MAR-2.....	43
3.3. Obtenção das linhagens RC ₁ F ₃ – Rudá x BAT 332.....	46
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À MANCHA-ANGULAR GENETICAMENTE MAIS PRÓXIMAS DO GENITOR RECORRENTE

1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Material genético.....	56
2.2. Extração de DNA e amplificação pela técnica de RAPD	57
2.3. Análise dos dados	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1. Análise molecular das linhagens RC ₂ F ₃ do cruzamento Rudá x México 54.....	59
3.2. Análise molecular das linhagens RC ₁ F ₃ do cruzamento Rudá x MAR-2.....	62
3.3. Análise molecular das linhagens RC ₁ F ₃ do cruzamento Rudá x BAT 332.....	65
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	73
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1. Material genético.....	78
2.2. Raças e preparo do inóculo.....	81
2.3. Inoculação e avaliação.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

RESUMO

OLIVEIRA, Eder Jorge, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2002. **Seleção de Linhagens de Feijoeiro Resistentes à Mancha-angular Assistida por Marcadores Moleculares e Identificação de Novas Fontes de Resistência.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Ana Lília Alzate-Marin.

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, é uma das principais doenças do feijoeiro, provocando perdas que podem chegar a 70% da produção no Brasil. Para o controle da doença, o uso de cultivares resistentes é uma medida eficiente, prática e econômica, no entanto, a alta variabilidade patogênica de *P. griseola* dificulta o trabalho dos melhoristas. Neste caso, a estratégia de piramidação de genes de resistência, pode ser utilizada, buscando-se uma resistência mais duradoura. Este trabalho teve como principais objetivos, a obtenção de linhagens de feijoeiro com grãos tipo carioca e resistentes à mancha-angular, além da caracterização de 58 cultivares de feijoeiro quanto a esta doença. Na geração RC₂F₂ do cruzamento Rudá x México 54, procedeu-se a seleção de plantas resistentes por meio de inoculação com a raça 63.19 de *P. griseola*, bem como pelo uso do marcador SCAR OPN02₈₉₀. Estas, geraram 15 famílias RC₂F_{2:3} com grãos tipo carioca, as quais foram avaliadas em teste de progênie, identificando-se duas famílias como homozigotas para o gene de resistência. A partir da análise das distâncias genéticas por marcadores RAPD, foram selecionadas quatro linhagens RC₂F₃ com distâncias genéticas relativas em

relação ao genitor Rudá variando de 8,38 a 11,26%. Para o cruzamento Rudá x MAR-2, utilizou-se a raça 63.39 de *P. griseola* e o marcador RAPD OPE04₅₀₀ na geração RC₁F₂, para seleção de plantas resistentes. Foram selecionadas dezenove famílias RC₁F_{2:3} com grãos tipo carioca, para o teste de progênie. Destas, foram selecionadas duas como resistentes homozigotas. Quatro linhagens RC₁F₃ foram selecionadas com auxílio de marcadores RAPD, com distâncias genéticas relativas variando de 11,73 a 14,17% em relação à cultivar Rudá. Na geração RC₁F₂ do cruzamento entre Rudá x BAT 332, plantas resistentes foram selecionadas, por meio do marcador RAPD OPA012₉₅₀. Selecionaram-se dezessete famílias RC₁F_{2:3} que possuíam grãos do tipo carioca para o teste de progênie. Por este teste, foram selecionadas 5 famílias como homozigotas resistentes. Seis linhagens RC₁F₃ foram selecionados pela análise por RAPD, com distâncias genéticas relativas variando de 13,94 a 14,14% em relação ao Rudá. Na caracterização de 58 cultivares de feijoeiro quanto à reação às raças 63.19, 31.15, 63.55 e 63.23 de *P. griseola*, as cultivares Antioquia 8 e CAL 143, ambas de origem andina e Equador 299 e México 235, de origem mesoamericana, apresentaram resistência às quatro raças testadas. O uso de cultivares andinas e mesoamericanas em programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular é importante, devido às evidências de coevolução patógeno-hospedeiro. Desta forma, Antioquia 8, CAL 143, Equador 299 e México 235 podem ser úteis em tais programas. Todas as outras cultivares possuem algum nível de suscetibilidade às quatro raças de *P. griseola* estudadas. Os mais suscetíveis foram: AB 7419, AN 9022180, Aporé, Bambuí, Carioca 80, CNC, CNF 9287, Diamante Negro, Early Gallatin, Jamapa e KW 780.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Eder Jorge, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2002.
Selection of Common Bean Lines Resistant to Angular Leaf Spot Assisted by Molecular Markers and Identification of New Resistance Sources.
Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Ana Lília Alzate-Marin.

Angular leaf spot caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* is a major common bean disease, and may cause yield losses up to 70% in Brazil. An effective, practical and economic way to control the angular leaf spot is to use resistant cultivars, however, high *P. griseola* pathogenic variability makes the development of such resistant cultivars a difficult task. In this case, pyramiding of resistance genes may be used if a longer lasting resistance is sought. This work aimed at obtaining common bean lines with “carioca” grain type and resistant to the angular leaf spot, as well as the characterization of 58 common bean cultivars to this disease. In generation BC₂F₂ of Ruda x Mexico 54 cross the selection of resistant plants was proceeded by inoculation of race 63.19 of *P. griseola*, as well as by the use of the SCAR OPN02₈₉₀ marker. Those plants bred 15 BC₂F_{2:3} families with “carioca” grain type, which were used in the progeny test, and two families were identified as resistant and homozygous. From the analyses of genetic distances by RAPD markers, four BC₂F₃ plants were selected with relative genetic distances to the recurrent parent Ruda ranging from 8.38 to 11.26%. In the Ruda x MAR-2 cross, race 63.39 of *P. griseola* and the RAPD OPE04₅₀₀ were used in

generation BC₁F₂ to select resistant plants. Nineteen BC₁F₂ plants were selected for progeny test which bred BC₁F_{2:3} families with “carioca” grain type, From those 19 families, 2 were selected as homozygous resistant. Through the analysis of BC₁F₃ plants by RAPD markers, four were selected with relative genetic distances to Ruda ranging from 11.73 to 14.17%. In generation BC₁F₂ of Ruda x BAT 332 cross, resistant plants were selected using the RAPD OPAO12₉₅₀ marker. Those plants bred 17 BC₁F_{2:3} families with “carioca” grain type, which were used in the progeny test, and 5 families were identified as resistant homozygous. Six BC₁F₃ individuals were selected through the RAPD analysis, with relative genetic distances, ranging from 13.94 to 14.14% to Ruda. In the characterization of 58 common bean cultivars, for their reaction to the races 63.19, 31.15, 63.55 and 63.23 of *P. griseola*, the cultivars Antioquia 8 and CAL143, both of Andean, and Equador 299 and México 235, of Mesoamerican common bean groups, showed resistance to the four tested races. The use of Andean and Mesoamerican common beans in breeding programs aiming angular leaf spot resistance is an important strategy due to the evidences of pathogen-host coevolution. Thus, Antioquia 8, CAL 143, Equador 299 and México 235 may be good choices in such programs. All the other cultivars were susceptible to at least one of the four races tested. Amongst the most susceptible ones were: AB 7419, AN 9022180, Aporé, Bambuí, Carioca 80, CNC, CNF 9287, Diamante Negro, Early Gallatin, Jamapa and KW 780.

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum é atualmente cultivado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todos os continentes (SCHWARTZ et al., 1996). Aspectos alimentares e o processo de domesticação da espécie contribuíram para que o feijão se tornasse uma das principais leguminosas comestíveis nestas regiões (HALL, 1991).

O feijão destaca-se como importante fonte de proteína na dieta humana mundial (SCHWARTZ et al., 1996) e como alternativa de custo inferior ao da proteína animal (TEIXEIRA e ROCHA, 1988), especialmente importante em países em desenvolvimento. No Brasil, o feijão está incorporado aos hábitos alimentares, na dieta da população rural e urbana (YOKOYAMA et al., 1996) e contribui com 18,5% do consumo de proteínas, chegando a representar, no Nordeste, 34% do ferro consumido (LAJOLO et al., 1996).

O Brasil é o maior produtor e consumidor desta leguminosa, com uma produção anual de 2,7 milhões de toneladas (BORÉM e CARNEIRO, 1998; FAOSTAT – banco de dados da FAO, 2002). Ocupa uma área de 4,15 milhões de hectares (IBGE, 2002). Com certa tendência de crescimento, o consumo per capita de feijão no Brasil situa-se acima dos 20,3 kg/habitante/ano (BORÉM e CARNEIRO, 1998).

O rendimento médio da cultura no Brasil é considerado baixo (705 kg/ha), sendo inferior à produtividade média mundial (IBGE, 2002). Contudo, é grande o

potencial desta cultura no Brasil, pois em condições favoráveis, pode chegar a 4000 kg/ha (VIEIRA et al., 1999).

A ocorrência de doenças é uma das principais causas do baixo rendimento da cultura no Brasil. Como principais objetivos do melhoramento do feijoeiro no país, estão o aumento da produtividade e resistência aos patógenos. Entre as doenças de maior impacto na produtividade do feijoeiro, estão aquelas causadas por fungos, como a antracnose, ferrugem e mancha-angular.

A mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma das doenças mais importantes da parte aérea do feijoeiro, sendo de ocorrência generalizada nas regiões produtoras desta leguminosa (MORA-BRENES et al., 1983; SARTORATO, 1988).

O controle da doença pode ser feito pelo uso de produtos químicos e de cultivares resistentes (SARTORATO et al., 1996). Entretanto, a grande variabilidade do patógeno, apresentando formas patogênicas especializadas ou patótipos, tem dificultado a obtenção de cultivares resistentes. Estudos da variabilidade do patógeno apresentam grande importância em programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular (FERREIRA et al., 1999). Neste sentido, uma estratégia interessante na obtenção de cultivares com resistência a um maior número de patótipos é a “piramidação” de genes, onde o objetivo é incorporar, em uma única cultivar, o maior número possível de genes de resistência. Neste caso, marcadores moleculares ligados aos vários genes de resistência podem facilitar grandemente este processo.

Nos programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular, um dos primeiros passos é a identificação e seleção de diferentes fontes de resistência. NIETSCHÉ et al. (2000a) avaliaram a reação de nove cultivares de feijoeiro a 60 isolados de *P. griseola*, classificados em 25 raças e demonstraram que as cultivares México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242, G5686 e BAT 332 são importantes fontes de resistência. Entretanto, é interessante que se tenha diversidade de fontes de resistência, para o sucesso na piramidação de genes de resistência complementares.

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro visando resistência a doenças do Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária – BIOAGRO/UFV, tem como objetivo o desenvolvimento de linhagens resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular por meio da piramidação de diferentes genes de resistência, bem

como a identificação de novas fontes de resistência para se manter na vanguarda do desenvolvimento de cultivares resistentes a estas doenças.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a seleção de linhagens de feijoeiro com grãos tipo carioca e resistentes à mancha-angular, bem como a identificação de novas fontes de resistência a esta doença.

Os objetivos específicos foram:

- Seleção de famílias com grãos tipo carioca e homozigotas para os locos que conferem resistência à *P. griseola* advindos das cultivares BAT 332, México 54 e MAR-2;
- Identificação de linhagens homozigotas resistentes à *P. griseola* mais próximas do genitor recorrente Rudá;
- Caracterização de 58 cultivares de feijoeiro quanto à resistência às raças 63.19, 63.55, 31.17 e 63.23 de *P. griseola*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância da Mancha-angular

A mancha-angular foi uma das primeiras doenças do feijoeiro a ser investigada no Brasil (NOACK, 1898, citado por COSTA et al., 1972). Esta doença era considerada de pequena importância no passado pois aparecia no final do ciclo da cultura, não causando grandes perdas. Entretanto, hoje é considerada de grande importância, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou safrinha nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (SARTORATO, 2001a), podendo causar redução de até 70% na produção.

O aparecimento precoce da doença pode ser devido a: (1) plantio da cultura em novas épocas, especialmente outono-inverno-primavera, quando as temperaturas são favoráveis, havendo a cultura ou restos de cultura contaminados no campo durante todo o ano; (2) plantio irrigado com pivôs-centrais, que propicia condição de alta umidade, favorável à doença; (3) utilização de sementes contaminadas, introduzindo o patógeno em novas regiões; (4) utilização de cultivares com base genética de resistência à doença muito restrita; (5) possíveis alterações no quadro das raças do patógeno ao longo dos anos (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998). Acredita-se que o plantio de materiais suscetíveis aliado a um ambiente favorável tenha proporcionado condições ideais à sua evolução (PRIA et al., 1999)

A mancha-angular causa severa desfolha, reduzindo a produtividade (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956). As perdas no rendimento são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença na cultura. Estimativas de perdas causadas por esta doença são da ordem de 80% da produção na África (BOSHOF et al., 1996), 60% na Colômbia (BARROS et al., 1957), 80% no México (CRISPIN et al., 1976;) e 70% no Brasil dependendo das condições ambientais e suscetibilidade das cultivares (MORA-BRENES et al., 1983; RAVA et al., 1985; SARTORATO e RAVA, 1992).

3.2. O fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sintomatologia e epidemiologia)

O fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, agente causador da mancha-angular, é um fungo imperfeito, pertencente à classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales, família Stilbaceae. Os conidióforos são produzidos em grupos denominados de corêmios ou sinêmios (estruturas reprodutivas), compostos de 8 a 40 conidióforos. Os conidióforos crescem formando tufos. Os esporos do fungo formam os conidiósporos ou conídios, na parte superior dos conidióforos. Os conídios são de coloração acinzentada, ligeiramente curvados, com dimensões de 3 – 8 x 43 – 68 µm com 1 a 6 septos (SAETLER, 1994).

Este fungo infecta numerosas culturas, incluindo feijão comum, feijão lima, feijão “scarlet runner”, feijão “terapy”, “black gram”, ervilha, cowpea, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi e *Vigna umbellata* (Thumb.) Ohwi & H. Ohashi (SAETLER, 1994).

A infecção e a doença são favorecidos por temperaturas entre 16 e 28°C, com um ótimo em 24°C (VIEIRA, 1994). Longos períodos de alta umidade relativa, alternados com períodos de baixa umidade e ação de ventos, são também importantes para o desenvolvimento da doença (PASTOR-CORRALES et al., 1998), sendo que a produção de sinêmios e de conídios é intensa durante períodos prolongados de alta umidade (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998). Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece sua disseminação.

Como fonte primária de inóculo do patógeno incluem-se sementes contaminadas e restos de plantas infectadas. Em ambos os casos, os esporos

produzidos são disseminados para as folhas pela ação do vento, respingos de chuva, ou ambos (PRIA et al., 1999).

A mancha-angular ocorre em folhas, hastes e vagens (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956; SARTORATO, et al., 1996). A penetração do fungo se dá pelos estômatos das folhas e à medida que ocorre a colonização, o micélio do fungo se estende do parênquima esponjoso às células paliçádicas e posteriormente às células da epiderme superior. O desenvolvimento intracelular do fungo nos tecidos necrosados se dá a partir do nono dia, ficando seu crescimento restrito aos feixes vasculares, dando a forma angular às lesões. Entre 9 e 12 dias após a infecção ocorre o desenvolvimento do estrômata na cavidade subestomatal, ressaltando-se que a esporulação ocorre durante períodos de alta umidade. Os esporos, após a disseminação são responsáveis pelo desenvolvimento do ciclo secundário da doença.

Pode haver a união de várias lesões numa mesma folha, o que causa necrose parcial, amarelecimento das folhas e por fim, sua queda prematura. Nas folhas primárias, as lesões, de coloração castanho-acinzentada, não possuem formato bem característico, geralmente com formato circular. Nas vagens, as manchas têm tamanho e conformação variáveis, mas são geralmente circulares ou ovais, de cor castanho-avermelhadas podendo apresentar bordas com coloração mais escura. Vagens infectadas apresentam sementes pouco desenvolvidas ou totalmente enrugadas (BARROS et al., 1957). No caule e nos pecíolos as lesões são pardo-avermelhadas e alongadas (VIEIRA, 1988, 1994; PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998).

3.3. Manejo da mancha-angular e medidas de controle

A mancha-angular pode ser controlada por meio de práticas culturais, emprego de fungicidas, tanto via tratamento de sementes, quanto em pulverizações foliares e também, pela resistência genética (SARTORATO et al., 1996). Dentre as práticas culturais, podem ser utilizadas sementes livres do patógeno, com o objetivo de evitar a introdução de novos patótipos em áreas nas quais os mesmos inexistem (DHINGRA e KUSHALAPA, 1980), rotação de culturas

por pelo menos dois anos e eliminação de restos culturais (CARDONA-ALVARES e WALKER, 1956).

Uma outra prática que pode ser adotada, é o uso de pulverizações foliares com fungicidas. No Brasil, o controle químico tem sido utilizado, principalmente, pelos grandes produtores, pois esta prática, normalmente, é onerosa. Entretanto, a maior parte da produção de feijão no Brasil advém dos pequenos e médios produtores que não utilizam este tipo de controle devido ao seu alto custo (SARTORATO, 2001b).

O uso de cultivares resistentes é uma prática econômica e eficiente, além de ecologicamente correta (GUZMÁN et al., 1995; SARTORATO et al., 1996; SARTORATO, 1989; SARTORATO, 2001b). Neste sentido, o conhecimento da variabilidade do patógeno é de suma importância para orientar os programas de melhoramento, pois com base nestas informações é que são selecionados os genitores para os cruzamentos.

3.4. Variabilidade do patógeno

O desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular é uma alternativa importante. Entretanto, é dificultada devido a grande variabilidade do patógeno, dificuldade de isolamento e crescimento lento do fungo em meio de cultura (KARANJA et al., 1994).

Estudos demonstram dois grandes grupos envolvidos na variabilidade do patógeno, quais sejam: Andino e Mesoamericano, devido a um padrão evolucionário similar ao que ocorre com a cultura do feijão (GEPTS e BLISS, 1985; GEPTS et al., 1986).

Para a caracterização do fenótipo de virulência em raças, os isolados são inoculados em um conjunto de 12 cultivares de feijoeiro (Tabela 1), chamadas de série diferenciadora da mancha-angular. Estas são representadas por raças de feijão pertencentes aos centros de domesticação andino e mesoamericano (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995). Por exemplo, se um isolado ataca as cultivares diferenciadoras F (grupo andino, valor binário 32), G (grupo mesoamericano 1) e K (grupo mesoamericano, valor binário 16), a raça denomina-

se 32.17. Obtêm-se a designação da raça, somando-se seus valores binários para cada diferenciadora, no caso de reação de compatibilidade.

Os isolados de *P. griseola* obtidos de cultivares andinos atacam predominantemente cultivares diferenciadoras de sementes grandes, mostrando um estreito e específico padrão de virulência, enquanto que os isolados obtidos de materiais mesoamericanos tem um padrão de virulência menos específico. Estes atacam preferencialmente cultivares mesoamericanos, no entanto, podem também atacar cultivares andinos (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995).

ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ (1979) verificaram a existência de especialização fisiológica ou de raças de *P. griseola* ao inocular diferentes isolados em diferentes cultivares. BURUCHARA (1983), utilizando seis cultivares diferenciadoras e 21 isolados, determinou a existência de 5 raças de *P. griseola*.

Tabela 1. Cultivares de feijão utilizadas como diferenciadoras para caracterizar as raças de *P. griseola*

Cultivar diferenciadora	Tamanho da semente¹	Acervo genético	Valor binário² quando suscetível
A. Don Timoteo	G	Andino	1
B. G 11796	G	Andino	2
C. Bolón Bayo	G	Andino	4
D. Montcalm	G	Andino	8
E. Amendoim	G	Andino	16
F. G 5686	G	Andino	32
G. PAN 72	P	Mesoamericano	1
H. G 2858	M	Mesoamericano	2
I. Flor de Mayo	P	Mesoamericano	4
J. México 54	M	Mesoamericano	8
K. BAT 332	P	Mesoamericano	16
L. Cornell 49242	P	Mesoamericano	32

1/ G = grande, M = médio e P = pequeno

2/ Valor binário para nomear as raças de *P. griseola*.

Estudos sobre a variabilidade do patógeno feitos com a série diferenciadora (CIAT, 1986; CORREA-VICTORIA et al., 1989; SARTORATO, 1989), marcadores moleculares RAPD (GUZMÁN et al., 1995), pelos dois métodos (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995; MAYA et al., 1995; NIETSCHE et al., 2001, CHACÓN et al., 1997), bem como da co-evolução patógeno-hospedeiro (GUZMÁN et al., 1995; PASTOR-CORRALES e JARA, 1995) tornam-se primordiais em programas que visam a obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular.

3.5. Fontes de resistência à *P. griseola*

Um dos primeiros passos no programa de melhoramento visando resistência à mancha-angular é a identificação de fontes de resistência. Diversos pesquisadores têm encontrado fontes de resistência à mancha-angular. BROCK (1951), na Austrália, testou mais de 150 acessos de *Phaseolus vulgaris* e dois acessos de *Phaseolus coccineus*, quanto a reação à *P. griseola* e demonstrou que as cultivares Alabama, Café, Califórnia Small White, Case Knife (*P. coccineus*), Epicure, Mexican Black, MsCaslan, Navy, Negro, Costa Rica, Scotia e Rojo Chico, podem ser consideradas como altamente resistentes.

A cultivar Preto 20 foi considerada resistente à mancha-angular por VIEIRA (1964). Este mesmo autor, em 1988, relatou as seguintes cultivares de feijão como resistentes: Morado (G2392), Col. Nº 161 (G2614), Col. Nº 38 (G2704), G2922, Puebla 152 (G3353), Guanajuato 115-A (G3449), Guatemala 669 (G9586), G11823, G 12391 e G 13165.

COSTA et al. (1972) citaram a cultivar CUVA-168-N como a mais resistente, em ensaios de 36 cultivares de feijão realizado na Estação Experimental de Uberaba, MG, em 1968/69.

RAVA et al. (1985) demonstraram que as cultivares Jalo EEP 558 e Caraota 260 são resistentes e Ricopardo 896 possui apenas resistência intermediária. Estas mesmas cultivares apresentaram menor índice de doença, bem como menor perda em rendimento, dentre nove cultivares de feijoeiro testadas para resistência à mancha-angular (SARTORATO e RAVA, 1992). SANTOS FILHO et al. (1976) também demonstraram que a cultivar Caraota 260 é resistente à mancha-angular possuindo um gene recessivo de resistência. PAULA-JR et al. (1997) verificaram

que as cultivares Milionário 1732 e Ouro foram as mais resistentes em Minas Gerais.

PAULA-JR e ZAMBOLIM (1998) citaram as cultivares México 167, ICA Guali, Diacol Nima, IPA 86, Aiguille Vert, Cubano, Jalo, Vermelho, Diacol Calima, Tupi, Cornell 49242, RG 1342CH60, México 279, México 74, AN512722, PF721245, como cultivares que apresentam diferentes níveis de resistência à mancha-angular. Em estudo conduzido por PASTOR-CORRALES e PAULA-JR (1996), a cultivar México 54, apresentou-se como importante fonte de resistência.

Segundo SARTORATO et al. (1996), testes realizados no campo indicaram que as cultivares Bagajó, Costa Rica, FT-120, FT-Tarumã, Favita, Gordo, IAPAR 31, IAPAR 44, IPA 1, IPA 6, Iraí, Jalo, Jalo EEP 558, Mineiro Precoce, Ouro Negro, Pampa, Rico 1735, Rio Negro, Rim de Porco e Varre-Sai, comportaram-se como resistentes ou moderadamente resistentes à *P. griseola*.

