

THIAGO LÍVIO PESSOA OLIVEIRA DE SOUZA

CLASSIFICAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *Uromyces  
appendiculatus* E PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO  
PATÓGENO EM FEIJÃO DO TIPO CARIOCA

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729c  
2005

Souza, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de, 1981-  
Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces  
appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao  
patógeno em feijão do tipo carioca / Thiago Lívio Pessoa  
Oliveira de Souza. – Viçosa: UFV, 2005.  
xi, 98f : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografias

1. Feijão – Melhoramento genético. 2. Feijão – Resis-  
tência à doenças e pragas. 3. Feijão – Resistência a  
*Uromyces appendiculatus*. 4. Feijão – Resistência à fer-  
rugem. 5. Feijão – Genética molecular. 6. Feijão –  
Seleção. 7. Marcadores genéticos. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

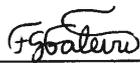
CDD 22.ed. 635.6523

THIAGO LÍVIO PESSOA OLIVEIRA DE SOUZA

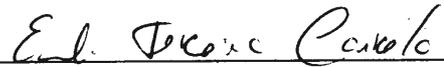
CLASSIFICAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *Uromyces appendiculatus* E PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO PATÓGENO EM FEIJÃO DO TIPO CARIOCA

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

APROVADA: 01 de agosto de 2005.



Dr. Fábio Gelape Faleiro



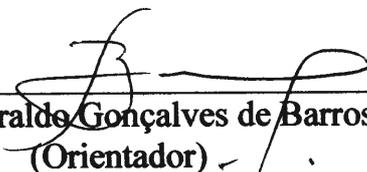
Dra. Eveline Teixeira Caixeta



Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Conselheiro)



Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro  
(Conselheiro)



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

*Aos meus maravilhosos pais Ademir e Maria da Glória.*

*Aos meus fraternos irmãos Eliana, Daniella, Luíz Flávio e Hélio.*

*Aos meus estimados cunhados e sobrinhos.*

*A todos os meus familiares, amigos e colegas.*

*À querida Ingrid.*

## **DEDICO**

*Ao povo brasileiro que, por meio dos impostos, proporcionou a  
manutenção da universidade pública, gratuita e de qualidade,  
o que tem viabilizado a minha formação profissional.*

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o grandioso Deus, por ter me concedido a benção desta encarnação, além do equilíbrio emocional e perseverança necessários para a conquista de mais esta vitória em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro, indispensável à condução deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao *Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture* (USDA), e ao Centro Nacional de Recursos Genéticos (Embrapa Cenargen), pelo fornecimento de sementes de algumas variedades de feijoeiro comum utilizadas neste trabalho.

Aos meus maravilhosos pais Ademir Oliveira de Sousa e Maria da Glória Pessoa Oliveira de Souza, pela participação efetiva em todos os momentos da minha vida, pela educação precisa e atenta, pelo apoio, incentivo e exemplo de dedicação e amor incondicional aos filhos.

Aos meus fraternos irmãos Eliana, Daniella, Luíz Flávio e Hélio, meus confidentes, pelo carinho e afeto mesmo à distância, pelo apoio constante, pela amizade e solidariedade, e por compreenderem a minha ausência física.

À querida Ingrid, pelo companheirismo, afeto e compreensão, e também pelo convívio sempre muito harmonioso.

Aos meus estimados cunhados Rodrigo e Fabiane, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao meu orientador, professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação constante e competente, pela paciência, compreensão, confiança e amizade, e também pelo apoio e incentivo desde a época de minha Iniciação Científica. Além disso, pelo exemplo de ética e comprometimento profissional, e por sua colaboração em minha formação como um todo.

Ao professor conselheiro Maurilio Alves Moreira, pelas sugestões, pelo zelo incansável com a manutenção das condições necessárias à pesquisa, e pelo exemplo de dedicação ao progresso científico da UFV e do país.

Ao professor conselheiro José Eustáquio de Sousa Carneiro, pelas sugestões, pela amizade e atenção sempre a mim dispensadas, e pelos ensinamentos relativos à cultura do feijoeiro e às técnicas de melhoramento de plantas.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, à Dra. Ana Lilia Alzate-Marin e ao Dr. Vilmar Antônio Ragagnin, meus amigos e incentivadores, sou grato pelos primeiros ensinamentos na área de genética molecular de plantas e de genética da interação planta-patógeno. Além disso, pelos conselhos, pela atenção e pelas valiosas sugestões quando da idealização deste trabalho. Ainda ao Dr. Vilmar Antônio Ragagnin, agradeço o auxílio inicial na condução de alguns experimentos.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro e à Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela participação na banca de defesa de tese, onde apresentaram importantes sugestões, contribuindo para a melhoria na apresentação dos resultados e na redação desta dissertação.

Aos estagiários Suelen e Endson, e aos amigos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV: Demerson, Márcia Regina, Kléver, Carlos Lásaro, Vagner, Mateus, Cassiana, Janaina, Valéria, José Eduardo, Jeziel e Edgard, os quais muito contribuíram, sem medir esforços, para realização deste trabalho. Além disso, sou grato pelo companheirismo, amizade e auxílio na interpretação dos resultados.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV, pelo convívio amistoso e sempre muito

agradável, propício para um bom ambiente de trabalho. Além disso, pela amizade e valiosa ajuda com as técnicas de biologia molecular.

Ao Sr. José Pinto Rosa, pelo auxílio na rotina de atividades realizadas em casa de vegetação.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, e aos colegas de curso, pelos importantes ensinamentos.

Às secretárias do curso de Genética e Melhoramento, Maria da Conceição e Rita de Cássia, pelo apoio.

Aos amigos da Ordem Espiritualista Cristã Vale do Amanhecer, minha segunda família, pelo convívio fraterno e edificante, pelo apoio constante e por me proporcionarem momentos tão especiais em todos estes anos que compartilhamos.

Aos amigos André Nessralla e Judson Vieira, pelo apoio e incentivo desde a nossa época de pré-vestibulandos.

A todos os amigos da “Seção 12” do Alojamento Velho da UFV, em especial, a Carlos Shigeaky, Vinícius, Cláudio Arcanjo, Fabrício, Mábio, Victor, Edmar, Jéferson, Douglas, Marcelo e Alexandre Capucho, pelo companheirismo e agradável convívio desde a nossa graduação.

À sociedade brasileira, pela manutenção da universidade pública, gratuita e de qualidade, o que tem proporcionado a minha formação profissional.

Enfim, a todos os meus familiares, amigos, colegas e àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

THIAGO LÍVIO PESSOA OLIVEIRA DE SOUZA, filho de Ademir Oliveira de Sousa e Maria da Glória Pessoa Oliveira de Souza, nasceu em Goiânia, Goiás, em 13 de abril de 1981.

Concluiu o ensino fundamental em 1995, na Escola Municipal Ana das Neves de Freitas, em Goiânia, Goiás. cursou o ensino médio no Colégio Visão, município de Formosa, Goiás, o qual foi concluído em 1998.

Em 1999, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, colando grau em janeiro de 2004 como Engenheiro Agrônomo. No período de sua graduação, desenvolveu atividades de pesquisa como bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Biologia Geral, atuando nas áreas de Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento Vegetal e de Genética da Interação Planta-Patógeno (2000 a 2003). Além disso, foi estagiário nos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV) e do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) - Embrapa Cerrados. Também foi monitor da disciplina Genética Básica na UFV (2003). Ainda durante sua graduação, foi coordenador geral do Centro Acadêmico de Agronomia, na gestão 2002/2003.

Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, na área de Genética Molecular de Plantas e de Microorganismos, defendendo tese em agosto de 2005. Neste mesmo período, iniciou o curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado, também no Programa de Genética e Melhoramento da UFV.

## ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. A cultura do feijoeiro comum.....	5
3.2. Patossistema <i>Uromyces appendiculatus</i> -feijoeiro.....	7
3.2.1. Aspectos gerais do fungo.....	7
3.2.2. Variabilidade do patógeno.....	9
3.2.3. Mecanismos de defesa existentes no hospedeiro.....	11
3.2.4. Fontes de resistência.....	13
3.3. Piramidação de genes de resistência a patógenos.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 1.....	30
CLASSIFICAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DO FUNGO <i>Uromyces appendiculatus</i> ORIUNDAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS	
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Variedades diferenciadoras.....	34
2.2. Origem e obtenção dos isolados monopustulares de <i>U. appendiculatus</i> .....	34
2.3. Inoculação do patógeno na série diferenciadora.....	35
2.4. Avaliação dos graus de reação ao patógeno.....	36
2.5. Designação das raças fisiológicas.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 2.....	50
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM FEIJÃO DO TIPO CARIOCA	
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54

2.1. Introgessão individual dos genes <i>Ur-5</i> e <i>Ur-11</i> no cultivar Rudá.....	54
2.1.1. Material genético e retrocruzamentos .....	54
2.1.2. Inoculação com <i>U. appendiculatus</i> e avaliação da doença .....	56
2.1.3. Análise de <i>fingerprinting</i> molecular .....	57
2.2. Piramidação.....	59
2.2.1. Material genético.....	59
2.2.2. Validação de marcadores moleculares para a seleção assistida .....	60
2.2.3. Obtenção das populações segregantes.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1. Introgessão individual dos genes <i>Ur-5</i> e <i>Ur-11</i> no cultivar Rudá.....	64
3.1.1. Primeiro retrocruzamento.....	64
3.1.2. Segundo retrocruzamento.....	64
3.1.3. Terceiro retrocruzamento .....	65
3.2. Piramidação dos genes <i>Ur-5</i> , <i>Ur-11</i> e <i>Ur-ON</i> .....	70
3.2.1. Validação dos marcadores.....	70
3.2.2. Populações segregantes .....	73
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
CAPÍTULO 3.....	85
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DO CULTIVAR BRSMG TALISMÃ QUANTO À RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO FEIJOEIRO	
1. INTRODUÇÃO .....	85
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95
CONCLUSÕES GERAIS.....	98

## RESUMO

SOUZA, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2005. **Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo carioca.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurilio Alves Moreira e José Eustáquio de Sousa Carneiro.

Visando contribuir com a padronização internacional da classificação de raças fisiológicas do fungo *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro comum, no presente trabalho foi realizada a caracterização de isolados do patógeno usando a nova série diferenciadora e o sistema binário de nomenclatura propostos no “3<sup>rd</sup> The Bean Rust Workshop”. Esses isolados, oriundos do estado de Minas Gerais, são utilizados nas avaliações dos genótipos resistentes à ferrugem desenvolvidos pelo programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV. O procedimento utilizado classificou 12 isolados em sete raças fisiológicas distintas: 21-3, 29-3, 53-3, 53-19, 61-3, 63-3 e 63-19. Espera-se que a adoção desse procedimento possa facilitar o intercâmbio de informações e o uso cooperativo dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa que, no mundo, estudam o *U. appendiculatus*. Com esta classificação, foram também identificadas fontes com amplo espectro de resistência: Mexico 309, Mexico 235 e PI 181996, as quais se mostraram incompatíveis com todos os isolados caracterizados. Em face à grande variabilidade apresentada por *U. appendiculatus*, e visando o controle genético eficiente e duradouro desse patógeno, outra meta do presente trabalho foi piramidar os genes de resistência *Ur-5* (Mexico 309), *Ur-11* (Belmidak RR-3, derivado de PI 181996) e *Ur-ON* (Ouro Negro) no *background* genético “carioca” do feijoeiro, utilizando o cultivar Rudá como genitor recorrente. Grãos do tipo carioca possuem maior aceitação pelo consumidor brasileiro. Para viabilizar a piramidação, a estratégia adotada foi o uso de marcadores moleculares, para estudos de *fingerprinting* e na seleção indireta dos genes

mencionados, em associação a métodos convencionais de melhoramento, como os retrocruzamentos e o avanço de gerações segregantes com controle genealógico. Os marcadores SCAR SI19<sub>460</sub> e SAE19<sub>890</sub>, e o RAPD OPX11<sub>550</sub>, associados aos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*, respectivamente, foram os utilizados no monitoramento dos alelos de resistência ao longo do processo de piramidação. A seleção com base no fenótipo era inviável devido ao idêntico espectro de resistência apresentado por estas fontes frente aos isolados de *U. appendiculatus* disponíveis na micoteca do BIOAGRO/UFV. A partir de plantas F<sub>2</sub> selecionadas com base nos três marcadores citados e quanto ao tipo de grãos, conforme o padrão Rudá, sementes F<sub>3</sub> portando os três genes piramidados foram obtidas. A partir dessa população, espera-se, posteriormente, atingir a homozigose para todos os locos de resistência, utilizando o método genealógico e a seleção assistida por marcadores moleculares. Concomitantemente às atividades já mencionadas, o cultivar com grãos do tipo carioca BRSMG Talismã, recentemente recomendado para o plantio em Minas Gerais e no Paraná, foi avaliado quanto à reação frente aos isolados de *U. appendiculatus* mantidos na coleção fúngica do BIOAGRO/UFV. Além disso, realizou-se também a sua caracterização molecular com os marcadores SI19<sub>460</sub>, SAE19<sub>890</sub> e OPX11<sub>550</sub>. BRSMG Talismã foi suscetível a cinco dos 12 isolados com os quais foi testado. Os três marcadores analisados foram polimórficos entre BRSMG Talismã e as fontes de resistência portadoras dos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*. Esses resultados corroboram a hipótese de ausência de alelos de resistência para esses três locos em BRSMG Talismã e demonstram que os marcadores moleculares poderão ser utilizados para o monitoramento de uma possível introgressão simultânea de *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* neste cultivar.

## ABSTRACT

SOUZA, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2005. **Classification of *Uromyces appendiculatus* physiological races and pyramiding of resistance genes to this pathogen in “carioca-type” common bean.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee Members: Maurilio Alves Moreira and José Eustáquio de Souza Carneiro.

Aiming to contribute to the international standardization of the classification of physiological races of the fungus *Uromyces appendiculatus*, the causal agent of common bean rust, this work characterized isolates of the pathogen using the new differential series and the binary nomenclature system recommended in the 3<sup>rd</sup> Bean Rust Workshop. These isolates were collected in the state of Minas Gerais, Brazil, and are used for the evaluation of bean rust resistant genotypes developed in the BIOAGRO/UFV breeding program. Twelve isolates were classified into seven physiological races: 21-3, 29-3, 53-3, 53-19, 61-3, 63-3 and 63-19. It is expected that the adoption of this classification procedure will facilitate the exchange of information among different research groups interested in common bean rust and its causal agent *U. appendiculatus*. The classification procedure also allowed the identification of resistance sources with ample resistance spectra: ‘Mexico 309’, ‘Mexico 235’ and ‘PI 181996’. These sources were incompatible with all the isolates analyzed. Considering the high variability of *U. appendiculatus*, and aiming the durable and efficient genetic control of this pathogen, in this work the following rust resistance genes were associated (pyramided) in the “carioca-type” genetic background Ruda: *Ur-5* (Mexico 309), *Ur-11* (Belmidak RR-3, derived from PI 181996) and *Ur-ON* (Ouro Negro). Cultivars with “carioca-type” grains are preferred by the Brazilian consumer. Molecular markers were used for fingerprinting analyses and indirect selection during the pyramiding process in association with conventional breeding techniques, such as backcrossing and segregating generation

advancement with genealogical control. SCAR markers SI19<sub>460</sub> and SAE19<sub>890</sub>, and RAPD marker OPX11<sub>630</sub>, linked to *Ur-5*, *Ur-11* and *Ur-ON*, respectively, were used to monitor the resistance alleles along the pyramiding process. The phenotypic selection of these three alleles was not possible because they present the same resistance spectra in relation to the isolates available in the BIOAGRO/UFV breeding program. F<sub>3</sub> seeds with pyramided *Ur-5*, *Ur-11* and *Ur-ON* rust resistance alleles were obtained from F<sub>2</sub> plants harboring the three molecular markers, and also the “carioca-type” genetic background. Aiming to reach homozygosity for all three resistance loci, the F<sub>3</sub> population and subsequent generations will be conducted by a molecular-marker assisted genealogical breeding process. In addition to the activities already mentioned, the “carioca-type” cultivar BRSMG Talismã, which was recently recommended for commercial use in the Minas Gerais and Paraná States, was evaluated as to its reaction to *U. appendiculatus* isolates maintained in the fungal collection of BIOAGRO/UFV. It was also characterized with molecular markers SI19<sub>460</sub>, SAE19<sub>890</sub> and OPX11<sub>630</sub>. The results demonstrate that ‘BRSMG Talismã’ is susceptible to five of the 12 *U. appendiculatus* isolates tested. The three molecular markers analyzed were polymorphic between ‘BRSMG Talismã’ and the resistance sources harboring the alleles *Ur-5*, *Ur-11* and *Ur-ON*. That indicates the absence of these resistance alleles in cultivar BRSMG Talismã and that these markers can be used to monitor the possible simultaneous introgression of the resistance alleles in this cultivar.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui uma grande importância social e econômica. Com isso, esforços têm sido despendidos para se obter melhores níveis de produtividade, a qual tem sido severamente afetada pela incidência de doenças, sobretudo as de origem fúngica. Entre tais doenças, merece destaque a ferrugem, incitada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.], que principalmente na safra do inverno, e sob irrigação, tem causado sérios prejuízos aos produtores (VIEIRA *et al.*, 2005).

Para o manejo integrado desta enfermidade, as medidas comumente empregadas incluem a eliminação dos restos culturais contaminados e a rotação de culturas, as quais diminuem o inóculo inicial do patógeno. Além disso, também são usados cultivares resistentes e a pulverização com fungicidas, por reduzirem a taxa de progresso da doença (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). O controle genético de *U. appendiculatus* tem recebido atenção especial pelas pesquisas, devido à sua eficácia, seu menor custo, sua fácil aceitação e uso pelos produtores, além de ser menos prejudicial ao ambiente em relação ao controle químico.

Uma etapa básica dos programas de melhoramento cujos objetivos incluem a resistência à ferrugem é a classificação das raças fisiológicas do seu agente causal e, por conseqüência, o diagnóstico da variabilidade apresentada pelo fungo. Nesta etapa, possíveis fontes de resistência podem ser identificadas ou mesmo confirmadas, com base na compatibilidade diferencial por elas apresentada frente aos isolados caracterizados (SOUZA *et al.*, 2005).

Um passo subsequente seria estudar a herança genética do mecanismo de incompatibilidade ao patógeno apresentado pelas fontes promissoras. Posteriormente, os genes caracterizados poderiam ser transferidos para genótipos agronomicamente adaptados e que possuam interesse comercial na região onde se pretende recomendar os novos cultivares. Simultaneamente a esta etapa, para

auxiliar os programas de melhoramento genético, marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ligados a genes de resistência ao *U. appendiculatus* e a outros importantes patógenos que atacam o feijoeiro estão sendo identificados, ou mesmo validados, para serem utilizados na seleção assistida desses genes (HALEY *et al.*, 1993; MIKLAS *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 1998; STAVELY, 2000; CAIXETA *et al.*, 2003; FALEIRO *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2004a, b, c).

Atualmente, o melhorista de plantas autógamas dispõe de várias estratégias para o desenvolvimento de linhagens resistentes a doenças. Porém, no caso da ferrugem do feijoeiro, por ser o *U. appendiculatus* um parasita obrigatório com ampla variabilidade genética e fisiológica, a transferência simultânea (piramidação) de distintos alelos de resistência para um único cultivar comercial tem sido a mais recomendada. Isso porque esta estratégia possibilita a obtenção de linhagens com resistência de maior espectro e durabilidade à doença (JOHNSON, 1984; STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; KELLY *et al.*, 1995).

O uso apenas de métodos convencionais de melhoramento não têm sido eficiente para viabilizar o processo de piramidação, principalmente em razão das dificuldades encontradas na identificação dos diferentes alelos de resistência contidos em um mesmo genótipo, o que demanda a realização de inoculações múltiplas ou seqüenciais em uma mesma população (MICHELMORE, 1995). Esta estratégia afeta o dinamismo do programa de melhoramento como um todo, além de comprometer a eficiência na avaliação da reação ao patógeno (BIGIRIMANA e HÖFTE, 2001). Interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência também dificulta o reconhecimento preciso dos vários alelos presentes em um mesmo genótipo (SINGH *et al.*, 2001). Por isso, marcadores moleculares, principalmente os de DNA, têm sido utilizados para monitorar a piramidação dos genes de interesse, dispensando a necessidade de inoculações múltiplas para a seleção dos genótipos promissores.

O programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), tem utilizado a seleção assistida por marcadores moleculares associada a métodos convencionais de melhoramento para piramidar genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular no *background* genético “carioca”, “preto” e “vermelho” do feijoeiro. Genótipos contendo simultaneamente genes de resistência às três doenças mencionadas já foram desenvolvidos, principalmente com grãos do tipo carioca (RAGAGNIN, 2004; ARRUDA, 2005). Porém, apenas o gene *Ur-ON* do cultivar Ouro Negro tem sido empregado para o controle genético da ferrugem. Para ampliar esta base genética, uma das prioridades do programa tem sido a caracterização e a introgressão de novos genes de resistência a esta enfermidade.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de: (i) classificar raças fisiológicas do fungo *U. appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro, oriundas do estado de Minas Gerais; e (ii) piramidar genes de resistência ao patógeno em feijão com grãos do tipo carioca, o qual possui maior aceitação pelo mercado consumidor brasileiro. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Obter isolados monopustulares a partir dos patótipos de *U. appendiculatus* mantidos na micoteca do BIOAGRO/UFV;
- Classificar os isolados obtidos em raças fisiológicas, com base na série diferenciadora e no sistema binário de nomenclatura propostos internacionalmente no “3<sup>rd</sup> The Bean Rust Workshop”;
- Introgredir individualmente os genes de resistência à ferrugem *Ur-5* (Mexico 309) e *Ur-11* (Belmidak RR-3) no cultivar com grãos do tipo carioca Rudá;
- Piramidar os genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* em Rudá, usando como estratégia a seleção assistida por marcadores moleculares associada a métodos convencionais de melhoramento;
- Caracterizar fenotipicamente e molecularmente o cultivar comercial BRSMG Talismã (grãos do tipo carioca) quanto à resistência à ferrugem, verificando a necessidade de introgredir genes de resistência neste cultivar e se os marcadores moleculares já identificados poderão ser utilizados para esse fim.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A cultura do feijoeiro comum

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre as mais antigas espécies cultivadas no mundo. Descobertas arqueológicas demonstraram evidências de que o seu consumo na alimentação humana já era uma realidade a pelo menos 5.000 anos antes da Era Cristã (CIAT, 1986). O gênero *Phaseolus*, com cerca de 55 espécies já identificadas, além de *P. vulgaris* L., possui outras quatro que são cultivadas: *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman, e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK *et al.*, 1993).

Atualmente, sabe-se que *P. vulgaris* teve dois centros principais de domesticação e um terceiro de menor expressão (GEPTS e DEBOUCK, 1993). O primeiro localiza-se na região central das Américas, principalmente no México. O segundo situa-se no sul dos Andes, abrangendo, sobretudo, o norte da Argentina e o sul do Peru. O terceiro é intermediário entre os dois primeiros, localizando-se na Colômbia. Após a descoberta do continente americano pelos europeus, no século XV, o feijão-comum foi levado ao Velho Mundo, onde se tornou muito familiar entre agricultores e botânicos (CIAT, 1986).

Entre as plantas leguminosas comestíveis, o feijão se destaca como uma das mais importantes, devido à sua ampla distribuição geográfica e pelo seu relevante valor nutricional. Trata-se de uma boa fonte de proteína (20-25%) e vitaminas, possui bom conteúdo de carboidratos, ferro e ácidos graxos livres (linoléico e linolênico), além de fornecer grande quantidade de fibras solúveis e insolúveis (SCHNEEMAN, 1986; SINGH e SINGH, 1992).

Seu cultivo visa, basicamente, à produção de grãos, os quais são consumidos principalmente secos. Também são comestíveis as vagens imaturas e as folhas, conforme o hábito alimentar de cada região (FONSECA *et al.*, 2002). O feijão é uma fonte de proteína economicamente mais acessível à população

quando comparada às fontes de origem animal, principalmente em países em desenvolvimento (SINGH e SINGH, 1992).

No Brasil, país maior produtor e consumidor mundial de grãos (FAO, 2004), o feijão-comum possui grande importância social e econômica. É cultivado tanto por pequenos agricultores, que utilizam baixo nível tecnológico no processo produtivo, quanto por empresários rurais altamente tecnificados, em uma área total de aproximadamente 4 milhões de hectares (IBGE, 2005). Seu consumo per capita ultrapassa 16 kg/habitante/ano (IBGE, 2005).