SARTORATO et al. (1982), trabalhando com a incidência de mancha-angular em sistema consorciado e solteiro, relataram que as cultivares Diacol Nima, Vermelho, Jalo, FF 28, FF 6 e ICA COL 10103 apresentaram os menores índices de severidade da doença, independentemente das épocas e dos sistemas de cultivo. SARTORATO et al. (1991), estudando a reação de 15 cultivares de feijoeiro a 24 isolados de *P. griseola*, encontraram que somente Cornell 49242, RG 1342 CH60, México 279 e México 54 mostraram resistência vertical completa a alguns isolados.

Avaliando a reação de cultivares de *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. polyanthus* a 54 isolados de *P. griseola*, BUSOGORO et al. (1999) encontraram que: a) os cultivares do grupo gênico secundário (*P. coccineus* e *P. polyanthus*) foram resistentes a um grande número de isolados, b) interação entre genótipos das plantas e isolados do patógeno sugerem genes para resistência vertical dentro do gênero *P. vulgaris*, assim como em *P. coccineus* e *P. polyanthus* e c) o cultivar NI666 (*P. coccineus*) mostrou-se resistente a todos os isolados do fungo, enquanto que a cultivar Aroana (*P. vulgaris*) foi a mais suscetível.

NIETSCHKE et al. (2000a) avaliando a reação de nove cultivares de feijoeiro a 60 isolados de *P. griseola*, classificados em 25 raças, relataram os cultivares México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242, G5686, além de BAT 332 como importantes fontes de resistência.

FALEIRO et al. (2001) relataram que as cultivares Ouro Negro e Emgopa 201 Ouro foram resistentes a três das cinco raças de mancha-angular utilizados em seu estudo.

PASTOR-CORRALES et al. (1998) avaliaram 22832 acessos de feijão e encontraram 59 materiais com nota intermediária (4 a 6) e 64 resistentes (2 a 3). Neste mesmo trabalho, a partir de uma avaliação de 13219 linhagens melhoradas, os autores encontraram 89 materiais resistentes ou com nota intermediária, mas não encontraram genótipos imunes (nota 1) à *P. griseola* no campo, indicando a necessidade de continuidade no trabalho de busca de novas e melhores fontes de resistência à *P. griseola*.

3.6. Herança da resistência à *P. griseola*

Estudos tem demonstrado que a resistência a este patógeno pode ser atribuída a um, dois ou três genes, sendo estes em alguns casos, recessivos (BARROS et al., 1957; SANTOS FILHO et al., 1976; SINGH e SAINI, 1980; SARTORATO et al., 1993).

Nos cruzamentos de Cornell 49242 com Rosinha G-2 e Caraota 260, foi observada herança monogênica dominante (SARTORATO et al., 1993). No cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto 111, encontrou-se herança monogênica dominante presente na cultivar Ouro Negro e monogênica recessiva em US Pinto 111 (CORRÊA et al., 2001). A resistência presente nas cultivares AND 277, MAR-2, México 54, Cornell 49242 e BAT 332, em cruzamentos com a cultivar Rudá, também revelou herança monogênica e dominante (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA et al., 1999; SARTORATO et al., 2000; NIETSCHKE et al., 2000b; CAIXETA, 2002).

CAIXETA (2002) fez testes de alelismo entre as fontes de resistência México 54, MAR-2, Cornell 49242, AND 277 e BAT 332 e observou uma maior complexidade que a encontrada nos estudos anteriores. Foi demonstrando que Cornell 49242 possui apenas um gene dominante, denominado de *Phg-3*; México 54 possui três genes, denominados de *Phg-2*, *Phg-5*, *Phg-6*; MAR-2 apresenta dois genes designados *Phg-4* e outro *Phg-5*² (forma alélica de *Phg-5*); BAT 332 possui a forma alélica *Phg-6*² e AND 277 possui as formas alélicas *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-*

4². Estes resultados são importantes no processo de piramidação de genes de resistência, pois entendendo a relação existente entre os genes, o melhorista tem a oportunidade de escolher os genitores para seu programa de melhoramento com as combinações mais favoráveis desses genes.

3.7. Melhoramento Genético e Piramidação de genes de resistência

Segundo BORÉM (2001), a estratégia de melhoramento visando resistência a doenças é relativamente simples quando se objetiva a transferência de apenas um gene que confere resistência vertical. Neste caso, o procedimento mais indicado é o uso do método dos retrocruzamentos combinado com a inoculação artificial para seleção de indivíduos resistentes. No entanto, a extensa variabilidade de *P. griseola* no Brasil, particularmente em Minas Gerais, tem sido um desafio aos programas de melhoramento do feijoeiro (PASTOR-CORRALES e PAULA JR., 1996; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998; NIETSCHE et al., 2001). Isso significa que a resistência obtida nem sempre é duradoura ou eficiente em todas as regiões de cultivo (RAMALHO e ABREU, 1998).

O conhecimento sobre a frequência e a distribuição de raças, combinados com o uso de diferentes genes de resistência, é necessário para o desenvolvimento de cultivares resistentes mais estáveis e adaptados às regiões de produção. Essa situação requer novas estratégias de melhoramento, como por exemplo a piramidação de genes de resistência provenientes de diferentes fontes (NELSON, 1978; McDONALD et al., 1988; HUANG et al., 1997; KELLY e MIKLAS, 1998). A piramidação de genes pode ser definida como a introgressão de vários genes de resistência em uma cultivar.

De acordo com PEDERSEN e LEATH (1988), a piramidação pode ser realizada com genes maiores, menores, efetivos (patógeno avirulento) ou não (patógeno virulento), raça-específico ou raça-não-específico, ou qualquer outro tipo de gene que confira resistência ao patógeno.

Em feijão, a piramidação de três genes de resistência a ferrugem, *UP-2*, *B-190* e *Ur-3* conferiu resistência a 63 das 65 raças de ferrugem do feijoeiro caracterizadas na coleção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA. Apenas as raças 58 e 67 superaram os genes dessa pirâmide (KELLY et

al., 1994). A linhagem de feijão G2333 constitui um exemplo natural de eficiência da piramidação de genes. Ela apresenta mais de um gene maior para resistência a antracnose. Uma coleção de 380 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, proveniente de diferentes partes do mundo são incompatíveis a esta cultivar (PASTOR-CORRALES et al., 1994).

HUANG et al. (1997) piramidaram quatro genes de resistência à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* na cultura do arroz. Linhagens melhoradas com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas para a resistência a este patógeno. Observou-se que essas linhagens apresentaram níveis mais altos de resistência e/ou maior espectro de resistência que linhagens (genitores) com apenas um gene. Este resultado pode ser devido a interação e/ou complementação entre genes de resistência.

SINGH et al. (2001) piramidaram os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21* de resistência à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) na cultivar de arroz PR106. Em inoculações em casa-de-vegetação, os autores demonstraram que a combinação dos genes promoveram altos níveis de resistência aos isolados testados. Testes feitos no campo, em 31 ambientes, confirmaram as observações feitas em casa-de-vegetação.

No patossistema mancha-angular/feijoeiro, devido a evidências de co-evolução, patógeno-hospedeiro, bem como da existência de grande variabilidade patogênica, o acúmulo de genes dos conjuntos gênicos andino e mesoamericano, é uma estratégia eficiente no controle da doença (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

MICHELMORE (1995) cita a piramidação de genes de resistência como uma estratégia eficiente no controle de patogenicias, tendo em vista o aumento na durabilidade da resistência. No entanto, há determinadas restrições quanto ao uso dessa estratégia no melhoramento genético por métodos convencionais de avaliação, tendo em vista a grande dificuldade de reconhecer a presença de diferentes genes de resistência em uma mesma cultivar. Uma série de cruzamentos-teste pode ser necessária para determinar a presença dos genes, o que torna o processo muito trabalhoso (FEHR, 1987; BROWN et al., 1996; HUANG et al., 1997; GEFFROY et al., 1998).

Segundo PEDERSEN e LEATH (1988), combinar três ou quatro genes em uma única cultivar e manter outras características superiores não é um trabalho

simples. Devido as interações epistáticas entre genes de resistência, muitos testes são requeridos com diferentes raças para assegurar que cada um dos alelos desejados esteja presente. Se vários genes estão sendo incorporados e todos eles conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (KELLY et al., 1995; MILACH e CRUZ, 1997).

Estas limitações dificultaram, no passado, o uso da piramidação como uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável. Entretanto, a possibilidade de usar marcadores moleculares para monitorar a presença de genes de resistência em um genótipo, levantou novamente a questão do uso desta estratégia no melhoramento. Uma vez que os genes de resistência sejam identificados por meio desta técnica, eles poderiam ser facilmente acumulados num genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares.

3.8. Marcadores moleculares

Os primeiros marcadores utilizados em plantas foram os marcadores morfológicos, determinados por mutações simples em um gene específico. Embora sejam de fácil monitoramento, possuem limitações, tais como número restrito de marcadores disponíveis, ausência de ligação com característica de importância econômica, influência do ambiente e efeitos deletérios das mutações (LANZA et al., 2000).

Mais recentemente, um outro tipo de marcador genético começou a ser utilizado, as isoenzimas (HEIDRICH-SOBRINHO, 1982). Por serem produtos diretos da expressão de genes, podem ser identificados em qualquer fase da planta e não interferem com o processo biológico que se deseja estudar (ROBINSON, 1998). Entretanto, possuem a desvantagem de apresentar um baixo número de locos detectáveis no genoma, além de baixo nível de polimorfismo genético em cada loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Com a crescente demanda por novas cultivares, a necessidade crescente de informações sobre novas espécies vegetais e o grande avanço da biologia molecular, surgiu a possibilidade de detecção de polimorfismo genético, por meio da análise direta da molécula de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Atualmente existem diversos tipos de marcadores moleculares e a escolha de um tipo em particular depende dos objetivos do pesquisador, do método e aspecto técnico a ser utilizado e das vantagens e limitações de cada marcador (WILLIAMS et al., 1993).

Marcadores moleculares possibilitam entender a contribuição de locos genéticos múltiplos no desenvolvimento dos organismos, além de mudanças na organização do genoma que ocorrem durante o desenvolvimento ou em resposta ao meio ambiente (YOUNG, 1993). Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para diversos estudos genéticos em organismos eucariotos e procariotos.

O RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphisms*), foi o primeiro marcador de DNA a ser utilizado no mapeamento genético (BOTSTEIN et al., 1980). A técnica do RFLP é baseada na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, na separação dos fragmentos em gel de agarose e na transferência destes para membranas de nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de DNA. As sondas são marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes e após a hibridização, são expostas a um filme de raio-X e submetidas ao processo de revelação. Os fragmentos serão detectados, se possuírem região de homologia à sonda. Os marcadores RFLP apresentam herança codominante, sendo possível a identificação de indivíduos homocigotos e heterocigotos na população. Outra importante vantagem dos RFLPs é o fato de representarem locos únicos em cada genoma, e possibilitarem a utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre espécies relacionadas. Uma grande limitação do RFLP é a inexistência de bibliotecas de sondas para espécies pouco estudadas. Outra limitação é sua complexidade técnica, o que requer laboratórios bem equipados e mão-de-obra altamente especializada (LANZA et al., 2000). O alto custo da técnica inviabiliza sua utilização em rotina nos programas de melhoramento (KELLY e MIKLAS, 1998).

Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), surgiu uma nova classe de marcadores baseados na amplificação seletiva do DNA (MULLIS e FALOONA, 1987). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna muito importante nos estudos de genética molecular, que envolve grande número de genótipos e organismos.

No início da década de 90 dois grupos (WILLIAMS et al., 1990 e WELSH et al., 1990) quase que ao mesmo tempo, baseados na técnica de PCR, descreveram um novo tipo de marcador genético, onde a amplificação do DNA não requer o conhecimento da seqüência alvo a ser copiada. Esses marcadores, chamados marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são gerados pela amplificação de seqüências de DNA, ao acaso, com pequenos oligonucleotídeos com seqüência arbitrária de nucleotídeos. A amplificação de segmentos de DNA é inteiramente ao acaso, podendo ser de um gene cópia única ou até seqüências altamente repetitivas (WILLIAMS et al. 1993).

Esta técnica exige pequena quantidade de DNA (AFANADOR et al., 1993), além de permitir a automatização do processo devido à utilização de uma DNA *polimerase* termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento (LANZA et al., 2000). Os polimorfismos revelados pela técnica RAPD são oriundos de mutações de ponto, ou deleções no sítio de pareamento do *primer* ou inserções entre os sítios de pareamento. Tais polimorfismos baseiam-se na presença ou ausência do fragmento amplificado de DNA, sendo considerados marcadores dominantes e, por isso não distinguem locos em estado heterozigoto, constituindo uma desvantagem do método (CARLSON et al., 1991). Uma outra desvantagem é que o RAPD pode gerar padrões de bandas variáveis, que não são devidos à variação genética, sendo chamados artefatos.

Os marcadores microssatélites também são marcadores que se baseiam em amplificações de PCR. Esses marcadores são denominados repetições de seqüências únicas (SSR – *simple sequence repeats*) e amplificam repetições de di-, tri-, tetra-, ou penta-nucleotídeos. São marcadores codominantes e altamente reprodutíveis. Quando disponíveis os *primers* de microssatélites, são de utilização mais rápida, mais econômicos e requerem menos trabalho do que a utilização de marcadores RFLPs (DENNY et al., 1996).

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) é uma classe de marcadores, que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP às facilidades da amplificação da PCR, apresentando-se como uma ferramenta útil na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995). Esta técnica tem sido utilizada de forma crescente para finalidades de *fingerprinting*, mapeamento genético localizado (*Bulk Segregant Analysis*) e construção de mapas

genéticos, principalmente em espécies cultivadas com baixa taxa de polimorfismo de DNA.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para fornecer informações a respeito da diversidade genética do germoplasma. A apurada determinação do grau de parentesco de linhas ou de populações pode auxiliar os melhoristas na obtenção de combinações genéticas mais favoráveis em programas de melhoramento. Com isto, os marcadores moleculares são utilizados em estudos de filogenia, determinação de similaridade genética, localização de genes, mapeamento genético, estudos evolucionários dentre outras aplicações.

Os melhoristas podem fazer uso dos marcadores moleculares para geração de informações genéticas e uso na seleção indireta de características ligadas ao marcador. O uso de marcadores visando resistência a patógenos oferece vantagem adicional de permitir seleção para resistência na ausência do patógeno ou de um variante do patógeno. Marcadores ligados a vários genes de resistência poderiam facilitar grandemente o melhoramento visando resistência a múltiplas doenças (piramidação), desde que a seleção baseada nos marcadores possa ser facilmente incorporada no programa de melhoramento (KELLY, 1995). Dessa forma, ferramentas moleculares oferecem novas oportunidades para a manipulação, por meio da seleção assistida por marcadores e entendimento dos genes de resistência (GEFFROY et al., 1998). Os marcadores de DNA também são úteis na análise genômica e estudos de evolução e clonagem de genes (CREGAN et al., 1999)

MICHELMORE (1995) cita uma série de usos de marcadores moleculares em programas de melhoramento para resistência a patógenos: (1) podem auxiliar na preservação e exploração de germoplasma; (2) permitem seleção baseada em marcadores; (3) facilitam a geração de combinações particulares de genes de resistência; (4) podem permitir, a médio prazo, a caracterização e manipulação de genes de resistência quantitativa; e (5) auxiliam a clonagem de genes de resistência que serão usados para obtenção de transgênicos.

A seleção assistida por marcadores moleculares tem sido utilizada como um método útil para introdução de genes maiores de resistência a patógenos (KELLY, 1995). Por meio da identificação indireta de genótipos, baseada em marcadores moleculares que segregam conjuntamente com os genes de resistência, muitos dos problemas de análise fenotípica podem ser resolvidos (REIFSCHNEIDER e

LOPES, 1997). Além disso, estes marcadores podem aumentar a velocidade de recuperação do fenótipo do genitor recorrente no processo de retrocruzamento (KELLY, 1995 e MILACH e CRUZ, 1997).

A seleção assistida por marcadores moleculares apresenta, também, grande potencial de utilização para a piramidação de genes de resistência (BORÉM, 2001; HUANG et al., 1997; MILACH e CRUZ, 1997), e a medida que o uso destes marcadores se tornarem parte dos programas de melhoramento, a estratégia de piramidação poderá ser mais amplamente aplicada (MILACH e CRUZ, 1997).

3.8.1. Marcadores RAPD no melhoramento visando resistência a patógenos

A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987) abriu enormes perspectivas para a análise de genes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). A técnica consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA, usando-se *primers* de seqüência definida que se ligam a fitas simples, sendo as cópias detectadas por eletroforese em gel. A PCR envolve três etapas: a) desnaturação das fitas do DNA; b) pareamento de *primers* com a fita de DNA; e c) síntese do fragmento pela DNA polimerase.

A técnica de PCR foi modificada para desenvolver um novo tipo de marcador, o polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente - RAPD. Este marcador apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos: (a) envolve um processo mais simples e mais rápido; (b) um conjunto único universal de *primers* arbitrários pode ser utilizado e rapidamente rastreado, no lugar das sondas; (c) apenas uma pequena quantidade de DNA é necessária; (d) mais sensível na detecção de polimorfismos do DNA; (e) custo por genotipagem é menor (KELLY, 1995; FERREIRA e GRATTAPAGILA, 1996). Portanto, a tecnologia de RAPD é bastante acessível e pode ser utilizada em estações experimentais de melhoramento, rotineiramente (FERREIRA e GRATTAPAGILA, 1996).

A identificação e seleção de genótipos que carregam combinações específicas de genes de resistência são amplamente feitos via análises de polimorfismo de DNA com marcadores RAPD (HALEY et al, 1994b; FOOLAD et al., 1993). Os marcadores RAPD tem tornado disponível o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro resistentes a doenças como ferrugem (HALEY et al, 1993),

mosaico-comum (HALEY et al, 1994a), antracnose (ADAM-BLONDOM et al, 1994; YOUNG e KELLY, 1994; ALZATE-MARIN et al., 1997) e mancha-angular (CARVALHO et al., 1997; FERREIRA et al., 1999; CORRÊA et al., 2001).

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por retrocruzamento é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores. Além de monitorar a presença do gene de interesse, a genotipagem dos indivíduos com marcadores moleculares permite a seleção de indivíduos mais semelhantes ao genitor recorrente. Desse modo, o número de ciclos de retrocruzamentos necessários para a recuperação do fenótipo recorrente é reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de cultivares melhoradas (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999).

No programa de Melhoramento do feijoeiro visando resistência a doenças do Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária – BIOAGRO/UFV, diversos marcadores para genes de resistência à mancha-angular já foram identificados. O objetivo do programa é desenvolver linhagens do tipo carioca com genes de resistência à mancha-angular, por meio de retrocruzamentos da cultivar Rudá com as diversas fontes de resistência. CARVALHO et al. (1998), trabalhando com a cultivar AND 277, relataram que o marcador RAPD OPOH-13₄₉₀ está ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência à raça 63.23 de *P. griseola*, a uma distância de 5,5 cM. Os marcadores RAPD OPN02₈₉₀, OPAC14₂₄₀₀ e OPE04₆₅₀ estão ligados em acoplamento, respectivamente, a 5,9; 6,6 e 11,8 cM de distância do gene de resistência ao patótipo 63.19 de *P. griseola* presente em México 54. Os marcadores OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀, também estão ligados ao gene de resistência presente em Cornell 49242 a uma distância de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente (NIETSCHKE et al., 2000). O marcador OPN02₈₉₀ foi convertido em SCAR (*sequence characterized amplified region*), para aumentar sua reprodutibilidade (SARTORATO et al., 2000).

O marcador OPE04₅₀₀, também em fase de acoplamento, está ligado ao gene de resistência ao patótipo 63.39 de *P. griseola*, presente em MAR-2, a uma distância de 5,8 cM (FERREIRA et al., 2000). CAIXETA (2002) relatou que os marcadores OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀ estão ligados à 5,83 e 5,10 cM, respectivamente, do gene de resistência ao patótipo 61.41 de *P. griseola* da cultivar BAT 332.

O objetivo do capítulo 1 é promover a seleção de famílias com grãos tipo carioca e homozigotas para os locos que conferem resistência à *P. griseola* advindos de retrocruzamentos das cultivares BAT 332, México 54 e MAR-2 com o *background* Rudá. O capítulo 2 visa a identificação de linhagens homozigotas resistentes à *P. griseola* mais próximas do genitor recorrente Rudá e o capítulo 3 a caracterização de 58 cultivares de feijoeiro quanto à resistência às raças 63.19, 63.55, 31.17 e 63.23 de *P. griseola*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A., SEVIGNAC, M., BANNEROT, H., DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *are*, a simple dominant gene conferring resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in french bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.865-870, 1994.
- AFANADOR, L.K, HALEY, S.D., KELLY, J.D. Adoption of a 'mini-prep' DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**. V.36, p.10-11, 1993.
- ALVAREZ-AYALA, G., SCHWARTZ, H.F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v.22, n.1, p. 86-88, 1979.
- ALZATE-MARIN. A.L., CARVALHO, G.A., MERANIN, H., BAIA, G.S., PAULA-JUNIOR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers associated with resistance to anthracnose in common bean. **Bean Improvement Cooperative**, v.40, n.40, p.130-131, 1997.
- ALZATE-MARIN. A.L., COSTA, M.A., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G. e MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p. 125-133, 2001.
- BARROS, O., CARDONA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p.3, 1957.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2001. 500p.
- BORÉM, A., CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.13-17.

- BOSHOFF, W.H.P., SWART, W.J., PRETORIUS, Z.A., LIEBENBERG, M.M., CROUS, P.W. Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in southern Africa. **Plant Pathology**, v.45, p. 344-349, 1996.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M.H., DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agriculture Science**, v.17, n.1, p.25-30, 1951.
- BROWN, A. H. D., GARVIN, D. F., BURDON, J. J., ABROTT, D.C., READ, B.J. The effect of combining scald resistance genes on disease levels, yield and quality traits in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.3, p.361-366, 1996.
- BURUCHARA, R. **Determination of pathogenic variation in *Isariopsis griseola* Sacc. and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burk., 1926) Young, Dye, and Wilkie 1978**. PhD Dissert. University of Nairobi, Nairobi, Kenya. 1983.
- BUSOGORO, J.P., JIJAKLI, M.H., LEPOIVRE, P. Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. **Plant Breeding**, v.118, n.5, p. 417-423, 1999.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG, UFV, 2002. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J.C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v.46, n.11, p. 610-615, 1956.
- CARLSON, J.E, TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., LUK, V.W.K., KAUFFELDT, C., RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.194-200, 1991.
- CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., ALZATE-MARIN, A.L., FERREIRA, C.F., PAULA-JUNIOR, T.J., FALEIRO, F.G., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.255-257, 1997.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JUNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p. 482-485, 1998.

- CHACÓN, M.I., JARA, C., CASTELLANOS, G., POSSO, C.E., BURUCHARA, R., CUASQUER, J.B., PASTOR-CORRALES, M.A. Genetic diversity and relation between common bean angular leaf spot fungus isolates from Africa and South America: genetic improvement implications. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 40, p. 122-123, 1997.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). **Annual Report**, 1985: Bean Program. Working Document N°. 14, pp.27-34, Cali, Colombia, 1986.
- CORREA-VICTORIA, F. J., PASTOR-CORRALES, M. A., SAETTES, A. W. Angular leaf spot. In: SCHOONHOVEN, A. V., VOYSEST, O. **Bean production problems in the tropics**. Cali, Colômbia: CIAT, 1989. 654p.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I.V., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHE, S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Herança da resistência a mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p. 27-32, 2001.
- COSTA, A. Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1, 1972, **Anais...**, Campinas: SP, 1972. p.281-384.
- CREGAN, P.B., MUDGE, J., FICKUS, E.W., MAREK, L.F., DANESH, D., DENNY, R., SHOEMAKER, R.C., MATTHEWS, B.F., JARVIK, T., YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p. 919-928, 1999.
- CRISPIN, A., SIFUENTES, J.A., AVILA, J.C. **Enfermedades y plagas del frijol en México**. México: INIA, 1976. P. 41. (Folheto de Divulgacion, 33).
- DENNY, R.L., LANGE, D.L., PENUELA, S., MUDGE, J., ORF, J.H., YOUNG, N.D. Marker-assisted selection for soybean cyst nematode resistance. **Soybean Genetics Newsletter**, v.23, n.3, p.179-182, 1996.
- DHINGRA, O.D., KUSHALAPPA, A.C. No correlation between angular leaf spot intensity and seed infection in bean by *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 149-152, 1980.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHE, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro comum à ferrugem e a mancha-angular em condições de casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p.86-89, 2001.
- FAOSTAT. Agriculture data. <http://www.fao.org>.2002. Visitado em 15 de junho de 2002.
- FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: McGraw-Hill, v.1, 1987. 536p.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1996. 220p.

- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, v.58, n.2, p.247-252, 1999.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.
- FOOLAD, M.R., JONES, R.A., RODRIGUES, R.L. RAPD marker for constructing intraspecific tomato gene maps. **Plant Cell Reports**, v.12, p.293-297, 1993.
- GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., et al. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.3/4, p.494-502, 1998.
- GEPTS, P., BLISS, F.A. F₁ hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggest two gene pools in cultivated bean germplasm. **Journal Heredity**, v.76, p. 447-450, 1985.
- GEPTS, P., OSBORN, T.C. RASHKA, K., BLISS, F.A. Electrophoretic analysis of phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean, *Phaseolus vulgaris*: evidence for multiple centers of domestication. **Economy Botany**, v.40, p. 451-468, 1986.
- GUIMARÃES, C. T., MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: editora UFV, 1999. p. 715-740.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W.C., TEMPLE, S.R., MANDELA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Phytopathology**, v.85, n.5, p. 600-607, 1995.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers LINKED to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.505-512, 1993.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L.K., KELLY, J.D. Identification and application of RAPD marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. **Phytopathology**, v.84, n.2, p. 157-160, 1994a.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L.K., KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and-repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v.34, p. 1061-1066, 1994b.
- HALL, R. **Compendium of bean disease**. Ontário: The American Phytopathological Society, 1991, p. 1-17.

- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.2, p.281-286, 1982.
- HUANG, N., ANGELES, E. R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, n.3, p.313-320, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. <http://www.ibge.net/home/estatística/indicadores/agropecuária/ispa/default.shtm>, visitado em 24 de Maio de 2002.
- KARANJA, T.W., MWANG'OMBE, A.W., MIBEY, R.K. The effect of media and light regimes on cultural and morphological characteristics and sporulation of *Phaeoisariopsis griseola* deighton. **East African Journal Agricultural and Forestry Journal**, v.59, n.3, p. 241-251, 1994.
- KELLY, J. D., MIKLAS, P. N., STAVELY, J. R., AFANADOR, L., HALEY, S.D. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v.37, p.15-16, 1994.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**. v.30, n.3, p.461-465, 1995.
- KELLY, J. D., AFANADOR, L., HALEY, S. D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, v.83, n.3, p.207-212, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, p.1-11, 1998.
- LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I., MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C. A., STONE, L. F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 23-56.
- LANZA, M.A., GUIMARÃES, C.T., SCHUSTER, I. Aplicações de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, 2000.
- MAYA, M.M., OTOYA, M.M., MAYER, J.E., PASTOR-CORRALES, M.A. Marcadores moleculares RAPD confirmam la diversidad y evolución de *Phaeoisariopsis griseola* in America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, n.2, p. 1-6, 1995.
- McDONALD, B. A., ALLARD, R. W., WEBSTER, R. K. Responses of two- three-, and four-component barley mixtures to a variable pathogen. **Crop Science**, v.28, p.447-452, 1988.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of diseases resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, v.15, p. 393-427, 1995.

- MILACH, S. C. K., CRUZ, R. P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v.27, n.4, p.685-689, 1997.
- MORA-BRENES, B. M., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p.599, 1983.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335, 1987.
- NESLSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, p.359-378, 1978.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v. 47, p. 567-572, 2000a.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v.148, p. 117-121, 2000b.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., FERREIRA, C.F., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais. **Euphytica**, v. 117, n.1, p. 77-84, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M. A., ERAZO, O. A, ESTRADA, E.I., SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v.78, p.959-962, 1994.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C.E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, n.1, p.15-24, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A., PAULA-JR, T.J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, 5,1996, Goiânia. **Anais...**, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP-APA, v.1, p.23-41, 1996.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C., SINGH, S. P. Pathogenic variation in sources of and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.
- PAULA-JR, T. J., NIETSCHKE, S., CARVALHO, G. A., FERREIRA, C.F., BORÉM, A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à mancha-angular de cultivares de feijão recomendados para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.294, 1997.

- PAULA-JR, T. J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- PEDERSEN, W. L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.369-378, 1988.
- PRIA, M.D., SILVA, O.C., COSTA, J.L.S., SOUZA, E.D.T., BERNI, R.F. Diagnose das doenças. In: CANTERI, M.G., PRIA, M.D., SILVA, O.C. (Eds.). **Principais doenças fúngicas do feijoeiro – Orientações para manejo ecológico**, Ponta Grossa, PR: UEPG, 1999. p. 17-33.
- RAMALHO, M. A. P., ABREU, A. F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.435-449.
- RAVA, S. C. A., SARTORATO, A., CARVALHO, J. R. P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, p.5-6, 1985.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B., LOPES, C. A. Resistência de plantas a fitobactérias. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R. Resistência de plantas a doenças. **XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, p. 41-46, 1997.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**, Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 329-368.
- SAETLER, A.W. Angular leaf spot. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. APS PRESS. The American Phytopathological Society, 1994. p. 15-16.
- SANTOS-FILHO, H. P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.23, n.127, p.226-230, 1976.
- SARTORATO, A., TEIXEIRA, M.G., ANTUNES, I.F. Incidência de mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) em dois sistemas e duas épocas de cultivo do feijoeiro comum. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1, Goiânia, 1982. **Anais...** Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, p.304-306.
- SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1989. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 1989.
- SARTORATO, A. Mancha-angular. In: ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**, Piracicaba: POTAFÓS, 1988. p. 589.

- SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M., BERGAMIM-FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.1, p.43-46, 1991.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha-angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 247-251, 1992.
- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C. A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.5, p.30, 1993.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C. A., STONE, L. F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 669-700.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p. 637-642, 2000.
- SARTORATO, A. **Resistência do feijoeiro comum à mancha-angular**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001a, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001a. CD-Room, Resumo 25.
- SARTORATO, A. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001b, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001b. CD-Room, Resumo 26.
- SCHWARTZ, H. F., BRINK, M. A., NULAND, D. S., FRANC, G. D. (Ed.). **Dry Bean Production and Pest Management**. Fort Collins: Cooperative Extension Resources Center, 1996. 106p.
- SINGH, A.K., SAINI, S.S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v.31, p.741-754, 1980.
- SINGH, S., SIDHU, J.S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H.S., KHUSH, G.S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.1011-1015, 2001.
- TEIXEIRA, S. M., ROCHA, L. S. A. Análise sócio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M J. O., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFÓS, 1988. p. 37-56.
- VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais. **Experientiae** v.4, p.1-68, 1964.

- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do feijoeiro**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1988. 231p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. In: **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. p.273-349.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.18, p.4407-4414, 1995.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., RAFALSKI, A., TINGEY, S. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods Enzymology**, v.218, p. 704-740, 1993.
- YOKOYAMA, L. P., BANNO, K., KLUTHCOUSKI, J. Aspectos sócio-econômicos da cultura. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C. A., STONE, L. F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 1-21.
- YOUNG, N.D. Applications of DNA genetic markers to the study of plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 229-236, 1993.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. A RAPD marker for the *are* anthracnose resistance gene in beans, **Bean Improvement Cooperative**, v.37, p.77-78, 1994.

IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta-se como um alimento rico em proteínas e de baixo custo para o brasileiro (VIEIRA et al., 1999).

No Brasil, a maioria dos programas de melhoramento do feijoeiro visam o aumento da capacidade produtiva, bem como a resistência a patógenos. VIEIRA (1983) cita mais de 45 doenças de maior ou menor importância, causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides. No entanto, dentre as doenças fúngicas da parte aérea que têm merecido atenção, estão a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, a ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* e a mancha-angular causada por *Phaeoisariopsis griseola*. Segundo PAULA JR. e ZAMBOLIM (1998) a mancha-angular ocasiona grandes prejuízos durante os meses de abril a julho, quando são observados nas principais regiões produtoras condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença como, temperaturas amenas e ocorrência de orvalho.

As perdas causadas pela mancha-angular podem chegar a 70% no Brasil dependendo das condições ambientais e suscetibilidade das cultivares (MORA-BRENES et al., 1983; RAVA et al., 1985; SARTORATO e RAVA, 1992).

Como medida de controle, pode-se utilizar práticas culturais, como sementes livres do patógeno (DHINGRA e KUSHALAPA, 1980), rotação de culturas por pelo menos dois anos, eliminação de restos culturais (CARDONA-ALVARES e WALKER, 1956) e uso de fungicidas. No entanto, esta última prática não é muito adotada no Brasil, tendo em vista que, a maior parte da produção advém de pequenos e médios produtores que não utilizam este tipo de tecnologia (SARTORATO, 2001).

O uso de cultivares resistentes constitui uma alternativa prática, econômica e eficiente, além de não prejudicial ao ambiente, no manejo da mancha-angular (GUZMÁN et al., 1995; SARTORATO et al., 1996; SARTORATO, 2001).

Para a obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular o uso do método dos retrocruzamentos têm sido utilizado para transferência de genes de resistência para cultivares superiores (RAGAGNIN, 2001). No retrocruzamento, a porção do genoma do parental doador é reduzida pela metade a cada ciclo, na ausência de seleção e ligação. A equação para a média de recuperação do genitor recorrente é $1 - (\frac{1}{2})^{m+1}$, em que m é o número de retrocruzamentos realizados.

O método dos retrocruzamentos tem sido utilizado principalmente para transferir características monogênicas. Entretanto, existem situações em que pode-se ter o interesse de transferir duas ou mais características para um genitor recorrente. Quando o objetivo é a transferência de duas ou mais características, pode-se utilizar a estratégia sequencial, paralela ou simultânea (BORÉM, 2001).

No programa sequencial, transfere-se um gene ou uma característica de cada vez. Após a transferência da primeira, inicia-se a transferência da segunda, sendo que este procedimento, embora simples, requer um longo período para sua conclusão. Na estratégia do programa paralelo, existe a condução de subprogramas, em que cada característica é transferida independentemente. Após a transferência em ambos os subprogramas, as progênies são intercruzadas permitindo a seleção de indivíduos com ambas as características. No programa simultâneo, as características são transferidas de uma só vez (BORÉM, 2001)

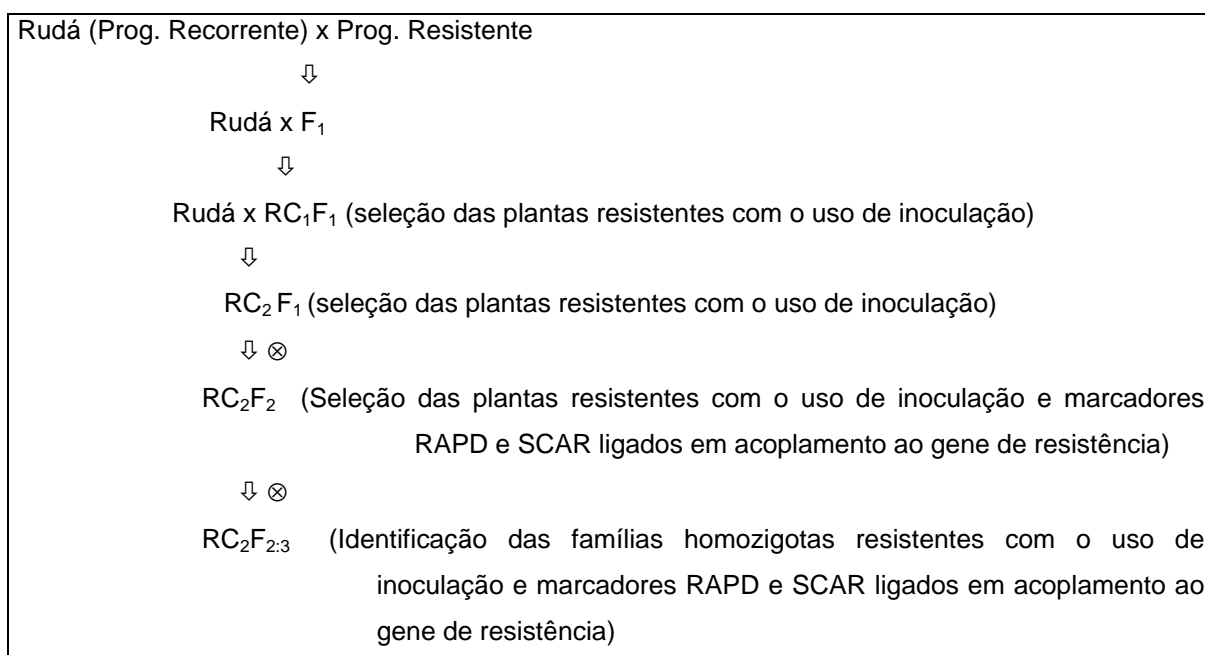
No Programa de Melhoramento do Feijoeiro visando resistência a doenças do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária/UFV utiliza-se a estratégia do programa paralelo, para a obtenção de pirâmides de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular.

Este trabalho é parte do subprograma visando resistência à mancha-angular e teve como objetivo a seleção de famílias com grãos tipo carioca, que possuam genes de resistência derivados das cultivares México 54, MAR-2 e BAT 332 em cruzamento com o *background* genético Rudá, por meio do uso de marcadores moleculares RAPD e SCAR, previamente identificados por pesquisadores do BIOAGRO/UFV, como auxílio na seleção das linhagens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de linhagens de feijoeiro com resistência à mancha-angular e com as características agronômicas da cultivar Rudá, foram utilizadas progênes oriundas de retrocruzamentos obtidos no Programa de melhoramento do Feijoeiro visando resistência a doenças do BIOAGRO/UFV (Figura 1).

Figura 1. Esquema dos retrocruzamentos visando a obtenção das famílias homozigotas de feijoeiro resistentes à mancha-angular.



2.1. Material genético e cruzamentos

As cultivares México 54, MAR-2, BAT 332 e Rudá, foram fornecidos pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP/EMBRAPA) e as sementes RC_nF₂ pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro visando resistência a doenças do BIOAGRO/UFV. A cultivar Rudá, desenvolvido pelo CIAT e introduzido no Brasil pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Goiânia, GO), foi utilizada por pesquisadores do BIOAGRO/UFV, como genitor recorrente, por possuir características culinárias e agronômicas desejáveis, tais como alta produtividade, estabilidade de produção e tipo de grão, sendo no entanto, suscetível a diversas raças de *P. griseola*.

Nos cruzamentos originais, os genitores BAT 332, México 54 e MAR-2, foram utilizados como fontes de resistência à mancha-angular (CAIXETA, 2002; SARTORATO et al., 2000; FERREIRA et al., 2000). Algumas características dos genitores utilizados neste trabalho são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos genitores utilizados nos cruzamentos.

Cultivares	Centro de origem	Tipo de grão	Cor da flor
Rudá	Mesoamericano	Carioca	Branca
BAT 332	Mesoamericano	Mulatinho	Roxa
MAR-2	Mesoamericano	Carioca	Branca
México 54	Mesoamericano	Mulatinho	Roxa

As populações oriundas dos cruzamentos Rudá x México 54 (157 sementes), Rudá x MAR-2 (109 sementes) e Rudá x BAT 332 (94 sementes), encontravam-se nas gerações RC_2F_2 , RC_1F_2 e RC_1F_2 , respectivamente. Estes materiais foram obtidos previamente por pesquisadores do BIOAGRO/UFV, de maneira que a cada ciclo de retrocruzamento, as plantas resistentes foram selecionadas. As sementes RC_nF_2 dos três cruzamentos foram utilizadas para a seleção de plantas resistentes pela inoculação com o fungo e pelo uso de marcadores moleculares RAPD e SCAR, previamente caracterizados (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores moleculares RAPD e SCAR caracterizados e utilizados na seleção de plantas resistentes derivadas das fontes de resistência BAT 332, México 54 e MAR-2.

Cultivares	Raça	Oligonucleotídeo Iniciador		Distância (cM)	Referência
		RAPD	SCAR		
BAT 332	61.41	OPAO12 ₉₅₀	-	5,8	Caixeta, 2002
México 54	63.19	-	N02 ₈₉₀	5,9	Sartorato et al., 2000
MAR-2	63.39	OPE04 ₅₀₀	-	5,8	Ferreira et al., 2000

No teste de progênie para a identificação de linhagens homozigotas para resistência à mancha-angular, foram utilizadas 15, 19 e 17 famílias $RC_nF_{2:3}$ dos

cruzamentos de Rudá com México 54, MAR-2 e BAT 332, respectivamente. Estas famílias foram selecionadas dentre as famílias $RC_nF_{2:3}$ resistentes, que apresentavam grãos do tipo carioca já fixados. As sementes foram semeadas em vasos contendo 3 Kg de solo adubado com NPK, de acordo com as necessidades da cultura e mantidos em condições de casa-de-vegetação.

2.2. Raças e preparo do inóculo

As raças de *P. griseola* utilizadas no presente trabalho (Tabela 3), pertencem a Micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro visando resistência a doenças do BIOAGRO/UFV. A escolha destas raças deveu-se à sua significativa importância, sendo freqüentemente encontrados em várias regiões produtoras (NIETSCHE, 2000), além de serem as mesmas utilizadas no estudo de herança de cada fonte de resistência (SARTORATO et al., 2000; FERREIRA et al., 2000; CAIXETA, 2002).

Tabela 3. Raças de *P. griseola* utilizadas no presente trabalho.

Cruzamentos	Raças
Rudá x BAT 332	61.41
Rudá x México 54	63.19
Rudá x MAR-2	63.39

Os isolados foram obtidos de culturas monospóricas, mantidos em placa de petri ou tubo de ensaio contendo meio V8 (Campbell Soup Company, EUA). De cada tubo contendo a cultura do patógeno, foi obtida uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de água estéril. Esta suspensão foi espalhada em placas contendo meio de suco de vegetais V8. Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, no escuro, a 24°C. Este procedimento produziu altos níveis de esporulação.

A suspensão de conídios para inoculação foi obtida adicionando-se água destilada e raspando-se suavemente a superfície do meio com o auxílio de uma espátula, em seguida filtrada em gaze. Esta suspensão foi ajustada para a concentração final de 2×10^4 conídios/ml.

2.3. Inoculação e avaliação

Quinze dias após o plantio (estádio V3), as plantas oriundas das populações segregantes RC_1F_2 (Rudá x MAR-2 e Rudá x BAT 332) e RC_2F_2 (Rudá x México 54), genitores e, posteriormente, as famílias $RC_nF_{2:3}$ resultantes com grãos tipo carioca, foram inoculados com uma suspensão de 2×10^4 conídios/ml de *P. griseola* (Tabela 3). A suspensão foi aplicada em ambas as faces, abaxial e adaxial, das folhas, com auxílio do atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. As plantas foram, então, incubadas por um período de 48 horas numa câmara úmida (RIBEIRO et al., 1993; LACERDA et al., 1994), mantidas entre 20 e 22°C e 100% de umidade relativa, sendo, posteriormente, transferidas para casa-de-vegetação.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 15 e 21 dias após inoculação, usando-se uma escala de severidade de nove graus (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987) descrita a seguir: 1 – plantas sem sintomas da doença; 2 – presença de até 3% de lesões; 3 – presença de até 5% de lesões não-esporuladas; 4 – presença de lesões esporuladas, que cobrem aproximadamente 10% da área foliar; 5 – presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, que cobrem aproximadamente 10-15% da área foliar; 6 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 15-20% da área foliar; 7 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 20-25% da área foliar; 8 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 25-30% da área foliar, geralmente associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; 9 – sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte. Plantas com notas acima de 3 foram consideradas suscetíveis.

2.4. Condições de amplificação do DNA pela técnica de RAPD e SCAR

Para confirmar a presença dos genes de resistência nas plantas RC_nF_2 e posteriormente, nas famílias $RC_nF_{2:3}$ resistentes homozigotas, foram utilizados marcadores moleculares RAPD e SCAR, previamente caracterizados para as fontes de resistência utilizadas no Programa de Melhoramento de Feijoeiro do

BIOAGRO/UFV, como mostrado na Tabela 2. Para efeito de normatização, os marcadores moleculares utilizados neste trabalho, apresentam um número subscrito, que corresponde ao seu tamanho em pares de nucleotídeos (pb). Todos estes marcadores, encontram-se ligados em fase de acoplamento ao alelo de resistência.

Para a extração de DNA, dois folíolos de cada planta RC_nF_2 e suas respectivas famílias $RC_nF_{2:3}$ e dos genitores (BAT 332, México 54, MAR-2 e Rudá) foram coletados e embalados em papel alumínio devidamente identificados e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

A extração foi efetuada com base na metodologia de DOYLE e DOYLE (1990) com algumas modificações (ABDELNOOR et al., 1995). Cada reação de amplificação de RAPD, apresentava um volume total de $25\mu\text{l}$, contendo 25 ng de DNA, $100\mu\text{M}$ de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,0 mM de MgCl_2 , 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, $0,4\ \mu\text{M}$ de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* e uma unidade de *Taq* polimerase.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador, de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os ciclos de amplificação constaram de uma etapa de desnaturação a $94\text{ }^\circ\text{C}$, por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde a $35\text{ }^\circ\text{C}$, por 30 segundos, e uma etapa de extensão a $72\text{ }^\circ\text{C}$, por um minuto. Depois de 40 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a $72\text{ }^\circ\text{C}$, por sete minutos.

Para a amplificação do DNA pela técnica de SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), procedeu-se a mistura de reação de $25\mu\text{l}$ contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas pela técnica de RAPD, com exceção do *primer*, que foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* específico. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos, sendo cada destes composto de 30 segundos a $94\text{ }^\circ\text{C}$, 60 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C e um passo final a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 7 minutos, após o último ciclo.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo $0,5\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II.

2.5. Análise da segregação dos genes de resistência

O teste de significância do χ^2 , utilizando o programa GENES (CRUZ, 2001) foi efetuado para comparar a razão teórica, esperada para segregação monogênica dominante dos genes de resistência, com as razões fenotípicas observadas entre as plantas RC_nF_2 , sendo esperada uma segregação de 3:1 ($R_ : rr$).

Para o teste de progênie das famílias $RC_nF_{2:3}$ foram utilizadas entre 8 e 12 plantas provenientes de cada uma das famílias $RC_nF_{2:3}$. Para genes que segregam independentemente, as informações baseadas em 8, 9, 10, 11 e 12 plantas RC_nF_3 permitem determinar com certeza de 89,98; 92,49; 94,36; 95,77 e 96,8%, respectivamente, o genótipo das plantas RC_nF_2 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção das linhagens RC₂F₃ – Rudá x México 54

Foram analisadas 157 plantas RC₂F₂ para resistência à mancha-angular, por meio de inoculação com a raça 63.19, para o qual foi identificado o marcador molecular do tipo SCAR N02₈₉₀ (SARTORATO et al., 2000). Do total de plantas RC₂F₂ analisadas, 109 apresentaram-se como resistentes, tanto pela inoculação quanto pela seleção por meio do marcador molecular e 32 plantas apresentaram-se suscetíveis em ambos os processos de avaliação.