O mercado brasileiro é exigente quanto aos aspectos relacionados com a cor, tamanho, forma e qualidade culinária dos grãos. Atualmente no país são cultivados feijões do tipo carioca, preto, vermelho, roxo, mulatinho, rosinha e manteigão, sendo os do tipo carioca os mais consumidos. No que se refere a este *background* genético, aos grãos devem apresentar cor creme com estrias marrom claras, ausência de brilho, o halo em torno do hilo deve ter a mesma tonalidade da cor creme, o formato do grão deve ser oblongo, o peso de 100 sementes em torno de 23 a 25 gramas e o tempo médio de cocção sempre inferior a 30 minutos (RAMALHO *et al.*, 2004).

Dependendo da região, seu plantio pode ser feito em três épocas do ano. Na primeira delas, a safra das águas, a semeadura é realizada no início do período chuvoso (outubro/novembro), e a colheita no início do verão. Na segunda safra, a da seca, o plantio é feito no mês de fevereiro ou março. Apesar do perigo premente de déficit hídrico após o mês de março, esta época de plantio é apreciada pelos produtores, pois possibilita a colheita em época seca. A terceira época de plantio (outono/inverno) é feita de abril a julho, e a colheita no inverno, sendo geralmente praticada por agricultores que utilizam alta tecnologia, pois demanda irrigação.

Apesar da relevância desta cultura no Brasil, a produtividade média nacional ainda é muito baixa, cerca de 750 kg/ha (IBGE, 2005). Um dos fatores que explicam essa situação é o grande número de doenças que acometem o feijoeiro (VIEIRA, 1983; VIEIRA *et al.*, 2005). Entre elas destaca-se a ferrugem, que dependendo das condições climáticas, do estágio de desenvolvimento das

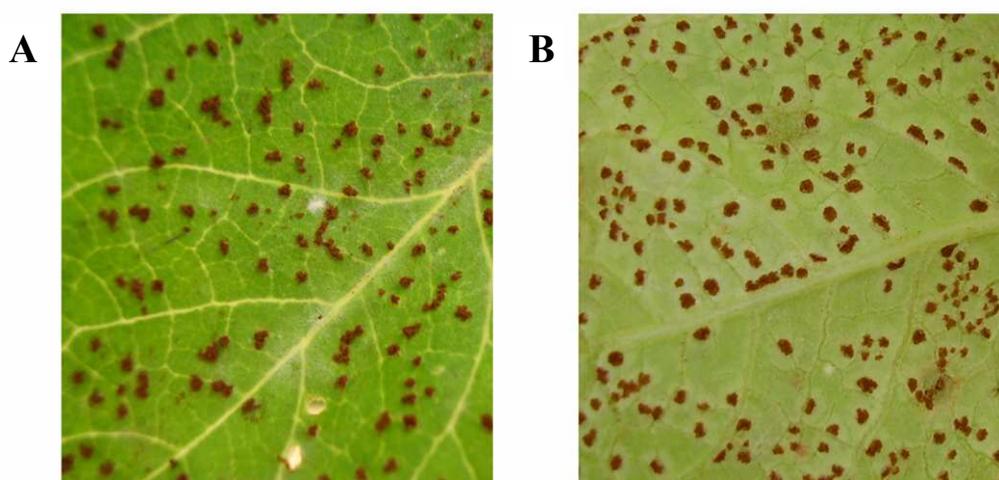
plantas e do uso de cultivares suscetíveis, pode ocasionar severos prejuízos na produção (JESUS JUNIOR *et al.*, 2001). Em decorrência da ferrugem, perdas superiores a 68% já foram relatadas em Minas Gerais (VIEIRA, 1983), onde a infecção ocorreu antes da floração e no plantio da seca. Temperaturas moderadas (17 a 27°C) e alta umidade relativa (>95%) propiciam-lhe a condição mais favorável (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). Assim, a partir de 1980, com o cultivo de feijão de inverno sob condições irrigadas, principalmente na região do Brasil Central, a ferrugem passou a ser uma preocupação a mais para os produtores (VIEIRA *et al.*, 2005).

### **3.2. Patossistema *Uromyces appendiculatus*-feijoeiro**

#### **3.2.1. Aspectos gerais do fungo**

O fungo *U. appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.] é um parasita obrigatório do tipo autóico (completa todo seu ciclo de vida em um único hospedeiro) e macrocíclico (produz todos os estádios de esporos) (ANDRUS, 1931). Faz parte do super-reino Eucariota, reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Teliomycetes, ordem Uredinales e família Pucciniaceae (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989). Infecta as faces abaxial e adaxial das folhas, onde inicialmente forma manchas esbranquiçadas, cerca de 5 dias após a infecção. Também é capaz de infectar vagens, pecíolos e ramos. As pústulas começam a eclodir expondo os uredosporos quando as frutificações do fungo amadurecem, aproximadamente 15 dias após a inoculação. Os uredosporos fazem com que as pústulas adquiram uma coloração marrom-avermelhada (cor de ferrugem) em ambas as superfícies foliares (Figura 1). Em condições favoráveis, e se a infecção é severa, as folhas tornam-se secas e escuras, sofrendo posterior senescência (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998).

Este fungo está mundialmente distribuído, mas sua infecção é favorecida nas regiões tropicais e subtropicais úmidas (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989), como é o caso do Brasil, onde a ocorrência de temperaturas moderadas e alta umidade do ar lhe favorecem. Por isso, as principais perdas na produção do feijoeiro decorrentes da incidência do *U. appendiculatus* ocorrem nestas regiões.



**Figura 1.** Reação compatível entre o fungo *U. appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro comum, e o cultivar US Pinto 111 (suscetível universal). Face adaxial (A) e abaxial (B) das folhas primárias infectadas.

Os uredosporos do fungo são disseminados principalmente pelo vento, mas também por meio de implementos agrícolas, água de irrigação e insetos, o que propicia a sobrevivência contínua do patógeno em lavouras cultivadas com variedades suscetíveis (ZAMBOLIM e CHAVES, 1974; FALEIRO *et al.*, 1996). O *U. appendiculatus* pode apresentar diversas gerações durante o ciclo de vida do hospedeiro. A sua reprodução sexuada é mediada por picniosporos compatíveis, o que proporciona a ocorrência de muitas raças, porém esse tipo de reprodução não ocorre nas condições ambientais do Brasil. No país, a reprodução do patógeno é assexuada, mecanismo também presente em seu ciclo de vida, o qual pode gerar grande variabilidade genética ao longo das várias gerações do fungo (GROTH e OZMON, 1994).

Por ser o *U. appendiculatus* um parasita obrigatório, ou seja, só se múltipla no hospedeiro compatível, a coleta de uredosporos somente é possível em plantas que apresentam os sintomas da ferrugem no campo ou quando inoculadas em condições artificiais especialmente controladas para esse fim (FALEIRO *et al.*, 1996). Esta última é a maneira mais viável e segura para multiplicar raças do patógeno visando sua manutenção em micotecas, pois garante a pureza das mesmas e a quantidade necessária de uredosporos na coleta.

O armazenamento adequado de uredosporos deve ser feito em ampolas de vidro recobertas com papel alumínio, evitando exposição à luz. Estas são geralmente acondicionadas a 5°C e sob umidade relativa de cerca de 50% (ZAMBOLIM e CHAVES, 1974). Desta maneira é possível impedir a germinação dos uredosporos e a contaminação com outros microrganismos.

### **3.2.2. Variabilidade do patógeno**

Já na década de 70, muitas raças do fungo *U. appendiculatus* haviam sido identificadas no Brasil e no exterior (DIAS FILHA e COSTA, 1968; FERRAZ, 1969; JUNQUEIRA NETTO *et al.*, 1969; AUGUSTIN e COSTA, 1971; COELHO e CHAVES, 1975). Porém, não era possível comparar com exatidão os resultados obtidos pelos vários autores, devido aos diferentes critérios utilizados na caracterização das raças, tanto no que se refere às variedades diferenciadoras adotadas quanto ao diagnóstico dos graus de reação ao patógeno (FALEIRO *et al.*, 1999a; VIEIRA *et al.*, 2005). No intuito de solucionar este problema, foi proposta no “The Bean Rust Workshop”, realizado em 1983, em Porto Rico, uma padronização da série diferenciadora, bem como da escala de avaliação dos tipos de infecção incitados pelo patógeno (STAVELY *et al.*, 1983). Com base neste procedimento, mais de 250 raças foram identificadas no mundo (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; PASTOR-CORRALES, 2001). No Brasil, caracterizações foram realizadas por MORA-NUÑES *et al.* (1992), SANTOS e RIOS (2000) e SOUZA *et al.* (2005). Porém, a nomenclatura atribuída às raças

continuou sendo desuniforme, dificultando a interpretação e comparação dos dados gerados pelos diferentes grupos de pesquisa.

No “3<sup>rd</sup> Bean Rust International Workshop”, realizado em 2002, na África do Sul, foi proposta uma nova série diferenciadora para o patógeno, contendo seis variedades de origem Andina e seis de origem Mesoamericana (Tabela 1), além de um novo sistema para designar as raças, visando à padronização internacional da nomenclatura a elas atribuída (STEADMAN *et al.*, 2002). Neste novo sistema de classificação, a escala de avaliação que considera seis graus de reação à doença, proposta por STAVELY *et al.* (1983), foi codificada em apenas dois tipos de infecção: resistente (graus de 1 a 3) e suscetível (grau 4 ou maior). Com base neste novo critério, recharacterizações de isolados de *U. appendiculatus* originados dos EUA, da África do Sul, de Honduras, da Argentina e de Moçambique já foram realizadas (STEADMAN *et al.*, 2002; ACEVEDO *et al.*, 2004; JOCHUA *et al.*, 2004). No Brasil, até o presente momento, ainda não existem relatos na literatura sobre classificações de raças do patógeno utilizando este novo procedimento.

**Tabela 1.** Nova série de variedades diferenciadoras para *U. appendiculatus* proposta no “3<sup>rd</sup> Bean Rust International Workshop”, realizado na África do Sul em 2002 (STEADMAN *et al.*, 2002)

<b>Ordem</b>	<b>Variedade</b>	<b>Gene</b>	<b>Origem</b>	<b>Valor Binário</b>
A	Early Gallatin	<i>Ur-4</i>	Andina	1
B	Redlands Pioneer	<i>Ur-13</i>	Andina	2
C	Montcalm	<i>Ur-?*</i>	Andina	4
D	PC-50	<i>Ur-9, Ur-12</i>	Andina	8
E	Golden Gate Wax	<i>Ur-6</i>	Andina	16
F	PI 260418	<i>Ur-?*</i>	Andina	32
A	Great Northern 1140	<i>Ur-7</i>	Mesoamericana	1
B	Aurora	<i>Ur-3</i>	Mesoamericana	2
C	Mexico 309	<i>Ur-5</i>	Mesoamericana	4
D	Mexico 235	<i>Ur-3<sup>+</sup></i>	Mesoamericana	8
E	Compuesto Negro Chimaltenango	<i>Ur-?*</i>	Mesoamericana	16
F	PI 181996	<i>Ur-11</i>	Mesoamericana	32

\*Gene ainda não caracterizado.

Marcadores isoenzimáticos e de DNA também têm sido utilizados no estudo da diversidade do fungo agente causal da ferrugem do feijoeiro (LU e GROTH, 1988; LINDE *et al.*, 1990a, b; MCCAIN *et al.*, 1992; GROTH *et al.*, 1995; MACLEAN *et al.*, 1995). De modo geral, tem sido demonstrado que *U. appendiculatus* não é uma espécie homogênea. Além disso, verifica-se uma maior variação entre os isolados que raramente, ou nunca, produzem teliosporos e os que normalmente produzem esse tipo de esporo. Estudos de diversidade genética entre isolados monopustulares identificados em Minas Gerais, com base em marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), foram realizados por FALEIRO *et al.* (1998). Os resultados demonstraram alta variabilidade entre eles, com distâncias genéticas variando de 9,60 a 83,12%.

Com base no que foi apresentado, torna-se evidente a alta variabilidade genética e fisiológica apresentada pelo fungo *U. appendiculatus*, o que dificulta os trabalhos de melhoramento cujos objetivos incluem o desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno.

### **3.2.3. Mecanismos de defesa existentes no hospedeiro**

O crescente avanço de ciências como a genética molecular e a epidemiologia tem contribuído para um melhor entendimento das interações planta-patógeno. Fica cada vez mais evidente que esse tipo de relação envolve fatores genéticos de ataque e defesa, presentes em patógenos e hospedeiros, respectivamente, os quais agem sob a influência do ambiente (FLOR, 1971; BROWN, 2003; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003; LAINE, 2004).

Distintos padrões de resistência raça-específica têm sido relatados na literatura. STAVELY e PASTOR-CORRALES (1989), assim como SINGH (1991), fizeram uma análise dos estudos sobre a genética da resistência do feijoeiro à ferrugem, e apresentaram as seguintes conclusões: (i) existem claras evidências de interação gene-a-gene no patossistema *U. appendiculatus*-feijoeiro, à semelhança do que ocorre na interação entre o fungo *Melampsora lini*, agente causal da ferrugem do linho (*Linum usitatissimum* L.), e seu hospedeiro, descrita

por FLOR (1942); (ii) existem vários alelos dominantes e de herança simples controlando resistência raça-específica, entretanto, há casos em que a resistência é controlada por dois ou mais genes dominantes complementares; (iii) foram identificadas fontes que apresentam resistência monogênica dominante eficaz no controle de múltiplas raças, ou seja, há genes que conferem amplo espectro de resistência; (iv) alguns genes de resistência exercem efeito epistático sobre outros semelhantes; e (v) também há casos onde a resistência é governada por alelos recessivos de herança simples.

Estudos de herança realizados por pesquisadores do BIOAGRO/UFV indicaram o envolvimento de genes de efeito maior, ou principal, e de genes de efeito menor, ou secundário, no controle genético da incompatibilidade do feijoeiro ao *U. appendiculatus* (FALEIRO, 1997; CORRÊA, 1999; FALEIRO, 2000; SOUZA *et al.*, 2002; DESSAUNE *et al.*, 2005).

Além da incompatibilidade, a hipersensibilidade é outro mecanismo utilizado pelo feijoeiro para resistir à ferrugem, no qual células do hospedeiro, marginais ao local de penetração do patógeno, morrem logo após a infecção. A morte destas células, chamadas de altruístas, restringe o crescimento do fungo ao local da infecção, impedindo a colonização generalizada da planta (GREENBERG e YAO, 2004).

No trabalho de SHAIK (1985), foram observadas evidências de que o aumento da densidade de tricomas nas folhas reduz o número de pústulas formadas pelo patógeno, porque impede que parte dos uredosporos atinja a superfície foliar. Esse autor, assim como GROTH e URS (1982), verificou que alguns cultivares apresentam a chamada “baixa receptividade” à ferrugem, em que a intensidade de pústulas é diminuída não importando a raça. O tubo germinativo dos uredosporos de *U. appendiculatus* geralmente penetra no hospedeiro através dos estômatos, provavelmente por isso a densidade de estômatos influencia o número de pústulas (SHAIK, 1985).

Alguns cultivares de feijoeiro são tolerantes à enfermidade, ou seja, mesmo infectados e apresentando os sintomas da ferrugem, no que se refere à

produção, se comportam como se não tivessem sido contaminados (VIEIRA, 1983).

#### 3.2.4. Fontes de resistência

As variedades portadoras de genes de resistência ao *U. appendiculatus* internacionalmente caracterizados são: B1627 (*Ur-1*); B2090 (*Ur-2*); B2055 (*Ur-2*<sup>2</sup>); Aurora, Ecuador 299, NEP-2 e 51051 (*Ur-3*); Mexico 235 (*Ur-3*<sup>+</sup>); Early Gallatin (*Ur-4*); Mexico 309 (*Ur-5*); Pinto Olathe e Golden Gate Wax (*Ur-6*); Great Northern 1140 (*Ur-7*); U.S. #3 (*Ur-8*); Pompadour Checa e PC-50 (*Ur-9*); Cape e Resisto (*Ur-10*); PI 181996 (*Ur-11*); California Small White 643, Pompadour Checa e PC-50 (*Ur-12*); e Redlands Pioneer (*Ur-13*) (BASSETT, 2004).

No Brasil, o cultivar Ouro Negro (Honduras 35), portador do gene de resistência à ferrugem *Ur-ON*, assim provisoriamente denominado pelo fato de não ter sido ainda completamente caracterizado, é a fonte de resistência mais utilizada (FALEIRO *et al.*, 2004). Este cultivar foi resistente a todos os patótipos de *U. appendiculatus* identificados em Minas Gerais por FALEIRO *et al.* (1999b), e moderadamente resistente a populações do patógeno amostradas em Goiás, Bahia, Paraná e São Paulo (RIOS *et al.*, 2001).

FALEIRO *et al.* (1999b) também demonstraram que Mexico 309 (gene *Ur-5*), diferenciador internacional para o *U. appendiculatus*, foi imune a nove e moderadamente resistente a dois dos 13 patótipos do fungo provenientes do Estado de Minas Gerais. No trabalho de SOUZA *et al.* (2005), a estabilidade desta resistência frente aos patótipos mais virulentos identificados por FALEIRO *et al.* (1999b) foi confirmada. Mexico 309 também se mostrou resistente a todos os 11 isolados do fungo identificados por SANTOS e RIOS (2000) no estado de Goiás. Além disso, foi incompatível com os patótipos 1 e 3, coletados no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás (RIOS *et al.*, 2001).

O gene de resistência *Ur-11*, presente na variedade diferenciadora PI 181996 e na linhagem norte americana Belmidak RR-3, também merece destaque devido ao seu bom desempenho frente a patótipos identificados em Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 2001).

Outras importantes fontes de resistência para o Brasil foram identificadas no trabalho desenvolvido por SOUZA *et al.* (2005). O cultivar Redlands Pioneer (*Ur-13*) foi resistente a todos os 39 isolados coletados nos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Minas Gerais; California Small White 643 (*Ur-12*) e Brown Beauty (*Ur-4*) foram resistentes a 38 destes 39; e AxS 37 (*Ur-?*) e Compuesto Negro Chimaltenango (*Ur-?*) mostraram-se incompatíveis com 37 e 34, respectivamente. Ecuador 299 (*Ur-3*) e Mexico 235 (*Ur-3<sup>+</sup>*) apresentaram amplo espectro de resistência apenas em Goiás e Minas Gerais; já Kentucky Wonder 814 (*Ur-?*), foi altamente resistente aos isolados oriundos de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, sendo suscetível aos demais.

### **3.3. Piramidação de genes de resistência a patógenos**

A piramidação, ou seja, a introgressão simultânea de distintos genes de resistência em um mesmo genótipo tem sido proposta como uma estratégia para o desenvolvimento de cultivares aptos ao controle genético eficiente de enfermidades (COYNE e SCHUSTER, 1975; MIKLAS *et al.*, 1993; KELLY e MIKLAS, 1998; FALEIRO *et al.*, 2004). Isso se deve ao fato de que a resistência monogênica, a mais amplamente usada pelos programas de melhoramento, pode ser facilmente suplantada em virtude do rápido surgimento de novas raças virulentas dos patógenos, uma vez que, geralmente, estes são parasitas que apresentam uma ampla variabilidade (MIKLAS *et al.*, 1993; STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989).

O conceito de piramidação pode ser entendido sob dois aspectos, restrito e amplo. O restrito se refere ao acúmulo de genes, na planta, que conferem incompatibilidade a diferentes raças de um mesmo patógeno. Isso acarreta em

um aumento do espectro de resistência à enfermidade e a torna possivelmente mais durável. O conceito amplo está relacionado à introgressão simultânea de genes de resistência a distintos patógenos, estratégia também conhecida como resistência múltipla. Com isso, as vantagens já mencionadas se aplicam a diferentes doenças (PEDERSEN e LEATH, 1988; MICHELMORE, 1995).

Evidências experimentais demonstraram que o acúmulo de genes confere maior resistência ao genótipo receptor do que a soma da resistência apresentada pelos seus genitores (YOSHIMURA *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001). Segundo SCHAFER e ROELFS (1985), a probabilidade de um patógeno suplantar a resistência imposta por uma pirâmide de quatro ou seis genes, é muito baixa. Para que isso ocorra, mutantes que surgem independentemente devem ser combinados no mesmo espaço e tempo, ou ainda, mutações devem ocorrer simultaneamente ou seqüencialmente no genoma de um mesmo isolado. NELSON (1979) argumenta que, no hospedeiro, a resistência decorrente dos efeitos parciais de numerosos genes exerce uma menor pressão de seleção sobre o patógeno e, assim, deve ser mais durável. Apesar deste conceito não ser aceito de forma unânime pela comunidade científica, existem comprovações experimentais que dão suporte à ocorrência desses efeitos parciais de resistência em alguns patossistemas hospedeiro-parasita (BRONDY *et al.*, 1986; PEDERSEN e LEATH, 1988). De acordo com a teoria apresentada, a durabilidade da resistência de um cultivar piramidado dependerá do número de genes a serem suplantados pelo patógeno, ou seja, quanto maior o número de genes introduzidos no hospedeiro mais difícil será para o patógeno desenvolver um genótipo virulento.

Outro aspecto que corrobora o uso da piramidação como estratégia para o controle genético eficaz de doenças, é o epidemiológico. Estudando o patossistema *Melampsora lini-Linum marginale* (espécie silvestre do linho), a partir de populações naturais de ambas as espécies coletadas na Planície de Kiandra, na Austrália, THRALL e BURDON (2003) demonstraram haver uma relação inversamente proporcional entre a fecundidade do patógeno (produção de esporos) e o acúmulo de virulência. Os autores observaram que as populações do

fungo capazes de infectar um maior número de populações do hospedeiro apresentavam menor agressividade comparativa frente ao controle suscetível. Isso indica que o acúmulo de genes de virulência no patógeno, ou seja, a inativação conjunta de vários genes de avirulência implica em um custo à sua adaptabilidade (*fitness*). Provavelmente seja por este motivo que a fixação da virulência não tem sido observada nos diferentes patossistemas parasita-hospedeiro (BROWN, 2003). No que se refere à piramidação, o estudo realizado por THRALL e BURDON (2003) indica que o surgimento de genótipos do patógeno capazes de suplantarem uma pirâmide de genes de resistência no hospedeiro, cuja probabilidade é inversamente proporcional ao número de genes piramidados, não implicará diretamente em um aumento da taxa de progresso da doença, uma vez que estes novos patótipos apresentarão uma menor agressividade. Esse fato é positivo dentro do ponto de vista epidemiológico, pois contém a doença em um nível abaixo do dano econômico, além de prevenir sua rápida disseminação.

Para viabilizar a piramidação, marcadores moleculares têm sido utilizados para monitorar os genes de interesse ao longo do processo de melhoramento (MIKLAS *et al.*, 1993; STAVELY, 2000; KELLY *et al.*, 2003). Com isso, é possível superar dificuldades encontradas durante a identificação dos vários alelos contidos em um mesmo genótipo. Entre tais dificuldades destacam-se a necessidade de inoculações múltiplas ou seqüenciais em uma mesma população, o que compromete a eficiência na avaliação da reação à doença, e a ocorrência de interações epistáticas entre os diferentes genes de interesse (MICHELMORE, 1995; BIGIRIMANA e HÖFTE, 2001; SINGH *et al.*, 2001; TOENNIESSEN *et al.*, 2003).

As principais etapas executadas durante o desenvolvimento de um programa de piramidação de genes de resistência a doenças assistido por marcadores moleculares, são: (i) identificação das raças mais virulentas e prevalentes do patógeno, e com isso, a caracterização das fontes de resistência promissoras para a região a qual se destinam os novos cultivares; (ii) estudo da herança genética do mecanismo de incompatibilidade às raças identificadas, a

partir de cruzamentos entre as fontes de resistência selecionadas e o cultivar suscetível de interesse; (iii) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência; (iv) obtenção de linhagens contendo os genes de resistência e as marcas moleculares correspondentes, mais freqüentemente, via retrocruzamentos; (v) identificação dos marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos alelos de resistência, evitando com isso problemas posteriores com os falsos positivos; e (v) piramidação dos alelos de resistência a partir de intercruzamentos entre as linhagens obtidas. Durante a condução de um programa desta natureza, as seguintes atividades são também consideradas como de rotina: (i) caracterização contínua da variabilidade genética do patógeno e do hospedeiro; (ii) caracterização e introdução de novas fontes de resistência ao programa; e (iii) identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Um trabalho pioneiro sobre piramidação de genes de resistência a patógenos foi o realizado por FLOR e COMSTOCK (1971), no qual os autores utilizaram retrocruzamentos e seleção com base no fenótipo para desenvolver um cultivar de linho contendo vários genes de resistência ao fungo *M. lini*, agente causal da ferrugem. Posteriormente, a piramidação, principalmente a assistida por marcadores moleculares, passou a ser preconizada e mesmo praticada no melhoramento de outras espécies.