Entre as plantas RC₂F₂, foram detectados indivíduos recombinantes, sendo que 5 plantas possuíam o marcador molecular mas eram suscetíveis e 7 plantas não possuíam o marcador molecular, mas eram resistentes. A presença de indivíduos recombinantes, de certa forma era esperado, pois, conforme relatado por SARTORATO et al. (2000), o marcador SCAR N02₈₉₀ está ligado ao alelo de resistência presente no genitor México 54 a uma distância de 5,9 cM e também, pela subjetividade na avaliação da doença por meio de notas. Existe uma grande dificuldade de avaliação da doença, tendo em vista que, frequentemente existem plantas que apresentam pequenas lesões típicas da doença, entretanto a esporulação do patógeno não se apresenta de forma evidente, com isto, existe a dificuldade de avaliá-las como resistentes (nota 3) ou suscetível (nota 4). Isso pode levar a um erro na avaliação da resistência. No entanto, neste trabalho, para prosseguir com o processo de seleção, foram consideradas apenas as 141 plantas que não apresentaram recombinação.

A eficiência de seleção, que estima a discordância entre a seleção feita por inoculação e por marcador molecular, medida como a proporção dos indivíduos identificados pela inoculação e pelo marcador, foi de 94% para a resistência e de 87,80% para a suscetibilidade, como se observa na Tabela 4. Este resultado é interessante, pois revela uma adequada eficiência de seleção das plantas resistentes portadoras do alelo de interesse, com o uso do marcador SCAR N02₈₉₀. Isto é especialmente importante, tendo em vista as dificuldades encontradas nos processos de manutenção e esporulação do fungo, bem como de avaliação da doença.

Tabela 4. Eficiência de seleção para a raça 63.19 de *P. griseola* em 157 plantas RC₂F₂ do cruzamento Rudá x México 54 baseado no marcador molecular SCAR N02₈₉₀

Fenótipo das plantas	Frequência observada ¹	Seleção pelo marcador ²	Eficiência de seleção pelo marcador (%)
Resistentes	R_ :116	R_ : 109 (+)	R_ : 94
Recombinantes		R_ : 7 (-)	
Suscetíveis	rr : 41	rr : 36 (-)	rr : 87,80
Recombinantes		rr : 5 (+)	

¹Nº de plantas resistentes e suscetíveis observadas via inoculação com a raça 63.19 de *P. griseola*, onde R_ corresponde a plantas resistentes e rr plantas suscetíveis

²+ = banda presente, - = banda ausente do marcador SCAR N02₈₉₀

Segundo KELLY e MIKLAS (1998), a eficiência da seleção indireta pode ser influenciada pelo número, distância de ligação e orientação dos marcadores, e também, pelos métodos de melhoramento utilizados. Quando são utilizados marcadores dominantes ligados diretamente ao alelo de suscetibilidade (marcadores em repulsão), é possível selecionar contra a suscetibilidade. O aumento da eficiência com esses marcadores, resulta da habilidade de selecionar contra os heterozigotos, e é particularmente útil quando a seleção é feita para genes de resistência recessivos. Marcadores ligados à suscetibilidade foram identificados para o gene *bc-3* de resistência ao Vírus do Mosaico-comum do feijoeiro. Para a identificação de indivíduos *bc-3/bc-3* resistentes homozigotos, uma eficiência de seleção de 82% na ausência do marcador ligado a suscetibilidade (repulsão) foi observada, em comparação a 26% de eficiência de seleção para outro marcador ligado em acoplamento (HALEY et al., 1994). Outros autores, também utilizaram esta metodologia (ALZATE-MARIN et al., 1999; ARRUDA, et al., 2000).

O marcador SCAR N02₈₉₀, ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência de México 54, promoveu uma adequada eficiência de seleção (94%) para a resistência (R_). Entretanto, este marcador não discrimina os indivíduos homozigotos dominantes dos heterozigotos, sendo necessário promover o teste de progênie para este propósito.

A eficiência de seleção com marcadores é sem dúvida uma importante ferramenta no acompanhamento dos genes de resistência em processos de seleção e piramidação de genes de resistência de diferentes fontes. Para isso, é

necessário promover estudos de herança da resistência para compreender como estes genes são herdados, e posteriormente, proceder à identificação de marcadores ligados a estes genes.

Neste trabalho, procurou-se estudar a segregação da população RC₂F₂. Pela análise do teste de significância do χ^2 , encontrou-se uma segregação monogênica dominante, verificando-se a proporção de três plantas resistentes (R₋) para uma suscetível (rr) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da segregação da resistência à raça 63.19 de *P. griseola* na população RC₂F₂ do cruzamento Rudá x México 54.

População	Nº de plantas		Relação esperada	c ²	Probabilidade (%)
	R ₋ (+) ¹	Rr(-)			
Rudá x México 54	109	36	3:1	0,0022	96,17

¹+ presença e - ausência do marcador

SARTORATO et al. (2000), estudando o cruzamento entre Rudá e México 54, demonstraram que a herança da resistência presente em México 54 à raça 63.19 de *P. griseola* era controlada por um gene dominante. Entretanto, CAIXETA (2002) por meio de teste de alelismo demonstrou a existência de uma maior complexidade da resistência nesta cultivar. Na caracterização dos genes que conferem resistência à raça 63.19 de *P. griseola* foram encontrados dois genes na cultivar México 54, que foram denominados de *Phg-2* e *Phg-5*.

Os dados apresentados aqui confirmam a presença de um gene dominante na geração RC₂F₂ do cruzamento Rudá x México 54, entretanto, não se sabe qual dos dois genes relatados por CAIXETA (2002) foi selecionado neste cruzamento. Com isso, foi adotado a denominação do gene *Phg-2*, inicialmente proposta por SARTORATO et al. (2000).

Após a análise da segregação dos genes e identificação das plantas resistentes, as sementes RC₂F₃ foram coletadas. Quinze famílias RC₂F_{2:3} foram selecionadas por apresentarem grãos do tipo carioca, para o teste de progênie, com intuito de identificar famílias homozigotas para o gene de resistência.

Por meio da inoculação com a raça 63.19 de *P. griseola*, foram selecionadas apenas duas famílias RC₂F_{2:3} como homozigotas resistentes. Estas duas famílias estão identificadas como 9-2-117 e 37-6-155 (Tabela 6).

Tabela 6. Análise da segregação da resistência à raça 63.19 de *P. griseola* das famílias RC₂F_{2:3} do cruzamento Rudá x México 54

Famílias	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistente	Suscetível	
37-8-84	9	3	Rr
37-8-80	7	5	Rr
37-8-60	11	1	Rr
9-4-89	7	3	Rr
9-4-110	8	4	Rr
9-4-106	9	3	Rr
37-7-35	8	2	Rr
37-7-30	5	4	Rr
9-2-117	10	0	RR
9-2-130	7	5	Rr
9-2-180	10	2	Rr
37-6-155	8	0	RR
9-3-179	8	4	Rr
37-6-148	9	3	Rr
9-3-171	10	2	Rr

A confirmação da resistência foi feita utilizando-se o marcador, sendo que todas as plantas possuem o marcador SCAR N02₈₉₀ (Figura 2).

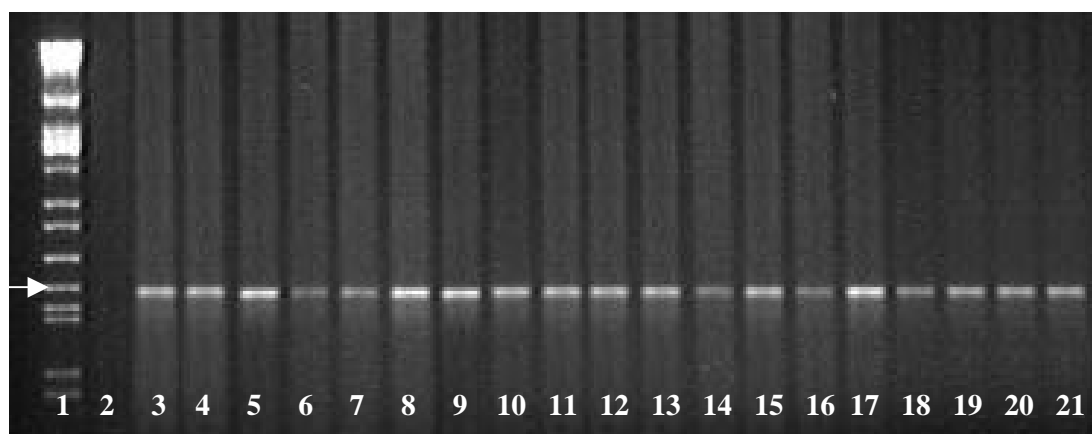


Figura 2. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o primer SCAR N02 (SARTORATO et al., 2000). Da esquerda para a direita: 1, DNA do fago lambda digerido com enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*; 2, Rudá; 3, México 54; 4-13 e 14-21 correspondem a indivíduos das famílias RC₂F_{2:3} homocigotas resistentes 9-2-117 e 37-6-155, respectivamente. A seta indica a banda de 890 pb correspondente ao marcador.

RAGAGNIN (2001) utilizou esta mesma metodologia para identificação de isolinhas homozigotas resistentes à ferrugem do feijoeiro, antracnose e mancha-angular.

As 18 linhagens RC_2F_3 serão caracterizadas pela técnica de RAPD, com intuito de identificar aquelas geneticamente mais próximas do genitor recorrente Rudá.

3.2. Obtenção das linhagens RC_1F_3 – Rudá x MAR-2

Neste cruzamento, foram analisadas 109 plantas RC_1F_2 para resistência à mancha-angular, por meio de inoculação com a raça 63.39, bem como pelo uso do marcador RAPD OPE04₅₀₀ (FERREIRA et al., 2000). Setenta e uma plantas RC_1F_2 apresentaram-se como resistentes, tanto pela inoculação quanto pela seleção por meio do marcador molecular. Vinte e nove plantas mostraram-se suscetíveis em ambos os processos de avaliação.

Foram detectados indivíduos recombinantes, como observado na geração RC_2F_2 do cruzamento entre Rudá x México 54. Foram encontradas 3 plantas RC_1F_2 que apresentavam o marcador molecular, mas eram suscetíveis e 6 que não possuíam o marcador molecular, mas eram resistentes. Conforme mencionado anteriormente, devido a subjetividade na avaliação da doença e ao fato do marcador RAPD OPE04₅₀₀ estar ligado ao gene de resistência à mancha-angular no genitor MAR-2 a uma distância de 5,8 cM (FERREIRA et al., 2000), a presença destes indivíduos é esperada. Para dar continuidade ao processo de seleção, foram analisadas apenas as 100 plantas que não apresentaram recombinação.

A eficiência de seleção das plantas resistentes com o uso do marcador RAPD OPE04, ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência de MAR-2, foi de 92,20% (Tabela 7).

Marcadores dominantes ligados em acoplamento a genes de resistência são úteis em programas de retrocruzamentos, pois podem ser utilizados para identificar e selecionar plantas RC_nF_1 heterozigotas durante os ciclos subsequentes de retrocruzamento (KELLY e MIKLAS, 1998).

Tabela 7. Eficiência de seleção para a raça 63.39 de *P. griseola* em 109 plantas RC₁F₂ do cruzamento Rudá x MAR-2 baseado no marcador molecular RAPD OPE04

Fenótipo das plantas	Frequência observada ¹	Seleção pelo marcador ²	Eficiência de seleção pelo marcador(%)
Resistentes	R_ :77	R_ : 71 (+)	R_ : 92,20
Recombinantes		R_ : 6 (-)	
Suscetíveis	rr : 32	rr : 29 (-)	rr : 90,62
Recombinantes		rr : 3 (+)	

¹Nº de plantas resistentes e suscetíveis observadas via inoculação com a raça 63.39 de *P. griseola*, onde R_ corresponde a plantas resistentes e rr plantas suscetíveis

²+ = banda presente, - = banda ausente do marcador RAPD OPE04

A resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, presente na cultivar MAR-2 em cruzamento com Rudá revelou herança monogênica e dominante (FERREIRA et al., 2000). CAIXETA (2002) demonstrou que a cultivar MAR-2 possui os genes de resistência *Phg-4* e *Phg-5*². Entretanto, o estudo de alelismo realizado com a raça 63.39 de *P. griseola* mostrou a não segregação da população F₂ do cruzamento México 54 x MAR-2, comprovando a presença de um loco em comum nestas duas cultivares. Estas duas cultivares apresentam diferentes reações, quando testadas contra um conjunto de raças do patógeno, por isso, os fatores presentes naquele loco em comum não são um mesmo alelo e sim alelos diferentes. Sendo assim, a cultivar México 54 possui o alelo *Phg-5* e MAR-2 o alelo *Phg-5*².

Confirmando os dados daqueles autores, observou-se a segregação de apenas um gene no cruzamento entre Rudá e MAR-2 (Tabela 8), e provavelmente este é o *Phg-5*².

Tabela 8. Análise da segregação da resistência à raça 63.39 de *P. griseola* na população RC₁F₂ do cruzamento Rudá x MAR-2.

População	Nº de plantas		Relação esperada	c ²	Probabilidade (%)
	R_(+) ¹	Rr(-)			
Rudá x MAR-2	71	29	3:1	0,85	35,56

¹+ presença e - ausência do marcador

Identificadas as plantas RC₁F₂ resistentes, procedeu-se à seleção e colheita daquelas com grãos tipo carioca. Foram selecionadas 19 famílias para o teste de progênie com intuito de identificar famílias homozigotas para o gene de resistência proveniente da cultivar MAR-2. Pelo uso de inoculação com a raça 63.39 de *P. griseola*, foram selecionadas apenas duas famílias RC₁F_{2:3} como homozigotas resistentes (Tabela 9). A confirmação da resistência foi feita utilizando o marcador RAPD OPE04₅₀₀ (Figura 3).

As 23 linhagens RC₁F₃ serão caracterizadas pela técnica de RAPD, com intuito de identificar aquelas geneticamente mais próximas do genitor recorrente Rudá, objetivando acelerar o desenvolvimento de cultivares resistentes no programa de melhoramento.

Tabela 9. Análise da segregação da resistência à raça 63.39 de *P. griseola* das famílias RC₁F_{2:3} do cruzamento Rudá x MAR-2

Famílias	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistente	Suscetível	
195A-66	10	2	Rr
195A-68	9	1	Rr
195A-83	10	2	Rr
195A-86	7	1	Rr
138A-18	8	3	Rr
138A-19	8	2	Rr
138A-22	5	3	Rr
138A-40	7	4	Rr
138A-42	5	4	Rr
138A-46	9	1	Rr
138A-17	6	3	Rr
138A-25	7	1	Rr
139A-120	12	0	RR
139A-128	10	3	Rr
139A-140	6	1	Rr
139A-142	10	0	RR
189A-11	6	2	Rr
189A-16	6	3	Rr
191A-102	8	3	Rr

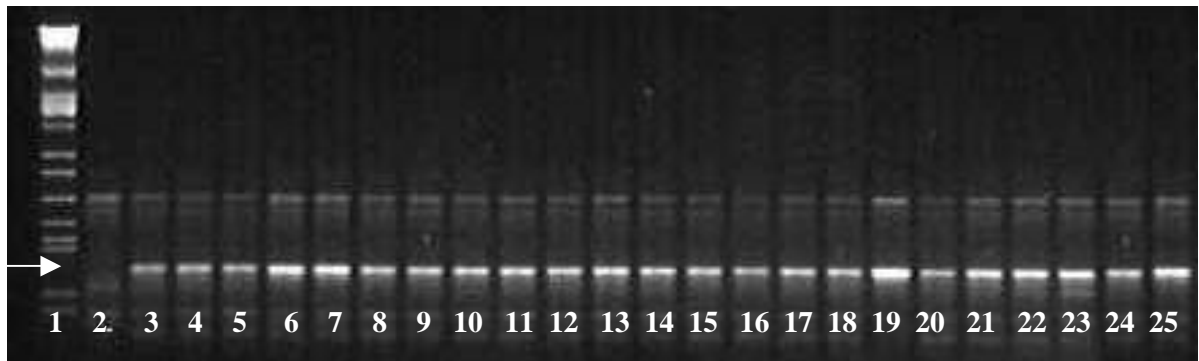


Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o primer RAPD OPE04 (FERREIRA et al., 2000). Da esquerda para a direita: 1, DNA do fago lambda digerido com enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*; 2, Rudá; 3, MAR-2; 4-15 e 16-25 correspondem a indivíduos das famílias RC₁F_{2:3} homocigotas resistentes 139A-120 e 139A-142, respectivamente. A seta indica a banda de 500 pb correspondente ao marcador.

3.3. Obtenção das linhagens RC₁F₃ – Rudá x BAT 332

Neste cruzamento, devido a problemas de repicagem e esporulação da raça 61.41 de *P. griseola*, não foi possível a inoculação das plantas RC₁F₂. Assim, 94 plantas RC₁F₂ do cruzamento entre Rudá x BAT 332, foram analisadas quanto a resistência à mancha angular, por meio do marcador molecular RAPD OPAO12₉₅₀ (CAIXETA, 2002). Como resultado observou-se que dentre as 94 plantas RC₁F₂, 65 apresentaram-se como resistentes e 29 como suscetíveis.

Os genes de resistência foram herdados do genitor BAT 332 de forma monogênica dominante. Verificou-se uma proporção de 3R₋:1rr (plantas resistentes: plantas suscetíveis), a qual foi confirmada pelo teste de significância do χ^2 (Tabela 10). A observação da segregação de um só gene dominante confirma os resultados obtidos por CAIXETA (2002). Este autor demonstrou que BAT 332 possui a forma alélica denominada de *Phg-6*².

Tabela 10. Análise da segregação da resistência à raça 61.41 de *P. griseola* na população RC₁F₂ do cruzamento Rudá x BAT 332.

População	Nº de plantas		Relação esperada	c ²	Probabilidade (%)
	R ₋ (+) ¹	Rr(-)			
Rudá x BAT 332	65	29	3:1	1,71	19,02

¹+ presença e - ausência do marcador

Foram derivadas 17 famílias $RC_1F_{2:3}$ com grãos do tipo carioca, para o teste de progênie, com intuito de identificar famílias homozigotas para o gene de resistência presente em BAT 332. Cinco famílias $RC_1F_{2:3}$ foram selecionadas como homozigotas resistentes, por meio da inoculação com a raça 61.41 de *P. griseola* (Tabela 11), sendo que a confirmação da resistência foi feita utilizando o marcador OPAO12₉₅₀ (Figura 4).

Tabela 11. Análise da segregação da resistência à raça 61.41 de *P. griseola* das famílias $RC_1F_{2:3}$ do cruzamento Rudá x BAT 332.

Famílias	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistente	Suscetível	
8-9-32	10	2	Rr
8-9-29	10	1	Rr
8-9-28	8	3	Rr
8-9-15	7	3	Rr
8-9-33	10	0	RR
8-4-27	10	2	Rr
8-4-23	10	1	Rr
8-4-15	6	5	Rr
8-4-11	11	0	RR
24-15-1	9	3	Rr
24-15-3	7	3	Rr
13-3-1	10	0	RR
13-3-3	11	0	RR
4-36-14	12	0	RR
4-36-11	10	2	Rr
4-36-3	7	4	Rr
4-36-1	9	3	Rr

As 54 linhagens RC_1F_3 das 5 famílias selecionadas como homozigotas para o loco que confere resistência à raça 61.41 serão caracterizadas pela técnica de RAPD para identificação daquelas geneticamente mais próximas do genitor Rudá.

A cultivar BAT 332 tem sido citada como potencial fonte de resistência à mancha-angular em Minas Gerais e outros Estados. Esta cultivar apresenta resistência a 10 de 25 raças de mancha-angular testadas por NIETSCHE et al. (2000). Segundo CAIXETA (2002), a cultivar BAT 332 apesar de não ser resistente a muitas raças, apresenta resistência a alguns isolados, os quais são virulentos para outras fontes de resistência, como Cornell 49242.

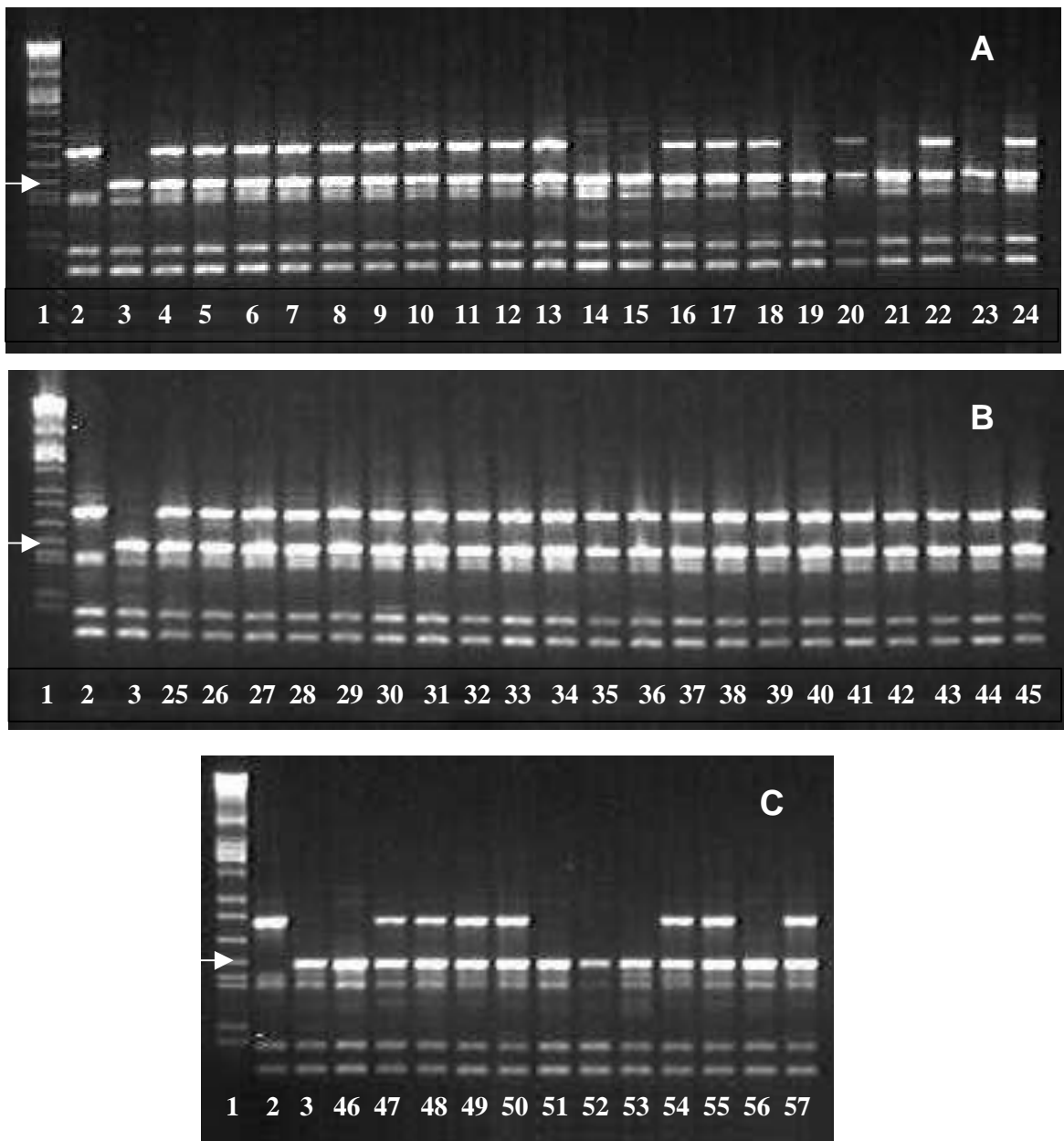


Figura 4. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o primer RAPD OPAO12 (CAIXETA, 2002). Da esquerda para a direita: 1, DNA do fago lambda digerido com enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*; 2, Rudá; 3, BAT 332; 4-13 e 14-24 (A) correspondem a indivíduos das famílias $RC_1F_{2:3}$ homozigotas resistentes 8-9-33 e 8-4-11, respectivamente; 25-34 e 35-45 (B) correspondem a indivíduos das famílias $RC_1F_{2:3}$ homozigotas resistentes 13-3-1 e 13-3-3, respectivamente; e 46-57 (C) correspondem a indivíduos da família $RC_1F_{2:3}$ homozigota resistente 4-36-14. A seta indica a banda de 950 pb correspondente ao marcador.

O genótipo México 54 confere resistência a 20 raças e MAR-2 confere resistência a 16 de 25 raças testadas (NIESTCHE et al., 2000). Existe uma

complementariedade de resistência entre BAT 332, México 54 e MAR-2, em relação a 22 raças testadas. As exceções compreendem a raça 63.63, para a qual ainda não foi identificado fonte de resistência no Brasil; a raça 63.21 para a qual as cultivares AND 277 e Cornell 49242 possuem resistência e a raça 31.31, para a qual G 5686 e Cornell 49242 possuem resistência (NIETSCHE, 2000).

Este trabalho demonstra a importância de se ter marcadores moleculares previamente identificados no programa de melhoramento do feijoeiro visando resistência à mancha-angular, tendo em vista que a seleção de plantas resistentes na geração RC_1F_2 do cruzamento Rudá x BAT 332, não pôde ser feita por meio de inoculação, devido a problemas de esporulação e inoculação do fungo. Com isto, a seleção das plantas resistentes teve que ser realizada apenas com o marcador RAPD OPAO12₉₅₀. Demonstrou-se que a seleção baseada no marcador foi eficiente, comprovado pela análise das famílias $RC_1F_{2:3}$ (Tabela 11), em que todas demonstraram ser resistentes por meio da inoculação com a raça 61.41 de *P. griseola* e ainda pela presença do marcador nos indivíduos das famílias homozigotas resistentes (Figura 4). Com isto foi possível selecionar linhagens RC_1F_3 com grãos tipo carioca e resistentes à mancha-angular por meio da seleção assistida pelo marcador molecular RAPD OPAO12₉₅₀.

As progênies das famílias selecionadas nos cruzamentos entre Rudá x México 54, Rudá x MAR-2 e Rudá x BAT 332 como homozigotas para os locos que conferem resistência à *P. griseola*, constituem-se de importantes linhagens para programas de melhoramento visando piramidação de genes de resistência a patógenos, além da possibilidade de utilização em programas de seleção recorrente.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O uso de cultivares resistentes é uma importante estratégia de controle da mancha-angular. O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem utilizado o método dos retrocruzamentos para a introdução de genes de resistência a esta doença na cultivar Rudá, sendo conduzidos subprogramas de retrocruzamentos paralelos para cada gene de resistência. O presente trabalho, teve como principal objetivo a identificação e seleção de famílias $RC_nF_{2:3}$ homozigotas para os locos que conferem resistência à mancha-angular, provenientes dos cruzamentos Rudá x México 54, Rudá x MAR-2 e Rudá x BAT 332.

Por meio da inoculação com a raça 63.19 de *P. griseola* e uso do marcador SCAR N02₈₉₀, foram selecionadas plantas RC_2F_2 resistentes do cruzamento entre Rudá e México 54. Foram identificadas duas famílias $RC_2F_{2:3}$ como homozigotas resistentes à mancha-angular com grãos tipo carioca.

As plantas RC_1F_2 oriundas do cruzamento entre Rudá e MAR-2 foram selecionadas pela inoculação com a raça 63.39 e marcador RAPD OPE04₅₀₀, enquanto que as plantas RC_1F_2 oriundas do cruzamento entre Rudá e BAT 332 foram selecionadas apenas pelo marcador OPAO12₉₅₀. Os resultados, permitiram selecionar duas e cinco famílias $RC_1F_{2:3}$ homozigotas resistentes às raças 63.39 e 61.41 de *P. griseola* com grãos tipo carioca provenientes dos cruzamentos entre Rudá x MAR-2 e Rudá x BAT 332, respectivamente.

Em todos os cruzamentos, os valores de χ^2 sugerem taxas de segregação de 3:1, indicando resistência monogênica dominante para as raças 63.19, 63.39 e 61.41 de *P. griseola*.

Este trabalho demonstra a utilidade dos marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos, auxiliando na seleção de indivíduos que possuem o gene desejado e ajudando na identificação de linhagens homozigotas para um determinado gene de resistência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN. A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.89, p. 281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN. A.L., COSTA, M.A., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p. 125-133, 2001.
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the Co-4 resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.90, p. 758-761, 2000.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2001. 500p.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG; UFV, 2002. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J.C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v.46, n.11, p. 610-615, 1956.
- CRUZ, C, D. **GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- DHINGRA, O.D., KUSHALAPPA, A.C. No correlation between angular leaf spot intensity and seed infection in bean by *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p.149-152, 1980.
- DOYLE, J. T., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., PAUAL JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.

- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W.C., TEMPLE, S.R., MANDELA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Phytopathology**, v.85, n.5, p. 600-607, 1995.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L.K., KELLY, J.D. Selection for monogenic resistance traits with coupling and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v.34, p. 1061-1066, 1994.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, v.30, n.3, p.461-465, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, p.1-11, 1998.
- LACERDA, J. T., COELHO, R. S. B., MARIANO, R. L. R., MENEZES, M. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n.2, p. 93-96, 1994.
- MORA-BRENES, B. M., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p.599, 1983.
- NIETSCHE, S. **Mancha-Angular do Feijoeiro-Comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. Viçosa, MG; UFV, 2000. 56p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v. 47, p. 567-572, 2000.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C., SINGH, S. P. Pathogenic variation in sources of and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.
- PAULA-JR, T. J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- RAGAGNIN, V.A. **Seleção, caracterização e comportamento de isolinhas de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular**. Viçosa, MG; UFV, 2001. 106p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- RAVA, S. C. A., SARTORATO, A., CARVALHO, J. R. P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, p.5-6, 1985.

- RIBEIRO, M. J., COELHO, R. S. B., MENEZES, M. A. Fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à mancha-angular do feijoeiro (*Isariopsis griseola* Sacc). **Caderno Omega Universidade Federal de Pernambuco Série Agronomia**, n.4, p. 243-246, 1993.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha-angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 247-251, 1992.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C. A., STONE, L. F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 669-700.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p. 637-642, 2000.
- SARTORATO, A. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, **Resumos ...** Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 26.
- VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M. A. (Comps.). **Standard system for evaluation of bean germplasm**. Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 817 p.
- WILLIAMS, J., KUBELIK, A. LIVAK, K., RAFALSKI, A., TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535. 1990.

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À MANCHA-ANGULAR GENETICAMENTE MAIS PRÓXIMAS DO GENITOR RECORRENTE

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com consumo per capita de 20,3 kg/hab./ano (BORÉM e CARNEIRO, 1998). O feijão destaca-se como importante fonte de proteína na dieta humana mundial (SCHWARTZ et al., 1996) e como alternativa de menor custo em relação a proteína animal (TEIXEIRA e ROCHA, 1988), importante principalmente para os países em desenvolvimento. O rendimento médio brasileiro da cultura esta em torno de 705 kg/ha (IBGE, 2002), quando se considerando um potencial de 4000 kg/ha (VIEIRA et al., 1999).

A baixa produtividade brasileira de feijão é devida, em parte, ao ataque de patógenos, sendo a cultura hospedeira de grande número de organismos patogênicos (fungos, bactérias, vírus e nematóides). Dentre as doenças causadas por fungos, pode-se destacar a mancha-angular, causada pelo agente patogênico *Phaeoisariopsis griseola*, de ocorrência generalizada nas diversas áreas produtoras desta leguminosa (MORA-BRENES et al., 1983; SARTORATO, 1988).

Para o controle da doença pode-se utilizar de pulverizações foliares com fungicidas, o que, entretanto, eleva os custos de produção. Práticas culturais, como utilização de sementes livres do patógeno, rotação de culturas por pelo menos dois anos e eliminação de restos culturais, também são recomendadas. No entanto, uma alternativa prática, econômica e eficiente, além de ecologicamente autosustentável é o uso de cultivares resistentes (SARTORATO, 2001).

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes a esta doença, tem-se utilizado o método dos retrocruzamentos com uma cultivar adaptada, produtiva e com boas características agronômicas e culinárias. Este método têm sido largamente utilizado para transferência de características simples como resistência a doenças, geralmente controladas por um único ou poucos genes (BORÉM, 2001).

Este método, pode ser associado ao uso de marcadores moleculares, com dois objetivos. O primeiro é ajudar na seleção de indivíduos que possuem o gene desejado, dispensando a necessidade de inoculações com o patógeno e possibilitando seleção precoce, e o segundo é selecionar, dentre estes, aqueles que possuem a maior porção do genoma da linhagem parental recorrente, na tentativa de apressar a recomposição de seu genoma (YOUNG e TANKSLEY, 1989).

A taxa com que as plantas recuperam o genótipo do genitor recorrente considerando o conjunto de genes responsáveis pela expressão das características agrônômicas e comerciais desejáveis podem estar sendo recuperadas mais rapidamente em algumas plantas nos primeiros retrocruzamentos. Se a cada retrocruzamento forem identificadas essas plantas para serem utilizados no retrocruzamento seguinte, o tempo para se fixar as características desejáveis pode ser reduzido, diminuindo conseqüentemente o tempo para o lançamento da nova cultivar (SANTOS et al., 2001). De acordo com ALZATE-MARIN et al., (2001) a alta acurácia dos marcadores moleculares para detectar a similaridade/divergência entre cultivares é uma vantagem a ser explorada em programas de seleção de cultivares desejáveis.

Exemplos bem sucedidos desta abordagem foram a transferência concomitante de dois alelos de resistência a ferrugem em cevada (TOOJINDA et al., 1998) e a seleção de isolinhas resistentes à mancha-angular, ferrugem e antracnose, mais próximas geneticamente do genitor recorrente (Rudá) com o auxílio de marcadores moleculares (RAGAGNIN, 2001).

Segundo LEE (1995), os marcadores de DNA oferecem consideráveis vantagens para os retrocruzamentos, como seleção indireta de genes desejáveis, seleção para regiões do genitor recorrente não-ligados à região introgridida e redução do arrasto de DNA (*linkage drag*) de região não desejada do genoma, situada próxima à região introgridida do genitor doador.

O objetivo deste trabalho foi o de identificar e selecionar linhagens RC_2F_3 homocigotas resistentes à raça 63.19 derivadas do cruzamento Rudá x México 54 e RC_1F_3 homocigotas resistentes às raças 61.41, 63.39 derivadas dos cruzamentos Rudá x BAT 332 e Rudá x MAR-2, respectivamente, mais próximas do genitor recorrente (Rudá), por meio do uso de marcadores moleculares RAPD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

Foram utilizadas linhagens oriundas de famílias $F_{2:3}$ derivadas das populações RC_2 de Rudá x México 54 e RC_1 de Rudá x MAR-2 e Rudá x BAT 332, homozigotas para os locos que conferem resistência às raças 63.19, 63.39 e 61.41 de *P. griseola*, respectivamente (Tabela 1). Estas linhagens foram obtidas como demonstrado no capítulo 1.

Tabela 1. Linhagens homozigotas para os locos que conferem resistência às raças 61.41, 63.39 e 63.19 de *P. griseola*

Linhagens			
Rudá x BAT 332 Geração RC_1F_3		Rudá x MAR-2 Geração RC_1F_3	Rudá x México 54 Geração RC_2F_3
8-9-33-1	13-3-1-136	139A-120-156	9-2-117-92
8-9-33-2	13-3-1-137	139A-120-157	9-2-117-93
8-9-33-3	13-3-1-138	139A-120-158	9-2-117-94
8-9-33-4	13-3-1-139	139A-120-159	9-2-117-95
8-9-33-5	13-3-1-141	139A-120-160	9-2-117-96
8-9-33-6	13-3-1-142	139A-120-161	9-2-117-97
8-9-33-7	13-3-1-143	139A-120-162	9-2-117-98
8-9-33-9	13-3-1-144	139A-120-163	9-2-117-99
8-9-33-11	13-3-1-145	139A-120-164	9-2-117-100
8-9-33-12	13-3-1-146	139A-120-165	9-2-117-101
8-4-11-61	13-3-1-147	139A-120-166	37-6-155-126
8-4-11-62	13-3-1-149	139A-120-167	37-6-155-127
8-4-11-63	13-3-1-150	139A-142-131	37-6-155-128
8-4-11-64	13-3-1-151	139A-142-132	37-6-155-129
8-4-11-65	13-3-1-152	139A-142-133	37-6-155-130
8-4-11-66	4-36-14-189	139A-142-134	37-6-155-131
8-4-11-67	4-36-14-190	139A-142-135	37-6-155-132
8-4-11-68	4-36-14-191	139A-142-136	37-6-155-133
8-4-11-69	4-36-14-192	139A-142-137	
8-4-11-70	4-36-14-193	139A-142-138	
8-4-11-71	4-36-14-194	139A-142-139	
13-3-1-130	4-36-14-195	139A-142-140	
13-3-1-131	4-36-14-196	139A-142-141	
13-3-1-132	4-36-14-197		
13-3-1-133	4-36-14-198		
13-3-1-134	4-36-14-199		
13-3-1-135	4-36-14-200		

2.2. Extração de DNA e amplificação pela técnica de RAPD

Para a extração de DNA, dois folíolos de cada genitor doador (BAT 332, MAR-2 e México 54) e do recorrente (Rudá), bem como de cada uma das linhagens RC_nF_3 foram coletados e embalados em papel alumínio, devidamente identificados e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

A extração foi efetuada com base na metodologia de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações (ABDELNOOR et al., 1995). Amostras de DNA dos genitores e das linhagens RC_nF_3 oriundas dos três retrocruzamentos, foram amplificadas pela técnica de RAPD. Os primers foram adquiridos junto à Operon Technologies (Alameda, CA, EUA).

Cada reação de amplificação de RAPD foi processada em um volume total de $25\mu\text{l}$, contendo 25 ng de DNA; $100\mu\text{M}$ de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,0 mM de MgCl_2 ; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; $0,4\ \mu\text{M}$ de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer*, e uma unidade de *Taq* polimerase.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador, de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os ciclos de amplificação constavam de uma etapa de desnaturação a $94\text{ }^\circ\text{C}$, por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde a $35\text{ }^\circ\text{C}$, por 30 segundos, e uma etapa de extensão a $72\text{ }^\circ\text{C}$, por um minuto. Depois de 40 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a $72\text{ }^\circ\text{C}$, por sete minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo $0,5\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II.

2.3. Análise dos dados

O registro dos dados foi feito a partir das bandas polimórficas intensas e médias detectadas entre os dois genitores envolvidos em cada retrocruzamento, bem como da progênie. Foi gerada uma matriz de dados, onde a codificação (0)

significou ausência e (1) presença da banda, entre os indivíduos, gerando uma matriz de valores binários.

Estimativas de similaridades genéticas entre as linhagens homozigotas resistentes e genitores, foram expressas como coeficientes de similaridades de Jaccard, empregando-se a equação $SG_{ij} = a/(a+b+c)$, em que SG_{ij} é a similaridade genética entre os genótipos i e j , a é o número de bandas presentes em ambos i e j , b é o número de bandas presentes em i e ausentes j , e c é o número de bandas presentes em j e ausentes em i . A conversão para distância genética (DG) foi feita, empregando-se a equação $DG_{ij} = 1 - SG_{ij}$. O programa GENES (CRUZ, 2001) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas. O dendrograma, baseado na matriz de distâncias genéticas, foi obtido pela análise de agrupamento do programa STATISTICA, versão 5.0, usando-se o método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic average*).

Para cálculo das distâncias genéticas relativas (DGR_{ij}), a maior DG_{ij} foi transformada para 100% e as demais DG_{ij} , corrigidas proporcionalmente. Pelas distâncias genéticas relativas, foram selecionadas, em cada cruzamento, aquelas linhagens que apresentaram as menores distâncias em relação ao genitor recorrente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise molecular das linhagens RC₂F₃ do cruzamento Rudá x México 54

Para a análise da divergência genética foram utilizadas 18 linhagens RC₂F₃ homocigotas para o loco que confere resistência à raça 63.19 de *P. griseola*, oriundas do cruzamento inicial entre Rudá e México 54. Neste estudo foram utilizados 20 *primers* previamente caracterizados como polimórficos entre os genitores. Estes geraram 42 bandas polimórficas, com uma média de 2,1 bandas por *primer*.

As distâncias genéticas relativas entre as linhagens RC₂F₃ e o genitor recorrente (Rudá) variaram de 8,38 a 30,23% (Tabela 2). A Tabela 3 apresenta a matriz de distância genética, calculada pelo Programa GENES (CRUZ, 2001).

Tabela 2. Distâncias genéticas relativas entre o genitor recorrente (Rudá), genitor doador (México 54) e linhagens RC₂F₃.

Genitor doador e linhagens	Distância Genética Relativa em relação ao Rudá (%)
México 54	100,00
9-2-117-92 ¹	8,38
9-2-117-93	11,17
9-2-117-94	30,23
9-2-117-95	14,08
9-2-117-96	24,73
9-2-117-97	19,39
9-2-117-98	16,90
9-2-117-99	13,84
9-2-117-100	19,55
9-2-117-101	11,26
37-6-155-126	19,39
37-6-155-127	16,62
37-6-155-128	13,97
37-6-155-129	21,98
37-6-155-130	16,76
37-6-155-131	16,76
37-6-155-132	14,08
37-6-155-133	11,17

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

Tabela 3. Distâncias genéticas (%) expressas como complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtidas para 18 linhagens RC₂F₃ originadas do cruzamento entre Rudá e México 54.

	Rudá	México 54	9-2-117-92	9-2-117-93	9-2-117-94	9-2-117-95	9-2-117-96	9-2-117-97	9-2-117-98	9-2-117-99	9-2-117-100	9-2-117-101	37-6-155-126	37-6-155-127	37-6-155-128	37-6-155-129	37-6-155-130	37-6-155-131	37-6-155-132	37-6-155-133	
Rudá	-																				
México 54	29,58	-																			
9-2-117-92 ¹	2,48	27,66	-																		
9-2-117-93	3,31	27,14	4,10	-																	
9-2-117-94	8,94	22,96	8,13	10,48	-																
9-2-117-95	4,17	26,81	6,56	4,17	6,67	-															
9-2-117-96	7,32	24,09	8,06	5,74	6,61	6,61	-														
9-2-117-97	5,74	25,36	3,31	5,74	5,00	6,61	6,56	-													
9-2-117-98	5,00	26,28	7,38	5,00	5,88	4,24	4,20	5,83	-												
9-2-117-99	4,10	26,43	3,28	4,10	9,68	6,56	6,50	6,50	7,38	-											
9-2-117-100	5,79	25,55	8,13	4,17	8,26	3,39	6,61	6,61	4,24	6,56	-										
9-2-117-101	3,33	27,34	4,13	4,96	5,83	4,20	4,17	4,17	5,04	5,74	5,83	-									
37-6-155-126	5,74	25,36	6,50	5,74	5,00	3,36	4,96	6,56	4,20	6,50	5,00	4,17	-								
37-6-155-127	4,92	25,90	2,48	4,92	5,79	7,38	7,32	2,50	8,20	5,69	7,38	3,33	5,74	-							
37-6-155-128	4,13	26,62	6,50	5,74	6,61	5,00	4,96	6,56	5,83	4,92	5,00	4,17	3,33	5,74	-						
37-6-155-129	6,50	24,64	4,10	3,31	7,38	5,79	5,74	5,74	6,61	5,69	5,79	4,96	4,13	3,31	7,32	-					
37-6-155-130	4,96	26,09	5,74	4,96	9,02	5,83	7,38	5,79	6,67	7,32	4,20	6,61	5,79	6,56	4,17	6,56	-				
37-6-155-131	4,96	26,09	5,74	6,56	7,44	7,44	4,17	4,17	5,04	7,32	5,83	5,00	8,94	6,56	5,79	8,13	5,00	-			
37-6-155-132	4,17	26,81	4,96	7,38	6,67	5,04	9,76	5,00	5,88	8,13	5,04	5,83	5,00	5,79	5,00	7,38	2,54	5,83	-		
37-6-155-133	3,31	27,14	4,10	6,50	7,38	7,38	8,87	5,74	8,20	7,26	7,38	4,96	5,74	3,31	4,13	6,50	3,33	6,56	2,52	-	

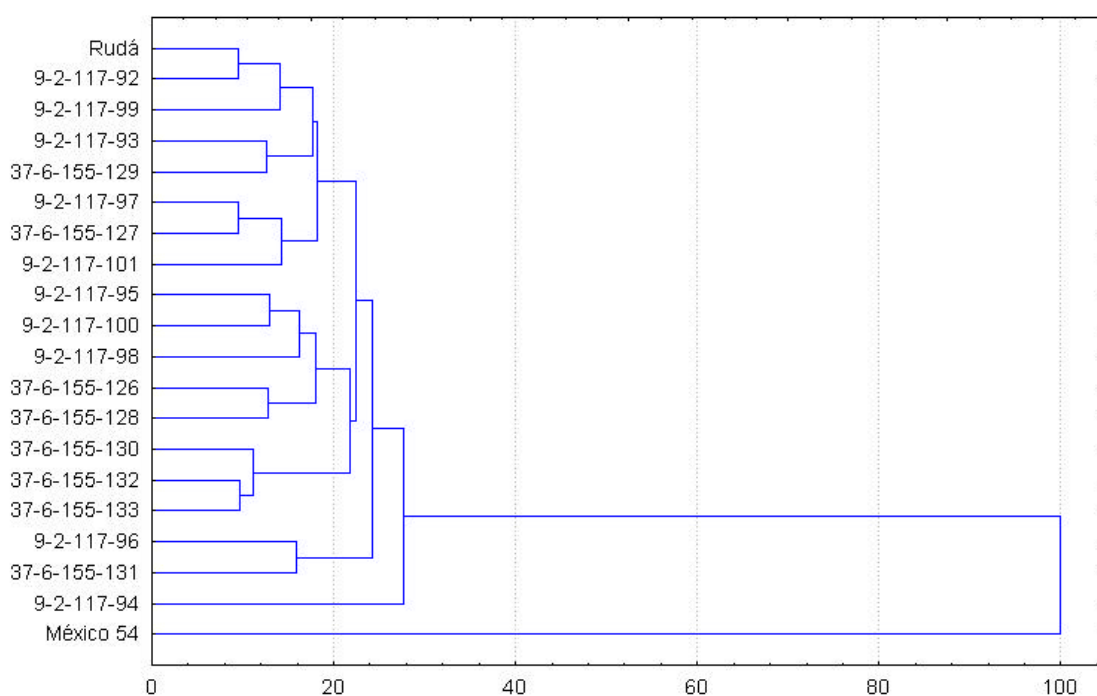
¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

As linhagens ainda se encontram geneticamente distantes do genitor recorrente, mas isto era de se esperar tendo em vista, que foram feitos apenas dois ciclos de retrocruzamento. Estas linhagens teoricamente possuem 87,5% do genoma do genitor Rudá, contudo os marcadores nos permitiram selecionar linhagens com distâncias de apenas 8,38% em relação a este genitor.