Em arroz, HUANG *et al.* (1997) piramidaram quatro genes de resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Linhagens com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas quanto à resistência a este patógeno. SINGH *et al.* (2001) introduziram no cultivar PR106 os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21*, os quais também conferem resistência à *X. oryzae* pv. *oryzae*. A partir de inoculações em casa de vegetação, estes autores demonstraram que as diferentes combinações de genes promoveram altos níveis de resistência aos isolados testados. Avaliações em nível de campo, em 31 ambientes, confirmaram as observações feitas em casa de vegetação.

Em milho, um trabalho relevante foi realizado por WIDSTROM *et al.* (2003). Os autores piramidaram QTLs envolvidos com a resistência física à

invasão da planta por *Aspergillus* spp., principalmente *A. flavus*, e também, à resistência química (detoxificação) contra a aflotoxina, metabólito produzido pelo fungo o qual é tóxico ao milho.

No trigo, esforços têm sido despendidos para, a partir da introgressão simultânea de genes de resistência em linhagens elites, promover o controle genético amplo e durável do oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) e das ferrugens do colmo (*Puccinea graminis* f. sp. *tritici*) e da folha (*Puccinea recondita* f. sp. *tritici*). A redução na produtividade desta cultura tem sido atribuída, freqüentemente, a estas moléstias (MOHAN *et al.*, 1997; FEDERIZZI *et al.*, 2005).

Na cevada, marcadores moleculares RAPD e STS (*Sequence Tagged Sites*) foram usados na seleção indireta dos alelos *rym4*, *rym9* e *rym11*, os quais conferem resistência ao vírus do mosaico dourado (BYDV), para viabilizar o processo de sua piramidação (WERNER *et al.*, 2000). Atualmente, trabalhos têm sido concentrados para adicionar os alelos *rym5* e *rym13* à pirâmide já desenvolvida e, além desses, alelos de resistência a outras viroses que acometem a cultura (THOMAS, 2003; ORDON *et al.*, 2004).

Na soja, marcadores moleculares RAPD e microssatélites ligados a genes de herança simples e a QTLs associados à resistência ao nematóide de cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe) têm sido identificados visando a piramidação (CREGAN *et al.*, 1999a, b; CERVINGI, 1999; SCHUSTER *et al.*, 2001; YUE *et al.*, 2001).

Em tomate, usando uma população segregante derivada do cruzamento entre *Lycopersicon esculentum* e *Lycopersicon hirsutum*, e também marcadores moleculares, ZHANG *et al.* (2002) mapearam alguns genes de resistência análogos entre as duas espécies mencionadas. Segundo os autores, o principal objetivo deste trabalho foi identificar e combinar genes de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (gene *I2*), *Meloidogyne* ssp. (gene *Mi*) e *Verticillium dahliae* (gene *Ve*).

Na cultura da maçã, o crestamento dos frutos, incitado pelo fungo *Venturia inaequalis*, tem causado sérios prejuízos aos produtores. Marcadores

moleculares associados aos genes *Vf*, *Vr*, *Vb*, *Va*, *Vm* e *Vbj*, os quais conferem resistência ao *V. inaequalis*, foram identificados e atualmente estão sendo utilizados no processo de piramidação destes genes (GYGAX *et al.*, 2004).

No feijoeiro, uma das espécies que tem recebido maior atenção dos melhoristas no que se refere à combinação de genes de resistência a patógenos, KELLY *et al.* (1995) piramidaram cinco alelos (*I*, *bc-u*, *bc-1<sup>2</sup>*, *bc-2<sup>2</sup>* e *bc-3*) que conferem incompatibilidade ao vírus do mosaico comum (BCMV). O *United States Department of Agriculture* (USDA), em colaboração com as Estações de Experimentação Agrícola de Michigan, Nebraska e North Dakota, EUA, já desenvolveram um total de 52 linhagens contendo genes piramidados para o BCMV e/ou para a ferrugem, com distintas combinações alélicas e em diferentes *backgrounds* genéticos (PASTOR-CORRALES, 2003). Outras linhagens de feijoeiro comum, e também de feijão caupi, com genes piramidados para uma ou mais enfermidades, são relatadas por BEAVER *et al.* (2003), COYNE *et al.* (2003) e KELLY *et al.* (2003).

Em atividades realizadas no programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV, o qual é assistido por marcadores moleculares, RAGAGNIN (2004) piramidou genes de resistência à ferrugem (*Ur-ON*), antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*) e mancha angular (*Phg-1*) nos cultivares Rudá e Pérola (grãos do tipo carioca). Visando a introgressão desta pirâmide gênica desenvolvida em feijão com grãos do tipo preto, este material foi posteriormente utilizado como genitor doador em retrocruzamentos com o cultivar Diamante Negro (COSTA, 2004), o qual já possui resistência ao cretamento bacteriano comum e ao mosaico comum. Posteriormente, no intuito de incrementar e tornar mais eficaz a pirâmide de resistência à antracnose, ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo *Co-4<sup>2</sup>* e introduziu o alelo *Co-5* na linhagem Rudá com genes piramidados. O alelo *Co-4<sup>2</sup>* é o mais efetivo entre os já caracterizados, sendo o único capaz de conferir resistência à raça 2047 de *C. lindemuthianum*, agente causal da antracnose. Atualmente, o programa do BIOAGRO/UFV tem concentrado esforços para introduzir novos genes de resistência à ferrugem e à

mancha angular no material genético desenvolvido e, além disso, transferir a pirâmide gênica já obtida para cultivares comerciais com grãos do tipo vermelho.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, M., ALLEYNE, A.T., FENTON, J., STEADMAN, J.R. Phenotypic and genotypic variation in *Uromyces appendiculatus* from regions of commercial production and centers of common bean domestication. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:115-116, 2004.
- ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30:333-342, 2005.
- ANDRUS, C.F. The mechanism of sex in *Uromyces appendiculatus* and *Uromyces vignae*. **Journal of Agricultural Research**, 42:559-587, 1931.
- ARRUDA, K.M.A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. 77p. (Tese de Mestrado)
- AUGUSTIN, E., COSTA, J.G.C. Levantamento de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli typica* no Rio Grande do Sul e Santa Catarina em 1968 e 1969. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 6:137-138, 1971.
- BASSETT, M.J. List of genes - *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:1-24, 2004.
- BEAVER, J.S., ROSAS, J.C., MYERS, J., ACOSTA, J., KELLY, J.D., NCHIMBI-MSOLLA, S., MISANGU, R., BOKOSI, J., TEMPLE, S., ARNAUD-SANTANA, E., COYNE, D.P. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. **Field Crops Research**, 82:87-102, 2003.
- BIGIRIMANA, J., HÖFTE, M. Bean anthracnose: inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Journal of Phytopathology**, 149: 403-408, 2001.
- BRONDY, U., NELSON, R.R., GREGORY, L.V. The residual and interactive expression of “defeated” wheat stem rust resistance genes. **Phytopatology**, 76:546-549, 1986.
- BROWN, J.K.M. Little else but parasites. **Science**, 299:1680-1681, 2003.
- CAIXETA, E.T, BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., NIESTCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134:297-303, 2003.
- CERVIGNI, G.D.L. **Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1999. 52p. (Tese de Mestrado)

- CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. **Informe annual 1986: programa de frijol**. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1986. 339p.
- COELHO, R.S.B., CHAVES, G.M. Comparação de dois métodos de amostragem na identificação de raças de *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Experientiae**, 19:149-186, 1975.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1999. 116p. (Tese de Doutorado)
- COSTA, M.R. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2004. 76p. (Tese de Mestrado)
- COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Genetic and breeding strategy for resistance to rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 24:795-803, 1975.
- COYNE, D.P., STEADMAN, J.R., GODOY-LUTZ, G., GILBERTSON, R., ARNAUD-SANTANA, E., BEAVER, J.S., MYERS, J.R. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to management of bean diseases. **Field Crops Research**, 82:155-168, 2003.
- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPECHT J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, 39:1464-1490, 1999a.
- CREGAN, P.B., MUDGE, J., FICKUS, E.W., DANESH, D., DENNY, R., YOUNG, N.D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:811-818, 1999b.
- DEBOUCK, D.G., TORO, O., PAREDES, O.M., JOHNSON, W.C., GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* in northwestern South America. **Economic Botany**, 47:408-423, 1993.
- DESSAUNE, S.N., SOUZA, T.L.P.O., NUNES, E.S., SANGLARD, D.A., DOUSA, C.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Uso do cultivar Mexico 309 como fonte resistência à ferrugem do feijoeiro no Brasil Central. In: **3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Gramado, RS. 1p. 2005. (Resumo)
- DIAS FILHA, I., COSTA, J.G.C. Identificação de raças fisiológicas da ferrugem (*Uromyces phaseoli typica*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 3:165-170, 1968.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21:123-125, 1996.

- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1997. 65p. (Tese de Mestrado)
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus* utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 23:386-390, 1998.
- FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sistema simplificado para nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 24:540-545, 1999a.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24:166-169, 1999b.
- FALEIRO, F.G. **Melhoramento e mapeamento genético do feijoeiro-comum: análise de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2000. 158p. (Tese de Doutorado)
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., STAVELY, J.R., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 26:77-80. 2001.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, 138:213-218, 2004.
- FAO - Food and Agriculture Organization (2004). **Food and agriculture indicators, 2004.** Disponível em: <<http://www.fao.org.2004>>. Acessado em julho de 2005.
- FEDERIZZI, L.C., SCHEEREN, P.L., BARBOSA NETO, J.F., MILACH, S.C.K., PACHECO, M.T. Melhoramento do trigo. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. p.659-697.
- FERRAZ, S. **Determinação de raças de *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli* na Zona da Mata, Minas Gerais, e resistência de variedades de *Phaseolus vulgaris* L. a algumas raças.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1969. 49p. (Tese de Mestrado)

- FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, 32:653-669, 1942.
- FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, 9:275-296, 1971.
- FLOR, H.H., COMSTOCK, V.E. Development of flax cultivar with multiple rust resistance conditioning genes. **Crop Science**, 11:64-66, 1971.
- FONSECA, S.V., VIEIRA, C., MINIM, V.P.R., CARDOSO, A.A. Folhas verdes de feijão na alimentação humana: avaliação sensorial, adubação nitrogenada e desfolhamento. **Bragantia**, 61:161-167, 2002.
- GEPTS, P., DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A., VOYSEST, O. (Eds.). **Common bean - Research for crop improvement**. Cali: CAB International. CIAT, Colômbia, 1993. p.7-53.
- GREENBERG, J.T., YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, 6:201-211, 2004.
- GROTH, J.V., URS, N.V.R.R. Differences among bean cultivars in receptivity to *Uromyces appendiculatus* var. *typical*. **Phytopathology**, 72:374-378, 1982.
- GROTH, J.V., OZMON, E.A. Contrasting effects of asexual reproduction and random mating on changes in virulence frequency in a field collection of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, 84:566-569, 1994.
- GROTH, J.V., MCCAIN, J.W., ROELFS, A.P. Virulence and isoenzyme diversity of sexual versus asexual collections of *Uromyces appendiculatus* (bean rust fungus). **Heredity**, 75:234-242, 1995.
- GYGAX, M., GIANFRANCESCHI, L., LIEBHARD, R., KELLERHALS, M., GESSLER, C., PATOCCHI, A. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:1702-1709, 2004.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, 14:177-193, 2003.
- 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**, 95:313-320, 1997.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2005). **Indicadores IBGE: estatística da produção agropecuária - maio de 2005**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Fasciculo\_Indicadores\_IBGE>. Acessado em julho de 2005.
- JESUS JUNIOR, W.C., VALE, F.X.R., MARTINEZ, C.A., COELHO, R.R., COSTA, L.C., HAU, B., ZAMBOLIM, L. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Photosynthetica**, 39:603-606, 2001.
- JOCHUA, C.N., STEADMAN, J.R., AMANE, M.I.V., FENTON, J.G. Pathotype variation and sources of resistance to the common bean rust pathogen in Southern Mozambique. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:113-114, 2004.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 22:309-330, 1984.
- JUNQUEIRA NETTO, A., ATHOW, K.L., VIEIRA, C. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* no estado de Minas Gerais. **Revista Ceres**, 16:1-9, 1969.
- 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**, 37:15-16, 1994.
- KELLY, J.D., AFANADOR, L., HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica** 82:207-212, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, 4:1-11, 1998.
- KELLY, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 82:135-154, 2003.
- LAINE, A.L. Resistance variation within and among host populations in a plant-pathogen metapopulation: implications for regional pathogen dynamics. **Journal of Ecology**, 92:990-1000, 2004.
- LINDE, D.C., GROTH, J.V., ROELFS, A.P. The genetic basis of isozyme variation in the bean rust fungus (*Uromyces appendiculatus*). **Journal of Heredity**, 81: 134-138, 1999a.
- LINDE, D.C., GROTH, J.V., ROELFS, A.P. Comparison of isozyme and virulence diversity patterns in the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, 80:141-147, 1990b.
- LU, T.H., GROTH, J.V. Isozymes detection and variation in *Uromyces appendiculatus*. **Canadian Journal of Botany**, 66:885-890, 1988.

- MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., IRWIN, J.A.G., MANNERS, J.M., GROTH, J.V. Random amplified polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, 85:757-765, 1995.
- MCCAIN, J.W., GROTH, J.V., ROELFS, A.P. Inter and intrapopulation isozymes variation in collections from sexually reproducing populations of the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. **Mycologia**, 84:329-340, 1992.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of diseases resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, 15:393-427, 1995.
- 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**, 85:745-749, 1993.
- MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G., YANO, M., BHATIA, C.R., SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, 3:87-103, 1997.
- MORA-NUÑES, O.A., VIEIRA, C., ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, 39:391-404, 1992.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant disease, an advanced treatise**. New York: Academic Press. New York, USA, 1979. p.23-46.
- ORDON, F., FRIEDT, W., SCHEURER, K., PELLIO, B., WERNER, K., NEUHAUS, G., HUTH, W., HABEKUSS, A., GRANER, A. Molecular markers in breeding for virus resistance in barley. **Journal of Applied Genetics**, 45:145-159, 2004.
- PASTOR-CORALES, 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 of the Bean Improvement Cooperative**, 44:103-104, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Sources, genes for resistance, and pedigrees of 52 rust and mosaic resistant dry bean germplasm lines released by the USDA Beltsville Bean Project in collaboration with the Michigan, Nebraska and North Dakota Agricultural Experiment Stations. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 46:235-241, 2003.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1998. p.375-433.

- PEDERSEN, W.L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, 26:369-378, 1988.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLAD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:237-238, 2004a.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLAD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:249-250, 2004b.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLAD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 271-272, 2004c.
- RAGAGNIN, V.A. **Piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular em feijão do tipo carioca**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2004. 79p. (Tese de Doutorado)
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B., CARNEIRO, J.E.S. Feijão de alta qualidade - cultivares. **Informe Agropecuário**, 25:21-32, 2004.
- RIOS, G.P., ANDRADE, E.M., COSTA, J.L.S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:128-133, 2001.
- SANTOS, S.C., RIOS, G.P. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* nos estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 25:607-611, 2000.
- SCHAFER, J.F., ROELFS, A.P. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence, **Phytopathology**, 75:749-750, 1985.
- SCHNEEMAN, B.O. Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effects. **Food Technology**, 40:104-110, 1986.
- SCHUSTER, I., ABDELNOOR, R.V., MARIN, S.R.R., CARVALHO, V.P., KIIHL, R.A.S., SILVA, J.F.V., SEDIYAMA, C.S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, 102:91-96, 2001.
- SHAIK, M. Race-nonspecific resistance in bean cultivars to races of *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* and its correlation with leaf epidermal characteristics. **Phytopathology**, 75:478-481, 1985.

- SINGH, S. Bean genetics. In: VAN SCHOONHEVEN, A., VOYSEST, O. (Eds). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB International. Wallingford, EUA, 1991. p.199-286.
- SINGH, U., SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany**, 46:310-321, 1992.
- 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**, 102:1011-1015, 2001.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of Belmidak RR-3 as a source for rust resistance in central Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:140-141, 2002.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, 30:143-149, 2005.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:iv-vi, 1983.
- STAVELY, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In: SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2ed. Cali: CIAT. Cali, Colombia, 1989. p.159-194.
- STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:1-4, 2000.
- STEADMAN, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A., BEAVER, J.S. An overview of the 3<sup>rd</sup> bean rust and 2<sup>nd</sup> bean common bacterial blight international workshops, march 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:120-125, 2002.
- THOMAS, W.T.B. Prospects for molecular breeding of barley. **Annals of Applied Biology**, 142:1-12, 2003.
- THRALL, P.H., BURDON, J.J. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. **Science**, 299:1735-1737, 2003.
- TOENNIESSEN, G.H., O'TOOLE, J.C., DEVRIES, J. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. **Current Opinion in Plant Biology**, 6:191-198, 2003.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1983. 231p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P., CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. p.301-391.

- WERNER K., FRIEDT W., ORDON F. Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex based on molecular markers and DH-lines. In: **8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium**. Adelaide, Australia. Vol II, contrib. papers: 200-202, 2000.
- WIDSTROM, N.W., BUTRON, A., GUO, B.Z., WILSON, D.M., SNOOK, M.E., CLEVELAND, T.E., LYNCH, R.E. Control of preharvest aflatoxin contamination in maize by pyramiding QTL involved in resistance to ear-feeding insects and invasion by *Aspergillus* spp. **European Journal of Agronomy**, 19:563-572, 2003.
- YOSHIMURA, S., YOSHIMURA, A., IWATA, N., MCCOUCH, S.R., ABENES, M.L., BARAOIDAN, M.R., MEW, T.W. NELSON R.J. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. **Molecular Breeding**, 1:375-387, 1995.
- YUE, P., ARELLI, P.R. & SLEPER, D.A. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:921-928, 2001.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastratrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Experientia**, 17:151-184, 1974.
- ZHANG, L.P., KHAN, A., NINO-LIU, D., FOOLAD, M.R. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* cross. **Genome**, 45:133-146, 2002.

## CAPÍTULO 1

### CLASSIFICAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DO FUNGO *Uromyces appendiculatus* ORIUNDAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS

#### 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.], agente causal da ferrugem do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), está mundialmente distribuído. No entanto, sua infecção é favorecida nas regiões com temperaturas entre 17 e 27°C e umidade relativa do ar em torno de 95% durante 10 a 18 horas/dia (AUGUSTIN *et al.*, 1972). Por isso, as maiores perdas em decorrência da ferrugem ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais úmidas (STAVELY *et al.*, 1989), como é o caso do Brasil, onde a doença é citada entre as de maior importância econômica devido aos sérios prejuízos que ela ocasiona (LINDGREN *et al.*, 1995; BASSANEZI *et al.*, 2001; JESUS JUNIOR *et al.*, 2001).

O uso de cultivares resistentes tem se mostrado uma estratégia vantajosa economicamente e menos impactante ao ambiente comparada aos métodos convencionais utilizados para o controle da ferrugem. Porém, a alta variabilidade patogênica de *U. appendiculatus* tem dificultado o trabalho dos melhoristas. A piramidação, ou seja, a introgressão simultânea de distintos genes de resistência em um mesmo genótipo de feijoeiro tem sido proposta no intuito de obter cultivares com resistência de amplo espectro e duradoura a doenças (COYNE e SCHUSTER, 1975; MIKLAS *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 1994; RAGAGNIN *et al.*, 2003).

A classificação de raças fisiológicas de *U. appendiculatus* e, por consequência, o conhecimento de sua variabilidade local, representa uma das

etapas básicas dos programas de melhoramento cujos objetivos incluem o controle genético da ferrugem. Além disso, nesta etapa é que poderão ser identificados os patótipos potencialmente úteis para monitorar o processo de piramidação, ou seja, as raças que serão capazes de discriminar distintos genes de resistência contidos em um mesmo genótipo com base na compatibilidade diferencial por eles apresentada.

Uma das dificuldades no estudo do fungo *U. appendiculatus* era a definição do conjunto de variedades diferenciadoras utilizadas para a determinação de suas raças fisiológicas. Entre os anos de 1941 e 1983, a classificação era feita com base na série diferenciadora proposta por HARTER e ZAUMEYER (1941). No entanto, alguns pesquisadores realizaram modificações nesta série, com o objetivo de facilitar a discriminação de determinados isolados (FISHER, 1952; DIAS FILHA e COSTA, 1968; AUGUSTIN e COSTA, 1971; PEREIRA e CHAVES, 1977; BALLANTYNE, 1978).

No “The Bean Rust Workshop”, realizado em Porto Rico no ano de 1983, 35 pesquisadores de diversos países propuseram uma série de 20 variedades como sendo o padrão internacional de diferenciadoras para *U. appendiculatus* (STAVELY *et al.*, 1983). Mas já em 1984, a variedade Mountainer White Half Runner foi eliminada desta série por ser muito semelhante à Kentucky Wonder 780 (STAVELY, 1984). Caracterizações de isolados brasileiros frente às 19 diferenciadoras recomendadas foram realizadas por MORA-NUÑES *et al.* (1992), SANTOS e RIOS (2000) e SOUZA *et al.* (2005). No trabalho de MORA-NUÑES *et al.* (1992), os autores concluíram que as variedades Kentucky Wonder 814, Early Gallatin, 51051, NEP-2, Ecuador 299, Pinto Olathe, Mexico 309 e Redlands Pioneer eram suficientes para a discriminação e classificação de isolados coletados no Brasil. Utilizando essas oito variedades, FALEIRO *et al.* (1999a) caracterizaram 13 raças do fungo no estado de Minas Gerais.

Outro aspecto que dificultou o estudo do patossistema *U. appendiculatus*-feijoeiro foi o uso de distintas escalas para avaliar os sintomas incitados pelo patógeno. Na tentativa de padronizar a avaliação, vários esforços foram despendidos (HARTER e ZAUMEYER, 1941; CRISPÍN e DONGO, 1962;

DAVISON e VAUGHAN, 1963; STAVELY *et al.*, 1983; FALEIRO *et al.*, 1999b). A escala proposta por DAVISON e VAUGHAN (1963) foi a mais usada em todo o mundo. No Brasil, alguns pesquisadores realizaram modificações nesta escala (JUNQUEIRA NETTO *et al.*, 1969; PEREIRA e CHAVES, 1977; CARRIJO *et al.*, 1980). No “The Bean Rust Workshop” também foi proposta uma escala para avaliar os tipos de infecção incitados por *U. appendiculatus*, a qual considerava 37 graus de reação (STAVELY *et al.*, 1983).

Além das distintas séries diferenciadoras e escalas de avaliação, outro fator que dificultou a classificação das raças fisiológicas do fungo foi a nomenclatura a elas atribuída. A terminologia utilizada para este fim não era uniforme. A maioria dos autores designava as raças arbitrariamente por números sucessivos (HARTER e ZAUMEYER, 1941; FISHER, 1952; ZÚÑIGA e VICTORIA, 1975; STAVELY, 1984). No Brasil, a nomenclatura geralmente era dada por um número precedido de uma letra maiúscula, a qual representava a área geográfica onde as raças eram identificadas (DIAS FILHA e COSTA, 1968; JUNQUEIRA NETTO *et al.*, 1969; AUGUSTIN e COSTA, 1971; COELHO e CHAVES 1975; CARRIJO *et al.*, 1980). Na Austrália, BALLANTYNE (1978) atribuiu a cada variedade diferenciadora uma letra minúscula e a designação foi dada pelas letras correspondentes às diferenciadoras com as quais as raças eram compatíveis.

Tentando simplificar a classificação de raças de *U. appendiculatus*, FALEIRO *et al.* (1999b) desenvolveram um procedimento que considerava como diferenciadoras apenas as oito variedades propostas por MORA-NUÑES *et al.* (1992). Além disso, propuseram o uso de uma escala de avaliação com três graus de reação e um sistema numérico para a nomenclatura das raças. Utilizando este procedimento, os autores agruparam em 66 as 86 raças do fungo que haviam sido previamente identificadas por STAVELY (1984), MORA-NUÑES *et al.* (1992) e FALEIRO *et al.* (1999a).