Foram selecionadas as linhagens RC₂F₃ com as menores distâncias em relação ao genitor recorrente Rudá, com a seguinte identificação: 9-2-117-92 (8,38%), 9-2-117-93 (11,17%), 9-2-117-101 (11,26%) e 37-6-155-133 (11,17%). Estas linhagens serão utilizadas em outro retrocruzamento com o genitor Rudá visando uma maior recuperação do genoma desta cultivar, além de avaliações no campo com intuito de selecionar linhagens com boas características agronômicas para serem utilizadas em programas de seleção recorrente.

De acordo com o dendrograma produzido pelo método UPGMA (Figura 1), a uma distância genética relativa de 30%, podem ser definidos dois grupos, um contendo o genitor doador (México 54), e o outro contendo todas as linhagens RC₂F₃ e o genitor recorrente (Rudá).

Figura 1. Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas relativas expressas em complementos de Jaccard, entre 18 linhagens RC₂F₃ originadas do cruzamento entre Rudá e México 54.



3.2. Análise molecular das linhagens RC₁F₃ do cruzamento Rudá x MAR-2

Para avaliar as distâncias genéticas entre 23 linhagens RC₁F₃ homozigotas resistentes à mancha-angular e o genitor recorrente Rudá, foram utilizados 25 *primers* RAPD, previamente caracterizados como polimórficos entre os genitores utilizados no cruzamento inicial. Estes *primers* geraram 47 bandas polimórficas, com uma média de 1,88 bandas por *primer*.

Como apresentado na Tabela 4, as distâncias genéticas relativas entre as linhagens RC₁F₃ e o genitor Rudá variaram de 11,73 a 27,97%. A Tabela 5 contém a matriz de distância genética calculada pelo Programa GENES (CRUZ, 2001).

Tabela 4. Distâncias genéticas relativas entre o genitor recorrente (Rudá), genitor doador (MAR-2) e linhagens RC₁F₃.

Genitor doador e linhagens	Distância Genética Relativa em relação ao Rudá (%)
MAR-2	100,00
139A-120-156	16,42
139A-120-157	16,53
139A-120-158	25,97
139A-120-159	25,80
139A-120-160	18,77
139A-120-161	16,42
139A-120-162	18,65
139A-120-163 ¹	11,73
139A-120-164	13,99
139A-120-165	16,32
139A-120-166	18,53
139A-120-167	16,42
139A-142-131	27,97
139A-142-132	25,48
139A-142-133	14,17
139A-142-134	16,42
139A-142-135	16,42
139A-142-136	14,17
139A-142-137	20,98
139A-142-138	20,59
139A-142-139	21,11
139A-142-140	20,98
139A-142-141	20,98

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

Tabela 5. Distâncias genéticas (%) relativas expressas como complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtidas para 23 linhagens RC₁F₃ originadas do cruzamento entre Rudá e MAR-2.

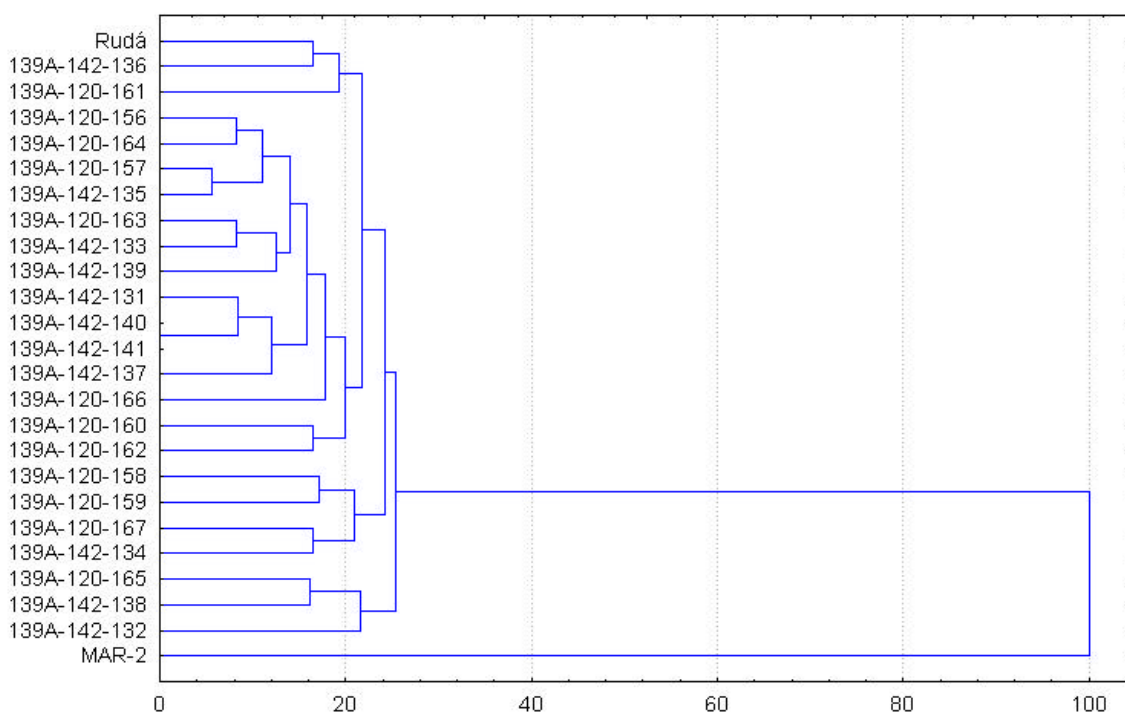
	Rudá	MAR-2	139A-120-156	139A-120-157	139A-120-158	139A-120-159	139A-120-160	139A-120-161	139A-120-162	139A-120-163	139A-120-164	139A-120-165	139A-120-166	139A-120-167	139A-142-131	139A-142-132	139A-142-133	139A-142-134	139A-142-135	139A-142-136	139A-142-137	139A-142-138	139A-142-139	139A-142-140	139A-142-141	
Rudá	-																									
MAR-2	27,33	-																								
139A-120-156	4,49	23,81	-																							
139A-120-157	4,52	23,95	2,61	-																						
139A-120-158	7,10	22,09	3,95	2,67	-																					
139A-120-159	7,05	21,95	6,45	5,23	4,00	-																				
139A-120-160	5,13	23,35	4,52	4,55	5,88	8,33	-																			
139A-120-161	4,49	23,81	5,13	5,16	7,74	6,45	4,52	-																		
139A-120-162	5,10	23,21	3,23	4,52	7,10	8,28	3,87	5,73	-																	
139A-120-163 ¹	3,21	24,71	3,85	3,87	6,45	6,41	5,73	3,85	4,46	-																
139A-120-164	3,82	24,12	1,94	3,23	5,81	8,23	3,85	4,46	2,56	3,18	-															
139A-120-165	4,46	23,67	5,10	6,37	8,92	7,64	6,96	3,85	5,70	5,06	5,66	-														
139A-120-166	5,06	23,08	3,21	4,49	7,05	5,77	6,33	4,46	5,06	4,43	3,80	4,43	-													
139A-120-167	4,49	23,81	3,87	5,16	3,95	5,19	5,77	6,37	5,73	5,10	4,46	6,33	5,70	-												
139A-142-131	7,64	21,34	4,55	3,29	4,64	5,88	5,19	5,81	5,16	5,77	5,13	7,01	5,13	7,05	-											
139A-142-132	6,96	21,69	6,37	7,64	7,74	7,69	8,23	6,37	6,96	7,55	5,70	3,85	5,70	7,59	7,05	-										
139A-142-133	3,87	24,40	3,25	1,97	4,61	5,84	5,16	4,52	3,87	1,95	2,58	5,73	3,85	4,52	3,92	7,01	-									
139A-142-134	4,49	23,81	3,87	6,41	5,23	5,19	5,77	6,37	6,96	6,33	5,70	5,10	5,70	3,87	5,81	5,13	7,01	-								
139A-142-135	4,49	23,81	2,60	1,32	3,95	6,45	3,25	3,87	3,23	3,85	1,94	6,33	4,46	3,87	3,27	7,59	1,96	6,37	-							
139A-142-136	3,87	24,40	4,52	4,55	5,88	7,10	6,41	4,52	6,37	4,49	3,85	4,49	6,33	7,01	6,45	4,52	5,16	4,52	5,77	-						
139A-142-137	5,73	22,75	3,87	5,16	5,23	5,19	5,77	5,13	5,73	3,85	4,46	6,33	5,70	3,87	3,27	7,59	3,25	3,87	3,87	5,77	-					
139A-142-138	5,63	22,35	3,80	5,06	7,59	8,75	5,66	6,25	4,40	5,00	4,38	3,77	5,59	6,25	5,70	6,25	5,66	5,03	5,03	5,66	5,03	-				
139A-142-139	5,77	22,89	3,90	2,63	3,97	5,23	5,81	6,41	5,77	3,87	4,49	6,37	4,49	5,16	3,29	6,41	1,97	5,16	3,90	5,81	3,90	5,06	-			
139A-142-140	5,73	22,75	2,60	3,90	5,23	6,45	4,52	5,13	4,49	3,85	3,21	5,10	3,21	6,37	1,97	5,13	3,25	3,87	3,87	4,52	2,60	3,80	2,61	-		
139A-142-141	5,73	22,75	2,60	3,90	5,23	6,45	4,52	5,13	4,49	3,85	3,21	5,10	3,21	6,37	1,97	5,13	3,25	3,87	3,87	4,52	2,60	3,80	2,61	0,00	-	

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

Foram selecionadas as linhagens RC_1F_3 com as menores distâncias em relação ao genitor recorrente, com a seguinte identificação: 139A-120-163 (11,73%), 139A-120-164 (13,99%), 139A-142-133 (14,17%) e 139A-142-136 (14,17%).

De acordo com o dendrograma (Figura 2), a uma distância genética relativa de 28%, pode-se definir dois grupos, um contendo o genitor doador (MAR-2), e o outro contendo todas as linhagens RC_1F_3 e o genitor recorrente (Rudá).

Figura 2. Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas relativas expressas em complementos de Jaccard, entre 23 linhagens RC_1F_3 originadas do cruzamento entre Rudá e MAR-2.



Pelo exposto anteriormente, foi observado que neste cruzamento, as progênes se encontram ainda mais distantes do genitor (Rudá) do que no cruzamento com México 54. Isto de certa forma, é devido ao fato de ter sido feito apenas um retrocruzamento, sendo que, teoricamente estas plantas possuem apenas 75% do genoma do genitor Rudá.

O arraste de genes ligados ao gene de interesse é uma outra hipótese sobre a maior distância genética em relação ao genitor recorrente. Quando os genitores

possuem pequena distância genética o arraste de ligação entre os indivíduos da progênie tem menor importância do que quando eles são mais distantes geneticamente.

Entretanto, ARRUDA, (1998) trabalhando com a introgressão do gene *Co-4* de resistência a antracnose da cultivar TO em Rudá, demonstrou que o arraste de genes parece não justificar a elevação das distâncias entre as plantas.

O uso de marcadores moleculares facilita a seleção de cultivares mais próximos ao genitor recorrente, pois como se observou nos resultados, é possível encontrar linhagens com distância genética de apenas 11,73% em relação ao Rudá. Sem este recurso o melhorista pode selecionar linhagens que possuam boas características agronômicas, porém levaria maior tempo para recuperação do genoma de parental recorrente. Isto demonstra o potencial dos marcadores moleculares na seleção de indivíduos para os próximos ciclos de retrocruzamentos, com objetivo de acelerar o processo de piramidação de genes de resistência.

3.3. Análise molecular das linhagens RC_1F_3 do cruzamento Rudá x BAT 332

Foram utilizados 28 *primers* RAPD polimórficos entre os genitores utilizados no cruzamento inicial, para avaliar a distância genética entre as 54 linhagens RC_1F_3 homocigotas resistentes à mancha-angular e o genitor recorrente (Rudá). Estes *primers* geraram 50 bandas polimórficas, com uma média de 1,78 bandas por *primer*.

A variação da distância genética relativa entre as linhagens RC_1F_3 e o genitor Rudá, foi de 13,94 a 30,00% (Tabela 6). A matriz de distância genética absoluta entre os genitores e as linhagens RC_1F_3 é apresentada na Tabela 7. Um fator importante na recuperação do genoma recorrente é a divergência genética entre os genitores. Como a distância genética absoluta entre Rudá e MAR-2 foi de 27,33% e entre Rudá e BAT 332 foi de 30,33% (Tabelas 5 e 7), e como foi feito apenas um retrocruzamento em ambos os casos, pode-se concluir que os resultados se ajustam a esta premissa, tendo em vista que a maior recuperação do genoma recorrente aconteceu entre a progênie do cruzamento entre Rudá e MAR-2 (distâncias variando de 11,73 a 27,97% em relação ao Rudá).

Tabela 6. Distâncias genéticas relativas entre o genitor recorrente (Rudá), genitor doador (BAT 332) e linhagens RC₁F₃.

Genitor doador e linhagens	Distância Genética Relativa em relação ao Rudá (%)	Genitor doador e linhagens	Distância Genética Relativa em relação ao Rudá (%)
BAT 332	100,00	13-3-1-136	16,27
8-9-33-1	27,31	13-3-1-137	23,08
8-9-33-2	25,21	13-3-1-138	16,38
8-9-33-3	16,38	13-3-1-139	18,72
8-9-33-4 ¹	13,94	13-3-1-141	21,06
8-9-33-5	18,46	13-3-1-142	16,27
8-9-33-6	18,33	13-3-1-143	20,77
8-9-33-7	18,46	13-3-1-144	16,38
8-9-33-9	18,46	13-3-1-145	16,38
8-9-33-11	22,92	13-3-1-146	16,27
8-9-33-12	22,76	13-3-1-147	25,38
8-4-11-61	14,04	13-3-1-149	20,92
8-4-11-62	20,77	13-3-1-150	16,27
8-4-11-63	18,46	13-3-1-151	23,08
8-4-11-64	18,59	13-3-1-152	16,38
8-4-11-65	13,94	4-36-14-189	29,79
8-4-11-66	14,14	4-36-14-190	30,00
8-4-11-67	25,56	4-36-14-191	23,24
8-4-11-68	20,92	4-36-14-192	25,38
8-4-11-69	18,72	4-36-14-193	23,24
8-4-11-70	14,14	4-36-14-194	27,69
8-4-11-71	16,27	4-36-14-195	23,08
13-3-1-130	30,00	4-36-14-196	23,08
13-3-1-131	16,27	4-36-14-197	23,24
13-3-1-132	18,72	4-36-14-198	20,92
13-3-1-133	23,40	4-36-14-199	25,56
13-3-1-134	23,08	4-36-14-200	18,72
13-3-1-135	14,04		

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

As distâncias genéticas desta progênie em relação ao Rudá ainda são altas. Contudo existe a possibilidade de se selecionar linhagens com uma distância genética relativa de apenas 13,94%.

Neste trabalho foram selecionadas as linhagens: 8-9-33-4 (13,94%), 8-4-11-61 (14,04%), 8-4-11-65 (13,94%), 8-4-11-66 (14,14%), 8-4-11-70 (14,14%) e 13-3-1-135 (14,04%).

Tabela 7. Distâncias genéticas (%) relativas expressas como complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtidas para 54 linhagens F₃RC₁ originadas do cruzamento entre Rudá e BAT 332.

	Rudá	BAT 332	8-9-33-1	8-9-33-2	8-9-33-3	8-9-33-4	8-9-33-5	8-9-33-6	8-9-33-7	8-9-33-9	8-9-33-11	8-9-33-12	8-4-11-61	8-4-11-62	8-4-11-63	8-4-11-64	8-4-11-65
Rudá	-																
BAT 332	30,30	-															
8-9-33-1	8,27	23,45	-														
8-9-33-2	7,64	24,07	3,52	-													
8-9-33-3	4,96	26,38	1,42	3,55	-												
8-9-33-4 ¹	4,23	26,67	2,10	4,20	3,50	-											
8-9-33-5	5,59	25,61	2,10	5,56	3,50	1,40	-										
8-9-33-6	5,56	25,45	2,08	5,52	3,47	1,39	1,39	-									
8-9-33-7	5,59	25,61	2,10	4,20	3,50	2,78	2,78	2,76	-								
8-9-33-9	5,59	25,61	2,10	5,56	2,11	1,40	1,40	1,39	2,78	-							
8-9-33-11	6,94	24,54	3,47	4,20	3,50	2,78	1,40	2,76	2,78	2,78	-						
8-9-33-12	6,90	24,39	3,45	5,52	3,47	2,76	2,76	2,74	2,76	1,39	2,76	-					
8-4-11-61	4,26	26,83	3,50	4,23	4,90	4,17	4,17	4,14	2,80	4,17	5,52	5,48	-				
8-4-11-62	6,29	25,15	5,52	4,90	4,20	4,83	4,83	4,79	6,16	3,47	4,83	4,79	3,50	-			
8-4-11-63	5,59	25,61	6,16	5,56	7,53	5,48	5,48	5,44	6,80	6,80	6,80	8,05	4,17	4,83	-		
8-4-11-64	5,63	25,77	6,21	4,23	6,25	4,17	5,52	5,48	5,52	5,52	5,52	6,80	2,82	2,11	4,17	-	
8-4-11-65	4,23	26,67	4,83	4,20	6,21	4,14	5,48	5,44	5,48	5,48	6,80	5,44	2,80	3,47	2,78	2,80	-
8-4-11-66	4,29	26,99	4,90	4,26	6,29	2,82	2,82	4,17	5,56	4,20	4,20	5,52	4,23	4,90	4,20	4,23	4,20
8-4-11-67	7,74	24,37	4,90	2,86	4,93	5,56	6,90	6,85	6,90	6,90	6,90	8,16	4,23	3,52	4,20	2,84	2,82
8-4-11-68	6,34	25,31	6,90	4,93	6,94	6,21	6,21	7,48	6,21	7,53	6,21	8,78	3,52	4,20	3,50	2,13	3,50
8-4-11-69	5,67	25,93	6,25	4,26	4,93	5,56	5,56	6,85	6,90	5,56	5,56	6,85	4,23	2,13	2,82	2,84	2,82
8-4-11-70	4,29	26,99	4,90	2,86	4,93	4,20	5,56	5,52	5,56	5,56	5,56	6,85	4,23	4,90	5,56	4,23	4,20
8-4-11-71	4,93	26,22	4,17	3,52	4,20	4,83	4,83	4,79	4,83	4,83	4,83	6,12	2,11	2,80	4,83	3,50	3,47
13-3-1-130	9,09	23,27	4,20	3,55	4,23	4,86	4,86	4,83	4,86	4,86	4,86	6,16	3,52	4,20	4,86	4,90	4,86
13-3-1-131	4,93	26,22	4,17	3,52	4,20	4,83	4,83	4,79	4,83	4,83	4,83	6,12	2,11	2,80	3,47	3,50	3,47
13-3-1-132	5,67	25,93	4,90	4,26	4,93	5,56	5,56	5,52	5,56	5,56	5,56	6,85	4,23	4,90	5,56	5,59	5,56
13-3-1-133	7,09	25,00	6,29	5,67	4,96	6,94	6,94	6,90	5,59	5,59	6,94	6,90	4,26	4,93	6,94	5,63	6,94

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

Tabela 7. Cont...

	Rudá	BAT 332	8-9-33-1	8-9-33-2	8-9-33-3	8-9-33-4	8-9-33-5	8-9-33-6	8-9-33-7	8-9-33-9	8-9-33-11	8-9-33-12	8-4-11-61	8-4-11-62	8-4-11-63	8-4-11-64	8-4-11-65
13-3-1-134	6,99	24,69	6,21	5,59	6,25	6,85	6,85	6,80	6,85	6,85	6,85	6,80	4,20	4,86	5,52	5,56	4,17
13-3-1-135	4,26	26,83	3,50	2,84	3,52	4,17	4,17	4,14	4,17	4,17	4,17	5,48	2,82	3,50	4,17	4,20	4,17
13-3-1-136	4,93	26,22	4,17	3,52	4,20	4,83	4,83	4,79	4,83	4,83	4,83	4,79	3,50	4,17	4,83	4,86	3,47
13-3-1-137	6,99	24,69	6,21	5,59	6,25	6,85	6,85	6,80	6,85	6,85	6,85	8,11	5,56	6,21	6,85	6,90	6,85
13-3-1-138	4,96	26,38	4,20	3,55	4,23	4,86	4,86	4,83	4,86	4,86	4,86	6,16	3,52	4,20	6,21	4,90	4,86
13-3-1-139	5,67	25,93	4,90	4,26	4,93	5,56	5,56	5,52	5,56	5,56	5,56	6,85	4,23	4,90	5,56	5,59	5,56
13-3-1-141	6,38	25,47	5,59	6,34	6,99	6,25	6,25	6,21	6,25	6,25	7,59	7,53	4,93	6,94	6,25	7,64	6,25
13-3-1-142	4,93	26,22	4,17	3,52	4,20	4,83	4,83	4,79	4,83	4,83	4,83	6,12	3,50	4,17	4,83	4,86	4,83
13-3-1-143	6,29	25,15	5,52	4,90	5,56	6,16	6,16	6,12	6,16	6,16	6,16	7,43	4,86	5,52	6,16	6,21	6,16
13-3-1-144	4,96	26,38	4,20	3,55	4,23	4,86	4,86	4,83	4,86	4,86	4,86	6,16	3,52	4,20	4,86	4,90	4,86
13-3-1-145	4,96	26,38	4,20	3,55	4,23	4,86	4,86	4,83	4,86	4,86	4,86	6,16	3,52	4,20	4,86	4,90	4,86
13-3-1-146	4,93	26,22	4,17	3,52	4,20	4,83	4,83	4,79	4,83	4,83	4,83	6,12	3,50	4,17	4,83	4,86	4,83
13-3-1-147	7,69	24,22	6,90	6,29	6,94	7,53	7,53	7,48	7,53	7,53	7,53	8,78	6,25	6,90	7,53	7,59	7,53
13-3-1-149	6,34	25,31	5,56	3,55	5,59	6,21	6,21	6,16	4,86	6,21	4,86	6,16	4,90	5,56	6,21	6,25	6,21
13-3-1-150	4,93	26,22	4,17	2,13	4,20	4,83	4,83	4,79	3,47	4,83	3,47	4,79	3,50	4,17	4,83	4,86	4,83
13-3-1-151	6,99	24,69	6,21	4,23	6,25	6,85	6,85	6,80	5,52	6,85	5,52	6,80	5,56	6,21	6,85	6,90	6,85
13-3-1-152	4,96	26,38	4,20	3,55	4,23	4,86	4,86	4,83	4,86	4,86	4,86	6,16	3,52	4,20	4,86	4,90	4,86
4-36-14-189	9,03	23,13	8,22	6,29	8,28	8,84	7,53	8,78	7,53	8,84	6,21	8,78	7,59	8,22	7,53	8,90	8,84
4-36-14-190	9,09	23,27	8,28	7,69	8,33	8,90	7,59	8,84	8,90	8,90	7,59	10,14	7,64	8,28	7,59	8,97	8,90
4-36-14-191	7,04	24,84	6,25	5,63	6,29	6,90	5,56	6,85	6,90	6,90	5,56	8,16	5,59	6,25	5,56	6,94	6,90
4-36-14-192	7,69	24,22	6,90	4,93	6,94	7,53	6,21	7,48	6,21	7,53	4,86	7,48	6,25	6,90	6,21	7,59	7,53
4-36-14-193	7,04	24,84	6,25	4,26	6,29	6,90	5,56	6,85	5,56	6,90	4,20	6,85	5,59	6,25	5,56	6,94	6,90
4-36-14-194	8,39	23,75	7,59	5,63	7,64	8,22	6,90	8,16	6,90	8,22	5,56	8,16	6,94	7,59	6,90	8,28	8,22
4-36-14-195	6,99	24,69	6,21	4,23	6,25	6,85	6,85	6,80	5,52	6,85	5,52	6,80	5,56	6,21	6,85	6,90	6,85
4-36-14-196	6,99	24,69	6,21	4,23	6,25	6,85	6,85	6,80	5,52	6,85	5,52	6,80	5,56	6,21	6,85	6,90	6,85
4-36-14-197	7,04	24,84	6,25	5,63	6,29	6,90	6,90	6,85	6,90	6,90	6,90	8,16	5,59	6,25	6,90	6,94	6,90
4-36-14-198	6,34	25,31	5,56	4,93	5,59	6,21	6,21	6,16	6,21	6,21	6,21	7,48	4,90	5,56	6,21	6,25	6,21
4-36-14-199	7,75	24,38	6,94	6,34	6,99	7,59	6,25	7,53	7,59	7,59	6,25	8,84	6,29	6,94	7,59	7,64	7,59
4-36-14-200	5,67	25,93	4,90	4,26	4,93	5,56	5,56	5,52	5,56	5,56	5,56	6,85	4,23	4,90	5,56	5,59	5,56

¹Os números em destaque referem-se à identificação das plantas selecionadas.

Tabela 7. Cont...

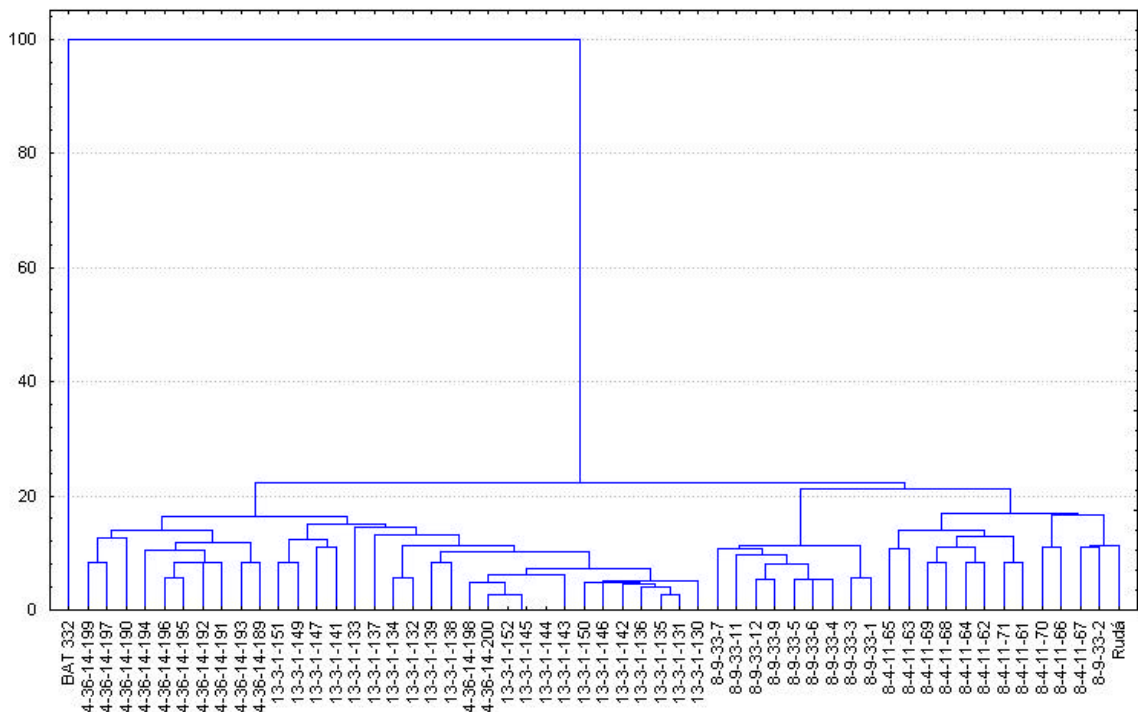
	8-4-11-66	8-4-11-67	8-4-11-68	8-4-11-69	8-4-11-70	8-4-11-71	13-3-1-130	13-3-1-131	13-3-1-132	13-3-1-133	13-3-1-134	13-3-1-135	13-3-1-136	13-3-1-137	13-3-1-138	13-3-1-139	13-3-1-141	13-3-1-142
8-4-11-67	5,63	-																
8-4-11-68	4,93	3,55	-															
8-4-11-69	4,26	2,86	2,14	-														
8-4-11-70	2,86	4,26	3,55	4,26	-													
8-4-11-71	4,90	3,52	2,82	3,52	2,13	-												
13-3-1-130	4,93	4,93	5,59	4,93	3,55	2,82	-											
13-3-1-131	4,90	3,52	4,20	3,52	3,52	1,41	1,42	-										
13-3-1-132	5,63	5,63	6,29	5,63	4,26	3,52	2,14	2,13	-									
13-3-1-133	5,67	7,04	6,34	5,67	4,29	4,93	3,57	3,55	2,88	-								
13-3-1-134	6,94	5,59	6,25	5,59	5,59	3,50	3,52	2,11	1,43	4,26	-							
13-3-1-135	4,23	4,23	4,90	4,23	2,84	2,11	0,71	0,71	1,43	2,86	2,82	-						
13-3-1-136	4,90	4,90	5,56	4,90	3,52	2,80	1,42	1,41	2,13	3,55	2,11	0,71	-					
13-3-1-137	6,94	6,94	7,59	6,94	5,59	4,86	3,52	3,50	2,84	4,26	4,20	2,82	3,50	-				
13-3-1-138	4,93	4,93	5,59	4,93	3,55	2,82	2,84	2,82	3,55	4,96	4,90	2,13	2,82	4,90	-			
13-3-1-139	5,63	5,63	6,29	5,63	4,26	3,52	2,14	2,13	2,86	4,29	4,23	1,43	2,13	4,23	2,14	-		
13-3-1-141	4,96	7,69	8,33	7,69	4,96	5,59	4,26	4,23	4,96	5,00	6,29	3,55	4,23	4,93	5,63	3,57	-	
13-3-1-142	4,90	4,90	5,56	4,90	3,52	2,80	1,42	1,41	2,13	3,55	3,50	0,71	1,41	2,11	2,82	2,13	4,23	-
13-3-1-143	6,25	6,25	6,90	6,25	4,90	4,17	2,82	2,80	3,52	4,93	4,86	2,11	2,80	3,50	2,82	3,52	4,23	1,41
13-3-1-144	4,93	4,93	5,59	4,93	3,55	2,82	1,43	1,42	2,14	3,57	3,52	0,71	1,42	3,52	2,84	2,14	2,86	1,42
13-3-1-145	4,93	4,93	5,59	4,93	3,55	2,82	1,43	1,42	2,14	3,57	3,52	0,71	1,42	3,52	2,84	2,14	2,86	1,42
13-3-1-146	4,90	4,90	5,56	4,90	3,52	2,80	1,42	1,41	2,13	3,55	3,50	0,71	1,41	3,50	2,82	2,13	4,23	1,41
13-3-1-147	6,29	7,64	8,28	7,64	4,93	5,56	4,23	4,20	4,93	4,96	6,25	3,52	4,20	3,52	4,23	3,55	2,86	4,20
13-3-1-149	4,93	6,29	6,94	6,29	3,55	4,20	2,84	2,82	3,55	3,57	4,90	2,13	2,82	3,52	4,23	3,55	2,86	2,82
13-3-1-150	4,90	4,90	5,56	4,90	3,52	2,80	1,42	1,41	2,13	3,55	3,50	0,71	1,41	3,50	2,82	2,13	4,23	1,41
13-3-1-151	5,59	6,94	7,59	6,94	4,23	4,86	3,52	3,50	4,23	4,26	5,56	2,82	3,50	4,20	4,90	2,84	3,55	2,11
13-3-1-152	4,93	4,93	5,59	4,93	3,55	2,82	1,43	1,42	2,14	3,57	3,52	0,71	1,42	3,52	2,84	2,14	2,86	1,42
4-36-14-189	7,64	8,97	6,94	7,64	6,29	5,56	5,59	5,56	4,93	6,34	6,25	4,90	5,56	6,25	6,94	6,29	6,99	5,56
4-36-14-190	7,69	9,03	8,33	7,69	7,69	6,94	5,63	5,59	4,96	6,38	6,29	4,93	5,59	3,55	6,99	6,34	5,67	5,59
4-36-14-191	5,63	6,99	6,29	5,63	5,63	4,90	3,55	3,52	2,86	4,29	4,23	2,84	3,52	4,23	4,93	4,26	4,96	3,52
4-36-14-192	6,29	7,64	6,94	6,29	6,29	5,56	4,23	4,20	3,55	4,96	4,90	3,52	4,20	4,90	4,23	4,93	5,63	4,20
4-36-14-193	5,63	6,99	6,29	5,63	5,63	4,90	3,55	3,52	4,26	5,67	5,59	2,84	3,52	5,59	4,93	4,26	4,96	3,52
4-36-14-194	6,99	8,33	7,64	6,99	6,99	6,25	4,93	4,90	4,26	5,67	5,59	4,23	4,90	2,84	6,29	5,63	4,96	3,52
4-36-14-195	6,94	6,94	7,59	6,94	5,59	4,86	3,52	3,50	2,84	4,26	4,20	2,82	3,50	4,20	4,90	4,23	4,93	3,50
4-36-14-196	6,94	6,94	7,59	6,94	5,59	4,86	3,52	3,50	2,84	4,26	4,20	2,82	3,50	2,82	4,90	4,23	4,93	3,50
4-36-14-197	6,99	6,99	6,29	6,99	4,26	3,52	3,55	3,52	2,86	4,29	4,23	2,84	3,52	2,84	4,93	4,26	3,57	3,52
4-36-14-198	6,29	6,29	6,94	6,29	4,93	4,20	2,84	2,82	2,14	3,57	3,52	2,13	2,82	2,13	4,23	3,55	4,26	1,42
4-36-14-199	6,34	7,69	5,63	6,34	4,96	4,23	5,63	5,59	4,96	6,38	6,29	4,93	5,59	4,93	5,63	6,34	5,67	5,59
4-36-14-200	5,63	5,63	6,29	5,63	4,26	3,52	2,14	2,13	1,44	2,88	2,84	1,43	2,13	2,84	3,55	2,86	3,57	2,13

Tabela 7. Cont...

	13-3-1-143	13-3-1-144	13-3-1-145	13-3-1-146	13-3-1-147	13-3-1-149	13-3-1-150	13-3-1-151	13-3-1-152	4-36-14-189	4-36-14-190	4-36-14-191	4-36-14-192	4-36-14-193	4-36-14-194	4-36-14-195	4-36-14-196	4-36-14-197	4-36-14-198	4-36-14-199	4-36-14-200	
13-3-1-144	1,42	-																				
13-3-1-145	1,42	0,00	-																			
13-3-1-146	2,80	1,42	1,42	-																		
13-3-1-147	4,20	4,23	4,23	4,20	-																	
13-3-1-149	4,20	2,84	2,84	2,82	2,84	-																
13-3-1-150	2,80	1,42	1,42	1,41	4,20	1,42	-															
13-3-1-151	3,50	3,52	3,52	3,50	3,52	2,13	2,11	-														
13-3-1-152	1,42	0,00	0,00	1,42	4,23	2,84	1,42	3,52	-													
4-36-14-189	5,56	4,23	4,23	5,56	8,28	5,59	4,20	6,25	4,23	-												
4-36-14-190	5,59	4,26	4,26	4,23	5,63	5,63	5,59	7,64	4,26	4,26	-											
4-36-14-191	3,52	2,14	2,14	2,13	6,29	4,93	3,52	5,59	2,14	3,55	2,16	-										
4-36-14-192	2,82	2,84	2,84	4,20	5,59	4,23	2,82	4,90	2,84	2,84	4,26	2,14	-									
4-36-14-193	3,52	2,14	2,14	3,52	6,29	3,55	2,13	4,23	2,14	2,14	3,57	2,86	2,14	-								
4-36-14-194	3,52	3,55	3,55	4,90	6,29	3,55	3,52	4,23	3,55	3,55	3,57	2,86	2,14	2,86	-							
4-36-14-195	3,50	2,13	2,13	2,11	6,25	3,52	2,11	4,20	2,13	3,52	3,55	1,43	2,13	2,84	2,84	-						
4-36-14-196	3,50	2,13	2,13	3,50	4,90	3,52	2,11	4,20	2,13	3,52	3,55	2,84	2,13	2,84	2,84	1,42	-					
4-36-14-197	3,52	2,14	2,14	3,52	4,93	3,55	3,52	5,59	2,14	3,55	3,57	2,86	3,55	4,26	2,86	2,84	2,84	-				
4-36-14-198	1,42	1,43	1,43	2,82	5,59	4,23	2,82	3,52	1,43	4,23	4,26	2,14	2,84	3,55	2,14	2,13	2,13	2,14	-			
4-36-14-199	5,59	4,26	4,26	4,23	6,99	5,63	5,59	7,64	4,26	4,26	2,88	2,16	4,26	4,96	3,57	3,55	4,93	2,16	4,26	-		
4-36-14-200	2,13	0,72	0,72	2,13	4,93	3,55	2,13	4,23	0,72	3,55	3,57	1,44	2,14	2,86	2,86	1,43	1,43	1,44	0,72	3,57	-	

Observa-se acentuada divergência genética do genitor não recorrente em relação às plantas das populações de retrocruzamento, principalmente porque elas possuem, em média, apenas 25% do seu genoma em RC₁. De acordo com o dendrograma (Figura 3), a uma distância genética relativa de 30%, pode-se definir dois grupos, um contendo o genitor doador (BAT 332), e o outro contendo todas as linhagens RC₁F₃ e o genitor recorrente (Rudá).

Figura 3. Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas relativas expressas em complementos de Jaccard, entre 54 linhagens RC₁F₃ originadas do cruzamento entre Rudá e BAT 332.



SANTOS et al. (2001), trabalhando com uma população RC₁F₄ oriunda do cruzamento entre G2333 e a linhagem ESAL 696, observaram que os menores valores de similaridade ocorreram entre o genitor doador G2333 e o recorrente ESAL 696, enquanto que os maiores valores de similaridade ocorreram entre a linhagem ESAL 696 e plantas da geração RC₁F₄, que possuem em média 75% do seu genoma.

Desta forma, o uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento permite identificar indivíduos com características

fenotípicas de interesse, além de poder ajudar na identificação daqueles, mais próximos ao genitor recorrente, acelerando, assim, o desenvolvimento de cultivares melhoradas (MIKLAS et al., 1993, YOUNG e KELLY, 1997). Segundo OPENSHAW et al. (1994) para se recuperar de 97 a 98% do genoma do genitor recorrente, o número de retrocruzamento poderia ser reduzido de seis, quando se trabalha com melhoramento tradicional, para apenas três, utilizando os marcadores de DNA.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Marcadores moleculares RAPD foram utilizados na seleção de linhagens RC_nF_3 homozigotas resistentes à mancha-angular, oriundas de três subprogramas de retrocruzamento com o objetivo de otimizar a eficiência no desenvolvimento de cultivares resistentes.

Do cruzamento entre Rudá e México 54, foram selecionadas 4 linhagens RC_2F_3 com distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente Rudá, variando de 8,38 a 11,26%. No cruzamento entre Rudá e MAR-2, foram selecionadas 4 linhagens RC_1F_3 com distâncias genéticas entre 11,73 e 14,17% e no cruzamento entre Rudá e BAT 332 foram selecionadas 6 linhagens RC_1F_3 com distâncias genéticas entre 13,94 e 14,14% em relação ao Rudá.

O agrupamento pelo método UPGMA definiu dois grupos em todos os três cruzamentos analisados. Um grupo contendo os genitores doadores e o outro contendo o genitor recorrente utilizado nos retrocruzamentos, bem como as progênes resultantes dos mesmos.

Com apenas um ou dois retrocruzamentos é possível selecionar linhagens de feijoeiro homozigotas resistentes à mancha-angular com relativa recuperação do genoma recorrente e ainda apresentando grãos do tipo carioca. Estas linhagens são úteis, pois aceleram a obtenção de isolinhas resistentes a mancha-angular do feijoeiro para o processo final de piramidação de genes de resistência.

Estas linhagens serão utilizadas para novo ciclo de retrocruzamento para aumentar a recuperação do genoma da cultivar Rudá, e também, serão avaliadas no campo para seleção daquelas com características agronômicas desejáveis para serem utilizadas em programas de seleção recorrente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., PELOSO, M.J. Del, BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Variabilidade genética em genótipos de feijoeiro comum avaliada com marcadores moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 188.
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene Co-4 no cultivar Rudá**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 101p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2001. 500p.
- BORÉM, A., CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.13-17.
- CRUZ, C, D. **GENES** - versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- DOYLE, J. T., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.
- HOSPITAL, F., CHEVALET, C., MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, v.132, p.1199-1210, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. <http://www.ibge.net/home/estatística/indicadores/agropecuária/ispa/default.shtm>, visitado em 24 de Maio de 2002.
- LEE, M. **DNA markers and plants breeding programs**. [S.l.]: Academic Press, Inc. Advances in Agronomy, p.344, 1995. v. 55.
- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 745-749, 1993.
- MORA-BRENES, B. M., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p.599, 1983.

- OPENSHAW, S.J., JARBOE, S.G., BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LAWER, R. (Ed.). **Joint plant breeding symposium on analysis data**. Corvallis: Oregon State University, 1994. p.41-43.
- RAGAGNIN, V.A. **Seleção, caracterização e comportamento de isolinhas de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular**. Viçosa, MG, UFV, 2001. 106p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SANTOS, J.B., HAGIWARA, W.E., CARMO, S.L.M. Viabilidade do RAPD para auxiliar na seleção em programa de retrocruzamento em feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 244.
- SARTORATO, A. Mancha-angular. In: ZIMMERMANN, M J. O., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**, Piracicaba: POTAFÓS, 1988. p. 589.
- SARTORATO, A. Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 26.
- SCHWARTZ, H. F., BRINK, M. A., NULAND, D. S., FRANC, G. D. (Eds.). **Dry Bean Production and Pest Management**. Fort Collins: Cooperative Extension Resources Center, 1996. 106p.
- TEIXEIRA, S. M., ROCHA, L. S. A. Análise sócio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M J. O., ROCHA, M., YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFÓS, 1988. p. 37-56.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. p.273-349.
- TOOJINDA, T, BAIRD, E., BOOTH, A., BROERS, L., HAYES, P., POWELL, W., THOMAS, W., VIVAR, H., YOUNG, G. Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.123-131, 1998.
- YOUNG, R., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 95-101, 1989.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science** , v. 37, p. 940-946, 1997.
- WILLIAMS, J., KUBELIK, A. LIVAK, K., RAFALSKI, A., TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, pp. 6531-6535. 1990.

IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO

A mancha-angular do feijoeiro comum (*Phaeoisariopsis griseola*) encontra-se distribuída em todas as regiões do mundo onde esta leguminosa é cultivada. Segundo o *Commonwealth Mycological Institute* esta enfermidade ocorre em mais de 60 países (SARTORATO e RAVA, 1994).

As perdas no rendimento da cultura são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença. Estimativas de perdas na produção causadas por esta doença são de até 80% na África (BOSHOF et al., 1996), 60% na Colômbia (BARROS et al., 1957), 80% no México (CRISPIN et al., 1976;) e 70% no Brasil dependendo das condições ambientais e suscetibilidade das cultivares (MORA-BRENES et al., 1983; RAVA et al., 1985; SARTORATO e RAVA, 1992). Atualmente o fungo *P. griseola* tem sido considerado, também, como um importante patógeno na Bolívia, América Central e México (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

Dentre as diversas estratégias que podem ser empregadas no controle da doença, a utilização de cultivares comerciais com adequado nível de resistência proporciona uma proteção adicional, dentro de um sistema de manejo integrado da mancha-angular (GUZMÁN et al., 1995; SARTORATO et al., 1996; SARTORATO, 1989; SARTORATO, 2001). Entretanto, a alta variabilidade do patógeno torna difícil encontrar cultivares de feijoeiro com ampla resistência a esta doença (CORRÊA et al., 2001).

De acordo com trabalhos de NIETSCHE et al. (1998) e APARÍCIO (1998), já foram caracterizados 53 raças de *P. griseola* no Brasil. Vários estudos sobre a variabilidade do patógeno, feitos por meio da série diferenciadora (CIAT, 1986; CORREA-VICTORIA, et al., 1989; SARTORATO, 1989), marcadores moleculares RAPD (GUZMÁN et al., 1995), por ambos os métodos (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995; MAYA et al., 1995; NIETSCHE et al., 2001, CHACÓN et al., 1997), bem como da co-evolução patógeno-hospedeiro (GUZMÁN et al., 1995) se tornam

primordiais em programas que visam a obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular.

No Brasil, existem diversos relatos de fontes de resistência à mancha-angular (VIEIRA, 1964; COSTA et al., 1972; SANTOS FILHO et al., 1976; SARTORATO et al., 1982, 1991; RAVA et al., 1985; SARTORATO e RAVA, 1992; PASTOR-CORRALES e PAULA-JR, 1996; SARTORATO et al., 1996; PAULA-JR et al., 1997; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998; NIETSCHE et al, 1998; NIETSCHE, et al., 2000; FALEIRO et al., 2001). Entretanto, de acordo com NIETSCHE et al. (2000) ainda não foi identificado nenhum acesso de *Phaseolus vulgaris* com resistência completa às diversas raças de *P. griseola*. Além disso, existem diferenças quanto à variabilidade patogênica de *P. griseola* nas diferentes regiões produtoras. Isto faz com que cultivares resistentes em determinadas regiões comportem-se de maneira diferente em outras.

O estudo da variabilidade genética do patógeno, bem como sua distribuição geográfica e a determinação de fontes com adequado nível de resistência, são pontos-chave em programas de melhoramento visando resistência a esta doença.

O objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar 58 cultivares de feijoeiro, pertencentes ao banco de germoplasma do BIOAGRO/UFV, quanto a resistência à mancha-angular por meio de inoculação com quatro raças de *P. griseola* previamente caracterizadas por NIETSCHE (2000).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O material genético utilizado no presente trabalho foi obtido com a EMBRAPA - Arroz e Feijão, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA e Universidade de Michigan (EUA) (Tabela 1). A Figura 1 mostra as 58 cultivares utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Características das cultivares utilizadas para caracterização quanto à resistência à mancha-angular.

Genótipo	Origem	Conjunto ¹ gênico	T ²	Genótipo	Origem	Conjunto ¹ gênico	T ²
Aurora	EUA	M	P	Early Gallatin	EUA	A/M	M
AB 136	México	M	M	Emgopa 201 Ouro	Colômbia	M	P
AB 7419	Brasil	M	P	Equador 299	Equador	M	M
AN 9022180	Brasil	M	P	Esal 633	Brasil	M	P
Antióquia 8	Colômbia	A	G	FT Bonito	Brasil	M	P
Aporé	Brasil	M	P	G 2333	México	M	M
AXS 37	EUA	M	P	GG Wax ⁵	EUA	A/M	M
Bambuí	Brasil	M	P	GG 416 ⁶	EUA	A?	G
B 98311	EUA	M	P	Goytacazes	Brasil	M	P
Brígida	Colômbia	M	P	IAPAR 14	Brasil	M	P
Brown Beauty	EUA	A	M	Ica Pijao	Colômbia	M	P
CAL 143	Colômbia	A	G	Jalo EEP 558	Brasil	A	G
Caraota	Venezuela	M	P	Jamapa	México	M	P
Carioca	Brasil	M	P	Kaboon	Holanda	A	G
Carioca 80	Brasil	M	P	KW 765 ⁷	EUA	A/M	M
Catrachita	Honduras	M	P	KW 780 ⁷	EUA	A/M	M
CNC ³	Guatemala	M	P	KW 814 ⁷	EUA	M	M
CNF 1710	México	M	M	Manteigão Fosco 11	Brasil	M	M
CNF 2113	Colômbia	A	G	MDRK ⁸	EUA	A	G
CNF 2114	Colômbia	A	G	Meia Noite	Brasil	M	P
CNF 5547	Brasil	M	P	México 235	México	M	M
CNF 8759	Colômbia	M	P	México 279	México	M	P
CNF 8863	México	M	P	México 309	México	A/M	M
CNF 9282	México	M	M	Milionário	Colômbia	M	P
CNF 9287	México	M	P	Mineiro Precoce	Brasil	A	G
Costa Rica	Brasil	M	P	N 98122	-	M	G
CSW 643 ⁴	EUA	M	P	NEP 2	Costa Rica	M	P
Diacol Calima	Colômbia	A	G	Novo Jalo	Brasil	A	G
Diamante Negro	Brasil	M	P	Olathe	EUA	M	M

¹Conjunto gênico, M – mesoamericano e A – andino; ²Tamanho das sementes: P = peso de 100 sementes < 25 gramas; M = peso de 100 sementes ≥ 25 e ≤ 40 gramas; G = peso de 100 sementes > 40 gramas; ³Compuesto Negro Chimalteano; ⁴Califórnia Small White; ⁵Golden Gate Wax; ⁶Golden Gate 416; ⁷Kentucky Wonder 765, 780 e 814; ⁸Michigan Dark Red Kidney.