Esta falta de padronização para a classificação de raças fisiológicas do agente causal da ferrugem do feijoeiro prejudicou a interpretação dos resultados obtidos com as classificações realizadas em todo o mundo. No “3<sup>rd</sup> Bean Rust

International Workshop”, realizado em 2002 na África do Sul, foi definida uma nova série diferenciadora para o fungo *U. appendiculatus*, contendo seis variedades Andinas e seis Mesoamericanas. Além disso, foi proposto um sistema binário para a nomenclatura das raças, no qual a avaliação da doença foi codificada em apenas duas classes de reação, resistente e suscetível (STEADMAN *et al.*, 2002). Na nova série diferenciadora, as variedades Early Gallatin, Redlands Pioneer, Golden Gate Wax, Aurora, Mexico 309, Mexico 235 e Compuesto Negro Chimaltenango, pertencentes à série proposta em 1983, foram mantidas. Já as variedades Montcalm, PC-50, PI 260418, Great Northern 1140 e PI 181996 foram acrescentadas.

Assim, este trabalho teve como objetivo classificar, com base no novo procedimento internacional (STEADMAN *et al.*, 2002), isolados monopustulares de 12 patótipos de *U. appendiculatus* coletados em quatro diferentes municípios produtores do estado de Minas Gerais. Tais isolados têm sido utilizados para selecionar genótipos resistentes à ferrugem no programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOIAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Com a adoção desse novo procedimento de classificação, espera-se facilitar o intercâmbio de informações entre os diferentes grupos de pesquisa que estudam o fungo *U. appendiculatus*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Variedades diferenciadoras

Sementes de sete das 12 variedades diferenciadoras para o fungo *U. appendiculatus*, Early Gallatin, Redlands Pioneer, Golden Gate Wax (GG Wax), Aurora, Mexico 309, Mexico 235 e Compuesto Negro Chimaltenango (CNC), e das variedades Ouro Negro (controle resistente) e US Pinto 111 (controle suscetível), foram obtidas do banco de germoplasma do programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. As outras cinco diferenciadoras complementares à série, Montcalm, PC-50, PI 260418, Great Northern 1140 (GN 1140) e PI 181996, foram fornecidas pelo *Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (USDA)*, Beltsville, Maryland, EUA. Para uniformizar o poder germinativo das sementes, estas foram multiplicadas em casa de vegetação antes de serem utilizadas nos ensaios envolvendo inoculações.

### 2.2. Origem e obtenção dos isolados monopustulares de *U. appendiculatus*

Os isolados monopustulares de *U. appendiculatus* classificados neste estudo foram obtidos a partir de 12 patótipos do fungo preservados na micoteca do BIOAGRO/UFV. Onze destes patótipos pertencem ao grupo dos 13 previamente identificados por FALEIRO *et al.* (1999a), os quais foram coletados em quatro municípios produtores de Minas Gerais, são eles: Coimbra (isolados 1, 2 e 4), Lavras (isolados 6, 7 e 8), Lambari (isolados 9 e 10) e Patos de Minas (isolados 11, 12 e 13). O outro patótipo, identificado como C (Coimbra), foi recentemente coletado no campo experimental da UFV situado no referido município mineiro.

Para a obtenção dos isolados monopustulares, foi empregada a variedade suscetível US Pinto 111 e a metodologia de inoculação descrita por CARRIJO *et*

*al.* (1980), utilizando uma concentração de inóculo menor que a usual ( $1,0 \times 10^4$  uredosporos/mL), com o objetivo de obter pústulas separadas. Os uredosporos provenientes de uma única pústula de cada um dos patótipos (isolados monopustulares) foram coletados cuidadosamente e posteriormente multiplicados em US Pinto 111 por três inoculações sucessivas, utilizando a concentração de inóculo padrão ( $2,0 \times 10^4$  uredosporos/mL) (DAVISON e VAUGHAN, 1964). Para evitar contaminações, para cada patótipo foi utilizada uma célula individual da câmara de nevoeiro durante o processo de incubação. Além disso, na casa de vegetação, as plantas de US Pinto 111 inoculadas com cada um dos distintos isolados permaneceram por aproximadamente 15 dias até a completa formação das pústulas, sendo isoladas por barreiras físicas construídas com lâminas de isopor. Após a multiplicação, os uredosporos dos isolados monopustulares foram coletados e armazenados em ampolas de vidro recobertas com papel alumínio, para evitar a exposição à luz, e acondicionados sob condições controladas ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $<50\%$ ), segundo a técnica descrita por ZAMBOLIM e CHAVES (1974).

A obtenção de isolados monopustulares a partir dos patótipos a serem classificados em raças fisiológicas foi realizada visando reduzir a possibilidade de misturas genéticas que levariam a interpretações errôneas nas avaliações da interação planta-patógeno. As misturas poderiam ter sido provocadas por contaminações durante as multiplicações do fungo anteriormente realizadas para a manutenção da micoteca.

### **2.3. Inoculação do patógeno na série diferenciadora**

Ensaio individuais foram conduzidos para classificar cada um dos 12 isolados monopustulares representativos de cada patótipo. Em cada ensaio, dez sementes de cada diferenciadora e de cada testemunha foram semeadas em bandejas plásticas (60 x 40 x 10 cm). Duas bandejas foram suficientes para comportar todas as 14 variedades (sete por bandeja). Para o plantio, em todos os

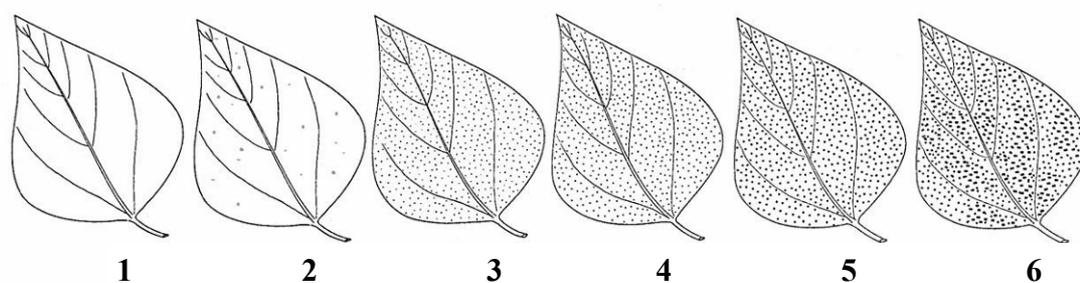
casos, foi utilizada uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg de 4-14-8 por m<sup>3</sup> de substrato. Este experimento foi realizado durante o inverno de 2004 e repetido no verão de 2005. Portanto, cada isolado foi classificado com base na reação por ele incitada em 20 plantas de cada diferenciadora.

As inoculações também foram realizadas segundo a metodologia descrita por CARRIJO *et al.* (1980), quando as folhas primárias das plantas apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. A concentração de inóculo foi de  $2,0 \times 10^4$  uredosporos/mL, suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, visando uma melhor dispersão. A suspensão foi aplicada em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador manual do tipo De Vilbiss nº 15, acionado por compressor elétrico. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $>95\%$ ), onde permaneceram por 48 horas, sob períodos de 12 horas luz/escuro. Para evitar contaminações, foram utilizados compartimentos individuais da câmara de nevoeiro para a incubação de cada isolado. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram até a avaliação dos sintomas da doença.

#### **2.4. Avaliação dos graus de reação ao patógeno**

Em todos os ensaios, os graus de reação ao patógeno foram determinados com base no método adotado pelo novo procedimento de classificação internacional (STEADMAN *et al.*, 2002), o qual se baseia em uma escala com seis tipos de infecção (STAVELY *et al.*, 1983): 1- ausência de sintomas (imune), 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro  $<300 \mu\text{m}$ , 4- pústulas esporulando com diâmetro de  $300 \mu\text{m}$  a  $499 \mu\text{m}$ , 5- pústulas esporulando com diâmetro de  $500 \mu\text{m}$  a  $800 \mu\text{m}$ , e 6- pústulas esporulando com diâmetro  $>800 \mu\text{m}$ .

Os graus de reação foram avaliados cerca de 15 dias após a inoculação, quando se completou o período de latência, que corresponde ao número de dias desde a inoculação até que 50% das pústulas apresentem esporulação. O diagnóstico foi realizado pela observação visual das lesões em ambas as faces das folhas primárias, utilizando como auxílio o diagrama de representação gráfica desenvolvido por CASTAÑO (1985) (Figura 1). Avaliou-se planta por planta. Todos os graus apresentados foram registrados, tanto o predominante quanto os presentes em menor frequência. As variedades que apresentaram predominantemente grau 3 ou menor foram consideradas resistentes, e as que apresentaram predominantemente grau 4 ou maior, suscetíveis (STEADMAN *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Diagrama de representação gráfica utilizado na avaliação dos graus de reação do feijoeiro ao *U. appendiculatus*, agente causal da ferrugem (CASTAÑO, 1985). Escala: 1- ausência de sintomas (imune), 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro <300  $\mu\text{m}$ , 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300  $\mu\text{m}$  a 499  $\mu\text{m}$ , 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500  $\mu\text{m}$  a 800  $\mu\text{m}$ , e 6- pústulas esporulando com diâmetro >800  $\mu\text{m}$ .

## 2.5. Designação das raças fisiológicas

Foram considerados como pertencentes à mesma raça os isolados que incitaram um mesmo padrão de reações frente às 12 variedades da série diferenciadora.

As raças fisiológicas foram designadas com base no sistema binário de nomenclatura proposto por STEADMAN *et al.* (2002), o qual se assemelha ao utilizado atualmente para a nomenclatura das raças do fungo *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro comum (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995). Este sistema se caracteriza pela separação, por meio de um hífen, dos valores obtidos com a avaliação das diferenciadoras de origem Andina e Mesoamericana que compõem a série (Andinas: 1- Early Gallatin, 2- Redlands Pioneer, 4- Montcalm, 8- PC-50, 16- GG Wax, 32- PI 260418; Mesoamericanas: 1- GN 1140, 2- Aurora, 4- Mexico 309, 8- Mexico 235, 16- CNC, 32- PI 181996). Na nomenclatura atribuída às raças, o primeiro número foi obtido pela soma dos valores binários referentes às variedades Andinas que se comportaram como suscetíveis. Já o segundo número, após o hífen, foi dado pela soma dos valores binários das variedades Mesoamericanas também suscetíveis.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os graus de reação apresentados pelas variedades diferenciadoras frente aos isolados monopustulares de *U. appendiculatus* classificados neste estudo podem ser visualizados na Tabela 1. O uso da nova série diferenciadora internacional e do sistema binário de nomenclatura classificou em sete raças fisiológicas distintas os 12 isolados avaliados (Tabela 2).

As raças 21-3, 29-3, 53-3, 53-19 e 63-19 foram pouco freqüentes na região, sendo representadas por apenas um isolado cada. Já as raças 61-3 e 63-3 foram as mais freqüentes, sendo representadas, respectivamente, por cinco e dois isolados.

Além da testemunha Ouro Negro, as diferenciadoras de origem Mesoamericana Mexico 309, Mexico 235 e PI 181996 foram resistentes a todos os isolados testados. A variedade CNC foi incompatível com dez dos 12 isolados, sendo suscetível apenas aos isolados 2 e 7 (raças 63-19 e 53-19, respectivamente). As outras duas diferenciadoras Mesoamericanas complementares à série, GN 1140 e Aurora, foram compatíveis com todos os isolados.

Com relação às diferenciadoras pertencentes ao *pool* gênico Andino, Early Gallatin, Montcalm e GG Wax foram suscetíveis a todos os isolados, assim como a testemunha US Pinto 111. Redlands Pioneer foi compatível apenas com os isolados 2 (raças 63-19), 9 e 13 (raça 63-3). PC-50 foi resistente aos isolados C, 7 e 8 (raças 21-3, 53-19 e 53-3, respectivamente) e suscetível aos demais. PI 260418 foi incompatível somente com os isolados C e 10 (raças 21-3 e 29-3, respectivamente).

As variedades Redlands Pioneer, PC-50, PI 260418 e CNC foram imprescindíveis para a classificação dos isolados avaliados neste trabalho, uma vez que possibilitaram a diferenciação efetiva entre eles. As demais variedades complementares à série apresentaram o mesmo tipo de reação (resistência ou suscetibilidade) frente cada um 12 isolados testados (Tabela 2).

**Tabela 1.** Graus de reação das variedades de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) diferenciadoras para o fungo *Uromyces appendiculatus*, e das testemunhas, a isolados monopustulares do patógeno coletados no estado de Minas Gerais

Variedade Diferenciadora <sup>†</sup>	Graus de Reação aos Isolados de <i>U. appendiculatus</i> <sup>‡</sup>											
	Patótipos <sup>§</sup>											
	C	1	2	4	6	7	8	9	10	11	12	13
Early Gallatin	4(12), 3(8)	6(17), 2(3)	6(17), 3(3)	5(9), 6(7), 4(4)	6(18), 5(2)	4(14), 6(6)	6(18), 3(2)	6(13), 5(7)	6(20)	6(15), 5(3), 4(2)	6(15), 5(5)	4(16), 6(4)
Redlands Pioneer	3(15), 5(5)	1(8), 2(6), 3(6)	4(15), 3(3), 2(2)	3(14), 4(6)	3(16), 4(4)	1(13), 4(7)	1(11), 2(9)	6(9), 4(8), 2(3)	1(12), 4(5), 2(3)	2(12), 4(8)	2(12), 4(6), 5(2)	4(14), 2(6)
Montcalm	5(20)	6(16), 4(2), 5(2)	6(18), 5(2)	6(20)	6(20)	6(17), 2(3)	6(20)	6(13), 4(5), 5(2)	6(20)	6(12), 5(8)	6(14), 5(6)	6(20)
PC-50	3(20)	4(14), 3(6)	6(9), 5(8), 3(3)	4(17), 5(3)	6(12), 4(6), 5(2)	3(13), 1(7)	2(16), 3(4)	5(16), 3(4)	5(20)	5(16), 3(4)	6(17), 2(3)	4(10), 5(10)
GG Wax	6(20)	6(15), 5(5)	6(16), 5(4)	6(20)	6(20)	5(11), 6(9)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)
PI 260418	3(20)	6(16), 2(4)	5(15), 3(5)	5(12), 3(6), 4(2)	4(12), 6(8)	4(14), 2(6)	5(15), 3(5)	6(11), 4(9)	3(11), 4(6), 2(3)	5(18), 3(2)	5(14), 3(4), 4(2)	6(10), 4(6), 3(4)
GN 1140	4(20)	6(15), 5(5)	5(16), 4(3), 1(6)	6(20)	6(13), 5(7)	6(13), 4(7)	6(9), 4(6), 5(5)	6(14), 5(4), 3(2)	6(20)	6(16), 2(4)	6(20)	6(13), 3(4), 4(3)
Aurora	6(20)	6(14), 5(6)	6(20)	6(20)	6(20)	6(15), 4(5)	6(13), 5(7)	6(120), 5(8)	6(20)	6(20)	6(20)	4(10), 6(10)
Mexico 309	1(20)	1(20)	1(20)	1(19), 2(1)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)	1(18), 2(2)	1(20)	1(20)
Mexico 235	1(8), 2(12)	1(17), 2(3)	1(20)	1(14), 2(6)	1(15), 2(5)	1(20)	1(20)	1(19), 3(1)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)
CNC	2(20)	1(10), 4(6), 3(4)	5(15), 2(5)	2(8), 1(7), 4(5)	2(11), 4(9)	4(16), 2(4)	1(18), 4(2)	2(13), 1(4), 4(3)	1(9), 3(7), 2(4)	1(12), 4(8)	2(14), 4(6)	1(12), 4(8)
PI 181996	1(20)	1(19), 2(1)	1(20)	1(20)	1(20)	1(19), 2(1)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)	1(17), 2(3)
Ouro Negro <sup>a</sup>	3(16), 4(4)	1(17), 2(3)	2(14), 3(6)	2(14), 3(6)	1(11), 2(5), 3(4)	1(20)	1(20)	1(20)	1(14), 3(6)	1(18), 3(2)	1(16), 3(4)	1(16), 3(4)
US Pinto 111 <sup>b</sup>	6(20)	6(13), 5(7)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)	6(20)	6(16), 5(4)	6(20)	6(20)	6(20)

<sup>†</sup>Variedades pertencentes à série diferenciadora internacional proposta por STEADMAN *et al.* (2002); <sup>a</sup>testemunha resistente; <sup>b</sup>testemunha suscetível.

<sup>‡</sup>Reação resistente: predominância de grau 3 ou menor; reação suscetível: predominância de grau 4 ou maior (Figura 1); onde aparecem mais de um grau de reação, estes estão dispostos em ordem decrescente de prevalência; cada grau é acompanhado, entre parênteses, pelo número de plantas de cada variedade que o apresentaram.

<sup>§</sup>1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 refere-se à nomenclatura original dos patótipos previamente identificados por FALEIRO *et al.* (1999a); o patótipo C (Coimbra) foi recentemente coletado no referido município mineiro por pesquisadores do BIOAGRO/UFV.

**Tabela 2.** Classificação de raças fisiológicas do fungo *Uromyces appendiculatus* com base na série diferenciadora internacional e no sistema binário de nomenclatura propostos por STEADMAN *et al.* (2002)

Pool Gênico	Valor Binário	Variedade Diferenciadora (Gene de Resistência)	Reação <sup>†</sup>											
			Isolados Monopustulares de <i>U. appendiculatus</i> <sup>‡</sup>											
			C	1	2	4	6	7	8	9	10	11	12	13
Andino	1	Early Gallatin ( <i>Ur-4</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	R. Pioneer ( <i>Ur-13</i> )	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	4	Montcalm ( <i>Ur-?</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	PC-50 ( <i>Ur-9, Ur-12</i> )	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	16	GG Wax ( <i>Ur-6</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	32	PI 260418 ( <i>Ur-?</i> )	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mesoamericano	1	GN 1140 ( <i>Ur-7</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	Aurora ( <i>Ur-3</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	Mexico 309 ( <i>Ur-5</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	Mexico 235 ( <i>Ur-3</i> <sup>+</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	CNC ( <i>Ur-?</i> )	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	32	PI 181996 ( <i>Ur-11</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nomenclatura das Raças			21-3	61-3	63-19	61-3	61-3	53-19	53-3	63-3	29-3	61-3	61-3	63-3

<sup>†</sup>Reação compatível (+) e incompatível (-).

<sup>‡</sup>Os isolados 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 correspondem aos patótipos previamente identificados por FALEIRO *et al.* (1999a).

A utilização da série diferenciadora e do sistema binário de nomenclatura para raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, propostos por STEADMAN *et al.* (2002), poderá servir como subsídio para a elaboração de uma metodologia de classificação internacionalmente padronizada. Isso facilitaria o processo de identificação e designação das raças, e também, o intercâmbio de informações e o uso cooperativo dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo. Nesse intuito, e utilizando este mesmo procedimento, reclassificações de isolados do referido patógeno originados dos EUA, da África do Sul, de Honduras, da Argentina e de Moçambique já foram realizadas (STEADMAN *et al.*, 2002; ACEVEDO *et al.*, 2004; JOCHUA *et al.*, 2004).

Neste trabalho duas raças foram representadas por diferentes isolados (Tabela 2). Este resultado diverge dos obtidos por FALEIRO *et al.* (1999a), os quais classificaram em 11 raças fisiológicas distintas, onze dos 12 patótipos de *U. appendiculatus* classificados neste estudo. Essa divergência pode ser explicada, principalmente, pela alteração das variedades que foram utilizadas como diferenciadoras. Além disso, pela redução do número de graus de reação de 37 para dois e pelo novo isolamento monopustular realizado no presente trabalho.

Estudos de diversidade genética entre esses mesmos 11 isolados, com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), demonstraram alta variabilidade entre eles (FALEIRO *et al.*, 1998). As distâncias genéticas obtidas variaram de 9,6 a 83,12%. A análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo, baseada em um dendrograma com 40% de distância relativa, dividiu os 11 isolados em quatro grupos distintos.

Outra possível causa da incongruência entre a classificação realizada neste estudo e a realizada por FALEIRO *et al.* (1999a), é a subjetividade da escala de sintomas usada por estes últimos autores, a qual foi proposta no “The Bean Rust Workshop” por STAVELY *et al.* (1983). Tal subjetividade já foi mencionada por FALEIRO *et al.* (1999b). O presente trabalho adotou a escala codificada em apenas duas classes de reação, resistente (predominância de graus de 1 a 3) e suscetível (predominância de graus de 4 a 6) (STEADMAN *et al.*, 2002). Entretanto, mesmo essa escala, que supera outras já desenvolvidas no que se

refere à subjetividade, também apresenta problemas quanto à distinção entre os graus limiares 3 e 4 (Figura 1). Isso dificulta a separação entre as classes resistente e suscetível, respectivamente. O diagnóstico preciso destas classes é imprescindível para a correta classificação de raças com base no procedimento proposto por STEADMAN *et al.* (2002).

No intuito de reduzir este problema, propõe-se que a determinação das classes de resistência e suscetibilidade seja modificada de modo a facilitar os seus diagnósticos. A classe de resistência poderia compreender apenas os graus de reação 1 e 2, sendo caracterizada desta forma pela ausência de uredosporos nas plantas avaliadas (Figura 1), o que facilitaria a detecção das reações incompatíveis. Com isso, o grau de reação 3, bem como os graus 4, 5 e 6 determinariam a classe de suscetibilidade, assim convencionada pela presença de uredosporos no tecido foliar infectado (Figura 1). O fato de virulência *vs.* avirulência (graus 1 e 2 *vs.* graus 3, 4, 5 e 6) ser uma característica qualitativa, pouco influenciada pelo ambiente, e agressividade (grau 3 *vs.* grau 4 *vs.* grau 5 *vs.* grau 6) ser uma característica quantitativa, mais sensível aos fatores ambientais, faz com que seja coerente essa proposta de modificação das classes de resistência e suscetibilidade.

A adoção dessa proposta poderia colaborar com a maior fidedignidade nas classificações das raças de *U. appendiculatus*, pelo fato de reduzir possíveis erros de avaliação decorrentes das distintas condições ambientais nas quais as diferenciadoras podem ser avaliadas, os quais já foram mencionados por SANTOS e RIOS (2000). Utilizando esse critério de avaliação, bem como a série diferenciadora e o sistema de nomenclatura sugeridos por STEADMAN *et al.* (2002), os 12 isolados classificados neste trabalho seriam reorganizados em cinco raças distintas, são elas: 53-3 (isolado 8), 61-3 (isolados 1, 10, 11 e 12), 61-19 (isolado 7), 63-3 (isolados C, 4, 6, 9 e 13) e 63-19 (isolado 2).

Uma importante contribuição deste trabalho foi a identificação de patótipos com uso potencial durante o processo de piramidação, ou seja, a detecção de raças capazes de discriminar distintos genes de resistência com base na compatibilidade diferencial por eles apresentada frente às raças. Como

exemplo, considerando a piramidação dos genes de resistência presentes nas diferenciadoras Redlands Pioneer (*Ur-13*) e CNC (*Ur-?*), os quais conferem amplo espectro no Brasil (SOUZA *et al.*, 2005), as raças 53-19 e 63-3 (Tabela 2) poderiam ser usadas, respectivamente, para a identificação de genótipos que contenham simultaneamente estes dois genes. O gene *Ur-13* confere resistência a 11 patótipos de *U. appendiculatus* identificados no estado de Goiás e a 23 caracterizados nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Já o gene ainda não caracterizado presente na variedade CNC (*Ur-?*), também conferiu resistência aos mesmos 11 isolados caracterizados em Goiás e aos sete avaliados em Minas Gerais por SOUZA *et al.* (2005).

Também foram demonstradas as reações nunca antes relatadas das diferenciadoras Montcalm, PC-50, PI 260418, GN 1140 e PI 181996 frente a isolados brasileiros de *U. appendiculatus* (Tabela 2). Estes dados auxiliarão os estudos de distribuição geográfica do patógeno.

Fontes promissoras para uso em programas de melhoramento que visam desenvolver cultivares resistentes à ferrugem e adaptados ao estado de Minas Gerais foram também identificadas. Além de Ouro Negro, fonte mais usada no país, as variedades Mexico 309, Mexico 235 e PI 181996 foram incompatíveis com todos os 12 isolados caracterizados (Tabela 1). CNC também apresentou um bom espectro de resistência, sendo suscetível a apenas dois isolados (Tabela 1). Desta maneira, sugere-se que estas fontes sejam preferencialmente usadas como doadoras de genes para o controle genético da ferrugem nesta região.

MACLEAN *et al.* (1995) e SANDLIN *et al.* (1999) demonstraram a especialização da virulência de *U. appendiculatus* ao *pool* Andino de *P. vulgaris*, mas também a existência de isolados não específicos, os quais são compatíveis com os dois *pools* gênicos do feijoeiro, Andino e Mesoamericano. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as raças fisiológicas amostradas no estado de Minas Gerais foram compatíveis com as variedades pertencentes a ambos os *pools* gênicos (Tabela 1). Com isso, pode-se deduzir que os isolados classificados neste trabalho pertencem ao grupo dos não específicos.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Doze isolados monopustulares de *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro comum, oriundos do estado de Minas Gerais foram classificados com base na série diferenciadora internacional e no sistema binário de nomenclatura propostos no “3<sup>rd</sup> Bean Rust International Workshop”, realizado em 2002 na África do Sul. Tais isolados são utilizados nas avaliações dos genótipos resistentes à ferrugem desenvolvidos pelo programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV.

O procedimento utilizado classificou em sete raças fisiológicas distintas os 12 isolados avaliados. As raças 21-3, 29-3, 53-3, 53-19 e 63-19 foram pouco freqüentes, sendo representada por apenas um isolado cada. Já as raças 61-3 e 63-3, representadas por cinco e dois isolados, respectivamente, foram as mais freqüentes na região. Espera-se com a adoção desse novo procedimento corroborar a padronização da classificação de raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, facilitando assim o intercâmbio de informações e o uso cooperativo dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo. Contudo, em face à dificuldade encontrada em distinguir os graus de reação ao patógeno limiares para a separação entre as classes de resistência e suscetibilidade, foi proposta uma modificação no diagnóstico da doença. Propõe-se que resistência seja caracterizada pela ausência de uredosporos nas plantas avaliadas, sendo a suscetibilidade, portanto, convencionada pela presença de uredosporos no tecido foliar infectado. Utilizando o critério de avaliação da doença proposto neste trabalho, os 12 isolados de *U. appendiculatus* seriam classificados em cinco raças distintas: 53-3, 61-3, 61-19, 63-3 e 63-19.

As diferenciadoras Mexico 309, Mexico 235 e PI 181996 foram incompatíveis com todos os isolados caracterizados. Desta maneira, sugere-se que estas variedades sejam preferencialmente usadas como fontes de resistência à ferrugem pelos programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares adaptados ao estado de Minas Gerais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, M., ALLEYNE, A.T., FENTON, J., STEADMAN, J.R. Phenotypic and genotypic variation in *Uromyces appendiculatus* from regions of commercial production and centers of common bean domestication. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:115-116, 2004.
- AUGUSTIN, E., COSTA, J.G.C. Levantamento de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli typica* no Rio Grande do Sul e Santa Catarina em 1968 e 1969. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 6:137-138, 1971.
- AUGUSTIN, E., COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli typica* Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 97:526-529, 1972.
- BALLANTYNE, B.J. **The genetic bases of resistance to rust, caused by *Uromyces appendiculatus* in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. New South Wales: University of Sydney. Sydney, Australia, 1978. 262p. (PhD Thesis)
- CARRIJO, I.V., CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. Reação de vinte e cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a trinta e nove raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 5:245-255, 1980.
- CASTAÑO, J. **Manual standar para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol**. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1985.
- COELHO, R.S.B., CHAVES, G.M. Comparação de dois métodos de amostragem na identificação de raças de *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Experientiae**, 19:149-186, 1975.
- COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Genetic and breeding strategy for resistance to rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 24:795-803, 1975.
- CRISPÍN, A., DONGO, S.L. New physiologic races of bean rust *Uromyces phaseoli typica* from Mexico. **Plant Disease**, 46:411-413, 1962.
- DAVISON, A.D., VAUGHAN, E.K. A simplified method for identification of races of *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*. **Phytopathology**, 53:456-459, 1963.
- DIAS FILHA, I., COSTA, J.G.C. Identificação de raças fisiológicas da ferrugem (*Uromyces phaseoli typica*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 3:165-170, 1968.

- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus* utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 23:386-390, 1998.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24:166-169, 1999a.
- FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sistema simplificado para nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 24:540-545, 1999b.
- FISHER, H.H. New physiologic races of bean rust (*Uromyces phaseoli typica*). **Plant Disease**, 36:103-105, 1952.
- HARTER, L.L., ZAUMEYER, W.J. Differentiation of physiological races of *Uromyces phaseoli typica* on bean. **Journal Agricultural Research**, 62:717-731, 1941.
- JESUS JUNIOR, W.C., VALE, F.X.R., MARTINEZ, C.A., COELHO, R.R., COSTA, L.C., HAU, B., ZAMBOLIM, L. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Photosynthetica**, 39:603-606, 2001.
- JOCHUA, C.N., STEADMAN, J.R., AMANE, M.I.V., FENTON, J.G. Pathotype variation and sources of resistance to the common bean rust pathogen in Southern Mozambique. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:113-114, 2004.
- JUNQUEIRA NETTO, A., ATHOW, K.L., VIEIRA, C. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* no estado de Minas Gerais. **Revista Ceres**, 16:1-9, 1969.
- KELLY, J.D., HALEY, S.D., AFANADOR, L., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 37:15-16, 1994.
- LINDGREN, D.T., ESCRIDGE, K.M., STEADMAN, J.R., SCHAAF, D.M. A model for dry bean yield loss due to rust. **Hort Technology**, 5:35-37, 1995.
- MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., IRWIN, J.A.G., MANNERS, J.M., GROTH, J.V. Random amplified polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, 85:757-765, 1995.
- 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**, 85:745-749, 1993.

- MORA-NUÑES, O.A., VIEIRA, C., ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, 39:391-404, 1992.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *P. griseola* con el frijol comun en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19:15-23, 1995.
- PEREIRA, A.A., CHAVES, G.M. Differential varieties and a ternary system of nomenclature to designate races of *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 20:85-86, 1977.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596, 2003.
- SANDLIN, C.M., STEADMAN, J.R., ARAYA, C.M., COYNE, D.P. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. **Plant Disease**, 83:108-113, 1999.
- SANTOS, S.C., RIOS, G.P. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* nos estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 25:607-611, 2000.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, 30:143-149, 2005.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:iv-vi, 1983.
- STAVELY, J.R. Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. **Plant Disease**, 68:95-99, 1984.
- STAVELY, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In: SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2ed. Cali: CIAT. Cali, Colombia, 1989. p.159-194.
- STAVELY, J.R., STEADMAN, J.R., MCMILLAN JUNIOR, R.T. New pathogenic variability in *Uromyces appendiculatus* in North America. **Plant Disease**, 73:428-432, 1989.
- STEADMAN, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A., BEAVER, J.S. An overview of the 3<sup>rd</sup> bean rust and 2<sup>nd</sup> bean common bacterial blight international workshops, march 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:120-125, 2002.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastratrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Experientia**, 17:151-184, 1974.

ZÚÑIGA, R.Y.E., VICTORIA, J.I. Determinación de las razas fisiológicas de la roya del frijol (*Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth.) en el Valle del Cauca. **Acta Agronomica**, 25:75-85, 1975.

## CAPÍTULO 2

### PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM FEIJÃO DO TIPO CARIOCA

#### 1. INTRODUÇÃO

Os feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) com grãos do tipo carioca são os mais consumidos no Brasil, ocupando lugar de destaque no mercado nacional e nas pesquisas visando melhores níveis de produtividade. Porém, tem sido verificado que a maioria dos cultivares com este tipo de grãos, recomendados para o plantio no país, não apresentam níveis satisfatórios de resistência a determinados patógenos, entre os quais se encontra o fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.], agente causal da ferrugem (FALEIRO *et al.*, 1996, 1999a, 2001a; RIOS *et al.*, 2001). Embora esta doença não possua ocorrência generalizada no Brasil, dependendo das condições climáticas, do estágio de desenvolvimento das plantas e do cultivar utilizado, sua incidência pode causar drásticas perdas na produtividade (JESUS JUNIOR *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2005). LINDGREN *et al.* (1995) estimaram que a cada 1% de aumento na severidade da ferrugem, ocorre um decréscimo de aproximadamente 19 kg/ha na produtividade.

O uso de variedades resistentes para o controle de fitopatógenos tem sido uma medida preferencialmente recomendada por ser eficiente, de menor custo e de fácil adoção pelos produtores, além de ser ecologicamente mais adequada. Por isso, trata-se do componente mais importante do manejo integrado da ferrugem, o qual abrange outras estratégias, como a eliminação dos restos culturais contaminados, a rotação de culturas e a pulverização com fungicidas (MIKLAS *et al.*, 1993; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998).

No melhoramento vegetal, os retrocruzamentos têm sido muito utilizados para transferir características simples e de alta herdabilidade, como resistência a doenças, para linhagens elites. Com este método, após cada ciclo, a proporção do genoma usado como doador de uma dada característica é reduzida, em média, pela metade. Logo, após cerca de cinco a sete retrocruzamentos, é possível recuperar o *background* genético recorrente, porém, contendo a característica de interesse. Além disso, o uso deste método permite reduzir o arraste de genes (*linkage drag*) indesejáveis durante o processo de transferência de alelos de resistência a partir de um material genético exótico (HARLAN e POPE, 1922; FEHR, 1987).

Em associação aos retrocruzamentos, marcadores moleculares podem ser usados para selecionar, a cada ciclo, os indivíduos com maior proporção do genoma recorrente, o que reduz o número de cruzamentos necessários para a introgressão da característica de interesse (YONG e TANKSLEY, 1989; OPENSHAW *et al.*, 1994; FALEIRO *et al.*, 2004). Portanto, com a adoção desse procedimento, é possível dinamizar e acelerar o processo de melhoramento como um todo.

Em face à grande variabilidade genética e fisiológica apresentada pelo fungo *U. appendiculatus*, tanto no Brasil (FALEIRO *et al.*, 1998; SANTOS e RIOS, 2000; SOUZA *et al.*, 2005) como em outras partes do mundo (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; GROTH *et al.*, 1995; SANDLIN *et al.*, 1999; PASTOR-CORRALES, 2001), a associação (piramidação) de genes que conferem incompatibilidade a este patógeno é sugerida como uma estratégia para a obtenção de resistência ampla e durável à ferrugem. O uso de cultivares com genes piramidados dificulta, ou retarda, o surgimento de genótipos virulentos do patógeno (COYNE e SCHUSTER, 1975; MIKLAS *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 1994; RAGAGNIN, 2004). Isso se deve ao fato de que a resistência monogênica, a mais amplamente usada pelos programas de melhoramento, pode ser facilmente suplantada em virtude do rápido surgimento de novas raças infecciosas do fungo (STAVELY *et al.*, 1989).

No programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais, cujos objetivos incluem o controle de doenças por meio da resistência genética, o gene *Ur-ON*, presente no cultivar Ouro Negro, vinha sendo utilizado como a única fonte de resistência à ferrugem (RAGAGNIN *et al.*, 2003; COSTA, 2004; FALEIRO *et al.*, 2004; RAGAGNIN, 2004; ARRUDA, 2005). No entanto, outras fontes têm sido testadas e caracterizadas. Com isso, foi verificado que a variedade diferenciadora Mexico 309 e a linhagem norte-americana Belmidak RR-3 tiveram um ótimo desempenho frente a patótipos do fungo *U. appendiculatus* provenientes de distintas localidades do estado de Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 1999b; FALEIRO *et al.*, 2001b; SOUZA *et al.*, 2005). Estudos de herança demonstraram que a resistência apresentada por estas fontes se comporta como do tipo monogênica, de efeito maior ou principal, sendo governada pelos locos *Ur-5* (Mexico 309) e *Ur-11* (Belmidak RR-3), ambos com interação intra-alélica de dominância completa (STAVELY, 1990; SOUZA *et al.*, 2002; DESSAUNE *et al.*, 2005). Testes de alelismo foram realizados e constatou-se a independência de *Ur-5* e *Ur-11* em relação a *Ur-ON* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004).

Com isso, no programa do BIOAGRO/UFV, retrocruzamentos foram utilizados para introgridir individualmente os genes de resistência *Ur-5* e *Ur-11* no cultivar comercial Rudá (grãos do tipo carioca), para a posterior piramidação destes genes e de *Ur-ON* no referido *background* genético. Em uma etapa inicial, foram obtidas sementes RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, derivadas dos cruzamentos Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*) e Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*).

Desta forma, um dos objetivos do presente trabalho foi avançar ciclos de retrocruzamentos a partir das sementes RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> previamente obtidas, usando Rudá como genitor recorrente. Com este procedimento espera-se obter linhagens contendo individualmente os genes *Ur-5* e *Ur-11*, e com boa recuperação do genitor recorrente Rudá; estabelecida em aproximadamente 98%. Visando acelerar este processo, nas populações de retrocruzamento avaliadas neste trabalho, entre os indivíduos resistentes, realizou-se a seleção quanto à maior

similaridade genética em relação à Rudá. Para esse fim, foi utilizada a técnica de *fingerprinting* molecular com base em polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*). Posteriormente, atendendo a outro objetivo deste trabalho, o material genético desenvolvido contendo individualmente *Ur-5* e *Ur-11* foi inter cruzado e, em seguida, com a linhagem Vi-4899 (grãos do tipo carioca, portadora do gene *Ur-ON*), no intuito de piramidar os referidos genes no *background* genético “carioca” do feijoeiro. Esta estratégia visa o desenvolvimento de cultivares com resistência durável, de amplo espectro, que contemplem as exigências do mercado consumidor e que sejam adaptados às condições ambientais brasileiras.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Introgessão individual dos genes *Ur-5* e *Ur-11* no cultivar Rudá

#### 2.1.1. Material genético e retrocruzamentos

Os genitores utilizados no programa de retrocruzamentos, assim como suas principais características, são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais características dos genitores utilizados no programa de retrocruzamentos

Material Genético <sup>†</sup>	Hábito de Crescimento	Tamanho dos Grãos	Tipo de Grãos	Origem <sup>‡</sup>
Rudá	Indeterminado (tipo II)	Médio	Carioca	MA
Mexico 309	Indeterminado (tipo III)	Médio	Preto	A/MA
Belmidak RR-3	Indeterminado (tipo II)	Pequeno	Branco	MA

<sup>†</sup>Rudá: genitor recorrente, suscetível à ferrugem; Mexico 309 (gene *Ur-5*) e Belmidak RR-3 (gene *Ur-11*): genitores doadores, resistentes à ferrugem.

<sup>‡</sup>A: andina; MA: mesoamericana.

O cultivar Rudá, genitor recorrente utilizado em todos os retrocruzamentos, foi desenvolvido a partir da hibridação entre os cultivares Carioca e Rio Tibagi pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1986), sendo introduzido no Brasil como linhagem A285 pela Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás (CNPAF, 1995). Rudá possui características agrônômicas e comerciais desejáveis, como grãos do tipo carioca (cor creme com estrias marrom claras, fundo claro, sem halo, grãos de tamanho médio e não achatados), bons aspectos culinários e nutricionais, além de boa produtividade. Entretanto, é suscetível a diversos patógenos, inclusive ao *U. appendiculatus*.

Os genitores doadores usados foram Mexico 309 e Belmidak RR-3, portadores dos genes *Ur-5* e *Ur-11*, respectivamente.

Mexico 309 é uma das variedades que integram o grupo de 19 diferenciadoras elaborado por STAVELY *et al.* (1983), permanecendo na nova série internacionalmente proposta por STEADMAN *et al.* (2002). FALEIRO *et al.* (1999b) demonstraram que Mexico 309 foi imune a nove e moderadamente resistente a dois dos 13 patótipos de *U. appendiculatus* isolados no estado de Minas Gerais. No trabalho de SOUZA *et al.* (2005), a estabilidade desta resistência frente aos sete patótipos mais virulentos identificados por FALEIRO *et al.* (1999b) foi confirmada. Mexico 309 também se mostrou incompatível com 11 patótipos do fungo oriundos do estado de Goiás (SANTOS e RIOS, 2000) e foi resistente aos isolados 1, 3 e 8, coletados no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão (RIOS *et al.*, 2001). Além disso, quando testado frente a isolados de *U. appendiculatus* mantidos na coleção fúngica do programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no *United States Department of Agriculture* (USDA), Beltsville, Maryland, EUA, Mexico 309 foi resistente a 73 dos 94 avaliados (PASTOR-CORRALES, 2001). No trabalho realizado por SANDLIN *et al.* (1999), este cultivar também se mostrou incompatível com patótipos do fungo *U. appendiculatus* isolados na Argentina, República Dominicana, Honduras e Jamaica.

A linhagem Belmidak RR-3 foi desenvolvida pelo USDA, em colaboração com as Estações de Experimentação Agrícola de Michigan, Nebraska e North Dakota, EUA. Sua genealogia é composta por: Mayflower (grãos do tipo branco, genitor recorrente), NX-040 (gene *I*) e PI 181996 (gene *Ur-11*). Com isso, além de resistente à ferrugem (*Ur-11*), Belmidak RR-3 também possui o gene *I*, o qual confere resistência ao vírus do mosaico comum (STAVELY *et al.*, 1994). O gene de resistência à ferrugem *Ur-11* merece destaque devido ao seu ótimo desempenho frente a patótipos de *U. appendiculatus* identificados em Minas Gerais, sendo resistente a todos com os quais foi testado, conforme demonstrado por FALEIRO *et al.* (2001b) e no CAPÍTULO 1. Este gene também se mostrou resistente a 89 dos 90 isolados de *U. appendiculatus* com os quais foi testado em atividades realizadas por pesquisadores do USDA (STAVELY *et al.*, 1994; MIKLAS, 2002a).

As sementes RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (Rudá x Mexico 309 e Rudá x Belmidak RR-3) utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas pelo programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV. A partir destas, foram selecionadas as plantas resistentes com maior recuperação do genitor recorrente Rudá, as quais foram utilizadas como doadoras de pólen para o ciclo de retrocruzamentos seguinte.

Em todos os casos, os cruzamentos artificiais foram realizados em casa de vegetação, e as análises moleculares, no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

### **2.1.2. Inoculação com *U. appendiculatus* e avaliação da doença**

Em todos os ciclos de retrocruzamentos, a identificação dos indivíduos resistentes foi realizada após inoculações artificiais utilizando patótipos de *U. appendiculatus* isolados no estado de Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 1999b). No processo seletivo da população RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, anteriormente realizado por pesquisadores do BIOAGRO/UFV, foi utilizado o patótipo 6. Já na avaliação das populações RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>, realizada neste trabalho, foi usada uma mistura equitativa de uredosporos de vários patótipos (2, 6, 8 e 12 e 2, 6, 9, 10 e 13, respectivamente).

As inoculações foram realizadas conforme a metodologia proposta por CARRIJO *et al.* (1980). O inóculo foi preparado com água destilada contendo 0,05% de Tween 20, visando uma melhor dispersão dos esporos, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  uredosporos/mL. A inoculação foi realizada quando as folhas primárias das plantas apresentavam aproximadamente dois terços do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. O inóculo foi aspergido em ambas as superfícies foliares. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para a câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $>95\%$ ), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo ajustado para 12 horas. Após esse procedimento, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram até serem avaliadas, aos 15 dias após a inoculação.

A avaliação do grau de reação ao patógeno foi realizada com o auxílio do diagrama de representação gráfica desenvolvido por CASTAÑO (1985), o qual considera seis tipos de infecção. Os graus foram determinados mediante a observação visual dos sintomas em ambas as faces das folhas inoculadas. As plantas que apresentaram graus 1, 2 ou 3 (ausência de sintomas visíveis, lesões sem esporulação e/ou esporulando com menos de 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foram classificadas como resistentes, sendo assim selecionadas, e as com graus de 4 a 6 (lesões esporulando com diâmetro maior ou igual a 300  $\mu\text{m}$ ) foram consideradas suscetíveis, sendo, portanto, descartadas.

### **2.1.3. Análise de *fingerprinting* molecular**

Nas populações de retrocruzamento avaliadas no presente trabalho,  $\text{RC}_2\text{F}_1$  e  $\text{RC}_3\text{F}_1$  (Rudá x Mexico 309 e Rudá x Belmidak RR-3), os indivíduos resistentes foram submetidos à seleção quanto à maior similaridade genética em relação ao genitor recorrente Rudá, a qual foi determinada usando a técnica de *fingerprinting* molecular com base em marcadores RAPD. Este critério de seleção foi empregado com o objetivo de acelerar a recuperação do *background* genético recorrente no processo de introgressão individual dos genes de resistência à ferrugem *Ur-5* e *Ur-11* no cultivar Rudá.

Folhas dos genitores e das plantas  $\text{RC}_2\text{F}_1$  e  $\text{RC}_3\text{F}_1$  avaliadas como resistentes foram coletadas e mantidas a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de DNA, a qual foi realizada pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme o protocolo descrito por DOYLE e DOYLE (1990), adotando, entretanto, algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995). A amplificação de DNA pela técnica RAPD foi realizada com base na metodologia usada por VASCONCELOS *et al.* (1996). Cada ciclo de amplificação dos fragmentos de DNA foi constituído de uma etapa de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por 15 s, uma etapa de pareamento do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) ao DNA molde, a  $35^\circ\text{C}$  por 30 s, e uma etapa de extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 1 min. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a  $72^\circ\text{C}$  por 7 min. Cada reação

de amplificação com 25 µL continha 30 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM/50 mM de Tris-HCl/KCl (pH 8,3), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase, e 0,4 µM de um dos *primers* decâmeros utilizados (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA).

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3,0 µL de corante tipo IV (0,25% de azul de bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, submerso em TBE (Tris-Borato 90mM, EDTA 1mM, pH 8,0), a 120 volts por aproximadamente 3 horas. Ao término desse processo, os produtos de amplificação contidos nos géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em aparelho Eagle Eye II (Stratagene).

Na avaliação da similaridade genética em relação ao genitor recorrente Rudá, realizada em cada uma das distintas populações, foram utilizados 13 *primers* RAPD tomados ao acaso. Somente os produtos de amplificação de fácil visualização e distinção foram usados no estudo de *fingerprinting* molecular.

As bandas de DNA monomórficas e polimórficas detectadas entre os genótipos avaliados foram codificadas em uma matriz de valores binários, onde a codificação 0 (zero) significou ausência da banda e 1 (um), a presença.

Utilizou-se o Programa Genes versão Windows (CRUZ, 2001) para calcular as estimativas de similaridade genética ( $SG_{ij}$ ), com base no coeficiente de coincidência simples, dividindo-se o número total de encontros de presença (1-1) e ausência (0-0) de bandas comuns a dois dados indivíduos pelo número total de bandas analisadas:

$$SG_{ij} = (a + d) \div (a + b + c + d)$$

Sendo que:

$SG_{ij}$  – similaridade genética entre os genótipos  $i$  e  $j$ ;

$a$  – total de coincidências do tipo 1-1 para cada par de genótipos;

$b$  – total de discordâncias do tipo 1-0 para cada par de genótipos;

$c$  – total de discordâncias do tipo 0-1 para cada par de genótipos;

$d$  – total de coincidências do tipo 0-0 para cada par de genótipos.

A similaridade genética foi tomada como sendo igual a zero entre o genitor recorrente Rudá e os genitores doadores Mexico 309 e Belmidak RR-3. As demais foram corrigidas proporcionalmente.

## 2.2. Piramidação

### 2.2.1. Material genético

O material genético utilizado no processo de piramidação dos genes de resistência à ferrugem no cultivar Rudá encontra-se descrito na Tabela 2. Esse material foi obtido por retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares.

**Tabela 2.** Características do material genético utilizado como doador de genes de resistência à ferrugem no processo de piramidação

Material Genético	Genealogia	Gene de Resistência	Tipo de Grãos
Plantas RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	Rudá x Mexico 309	<i>Ur-5</i>	Carioca
Plantas RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	Rudá x Belmidak RR-3	<i>Ur-11</i>	Carioca
Linhagem Vi-4899	Rudá x Ouro Negro	<i>Ur-ON</i>	Carioca

As plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> derivadas dos cruzamentos Rudá x Mexico 309 e Rudá x Belmidak RR-3, portadoras dos genes *Ur-5* e *Ur-11*, respectivamente, foram obtidas pelo presente trabalho. Já a linhagem Vi-4899, a qual possui o gene *Ur-ON* (cultivar Ouro Negro), foi desenvolvida por FALEIRO *et al.* (2004), em atividades realizados no programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV. Esta linhagem além de ser resistente à ferrugem e possuir grãos do tipo carioca, também é portadora do gene *Co-10* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003; FALEIRO *et al.*, 2004), o qual confere resistência à antracnose do feijoeiro.