Figura 1. Sementes das 58 cultivares utilizadas na caracterização da reação às quatro raças de *P. griseola*



Figura 1. Cont...



Figura 1. Cont...



Para a avaliação da resistência foram utilizadas 12 plantas por cultivar. As sementes utilizadas foram plantadas em vasos contendo 3 kg de solo, adubado com NPK, em casa-de-vegetação. Em cada vaso foram semeadas 4 sementes.

Como testemunhas suscetíveis foram utilizadas as cultivares Rosinha G-2 e Rudá e como testemunha resistente foi utilizada a cultivar México 54.

2.2. Raças e preparo do inóculo

As raças de *P. griseola* utilizadas no presente trabalho pertencem a Micoteca do Programa de Melhoramento do feijoeiro visando resistência a doenças do BIOAGRO/UFV. Foram utilizadas as raças 63.19, 63.23, 31.17 e 63.55, por apresentarem significativa importância no Brasil (NIETSCHE, 2000).

Os isolados foram obtidos de cultura monospórica, mantidos em placa de petri ou tubo de ensaio contendo meio V8 (Campbell Soup Company, EUA). De cada tubo contendo a cultura do patógeno, foi obtido uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de água estéril. Esta suspensão foi espalhada em placas contendo meio de suco de vegetais V8. Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, no escuro, a 24°C. Este procedimento permitiu altos níveis de esporulação.

A suspensão de conídios para inoculação foi obtida adicionando-se água destilada e raspando-se suavemente a superfície do meio com o auxílio de uma espátula; em seguida filtrada em gaze. A suspensão foi ajustada para a concentração final de 2×10^4 conídios/ml.

2.3. Inoculação e avaliação

Entre os dezesseis e dezoito dias após o plantio (estágio V3), as plantas foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^4 conídios/ml de *P. griseola*. A suspensão foi aplicada em ambas as faces, abaxial e adaxial, das folhas, com auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. As plantas foram, então, incubadas por um período de 48 horas em câmara úmida (RIBEIRO et al., 1993; LACERDA et al., 1994) mantida entre 20 e 22°C e 100% de umidade relativa, sendo que as plantas inoculadas com diferentes raças foram mantidas em câmaras separadas, as quais foram, posteriormente, transferidas para casa-de-vegetação.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 15 e 21 dias após inoculação, usando-se uma escala de severidade de nove graus (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987), descrita a seguir: 1 – plantas sem sintomas da doença; 2 – presença de até 3% de lesões; 3 – presença de até 5% de lesões não-esporuladas; 4 – presença de lesões esporuladas, que cobrem aproximadamente 10% da área foliar; 5 – presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, que cobrem aproximadamente 10-15% da área foliar; 6 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 15-20% da área foliar; 7 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 20-25% da área foliar; 8 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 25-30% da área foliar, geralmente associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; 9 – sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte.

As plantas com notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes, de 4 a 6, com resistência intermediária e de 7 a 9, suscetíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados na Tabela 2 demonstram que Antioquia 8 e CAL 143, de origem andina e Equador 299 e México 235, mesoamericanas, foram resistentes às quatro raças utilizadas na inoculação. Ao se considerar que a maior parte do feijoeiro plantado em Minas Gerais pertence ao grupo mesoamericano, e que as raças de maior ocorrência no Estado são por conseguinte mesoamericanas (NIETSCHE et al., 2001), tem sido sugerido o uso de cultivares andinas como fontes de resistência em programas de melhoramento, visando resistência à mancha-angular. Desta forma, as cultivares Antioquia 8 e CAL 143 podem ser úteis no processo de transferência destes genes para cultivares mesoamericanas, uma vez que evidências de co-evolução patógeno-hospedeiro e também, a grande variabilidade do fungo *P. griseola* fazem com que a piramidação de genes dos dois grupos seja uma estratégia eficiente (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

CARVALHO et al. (1998) sugeriram AND 277, fonte do gene *Phg-1* de resistência à mancha-angular, como fonte de origem andina a ser utilizada em programas de melhoramento. Entretanto, CAIXETA (2002) trabalhando com teste de alelismo entre as fontes de resistência à mancha-angular (Cornell 49242, México 54, MAR-2, BAT 332 e AND 277), demonstrou que AND 277 possui três genes que ao contrário do esperado não segregam com genes de cultivares mesoamericanas, sugerindo a possibilidade da presença de genes mesoamericanos nesta cultivar. A condição híbrida do AND 277 já foi anteriormente observada, pois este cultivar cruza facilmente com cultivares mesoamericanas, sem apresentar a incompatibilidade típica dos cruzamentos entre indivíduos destes dois grupos. AND 277, também, apresenta enrugamento das folhas nas épocas de frio, sendo que esta anomalia é uma desordem genética que ocorre só quando existem combinações particulares de genes andinos e mesoamericanos, como já foi descrito por VOYSEST (2000). Acredita-se que esta cultivar possa funcionar como uma ponte para cruzamentos entre indivíduos destes dois grupos.

VIEIRA et al. (2002), estudando o comportamento de cultivares de feijão do tipo manteigão em Minas Gerais, demonstraram que a cultivar CAL 143 foi resistente à ferrugem, oídio, mancha-angular e mancha-de-alternária, e ainda foi

tão produtiva quanto a cultivar Pérola (tipo carioca), com média de nove ambientes, superiores a 2700 Kg/ha.

Tabela 2. Reação¹ de 58 cultivares de feijoeiro a quatro raças de *P. griseola*

Genótipo	Raças			
	63.19	31.17	63.55	63.23
Aurora	I	I	S	S
AB 136	I	R	S	S
AB 7419	S	S	S	S
AN 9022180	S	S	S	S
Antióquia 8	R	R	R	R
Aporé	S	S	S	S
AXS 37	I	R	I	S
Bambuí	S	S	S	S
B 98311	S	R	S	S
Brígida	S	S	I	S
Brown Beauty	S	S	I	S
CAL 143	R	R	R	R
Caraota 260	S	S	S	S
Carioca	I	S	S	S
Carioca 80	S	S	S	S
Catrachita 10	S	R	S	I
CNC	S	S	S	S
CNF 1710	I	R	S	S
CNF 2113	S	S	I	R
CNF 2114	R	R	S	R
CNF 5547	S	S	I	S
CNF 8759	S	S	S	R
CNF 8863	S	I	S	S
CNF 9282	S	I	S	S
CNF 9287	S	S	S	S
Costa Rica	S	S	R	R
CSW 643	I	R	I	S
Diacol Calima	I	I	R	R
Diamante Negro	S	S	S	S
Early Gallatin	S	S	S	S
Engopa 201	S	S	I	I
Equador 299	R	R	R	R
Esal 633	S	S	S	R
FT Bonito	S	S	I	S
G 2333	S	R	I	S

¹ S = suscetível, I = resistência intermediária e R = resistente

Tabela 2. Cont...

Genótipo	Raças			
	63.19	31.17	63.55	63.23
GG Wax	S	S	S	I
GG 416	R	S	R	R
Goytacazes	I	R	R	S
IAPAR 14	R	I	I	S
Ica Pijao	S	I	S	S
Jalo EEP 558	S	S	S	I
Jamapa	S	S	S	S
Kaboon	I	S	I	R
KW 765	I	S	S	S
KW 780	S	S	S	S
KW 814	S	S	S	R
Manteigão Fosco 11	R	I	S	R
MDRK	S	S	R	R
Meia Noite	S	S	I	S
México 235	R	R	R	R
México 279	S	S	R	R
México 309	S	S	S	S
Milionário	S	S	I	S
Mineiro Precoce	S	S	S	I
N 98122	S	S	S	S
NEP 2	S	S	R	S
Novo Jalo	I	S	R	R
Olathe	S	S	S	R
México 54 ²	R	R	R	R
Rudá ³	S	S	S	S
Rosinha G-2 ³	S	S	S	S

¹ S = suscetível, I = resistência intermediária e R = resistente

² Testemunha resistente

³ Testemunha suscetível

A identificação de Antioquia 8 e CAL 143, como fontes de resistência às raças 31.17, 63.19, 63.23 e 63.39 de *P. griseola*, abre a possibilidade de utilizá-las como fontes andinas em programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular e possivelmente a outras doenças. No entanto, há necessidade de se realizar estudos adicionais com intuito de verificar a reação destas duas cultivares a outras raças do patógeno.

As cultivares Equador 299 e México 235 também podem ser úteis em programas de retrocruzamentos que utilizam cultivares mesoamericanas como genitores recorrentes, tendo em vista a relativa facilidade de transferência de genes entre indivíduos do mesmo conjunto gênico. Além disso, estas duas

cultivares apresentam resistência a um grande número de raças de *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro (VIEIRA, 1988; FALEIRO, 1997; PASTOR-CORRALES, 2001, 2002; KIMANI et al., 2002). Com isso, existe a possibilidade de transferência concomitante de genes de resistência à mancha-angular e ferrugem presentes nestas cultivares para outras.

As cultivares CNF 2114 e GG 416 mostraram resistência a três das quatro raças testadas, podendo também, serem úteis em estudos de resistência à mancha-angular. Resistência a duas raças foi verificada em Costa Rica, Diacol Calima, Goytacazes, Manteigão Fosco 11, MDRK, México 279 e Novo Jalo. Neste grupo, a cultivar Diacol Calima ainda apresenta resistência intermediária às outras duas raças testadas, sendo também uma opção para programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular.

As cultivares AB 136, B98311, Caraota 260, CNF 8759, ESAL 633, KW 814, Nep 2 e Olathe, apresentam resistência a pelo menos uma das raças testadas. As cultivares Catrachita, CNF 1710, CNF 2113 e G2333 também possuem resistência a uma das raças testadas, porém apresentam resistência intermediária a pelo menos uma das outras raças testadas, enquanto que as cultivares AXS 37, CSW 643, IAPAR 14 e Kaboon, além de possuírem resistência a uma raça, possuem, também, resistência intermediária a outras duas raças utilizadas no trabalho.

Brígida, Brown Beauty, Carioca, CNF 5547, CNF 8863, CNF 9282, Emgopa 201 Ouro, FT Bonito, GG Wax, Ica Pijão, Jalo EEP 558 e KW 765 apresentam resistência intermediária a pelo menos uma das raças testadas. Entretanto, as cultivares AB 7419, AN 9022180, Aporé, Bambuí, Carioca 80, CNC, CNF 9287, Diamante Negro, Early Gallatin, Jamapa e KW 780 foram suscetíveis a todas as raças testadas.

FALEIRO et al. (2001), avaliando a reação de 17 cultivares de feijoeiro recomendados para Minas Gerais, a 5 raças de *P. griseola* (63.55, 31.23, 63.39, 31.55 e 63.23), demonstraram que as cultivares Ouro Negro e Emgopa 201 Ouro comportaram-se como as mais resistentes, apresentando resistência completa às raças 63.55, 31.23 e 63.23. A cultivar Milionário (ou Milionário 1732) foi resistente às raças 63.55, 31.23 e suscetível a raça 63.23. As cultivares Jalo EEP 558, Mineiro Precoce, Novo Jalo, Carioca MG, Carioca (ou Carioca 1030), Aporé e Diamante Negro foram suscetíveis a todas as raças testadas por estes autores. A cultivar Meia Noite foi resistente somente à raça 31.23.

Confirmando os dados de FALEIRO et al. (2001), as cultivares Carioca, Aporé, e Diamante Negro foram suscetíveis a todas as raças testadas no presente trabalho. Entretanto, a cultivar Emgopa 201 Ouro apresentou resistência intermediária às raças 63.55 e 63.23 de *P. griseola*, com a maioria das doze plantas testadas apresentando notas variando de 4 a 5. A cultivar Milionário apresentou resistência intermediária à raça 63.55; as cultivares Jalo EEP 558 e Mineiro Precoce, apresentaram resistência intermediária à raça 63.23 e a cultivar Novo Jalo comportou-se como resistente às raças 63.55 e 63.23. As discordâncias existentes entre os dois trabalhos pode ser devida a diferenças de temperatura e umidade na inoculação, época de avaliação da resistência, número de plantas avaliadas, dentre outros fatores, que podem favorecer ou não o desenvolvimento e colonização pelo fungo e conseqüentemente influenciar na manifestação da doença.

A cultivar Jalo EEP 558 é citada como resistente à mancha-angular (RAVA et al., 1985, PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998, SARTORATO et al., 1996, SARTORATO e RAVA, 1992). Entretanto, esta cultivar foi suscetível às raças 63.19, 31.17 e 63.55 e apresentou resistência intermediária à raça 63.23, a mais prevalente em Minas Gerais (NIETSCHE, 2000). A cultivar Caraota 260 também é mencionada como resistente à mancha-angular por RAVA et al. (1985) e SANTOS FILHO et al. (1976). Entretanto, neste trabalho, ela comportou-se como suscetível a todas as raças testadas.

Em estudo conduzido por PASTOR-CORRALES e PAULA-JR (1996), a cultivar G5686 apresentou-se como a mais resistente a isolados brasileiros de *P. griseola* e a cultivar México 54, apresentou-se como importante fonte de resistência.

Segundo SARTORATO et al. (1996), testes realizados no campo pelo CNPAF, indicaram que as cultivares Bagajó, Costa Rica, FT-120, FT-Tarumã, Favita, Gordo, IAPAR 31, IAPAR 44, IPA 1, IPA 6, Iraí, Jalo, Jalo EEP 558, Mineiro Precoce, Ouro Negro, Pampa, Rico 1735, Rio Negro, Rim de Porco e Varre-Sai, comportaram-se como resistentes ou moderadamente resistentes à enfermidade. Entretanto, neste trabalho a cultivar Costa Rica apresentou resistência apenas às raças 63.55 e 63.23, e a cultivar Mineiro Precoce apresentou resistência intermediária à raça 63.23 e suscetibilidade às outras raças testadas.

Provavelmente, a(s) raça(s) presentes no campo no CNPAF, não são as mesmas utilizadas neste trabalho, contribuindo para os diferentes resultados encontrados.

SARTORATO et al. (1991), estudando a reação de 15 cultivares de feijoeiro a 24 isolados de *P. griseola*, demonstraram que somente Cornell 49242, RG 1342 CH60, México 279 e México 54 mostraram resistência vertical completa a alguns isolados. No presente trabalho, também foi encontrado que a cultivar México 279 apresenta resistência à mancha-angular, porém somente a duas das raças testadas (63.55 e 63.23).

Este trabalho é de grande importância para a cultura do feijoeiro no Brasil pois a mancha-angular é uma doença difícil de ser trabalhada, devido à dificuldade de multiplicação e manutenção do patógeno e exigência de habilidade do pesquisador na avaliação da doença. Além do mais, poucos grupos de pesquisa trabalham com esta doença (principalmente EMBRAPA/CNPAF e BIOAGRO/UFV). Como mencionado, o fungo *P. griseola* apresenta alta variabilidade patogênica, com isto, a busca de novas e melhores fontes de resistência tem sido uma constante. As fontes de resistência aqui citadas devem ser caracterizadas com outras raças do fungo para entender melhor a relação destas fontes com as diferentes raças do patógeno, a fim de finalmente poderem ser utilizadas em programas de melhoramento.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A mancha-angular causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, apresenta grande importância, como doença causadora de grandes perdas da cultura do feijoeiro no Brasil. O desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido proposto, como maneira eficaz, eficiente e econômica para o controle da doença. Porém, a alta variabilidade apresentada pelo patógeno, dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes. No Brasil já foram catalogados cerca de 196 isolados, sendo identificadas 53 raças. Um dos primeiros passos no programa de melhoramento visando resistência à mancha-angular seria a identificação e seleção de diferentes fontes de resistência.

Este trabalho foi conduzido, objetivando-se a caracterização de 58 cultivares de feijoeiro quanto a reação às raças 63.19, 31.17, 63.55 e 63.23 de *P. griseola*. As cultivares Antioquia 8 e CAL 143, ambas de origem andina e Equador 299 e México 235, de origem mesoamericana, apresentaram resistência às quatro raças testadas. Devido a evidências de co-evolução patógeno-hospedeiro, o uso combinado de cultivares andinas e mesoamericanas em programas de melhoramento, é sugerido como estratégia eficiente no desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular. Neste particular, Antioquia 8 e CAL 143 seriam potencialmente úteis aos programas de melhoramento.

As cultivares CNF 2114 e GG 416 mostraram resistência a três das quatro raças testadas, podendo também, serem úteis em trabalhos de resistência à mancha-angular. Todas as outras cultivares foram suscetíveis a pelo menos uma das quatro raças testadas. Dentre as mais suscetíveis temos: AB 7419, AN 9022180, Aporé, Bambuí, Carioca 80, CNC, CNF 9287, Diamante Negro, Early Gallatin, Jamapa e KW 780.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a maioria das cultivares avaliadas, possuem algum nível de suscetibilidade às quatro raças de *P. griseola* estudadas. As cultivares do tipo carioca, mostraram-se marcadamente mais suscetíveis. Entretanto, existem fontes de resistência a esta doença, prontamente acessível aos programas brasileiros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARICIO, B.H.E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia.** Cali, Colombia, 1998. 120p. (Trabajo de Grado) – Facultad de Ciencias, Universidad Del Valle, 1998.
- BARROS, O., CARDONA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p3, 1957.
- BOSHOFF, W.H.P., SWART, W.J., PRETORIUS, Z.A., LIEBENBERG, M.M., CROUS, P.W. Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in southern Africa. **Plant Pathology**, v.45, p. 344-349, 1996.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro.** Viçosa, MG, UFV, 2002. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JUNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p. 482-485, 1998.
- CHACÓN, M.I., JARA, C., CASTELLANOS, G., POSSO, C.E., BURUCHARA, R., CUASQUER, J.B., PASTOR-CORRALES, M.A. Genetic diversity and relation between common bean angular leaf spot fungus isolates from Africa and South America: genetic improvement implications. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 40, p. 122-123, 1997.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). **Annual Report**, 1985: Bean Program. Working Document N°. 14, pp.27-34, Cali, Colombia, 1986.
- CORREA-VICTORIA, F. J., PASTOR-CORRALES, M. A., SAETTES, A. W. Angular leaf spot. In: SCHOONHOVEN, A. V., VOYSEST, O. **Bean production problems in the tropics.** Cali, Colômbia: CIAT, 1989. 654p.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I.V., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHE, S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Herança da resistência a mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p. 27-32, 2001.
- COSTA, A. Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1, 1972, **Anais...**, Campinas: SP, 1972. p.281-384.
- CRISPIN, A., SIFUENTES, J.A., AVILA, J.C. **Enfermedades y plagas del frijol en México.** México: INIA, 1976. P. 41. (Folheto de Divulgacion, 33).

- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* avar. *Appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro.** Viçosa, MG, UFV, 1997. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHÉ, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro comum à ferrugem e a mancha-angular em condições de casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p.86-89, 2001.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W.C., TEMPLE, S.R., MANDELA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Phytopathology**, v.85, n.5, p. 600-607, 1995.
- KIMANI, P.M., ASSEFA, H., RAKOTOMALALA, G., RABAKOARIHANTA, A. Research of bean rust in east and central Africa: status and future directions. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v.45, p.134-135, 2002.
- LACERDA, J. T., COELHO, R. S. B., MARIANO, R. L. R., MENEZES, M. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n.2, p. 93-96, 1994.
- MAYA, M.M., OTOYA, M.M., MAYER, J.E., PASTOR-CORRALES, M.A. Marcadores moleculares RAPD confirmam la diversidad y evolución de *Phaeoisariopsis griseola* America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, n.2, p. 1-6, 1995.
- MORA-BRENES, B. M., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p.599, 1983.
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência a mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 45, p. 567-571, 1998.
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v. 47, p. 567-572, 2000.
- NIETSCHÉ, S. **Mancha-Angular do Feijoeiro-Comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência.** Viçosa, MG, UFV, 2000. 56p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., FERREIRA, C.F., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais. **Euphytica**, v. 117, n.1, p. 77-84, 2001.

- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C.E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, n.1, p.15-24, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A., PAULA-JR, T.J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5,1996, Goiânia. **Anais**, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP-APA, v.1, p.23-41, 1996.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C., SINGH, S. P. Pathogenic variation in sources of and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.
- PASTOR-CORRALES, M. A. The reaction of 19 bean rust differential cultivars to 94 races of *Uromyces appendiculatus* and the implication for the development of rust resistance cultivars. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v.44, p.103-104, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Apparent vulnerability of certain of rust resistance gene combinations in common bean for the management of *Uromyces appendiculatus*. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v.45, p.42-43, 2002.
- PAULA-JR, T. J., NIETSCHKE, S., CARVALHO, G. A., FERREIRA, C.F., BORÉM, A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à mancha-angular de cultivares de feijão recomendados para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.294, 1997.
- PAULA-JR, T. J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- RAVA, S. C. A., SARTORATO, A., CARVALHO, J. R. P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, p.5-6, 1985.
- RIBEIRO, M. J., COELHO, R. S. B., MENEZES, M. A. Fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à mancha-angular do feijoeiro (*Isariopsis griseola* Sacc). **Caderno Omega Universidade Federal de Pernambuco Série Agronomia**, n. 4, p. 243-246, 1993.
- SANTOS-FILHO, H. P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.23, n.127, p.226-230, 1976.
- SARTORATO, A., TEIXEIRA, M.G., ANTUNES, I.F. Incidência de mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) em dois sistemas e duas épocas de cultivo do feijoeiro comum. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1, Goiânia, 1982. **Anais...** Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, p.304-306.

- SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1989. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 1989.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M., BERGAMIM-FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.1, p.43-46, 1991.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha-angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 247-251, 1992.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 330p.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C. A., STONE, L. F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil.** Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 669-700.
- SARTORATO, A. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, **Resumos...** Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 26.
- VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M. A. (Comps.). **Standard system for evaluation of bean germplasm.** Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais. **Experientiae**, v.4, p.1-68, 1964.
- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do feijoeiro.** Viçosa: Imprensa Universitária, 1988. 231p.
- VIEIRA, R.F., VIEIRA,C., PINTO, C.M.F., RODRIGUES, O.L. Comportamento de cultivares de feijão do tipo manteigão em Minas Gerais – III. **Revista Ceres**, v.49, p.29-39, 2002.
- VOYSEST, O.V. **Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus, vulgaris* L.):** legado de variedades de América Latina 1930-1999. Cali, colombia, CIAT. 195 p. 2000.