O gene *Ur-ON* do cultivar Ouro Negro, fonte de resistência ao *U. appendiculatus* mais usada no país, mostrou-se incompatível com todos os patótipos do fungo identificados em Minas Gerais por FALEIRO *et al.* (1999b), além de ser moderadamente resistente a populações do patógeno amostradas nos

estados de Goiás, Bahia, Paraná e São Paulo (RIOS *et al.*, 2001). Segundo comunicação pessoal do Dr. J. R. Stavely, citada por ALZATE-MARIN *et al.* (2004), quando testado com 24 dos 94 isolados do fungo *U. appendiculatus* preservados na micoteca do USDA, *Ur-ON* conferiu resistência a 23 deles. O cultivar Ouro Negro tem mantido sua incompatibilidade com a grande maioria dos patótipos com os quais tem sido testado desde a sua introdução no Brasil (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998; VIEIRA *et al.*, 2005).

Quanto à produtividade de grãos, Vi-4899 obteve média estatisticamente similar a de seus genitores, e também em relação ao cultivar Pérola, o mais plantado no Brasil, em experimentos realizados na região da Zona da Mata de Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 2004). Além disso, dentre um grupo de 12 genótipos, entre os quais se encontravam linhagens avançadas desenvolvidas por diferentes instituições de pesquisa do país e os cultivares Carioca e Pérola, Vi-4899 apresentou ampla adaptação e desempenho superior em diferentes ambientes da região Sul do Brasil (CARNEIRO *et al.*, 2003).

### **2.2.2. Validação de marcadores moleculares para a seleção assistida**

Tendo em vista que os genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* conferem resistência a todas as raças fisiológicas do fungo *U. appendiculatus* disponíveis na micoteca do BIOAGRO/UFV (CAPÍTULO 1), o monitoramento destes genes durante o processo de piramidação só poderia ser viabilizado via seleção assistida por marcadores moleculares. Para esse fim, marcas identificadas como ligadas a *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* (Tabela 3) foram testadas frente às fontes utilizadas como doadoras individuais de cada um destes genes (Tabela 2). Com isso, objetivou-se validar os marcadores capazes de discriminar cada gene em específico, os quais, desta forma, poderiam ser utilizados na seleção indireta dos alelos de resistência durante a piramidação.

**Tabela 3.** Marcadores moleculares RAPD (OP) e SCAR (S) ligados aos genes de resistência à ferrugem do feijoeiro usados no processo de piramidação

Marcador	Seqüência do <i>primer</i> (5' → 3')	Gene	Cultivar/Fonte	Distância (cM) <sup>†</sup>	TP (°C) <sup>‡</sup>	Referência
OPX11 <sub>550</sub>	GGAGCCTCAG	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	5,8 – A	35	FALEIRO <i>et al.</i> (2000)
OPF10 <sub>970</sub>	GGAAGCTTGG	<i>Ur-5</i>	B-190	8,9 – A	35	FALEIRO <i>et al.</i> (2003)
OPAC20 <sub>490</sub>	ACGGAAGTGG	<i>Ur-11</i>	PI 181986	2,1 – A	35	HALEY <i>et al.</i> (1993)
SF10 <sub>1.050</sub>	GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA GGAAGCTTGGCTATGATGGT	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	SR – A	35	JOHNSON <i>et al.</i> (1995)
SBA08 <sub>560</sub>	CCACAGCCGACGGAGGAG GCCATGTTTTTTGTCCCC	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	4,3 – A	65	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SI19 <sub>460</sub>	AATGCGGGAGTTCAATAGAAAAACC AATGCGGGAGATATTTAAAAGGAAAG	<i>Ur-5</i>	B-190 Mexico 309	6,0 – A	65	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SAE19 <sub>890</sub>	CAGTCCCTGACAACATAACACC CAGTCCCTAAAGTAGTTTGTCCCTA	<i>Ur-11</i>	Belmidak RR-3	SR – A	53	MELOTTO e KELLY (1998) DESSAUNE <i>et al.</i> (2005)
				1,0 – R	58	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004)

<sup>†</sup>(A): marcador ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência, (R): marcador ligado em fase de repulsão; (SR): sem recombinantes.

<sup>‡</sup>Temperatura de anelamento dos *primers*.

Assim, folhas das plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*) e Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*), de plantas da linhagem Vi-4899 (derivada do cruzamento Rudá x Ouro Negro, gene *Ur-ON*), e de seus genitores foram coletadas e delas extraiu-se o DNA, conforme a metodologia descrita no item 2.1.3. A amplificação do DNA pela técnica RAPD, a eletroforese em gel de agarose e a fotodocumentação dos produtos de amplificação foram realizadas de acordo com VASCONCELOS *et al.* (1996). Nas avaliações usando marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), os procedimentos foram os mesmos usados nos ensaios com a técnica RAPD, exceto com relação ao oligonucleotídeo iniciador, que foi substituído por 0,2 µM de cada *primer* específico. As temperaturas de anelamento usadas para cada par de *primers* SCAR encontram-se descritas na Tabela 3.

Os marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos genes de resistência à ferrugem *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* foram utilizados para viabilizar a seleção de plantas contendo alelos dominantes para os três referidos locos. Para tornar possível este processo, foi necessário realizar a extração de DNA dos indivíduos de todas as gerações obtidas, desde a derivada do cruzamento inicial entre plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*) e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*), até a geração F<sub>2</sub> proveniente do processo de piramidação.

### **2.2.3. Obtenção das populações segregantes**

Em uma primeira etapa foram realizados cruzamentos entre as fontes portadoras dos genes *Ur-5* e *Ur-11* (Tabela 2). Usando marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um destes genes, identificados durante o processo de validação, foram selecionadas, na população F<sub>2</sub> derivada deste cruzamento, plantas que possuíam alelos de resistência para ambos os locos. Tais plantas foram usadas como genitores femininos em cruzamentos com a linhagem Vi-4899, doadora do gene *Ur-ON* (Tabela 2). Com isso, plantas F<sub>1</sub> foram obtidas. Dentre estas, foram selecionados os híbridos triplos (genótipo *Ur-*

*5ur-5Ur-11ur-11Ur-ONur-ON*), os quais geraram a população F<sub>2</sub> da piramidação. Essa população também foi avaliada com marcadores moleculares para a identificação das plantas portadoras dos três alelos de resistência.

Em todos os casos, os cruzamentos artificiais foram realizados em casa de vegetação, e as análises moleculares, no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Introgessão individual dos genes *Ur-5* e *Ur-11* no cultivar Rudá

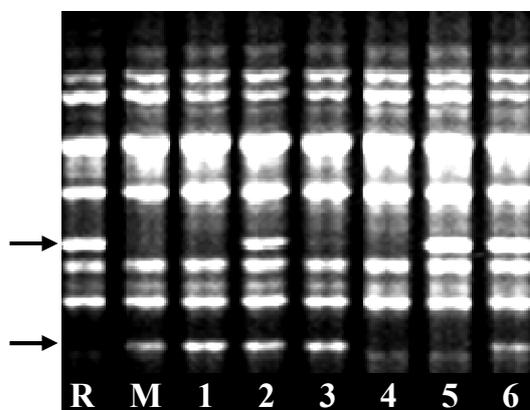
##### 3.1.1. Primeiro retrocruzamento

Em atividades anteriormente realizadas no programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV, foram obtidas 21 plantas  $RC_1F_1$  derivadas do cruzamento Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*). Quando inoculadas com o patótipo 6 (raça 61-3) de *U. appendiculatus*, sete se mostraram resistentes, as quais foram utilizadas como genitores masculinos no ciclo de retrocruzamentos subsequente. Com relação aos indivíduos  $RC_1F_1$  oriundos do cruzamento Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*), seis dos 17 avaliados foram classificados como incompatíveis com o patótipo 6, sendo, portanto, utilizados como doadores de pólen para o segundo ciclo de retrocruzamentos.

##### 3.1.2. Segundo retrocruzamento

Vinte e duas plantas  $RC_2F_1$  derivadas do cruzamento Rudá x Mexico 309 foram avaliadas com base na reação aos patótipos 2 (raça 63-19), 6 (raça 61-3), 8 (raça 53-3) e 12 (raça 61-3) de *U. appendiculatus*. Destas, seis se mostraram resistentes, as quais foram submetidas à análise de *fingerprinting* molecular. Tal análise foi realizada utilizando 13 *primers* RAPD escolhidos aleatoriamente, os quais geraram 93 produtos de amplificação, sendo 35 polimórficos e 58 monomórficos. Na Figura 1 podem ser observados os padrões das bandas de DNA dos seis referidos indivíduos, e dos genitores, obtidos por meio da amplificação com o *primer* OPF6. A avaliação da similaridade genética destas seis plantas  $RC_2F_1$  (Rudá x Mexico 309) em relação a Rudá demonstrou uma recuperação do *background* recorrente que variou de 86,8 a 94,3% (Figura 2A). Foram selecionados os indivíduos 28.1, 34.1 e 34.2 para comporem o ciclo de

retrocruzamentos seguinte, os quais tiveram recuperação de 88,7, 94,3 e 92,5%, respectivamente (Figura 2A).



**Figura 1.** Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA de indivíduos  $RC_2F_1$  (Rudá x Mexico 309) resistentes, e de seus genitores, usando o *primer* OPF6. As canaletas correspondem a: Rudá (R), Mexico 309 (M) e plantas  $RC_2F_1$  resistentes (1 a 6). As setas indicam as bandas consideradas como polimórficas.

Com relação à população  $RC_2F_1$  originada a partir do cruzamento Rudá x Belmidak RR-3, cinco dos 18 indivíduos avaliados foram selecionados também quanto à resistência aos patótipos 2, 6, 8 e 12 de *U. appendiculatus*. Estes, posteriormente, foram submetidas à análise de *fingerprinting* molecular. Os treze *primers* RAPD usados para esse fim, tomados ao acaso, geraram um total de 69 marcas de DNA, sendo 36 monomórficas e 33 polimórficas. Os resultados da análise de similaridade genética mostraram uma recuperação do *background* Rudá variando de 75,8 a 97,0% (Figura 3A). Foram selecionados para o terceiro retrocruzamento os indivíduos 2.1 e 2.6, os quais apresentaram recuperação de 97,0 e 87,9%, respectivamente (Figura 3A).

### 3.1.3. Terceiro retrocruzamento

Na população  $RC_3F_1$  obtida a partir dos indivíduos  $RC_2F_1$  (Rudá x Mexico 309) selecionados, sete das 33 plantas avaliadas foram incompatíveis com os patótipos 2 (raça 63-19), 6 (raça 61-3), 9 (raça 63-3), 10 (raça 29-3) e 13 (raça

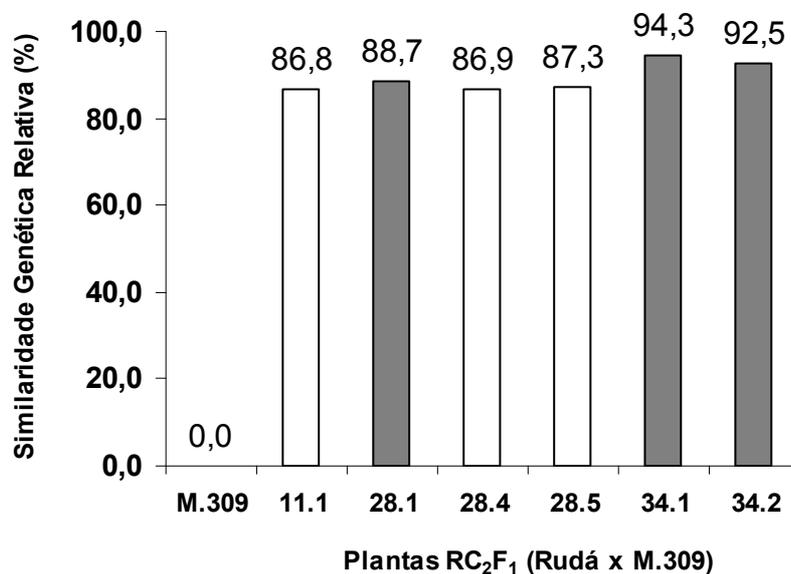
63-3) de *U. appendiculatus*, sendo, com isso, submetidas à análise molecular. Os 13 *primers* RAPD utilizados, escolhidos aleatoriamente, geraram 80 marcas de DNA, sendo que 39 foram polimórficas e 51 monomórficas. A recuperação do *background* Rudá, determinada pela análise de similaridade genética relativa, variou de 80,8 a 98,1% (Figura 2B). Foram selecionados os indivíduos 34.1.5 e 32.2.1, que tiveram recuperação de 97,6 e 98,1%, respectivamente (Figura 2B).

Vinte e duas plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (Rudá x Belmidak RR-3) foram também avaliadas quanto à reação aos patótipos 2, 6, 9, 10 e 13. Destas, as sete que se mostraram resistentes foram selecionadas. Na análise de *fingerprinting* molecular destas plantas, os 13 *primers* RAPD utilizados, tomados ao acaso, geraram 95 bandas de DNA, das quais 39 foram polimórficas e 56 monomórficas. A avaliação da similaridade genética demonstrou uma recuperação do genitor recorrente Rudá que variou entre 82,1 e 98,2% (Figura 3B). Foram selecionados os indivíduos 2.1.26 e 2.6.15, os quais tiveram recuperação de 98,2 e 97,4%, respectivamente (Figura 3B).

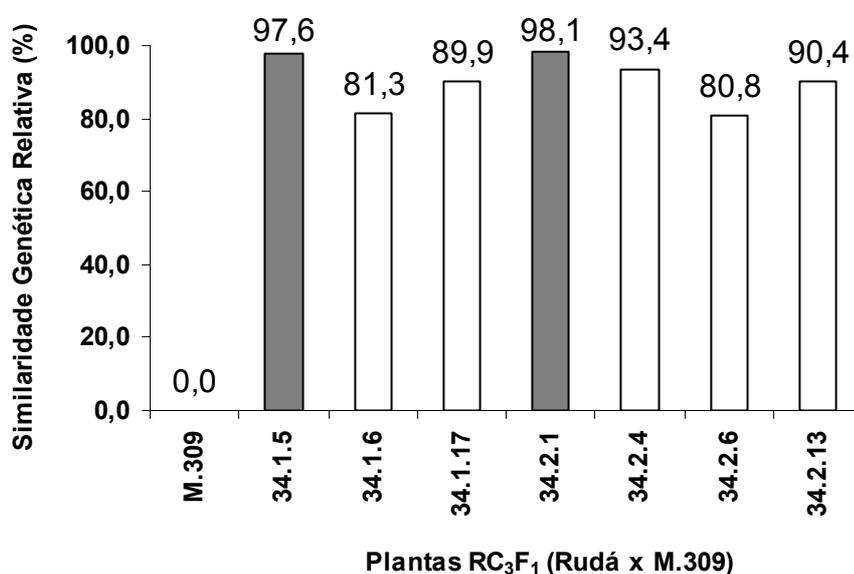
Após apenas três ciclos de retrocruzamentos, sendo os dois últimos assistidos por marcadores moleculares, foram desenvolvidas sementes genéticas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> portando individualmente os alelos de resistência à ferrugem *Ur-5* e *Ur-11*, e com boa recuperação do *background* genético carioca do cultivar Rudá; aproximadamente 98%, conforme objetivo estabelecido anteriormente.

Os resultados obtidos no presente trabalho vão de encontro aos relatados por FALEIRO *et al.* (2004). Esses autores introduziram no cultivar Rudá, após três retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares RAPD, o gene de resistência à ferrugem presente no cultivar Ouro Negro (*Ur-ON*). Além disso, os dados aqui apresentados também corroboram a proposta de OPENSHAW *et al.* (1994), a qual afirma que o número de retrocruzamentos necessários para a recuperação do genoma recorrente pode ser reduzido para até três, quando estes forem assistidos pela técnica de *fingerprinting* molecular. Com isso, nota-se que a utilização conjunta de marcadores moleculares com métodos convencionais de melhoramento dinamiza e acelera a introgressão de características simples e de alta herdabilidade, como resistência a doenças, em cultivares comerciais.

(A)

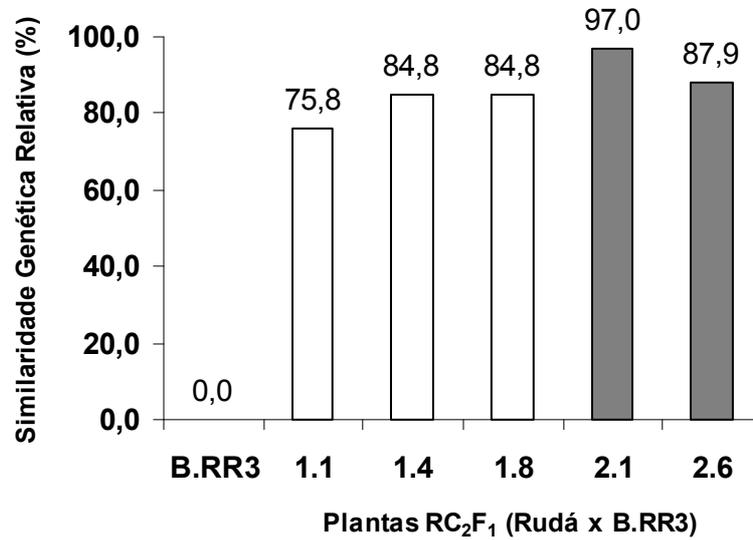


(B)

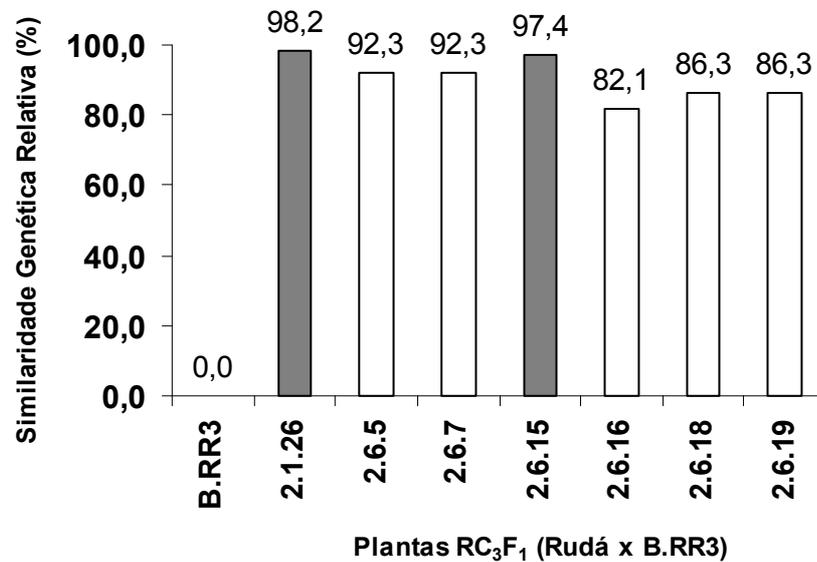


**Figura 2.** Similaridade genética relativa (%) de plantas  $RC_2F_1$  (A) e  $RC_3F_1$  (B) resistentes à ferrugem, e do genitor doador Mexico 309 (M.309), em relação ao genitor recorrente Rudá. As colunas em cinza correspondem às plantas com maior similaridade genética em relação a Rudá, as quais foram selecionadas.

(A)



(B)



**Figura 3.** Similaridade genética relativa (%) de plantas RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (A) e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (B) resistentes à ferrugem, e do genitor doador Belmidak RR-3 (B.RR3), em relação ao genitor recorrente Rudá. As colunas em cinza correspondem às plantas com maior similaridade genética em relação a Rudá, as quais foram selecionadas.

Outro aspecto relevante deste trabalho foi o fato da recuperação média do *background* Rudá, estimada com base na análise de *fingerprinting* molecular, ter sido coerente com a recuperação esperada considerando eventos de recombinação e a segregação independente dos cromossomos homólogos (Tabela 4). Com isso, pode-se inferir que a análise molecular realizada neste estudo, no que diz respeito ao número de *primers* RAPD utilizados e bandas de DNA avaliadas, foi eficiente para uma amostragem representativa do genoma recorrente.

**Tabela 4.** Parâmetros usados na estimação da similaridade genética relativa de plantas RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> resistentes à ferrugem, e dos genitores doadores Mexico 309 e Belmidak RR-3, em relação ao genitor recorrente Rudá

Parâmetro	Cruzamento/Geração			
	Rudá x Mexico 309		Rudá x Belmidak RR-3	
	RC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	RC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>
Número de <i>primers</i> RAPD <sup>†</sup>	13	13	13	13
Número total de bandas avaliadas <sup>‡</sup>	93	80	69	95
Número de bandas polimórficas	35	39	36	39
Número de bandas monomórficas	58	41	33	56
% Bandas polimórficas	37,6%	48,7%	52,2%	41,0%
Média da similaridade genética obtida pela análise de <i>fingerprinting</i> molecular	89,4%	90,2%	86,1%	90,7%
Similaridade genética esperada <sup>§</sup>	87,5%	93,7%	87,5%	93,7%

<sup>†</sup>Tomados ao acaso quando da análise de cada uma das distintas gerações.

<sup>‡</sup>Produtos de amplificação de fácil visualização e distinção.

<sup>§</sup>Obtida pelo estimador:  $[1 - (0,5)^{n+1}] \times 100$ , sendo "n" o número de ciclos de retrocruzamentos.

As plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> resistentes e com maior similaridade genética em relação ao genitor recorrente, obtidas a partir de ambos os cruzamentos (Figuras 2B e 3B), foram utilizadas como doadoras dos alelos *Ur-5* e *Ur-11* para a piramidação destes e de *Ur-ON* no *background* genético Rudá. As sementes RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, produzidas a partir das plantas mencionadas, foram coletadas e armazenadas no banco de germoplasma do BIOAGRO/UFV. A partir destas populações, em trabalhos futuros, espera-se obter linhagens individualmente homocigotas para os locos *Ur-5* e *Ur-11*, além de portadoras de grãos com o mesmo padrão dos produzidos por Rudá. Estas linhagens, após serem testadas

quanto à resistência e ao desempenho agrônômico, se superiores, poderão ser lançadas como novos cultivares.

### **3.2. Piramidação dos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON***

#### **3.2.1. Validação dos marcadores**

Os resultados da validação dos marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* são apresentados na Tabela 5. Para a seleção indireta destes genes durante sua piramidação no cultivar Rudá, foi demonstrado ser viável somente a utilização dos marcadores SI19<sub>460</sub> (*Ur-5*), SAE19<sub>890</sub> (*Ur-11*) e OPX11<sub>550</sub> (*Ur-ON*). Os outros marcadores avaliados não foram polimórficos entre as distintas fontes de resistência à ferrugem. Pelo fato de não serem específicos, apresentando resultados falsos positivos, estes não podem ser usados na seleção assistida dos genes de resistência com o quais estão associados quando da piramidação. MIKLAS *et al.* (2002b) já haviam relatado a ocorrência de resultados falsos positivos relacionados aos marcadores OPAC20<sub>490</sub> (*Ur-11*) e SF10<sub>1.050</sub> (*Ur-ON*). Neste trabalho, OPF10<sub>970</sub> (*Ur-5*) e SBA08<sub>560</sub> (*Ur-ON*) também se mostraram inespecíficos em relação às fontes utilizadas.

O programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV já vinha utilizando o marcador OPX11<sub>550</sub> para a seleção indireta do gene *Ur-ON* durante a sua introgressão conjunta com a de genes de resistência à antracnose e à mancha angular em linhagens de feijoeiro com grãos do tipo carioca e preto (RAGAGNIN, 2004; COSTA, 2004; ARRUDA, 2005). Esse marcador foi identificado por FALEIRO *et al.* (2000) como ligado em fase de acoplamento a 5,8 cM do gene *Ur-ON*, em uma população F<sub>2</sub> derivada do cruzamento US Pinto 111 x Ouro Negro. Posteriormente, foi avaliado em uma população de RILs derivada de Rudá x Ouro Negro, mostrando, neste caso, estar ligado a 8,9 cM de distância do loco *Ur-ON* (FALEIRO *et al.*, 2003).

**Tabela 5.** Resumo dos resultados obtidos com a amplificação do DNA de fontes de resistência à ferrugem, e do cultivar Rudá, usando marcadores moleculares RAPD (OP) e SCAR (S) ligados aos seus respectivos genes de resistência

Material Genético	Gene <sup>†</sup>	Marcador Molecular <sup>‡</sup>						
		OPX11 <sub>550</sub> <i>Ur-ON</i> (A)	OPF10 <sub>970</sub> <i>Ur-5</i> (A)	OPAC20 <sub>490</sub> <i>Ur-11</i> (A)	SF10 <sub>1,050</sub> <i>Ur-ON</i> (A)	SBA08 <sub>560</sub> <i>Ur-ON</i> (A)	SI19 <sub>460</sub> <i>Ur-5</i> (A)	SAE19 <sub>890</sub> <i>Ur-11</i> (R)
Plantas RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> (Rudá x Mexico 309)	<i>Ur-5</i> (ht)	-	+	+	+	+	+	+
Plantas RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> (Rudá x Belmidak RR-3)	<i>Ur-11</i> (ht)	-	-	+	-	-	-	+
Vi-4899 (Rudá x Ouro Negro)	<i>Ur-ON</i> (hm)	+	+	+	+	+	-	+
Rudá	*	-	-	-	-	-	-	+
Mexico 309	<i>Ur-5</i> (hm)	-	+	+	+	+	+	+
Belmidak RR-3	<i>Ur-11</i> (hm)	-	-	+	-	-	-	-
Ouro Negro	<i>Ur-ON</i> (hm)	+	+	+	+	+	-	+

<sup>†</sup>(ht): em heterozigose, (hm): em homozigose, (\*): ausência de genes de resistência.

<sup>‡</sup>(A): marcador ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência, (R): marcador ligado em fase de repulsão; (+): presença da marca, (-): ausência da marca. Em cinza estão evidenciados resultados falsos positivos, o que invalida o uso do respectivo marcador para a seleção assistida do gene de resistência com o qual ele está ligado durante o processo de piramidação.

O marcador RAPD OPAE19<sub>890</sub> foi identificado por JOHNSON *et al.* (1995) como ligado em fase de repulsão a 6,2 cM do gene *Ur-11* presente em PI 181996. Este, posteriormente, foi avaliado por SOUZA *et al.* (2002) em uma população F<sub>2:3</sub> derivada do cruzamento Rudá x Belmidak RR-3 (derivado de PI 181996), mostrando, neste caso, estar ligado a uma distância de 1,0 cM do referido gene de resistência. Este marcador foi convertido em SCAR (SAE19<sub>890</sub>) por QUEIROZ *et al.* (2004), e quando testado na mesma população usada por SOUZA *et al.* (2002), confirmou-se sua ligação em fase de repulsão a 1,0 cM do gene *Ur-11*.

HALEY *et al.* (1993) identificaram o marcador RAPD OPI19<sub>460</sub> como ligado, em fase de acoplamento e sem apresentar recombinantes, ao gene *Ur-5* do cultivar B-190 (derivado de Mexico 309). Este marcador foi posteriormente convertido em SCAR por MELOTTO e KELLY (1998), sendo assim denominado de SI19<sub>460</sub>. Recentemente, no trabalho desenvolvido por DESSAUNE *et al.* (2005), SI19<sub>460</sub> mostrou-se ligado a 3,3 cM do gene *Ur-5* em uma população segregante derivada do cruzamento Rudá x Mexico 309.

O uso destes marcadores é fundamental para o monitoramento dos genótipos que contenham simultaneamente alelos de resistência para *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* durante o processo de piramidação. Isso se deve ao fato de que na micoteca do BIOAGRO/UFV não existem patótipos capazes de discriminar estes genes com base nos espectros de resistência por eles apresentados, ou seja, os três conferem resistência a todos os isolados (CAPÍTULO 1). Outro mérito relevante da validação de marcadores capazes de discriminar especificamente cada um dos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*, é que estes poderão também ser utilizados quando da introgressão destes genes em cultivares modernos ou linhagens elites que apresentem suscetibilidade à ferrugem (STAVELY, 2000).

Nesta etapa do presente trabalho, nota-se a importância da colaboração e do uso cooperativo dos resultados obtidos entre os programas de melhoramento cujos objetivos incluem a piramidação de genes de resistência a doenças. Uma vez que, tanto a identificação e o desenvolvimento de novos marcadores quanto a validação dos que já se encontram disponíveis, são de suma importância para os

diferentes grupos de pesquisa, e requer um esforço concentrado. Testar a fidelidade de uma marca molecular com a característica a qual ela está associada não é interesse apenas do grupo que a identificou ou desenvolveu, mas também dos que idealizam sua utilização.

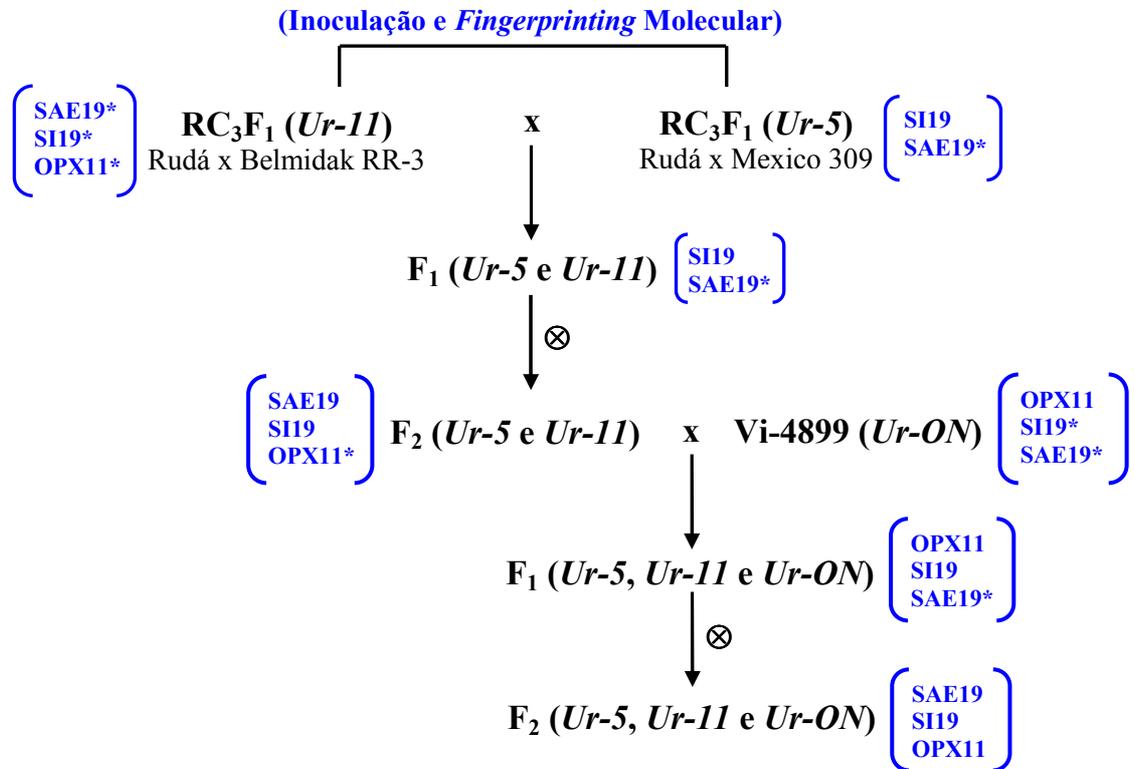
### 3.2.2. Populações segregantes

Tendo em vista a natureza dos marcadores moleculares validados como possíveis de serem utilizados no processo de piramidação, principalmente no que diz respeito à fase de ligação em relação aos genes de resistência (Tabela 5), na Figura 4 encontra-se um resumo da estratégia utilizada neste trabalho para a introgressão simultânea de *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* no *background* genético “carioca” do cultivar Rudá.

Inicialmente, visando associar os genes *Ur-5* e *Ur-11*, foram realizados cruzamentos entre as plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> selecionadas quanto à resistência à ferrugem e com base no estudo de *fingerprinting* molecular (Figuras 2B e 3B). As plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> derivadas do cruzamento Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*) foram usadas como genitores masculinos, e as derivadas de Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*) como genitores femininos. Todas estas plantas apresentaram a marca SAE19<sub>890</sub> e não apresentaram a marca produzida por OPX11<sub>550</sub>. Somente as portadoras do gene *Ur-5* apresentaram a marca SI19<sub>460</sub> (Tabela 5).

A partir destes cruzamentos foram obtidas 19 plantas F<sub>1</sub>, dentre essas, híbridos simples (genótipo *Ur-5ur-5Ur-11ur-11*). Por meio da análise molecular usando SI19<sub>460</sub>, seis das 19 plantas F<sub>1</sub> foram selecionadas, as quais também foram testadas com SAE19<sub>890</sub> para confirmar a presença do produto de amplificação produzido por este marcador e, assim, evitar a seleção de falsos positivos posteriormente. As plantas F<sub>1</sub> que apresentaram a marca SAE19<sub>890</sub>, por autofecundação, geraram a população F<sub>2</sub> carregando os alelos *Ur-5* e *Ur-11*, formada por 83 plantas. Essa população foi primeiramente avaliada com o marcador SAE19<sub>890</sub> e, com isso, selecionou-se 11 indivíduos homocigotos

dominantes para o loco *Ur-11*. A partir destes, usando o marcador SI19<sub>460</sub>, foram identificados sete indivíduos que também possuíam o alelo *Ur-5*.



**Figura 4.** Representação esquemática da estratégia utilizada para a piramidação de genes de resistência à ferrugem no cultivar Rudá. Em azul, entre parênteses e em seqüência, os critérios usados para a seleção indireta dos alelos de resistência em cada etapa do processo de melhoramento. Os marcadores SI19 e OPX11 são ligados, em fase de acoplamento, aos genes *Ur-5* e *Ur-ON*, respectivamente, e o marcador SAE19, em fase de repulsão ao gene *Ur-11*. O asterisco (\*) indica os marcadores que foram utilizados, nas respectivas etapas de seleção, apenas para evitar problemas de falsos positivos nas gerações subseqüentes.

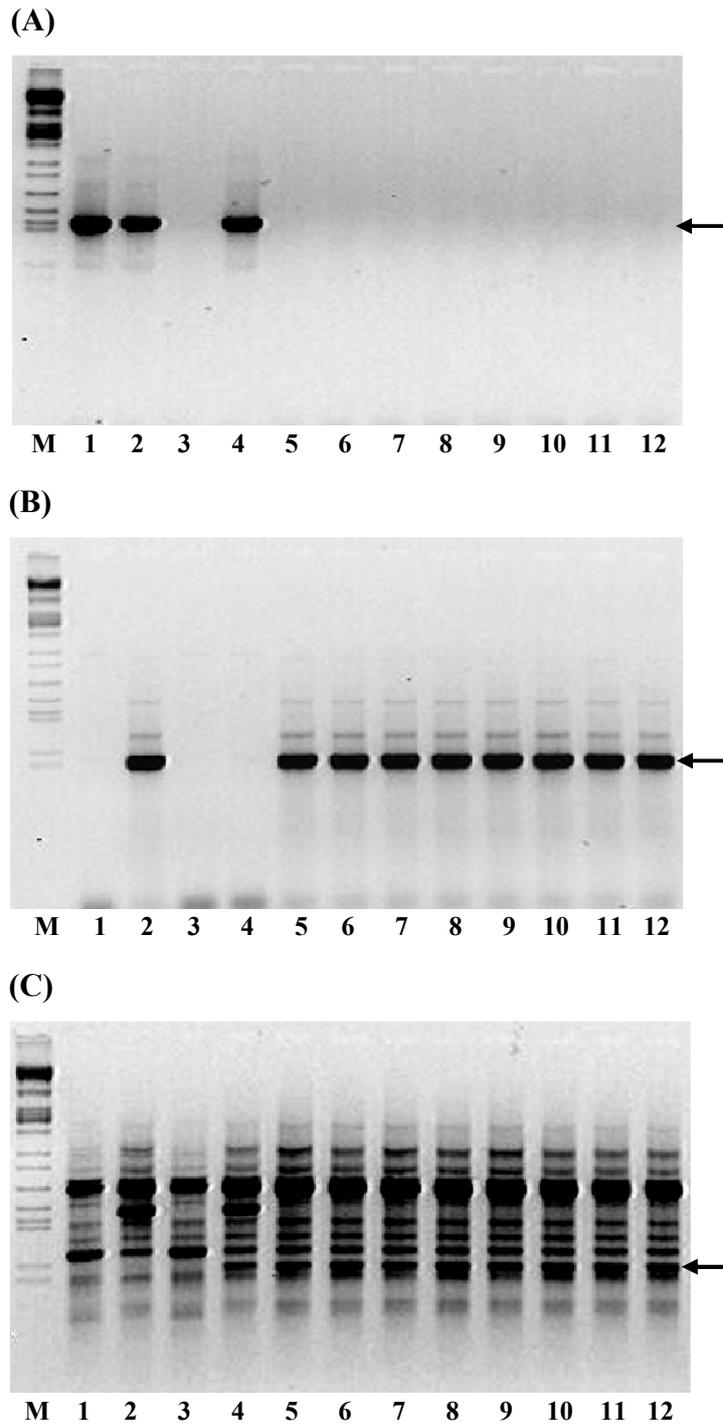
As sete plantas F<sub>2</sub> selecionadas com ambos os marcadores (genótipos *Ur-11Ur-11Ur-5*) foram testadas com OPX11<sub>550</sub> e não apresentaram a marca correspondente, sendo, portanto, cruzadas com a linhagem Vi-4899 (genótipo *Ur-ONUr-ON*), usada como genitor masculino. Assim, 68 plantas F<sub>1</sub> foram obtidas, a partir das quais oito foram selecionados após a análise molecular usando os marcadores OPX11<sub>550</sub>, SI19<sub>460</sub> e SAE19<sub>890</sub>, respectivamente. Neste

caso, o marcador SAE19<sub>890</sub> foi usado também no intuito de evitar possíveis problemas futuros com os falsos positivos. Após esta etapa, a partir da autofecundação dos oito híbridos triplos selecionados (genótipo *Ur-5ur-5Ur-11ur-11Ur-ONur-ON*), foi gerada uma população F<sub>2</sub>, a qual foi novamente avaliada com os três marcadores.

No processo seletivo da população F<sub>2</sub> da piramidação, inicialmente, foi realizada a identificação das plantas homozigotas dominantes para o loco *Ur-11*, usando para esse fim o marcador SAE19<sub>890</sub>. Das 189 plantas avaliadas, 55 não apresentaram a marca SAE19<sub>890</sub> (genótipo *Ur-11Ur-11*). A partir destas, foram identificadas as que carregavam simultaneamente os alelos *Ur-5* (genótipo *Ur-5\_\_*) e *Ur-ON* (genótipo *Ur-ON\_\_*), com base na análise molecular com os marcadores SI19<sub>460</sub> e OPX11<sub>550</sub>, respectivamente. Ao final deste processo, foram selecionadas 17 plantas.

Ao analisar as sementes F<sub>2:3</sub> produzidas pelas 17 plantas selecionadas a partir da população F<sub>2</sub> da piramidação, constatou-se que oito delas deram origem a sementes com o mesmo padrão das produzidas pelo cultivar Rudá; cor creme com estrias marrom claras, fundo claro, sem halo, de tamanho médio e não achatadas. Segundo MARQUES JÚNIOR *et al.* (1997) e SANTOS *et al.* (2001), a seleção precoce da característica tipo de grãos é bastante eficiente, devido à sua alta herdabilidade. Além disso, do ponto de vista prático, esta estratégia é favorável aos programas de melhoramento, os quais, nas gerações futuras, poderão concentrar seus esforços nas avaliações de outras características, como é o caso da produtividade. Possuir grãos aceitáveis comercialmente é um dos fatores primordiais para o sucesso do cultivar a ser desenvolvido.

Assim, a partir das sementes produzidas por estas oito plantas F<sub>2</sub> contendo os três alelos de resistência à ferrugem piramidados, selecionadas com base nos marcadores associados especificamente a cada um destes genes (Figura 5), e quanto ao tipo de grãos, será constituída a população F<sub>3</sub> subsequente. Espera-se, posteriormente, atingir a homozigose para todos os locos de resistência, conduzindo as gerações por autofecundações, utilizando o método genealógico e a seleção com base nos marcadores moleculares validados.



**Figura 5.** Análise eletroforética de produtos de amplificação do DNA usando os *primers* SAE19<sub>890</sub> (A), SI19<sub>460</sub> (B) e OPX11<sub>550</sub> (C) (Tabelas 3 e 5). As canaletas M contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Rudá, Mexico 309 (*Ur-5*), BelmidaK RR-3 (*Ur-11*) e Ouro Negro (*Ur-ON*) estão representados nas canaletas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Em seguida, são representadas as plantas F<sub>2</sub> que contém os três alelos de resistência à ferrugem (canaletas 5-12), as quais também possuem grãos do tipo carioca com o mesmo padrão dos produzidos por Rudá. As setas indicam as bandas polimórficas associadas aos referidos alelos de resistência.

A próxima etapa será confirmar a homozigose para o loco *Ur-11* nas plantas F<sub>3</sub> a serem obtidas, por meio da análise molecular com o marcador SAE19<sub>890</sub>, as quais também serão avaliadas com SI19<sub>460</sub> e OPX11<sub>550</sub> para, assim, identificar os genótipos *Ur-5*\_\_ e *Ur-ON*\_\_, respectivamente. Posteriormente, a partir das plantas F<sub>3</sub> a serem selecionadas, espera-se obter as famílias F<sub>3:4</sub>, as quais serão submetidas ao teste de progênie usando os marcadores moleculares, o que permitirá a identificação de famílias homozigotas para todos os locos de resistência.

Com base no que foi apresentado neste trabalho, pôde-se verificar que a estratégia de pirâmidação adotada, usando a seleção assistida por marcadores moleculares em conjunto com métodos convencionais de melhoramento, diminuiu consideravelmente o tempo médio exigido para a introgressão simultânea de genes de resistência à ferrugem em um mesmo genótipo do feijoeiro. O germoplasma desenvolvido poderá ser diretamente combinado com outros materiais desenvolvidos pelo programa do BIOAGRO/UFV, os quais já possuem genes de resistência para outras doenças, como antracnose e mancha angular (RAGANIN, 2004; COSTA, 2004; ARRUDA, 2005).

A equipe do BIOAGRO/UFV tem trabalhado desde 1992 visando o desenvolvimento de cultivares comerciais resistente à ferrugem, antracnose e mancha angular. Já foram criadas várias isolinhas avançadas contendo genes de resistência para as três doenças mencionadas. Essas isolinhas estão agora sendo intercruzadas para a pirâmidação de diversos genes de resistência em um mesmo *background* genético. Todo o processo de melhoramento tem sido acompanhado por estudos de herança dos genes de resistência, testes de alelismo entre eles e, também, monitorado por marcadores moleculares identificados e/ou validados nas próprias populações desenvolvidas pelo programa.

O material a ser obtido ao final do processo de pirâmidação para ferrugem, iniciado neste trabalho, poderá vir a ser posteriormente lançado como cultivar, caso este confirme sua resistência e se mostre produtivo nos experimentos a serem futuramente realizados em campo.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Em avaliações realizadas no programa de melhoramento do feijoeiro comum para resistência a doenças conduzido no BIOAGRO/UFV, a variedade diferenciadora Mexico 309 e a linhagem Belmidak RR-3, portadoras dos genes *Ur-5* e *Ur-11*, respectivamente, apresentaram um amplo espectro de resistência ao fungo *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem. Estudos de alelismo demonstraram a independência destes genes em relação à *Ur-ON*, presente no cultivar Ouro Negro, o qual já vem sendo utilizado como fonte de resistência no Brasil.

O objetivo deste trabalho foi introduzir individualmente os genes *Ur-5* e *Ur-11* no cultivar comercial Rudá (grãos tipo carioca), para a posterior piramidação destes genes e de *Ur-ON* no *background* genético “carioca” do feijoeiro.

Após apenas três ciclos de retrocruzamentos, sendo os dois últimos assistidos por marcadores moleculares, foram obtidas sementes portando individualmente os alelos *Ur-5* e *Ur-11*, e com aproximadamente 98% de recuperação do *background* Rudá. Esse material genético foi utilizado na piramidação de *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON* em uma mesma linhagem com grãos do tipo carioca. Para esse fim, as sementes RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> desenvolvidas, originadas a partir dos cruzamentos Rudá x Mexico 309 (*Ur-5*) e Rudá x Belmidak RR-3 (*Ur-11*), foram inter cruzadas e, com isso, plantas contendo simultaneamente *Ur-5* e *Ur-11* foram obtidas. Estas foram novamente cruzadas com a linhagem Vi-4899 (*Ur-ON*), essencialmente derivada de Rudá por retrocruzamentos. Assim, foram desenvolvidos híbridos triplos para os locos *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11*. A partir da autofecundação destes, obteve-se a geração F<sub>2</sub> da piramidação.

Uma vez que Ouro Negro, Mexico 309 e Belmidak RR-3 foram incompatíveis com todas as raças de *U. appendiculatus* mantidas na micoteca do BIOAGRO/UFV, o monitoramento de seus genes de resistência durante o processo de piramidação foi realizado por meio da seleção assistida pelos

marcadores moleculares SI19<sub>460</sub> (*Ur-5*), SAE19<sub>890</sub> (*Ur-11*), e OPX11<sub>550</sub> (*Ur-ON*). Assim, foram obtidas sementes que originarão a população F<sub>3</sub> da piramidação, a partir das plantas F<sub>2</sub> selecionadas com base nos três marcadores mencionados e quanto ao tipo de grãos, de acordo com o padrão dos produzidos pelo cultivar Rudá. A partir desta população, espera-se, em trabalhos futuros, atingir a homozigose para todos os locos de resistência, utilizando o método genealógico e a seleção assistida por marcadores moleculares.

Uma das metas do programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV é utilizar o germoplasma obtido no presente trabalho para o desenvolvimento de linhagens com grãos do tipo carioca e contendo diferentes genes de resistência piramidados para ferrugem, antracnose e mancha angular. Além disso, o material genético a ser obtido ao final do processo iniciado neste trabalho, após ser testado quanto ao desempenho agronômico, se superior, poderá também ser lançados como novo cultivar.

## 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**, 18:265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003.
- ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopatology**, 152:60-64, 2004.
- ARRUDA, K.M.A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. 77p. (Tese de Mestrado)
- CARNEIRO, G.E.S., DEL PELOSO, M.J., FONSECA JÚNIOR, N.S., MESQUITA, A.N., MICHEL, C.A., ROS, C., SILVEIRA, E.P., SOARES, D.M., TOLENTINO, G., SANDER, G.R., TAVARES, H.E., ANTUNES, I.F., ASSMANN, I.C., DÍAZ, J.L.C., TRAGNAGO, J.L., SOUZA, J.F., TEIXEIRA, M.G., RIBEIRO, N.D., HEMP, S., MODA-CIRINO, VÂNIA. Interação genótipo-ambiente de linhagens de feijão preto e carioca no ensaio nacional sul. In: **2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro, Bahia. 6p. 2003. (Resumo)
- CARRIJO, I.V., CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. Reação de vinte e cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a trinta e nove raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 5:245-255, 1980.
- CASTAÑO, J. **Manual standar para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol**. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1985.
- CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. **Informe Annual 1986: programa de frijol**. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1986. 339p.
- CNPAF - Centro Nacional de Pesquisas de Arroz e Feijão. **Rudá: nova cultivar de feijão**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás, Goiás, 1995. (Folder)
- CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOOD-GOD, P.I., RAGAGNIN, V.A., FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

- COSTA, M.R. **Introgessão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular no cultivar de feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2004. 76p. (Tese de Mestrado)
- COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Genetic and breeding strategy for resistance to rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 24:795-803, 1975.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2001. 648p.
- DESSAUNE, S.N., SOUZA, T.L.P.O., NUNES, E.S., SANGLARD, D.A., DOUSA, C.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Uso do cultivar Mexico 309 como fonte resistência à ferrugem do feijoeiro no Brasil Central. In: **3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Gramado, Rio Grande do Sul. 1p. 2005. (Resumo)
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21:123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus* utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 23:386-390, 1998.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência do feijoeiro comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18, 1999a.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24:166-169, 1999b.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23:399-402, 2000.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHKE, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro comum à ferrugem e à mancha-angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 26:86-89, 2001a.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., STAVELY, J.R., BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 26:77-80, 2001b.

- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro comum à ferrugem, antracnose e mancha angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:59-66, 2003.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, 138:213-218, 2004.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development, vol. 1: theory and technique**. New York: Macmillan. New York, USA, 1987. 525p.
- GROTH, J.V., MCCAIN, J.W., ROELFS, A.P. Virulence and isoenzyme diversity of sexual versus asexual collections of *Uromyces appendiculatus* (bean rust fungus). **Heredity**, 75:234-242, 1995.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.
- HARLAN, H.V., POPE, M.N. The use and value of backcross in small-grain breeding. **Journal Hereditary**, 13:319-322, 1922.
- JESUS JUNIOR, W.C., VALE, F.X.R., MARTINEZ, C.A., COELHO, R.R., COSTA, L.C., HAU, B., ZAMBOLIM, L. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Photosynthetica**, 39:603-606, 2001.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:659-664, 1995.
- KELLY, J.D., HALEY, S.D., AFANADOR, L., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 37:15-16, 1994.
- LINDGREN, D.T., ESCRIDGE, K.M., STEADMAN, J.R., SCHAAF, D.M. A model for dry bean yield loss due to rust. **Hort Technology**, 5:35-37, 1995.
- MARQUES JÚNIOR, O.G., RAMALHO, M.A.P., FERREIRA, D.F., SANTOS, J.B. Viabilidade do emprego de notas na avaliação de alguns caracteres do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, 44:411-420, 1997.
- MELOTTO, M., KELLY, J.D. SCAR markers linked to major disease genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 1998.
- 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**, 85:745-749, 1993.

- MIKLAS, P.N. Marker-assisted selection for disease resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:1-3, 2002a.
- MIKLAS, P.N., PASTOR-CORRALES, M.A., JUNG, G., COYNE, D.P., KELLY, J.D., MCCLEAN, P.E., GEPTS, P. Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:125-129, 2002b.
- OPENSHAW, S.J., JARBOE, S.G., BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.). **ASHS/CSSA joint plant breeding symposium on analysis of molecular data**. Corvallis: Oregon State University, 1994. p.41-43.
- 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 of the Bean Improvement Cooperative**, 44:103-104, 2001.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1998. p.375-433.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLAD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271-272. 2004.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596, 2003.
- RAGAGNIN, V.A. **Piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular em feijão do tipo carioca**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2004. 79p. (Tese de Doutorado)
- RIOS, G.P., ANDRADE, E.M., COSTA, J.L.S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:128-133, 2001.
- SANDLIN, C.M., STEADMAN, J.R., ARAYA, C.M., COYNE, D.P. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. **Plant Disease**, 83:108-113, 1999.
- SANTOS, S.C., RIOS, G.P. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* nos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 25:607-611, 2000.

- SANTOS, V.S., RAMALHO, M.A.P., CARNEIRO, J.E.S., ABREU, A.F.B. Implications of early selection for grain type in common bean genetic breeding. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:13-14, 2001.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman. San Francisco, USA, 1973. 573p.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of Belmidak RR-3 as a source for rust resistance in central Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:140-141, 2002.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, 30:143-149, 2005.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:iv-vi, 1983.
- STAVELY, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In: SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2ed. Cali: CIAT. Cali, Colombia, 1989. p.159-194.
- STAVELY, J.R., STEADMAN, J.R., MCMILLAN JUNIOR, R.T. New pathogenic variability in *Uromyces appendiculatus* in North America. **Plant Disease**, 73:428-432, 1989.
- STAVELY, J.R. Genetic of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80:1056, 1990. (Abstract).
- STAVELY, J.R., KELLY, J.D., GRAFTON, K.F. BelMiDak-rust resistant navy dry beans germplasm lines. **Hort Science**, 29:709-711, 1994.
- STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:1-4, 2000.
- VASCONCELOS, M.J.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., VIEIRA, C. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. as determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, 19:447-451, 1996.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P., CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. p.301-391.
- YOUNG, N.D., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, 77:95-101, 1989.

## CAPÍTULO 3

### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DO CULTIVAR BRSMG TALISMÃ QUANTO À RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO FEIJOEIRO

#### 1. INTRODUÇÃO

Os cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) atualmente lançados no Brasil necessitam apresentar alto espectro de resistência a doenças, uma vez que estas constituem uma das principais causas da baixa produtividade da cultura no país. As perdas em decorrência de enfermidades se agravam, principalmente, quando se considera o cultivo em pequenas propriedades que empregam baixo nível tecnológico no processo produtivo, mas que possuem um papel importante, pois somadas, produzem a maior fração do produto que se destina ao abastecimento do mercado interno (RAMALHO e ABREU, 1998). Dentre as principais doenças de origem fúngica que acometem o feijoeiro, assim consideradas por acarretarem sérios prejuízos, encontra-se a ferrugem, incitada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.]. A incidência deste patógeno ocorre principalmente quando são observadas, nas regiões produtoras, temperaturas amenas e ocorrência de orvalho (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998).

O controle da ferrugem por meio da utilização de cultivares resistentes tem sido considerado eficiente, seguro, de menor custo e acessível a produtores de qualquer nível econômico. Entretanto, tem-se verificado no Brasil que a maioria dos cultivares de feijoeiro recomendados para o plantio não apresentam níveis satisfatórios de resistência ao *U. appendiculatus* (FALEIRO *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 2001a; RIOS *et al.*, 2001).

O cultivar BRSMG Talismã é proveniente de um programa de seleção recorrente conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA). A sua genealogia é composta pelos seguintes genitores: BAT 477, IAPAR 14; FT 84-29, Jalo EEP, A 252; A 77, Ojo de Liebre; ESAL 645, Pintado e Carioca (RAMALHO *et al.*, 2002). Além de possuir grãos do tipo carioca dentro das exigências do mercado (cor creme com estrias marrom claras, fundo claro, sem halo, grãos de tamanho médio e não achatados), BRSMG Talismã apresenta boas propriedades culinárias e nutricionais, como tempo médio de cocção de 28,5 minutos, 9,8% de sólidos solúveis e 23,8% de proteína (ABREU *et al.*, 2004). Tal cultivar foi recomendado para o plantio no estado de Minas Gerais no ano de 2002 e para o estado do Paraná em 2003 (ABREU *et al.*, 2004), podendo ainda ser recomendado para outras regiões do país. No que se refere à produtividade de grãos, avaliações de campo demonstraram que BRSMG Talismã foi, em média, 10,6% superior às testemunhas Carioca e Pérola (cultivar mais plantado no Brasil) (RAMALHO *et al.*, 2002). Com relação a doenças, apresentou boa resistência às raças 65 e 89 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., agente causal da antracnose do feijoeiro, quando inoculadas artificialmente sob condições controladas (RAMALHO *et al.*, 2002). Tal resistência foi confirmada no trabalho desenvolvido por ARRUDA (2005). Estas raças encontram-se entre as mais prevalentes no Brasil (ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004). Além disso, possui resistência intermediária à mancha angular e resistência ao vírus do mosaico comum, conforme se constatou durante avaliações realizadas em nível de campo (RAMALHO *et al.*, 2002). No caso da ferrugem, tem sido observada alta suscetibilidade neste cultivar em lavouras da Zona da Mata Mineira.

Marcadores moleculares têm sido usados como ferramenta para a seleção assistida de genes de resistência em programas de melhoramento cujos objetivos incluem o desenvolvimento de cultivares aptos ao controle genético de doenças. Estes marcadores possibilitam o monitoramento da transferência de alelos de interesse, de forma individual ou simultânea (piramidação), para genótipos adaptados. Tal ferramenta tem permitido, ainda, a verificação da presença de

alelos de resistência em cultivares comerciais, os quais não foram diretamente selecionados durante o desenvolvimento de tais cultivares, devido, principalmente, a limitações nas metodologias convencionais de monitoramento da resistência (ALZATE-MARIN *et al.*, 2001).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a reação de BRSMG Talismã frente a diferentes patótipos de *U. appendiculatus* coletados no estado de Minas Gerais, em face à grande variabilidade patogênica apresentada por este fungo (FALEIRO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2005). Também foi realizada a caracterização molecular deste cultivar por meio da amplificação do seu DNA com marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) previamente identificados como especificamente ligados aos alelos de resistência à ferrugem *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* (CAPÍTULO 2). Tais marcadores estão sendo usados para a seleção indireta de tais alelos no programa de piramidação de genes de resistência a doenças do feijoeiro conduzido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de BRSMG Talismã e dos cultivares usados como testemunhas resistente (Ouro Negro) e suscetível (US Pinto 111) ao *U. appendiculatus* foram obtidas do banco de germoplasma do programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV.

Para averiguar a reação de BRSMG Talismã à ferrugem, foram usados 12 patótipos do fungo *U. appendiculatus*. Onze destes pertencem ao grupo dos 13 previamente caracterizados por FALEIRO *et al.* (1999), os quais são oriundos do estado de Minas Gerais. O outro patótipo, identificado como C (Coimbra), foi recentemente coletado por pesquisadores do BIOAGRO/UFV no campo experimental da instituição situado no referido município mineiro.

As inoculações com o patógeno foram realizadas conforme a metodologia descrita por CARRIJO *et al.* (1980). Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Dez plantas de BRSMG Talismã e de cada cultivar testemunha foram utilizadas para a inoculação individual dos 12 patótipos de *U. appendiculatus*.

Na avaliação dos sintomas da ferrugem, foram considerados seis graus de reação à doença, com base na escala proposta por STAVELY *et al.* (1983). O diagnóstico dos graus de reação foi realizado mediante observação visual das lesões incitadas nas folhas inoculadas, utilizando como auxílio o diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985). Foram registrados todos os graus observados, relacionando-se primeiro o grau predominante e, a seguir, os presentes em menor frequência. Em todos os casos, foram consideradas resistentes as plantas que apresentaram predominantemente grau 1, 2 ou 3 (ausência de sintomas visíveis, manchas cloróticas ou necróticas sem esporulação e/ou lesões esporulantes com diâmetro menor que 300 µm). As plantas com grau 4 ou maior (lesões esporulando com diâmetro maior ou igual a 300 µm) foram consideradas suscetíveis.

Folhas das plantas de BRSMG Talismã, das fontes portadoras dos genes de resistência à ferrugem *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* (Tabela 1), e da testemunha

suscetível US Pinto 111, foram coletadas e mantidas a -80°C para posterior extração de DNA, a qual foi realizada com base no protocolo descrito por DOYLE e DOYLE (1990), adotando, entretanto, algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995). A amplificação do DNA pela técnica RAPD, a eletroforese em gel de agarose e a fotodocumentação dos produtos de amplificação foram realizadas de acordo com a metodologia usada por VASCONCELOS *et al.* (1996). Nas avaliações com a técnica SCAR, os procedimentos foram os mesmos usados nos ensaios com a técnica RAPD, exceto com relação ao oligonucleotídeo iniciador, que foi substituído por 0,2 µM de cada *primer* específico. As temperaturas de anelamento usadas para cada par de *primers* SCAR encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características de marcadores RAPD (OP) e SCAR (S) ligados a genes de resistência à ferrugem do feijoeiro

Marcador	Gene	Cultivar/ Fonte	Distância (cM) <sup>†</sup>	TP (°C) <sup>‡</sup>	Referência
OPX11 <sub>550</sub>	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	5,8 – A	35	FALEIRO <i>et al.</i> (2000)
			8,9 – A	35	FALEIRO <i>et al.</i> (2003)
SCAR I19 <sub>460</sub>	<i>Ur-5</i>	B-190	SR – A	53	MELOTTO e KELLY (1998)
		Mexico 309	3,3 – A	50	DESSAUNE <i>et al.</i> (2005)
SCAR AE19 <sub>890</sub>	<i>Ur-11</i>	Belmidak RR3	1,0 – R	58	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004)

<sup>†</sup>(A): marcador ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência, (R): marcador ligado em fase de repulsão.

<sup>‡</sup>Temperatura de anelamento dos *primers*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização fenotípica de BRSMG Talismã quanto à reação ao *U. appendiculatus* mostraram que este cultivar foi suscetível a cinco dos 12 patótipos avaliados. É importante ressaltar que altos graus de suscetibilidade foram detectados em BRSMG Talismã quando testado frente aos patótipos C e 6 (Tabela 2).

Outro aspecto interessante foi o fato do referido cultivar ter sido incompatível com os patótipos 1, 4, 11 e 12 e compatível com o 6, todos classificados como pertencentes à uma mesma raça fisiológica, a raça 61-3. O mesmo ocorreu com relação à raça 63-3. BRSMG Talismã foi resistente ao patótipo 9 e suscetível ao patótipo 13, ambos pertencentes à esta raça (Tabela 2). Estes resultados corroboram a afirmação de que o fungo *U. appendiculatus* apresenta uma grande variabilidade patogênica (PASTOR-CORRALES, 2001; SOUZA *et al.*, 2005).

**Tabela 2.** Avaliação do cultivar de feijoeiro comum BRSMG Talismã, e testemunhas, quanto à reação ao fungo *U. appendiculatus*

Patótipo (Raça) <sup>†</sup>	Cultivares <sup>‡</sup>		
	BRSMG Talismã	US Pinto 111 <sup>a</sup>	Ouro Negro <sup>b</sup>
C (21-3)	6 - S	6 - S	2 - R
1 (61-3)	2 - R	6 - S	1 - R
2 (63-19)	1,2 - R	6 - S	1 - R
4 (61-3)	1 - R	6 - S	1 - R
6 (61-3)	5 - S	6 - S	2 - R
7 (53-19)	4,3 - S	6 - S	1 - R
8 (53-3)	1 - R	6 - S	1 - R
9 (63-3)	1 - R	6 - S	1 - R
10 (29-3)	4 - S	6 - S	1 - R
11 (61-3)	1 - R	6 - S	1 - R
12 (61-3)	2,1 - R	6 - S	2,3 - R
13 (63-3)	4 - S	6 - S	1 - R

<sup>†</sup>Patótipos de *U. appendiculatus* coletados no estado de Minas Gerais.

<sup>‡</sup>Plantas resistentes (R): predominância de grau 1, 2 ou 3 - ausência de sintomas visíveis, manchas cloróticas ou necróticas sem esporulação e/ou lesões esporulantes com menos de 300 µm de diâmetro; plantas suscetíveis (S): predominância de grau 4 ou maior - lesões esporulando com diâmetro maior ou igual a 300 µm. Onde aparecem mais de um grau de reação, eles estão dispostos em ordem decrescente de prevalência. <sup>a</sup>Testemunha suscetível.

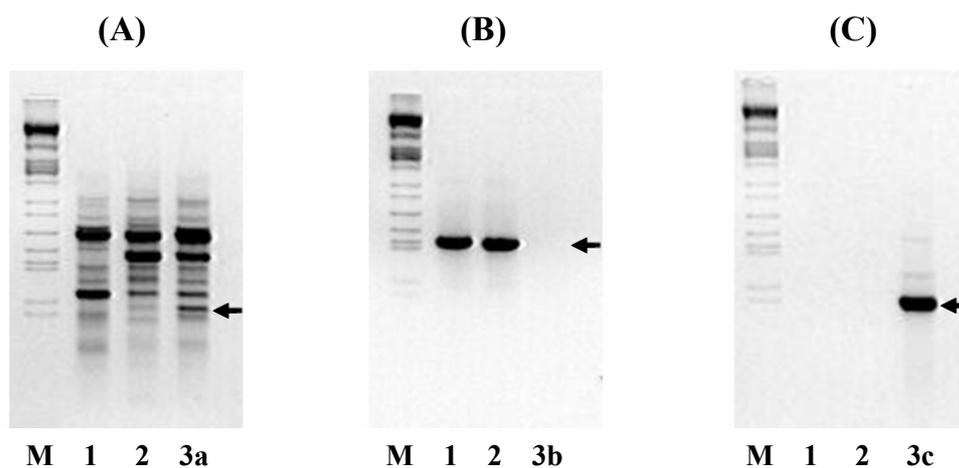
<sup>b</sup>Testemunha resistente (gene *Ur-ON*).

Tem-se observado uma grande incidência de ferrugem nas lavouras cultivadas com BRSMG Talismã na região da Zona da Mata Mineira. O mesmo foi observado neste trabalho, onde este cultivar também apresentou alto grau de suscetibilidade ao patótipo C (Coimbra), o qual foi recentemente coletado no campo experimental da UFV situado no referido município mineiro. Portanto, seria importante a transferência de genes de resistência a esta doença para BRSMG Talismã.

Para obter uma resistência duradoura e de amplo espectro à ferrugem, é recomendada a transferência simultânea de distintos genes de resistência ao *U. appendiculatus* para o genótipo de interesse. O cultivar Ouro Negro (gene *Ur-ON*), testemunha resistente à ferrugem usada neste trabalho, foi imune a nove (nota 1) e resistente a três (nota 2) dos patótipos analisados (Tabela 2). FALEIRO *et al.* (1996) já haviam destacado a sua importância como fonte doadora de resistência à ferrugem a ser usada pelos programas de melhoramento no estado de Minas Gerais. Além disso, Ouro Negro também se mostrou moderadamente resistente a populações de *U. appendiculatus* oriundas dos estados de Goiás, Bahia, Paraná e São Paulo (RIOS *et al.*, 2001). Também merecem destaque, quanto ao espectro de resistência, o cultivar diferenciador Mexico 309 (gene *Ur-5*) e a linhagem norte americana Belmidak RR3 (gene *Ur-11*), os quais apresentaram um ótimo desempenho frente a patótipos do fungo testados em Minas Gerais e em outros estados brasileiros (FALEIRO *et al.*, 1999; SANTOS e RIOS, 2000; FALEIRO *et al.*, 2001b; SOUZA *et al.*, 2005). Os genes presentes nas três fontes citadas poderão, portanto, ser incorporados em BRSMG Talismã.

Um resumo das características dos marcadores RAPD e SCAR ligados especificamente a genes que conferem incompatibilidade à ferrugem (CAPÍTULO 2), utilizados na caracterização molecular da resistência de BRSMG Talismã, encontra-se na Tabela 1. Todas as marcas moleculares avaliadas foram polimórficas entre BRSMG Talismã e as três fontes de resistência à doença, as quais possuem genes já caracterizados e utilizados no programa de piramidação conduzido no BIOAGRO/UFV. Tais resultados são

mostrados na Figura 1: DNA de BRSMG Talismã, Ouro Negro (gene *Ur-ON*) e US Pinto 111 (suscetível universal) amplificado com o marcador OPX11<sub>550</sub> (Figura 1A); DNA de BRSMG Talismã, BelmidaK RR3 (gene *Ur-11*) e US Pinto 111 amplificado com o marcador SAE19<sub>890</sub> (Figura 1B); DNA de BRSMG Talismã, Mexico 309 (gene *Ur-5*) e US Pinto 111 amplificado com o marcador SI19<sub>460</sub> (Figura 1C).



**Figura 1.** Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA de BRSMG Talismã, e testemunhas, com os marcadores OPX11<sub>550</sub> (A), SAE19<sub>890</sub> (B) e SI19<sub>460</sub> (C) (Tabela 1). As canaletas M contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de tamanho). Os produtos de amplificação do DNA de BRSMG Talismã, US Pinto 111 (suscetível), Ouro Negro (*Ur-ON*), BelmidaK RR3 (*Ur-11*) e Mexico 309 (*Ur-5*) são mostrados nas canaletas 1, 2, 3a, 3b e 3c, respectivamente. As setas indicam as bandas polimórficas associadas aos referidos genes de resistência à ferrugem.

O polimorfismo entre BRSMG Talismã e as fontes portadoras dos genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* indica a ausência de alelos para estes genes de resistência no cultivar BRSMG Talismã. Além disso, valida os marcadores para serem utilizados em um possível monitoramento da introgressão simultânea destes genes no *background* genético do referido cultivar. É importante salientar que tais marcadores são capazes de discriminar de forma específica cada um dos

genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* (CAPÍTULO 2), o que é fundamental para viabilizar o processo de piramidação assistida por marcadores moleculares.

Os resultados destas avaliações, no âmbito fenotípico e molecular, são de grande importância não só para os produtores, na escolha do material genético a ser cultivado, mas também para orientar os programas de melhoramento cujos objetivos incluem o desenvolvimento de cultivares resistentes a patógenos. A caracterização de linhagens com potencial agrônômico é útil no processo de escolha de genitores, etapa fundamental para o sucesso de um programa de melhoramento.

A resistência à ferrugem poderia ser transferida para BRSMG Talismã por meio do cruzamento entre este cultivar e o material genético recentemente desenvolvido pelo programa de melhoramento do feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV. Este material além de possuir grãos do tipo carioca conforme os produzidos pelo genitor recorrente Rudá, também carrega simultaneamente os alelos *Ur-ON*, *Ur-11* e *Ur-5* (CAPÍTULO 2).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Informações a respeito dos cultivares de feijoeiro comum recomendados para uso comercial no Brasil, no que se refere à reação a patógenos, são de grande importância não só para os produtores, na escolha do material genético a ser cultivado, mas também para orientar os futuros trabalhos de melhoramento.

Assim, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a reação do cultivar BRSMG Talismã frente a 12 isolados do fungo *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro, coletados no estado de Minas Gerais. Outro propósito foi caracterizar molecularmente BRSMG Talismã com marcadores RAPD e SCAR especificamente ligados aos genes de resistência à ferrugem *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11*. Tais marcadores estão sendo usados para a seleção indireta dos referidos genes no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV, o qual visa a piramidação de genes de resistência a doenças.

Os resultados demonstram que BRSMG Talismã foi suscetível a cinco dos 12 patótipos de *U. appendiculatus* com os quais foi testado. Todos os marcadores analisados foram polimórficos entre BRSMG Talismã e as fontes de resistência à ferrugem portadoras dos genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11*. Isso indica a ausência de alelos de resistência para estes genes em BRSMG Talismã. Além disso, valida os marcadores para serem utilizados em um possível monitoramento da introgressão simultânea dos referidos alelos no cultivar BRSMG Talismã.

## 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**, 18:265-273, 1995.
- ABREU, A.F.B., RAMALHO, M.A.P., CARNEIRO, J.E.S., GONÇALVES, F.M.A., SANTOS, J.B., PELOSO, M.J.D., FARIA, L.C., CARNEIRO, G.E.S., PEREIRA FILHO, I.A. "BRSMG Talismã": common bean cultivar with carioca grain type. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:319-320, 2004.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., 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**, 1:125-133, 2001.
- ALZATE-MARIN, A.L., SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:241-242, 2004.
- ARRUDA, K.M.A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. 77p. (Tese de Mestrado)
- CARRIJO, I.V., CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. Reação de vinte e cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a trinta e nove raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 5:245-255, 1980.
- CASTAÑO, J. **Manual standar para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol**. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1985.
- CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOOD-GOD, P.I., RAGAGNIN, V.A., FALEIRO, F.G., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.
- DESSAUNE, S.N., SOUZA, T.L.P.O., NUNES, E.S., SANGLARD, D.A., DOUSA, C.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Uso do cultivar Mexico 309 como fonte resistência à ferrugem do feijoeiro no Brasil Central. In: **3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Gramado, Rio Grande do Sul. 1p. 2005. (Resumo)
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.

- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21:123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24:166-169, 1999.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23:399-402, 2000.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHKE, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro comum à ferrugem e à mancha angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 26:86-89, 2001a.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., STAVELY, J.R., BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 26:77-80, 2001b.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOODGOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro comum à ferrugem, antracnose e mancha angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:59-66, 2003.
- MELOTTO, M., KELLY, J.D. SCAR markers linked to major disease genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 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 of the Bean Improvement Cooperative**, 44:103-104, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M.A., STAVELY, J.R., KELLY, J.D., GRAFTON, K.F., STEADMAN, J.R., COYNE, D.P., LINDGREN, D.T., SCULLY, B.T. Rust and mosaic resistant bean germplasm releases, 1997-1999. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:101-102, 2001.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1998. p.375-433.

- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLAD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271-272, 2004.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 1998. p.435-450.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B., CARNEIRO, J.E.S., GONÇALVES, F.M.A., SANTOS, J.B., PELOSO, M.J.D., FARIA, L.C., CARNEIRO, G.E.S., PEREIRA FILHO, I.A. **Comunicado Técnico 36: o 'Talismã' de sua lavoura de feijoeiro**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa-CPAF. Santo Antonio de Goiás, Goiás, 2002. 4p.
- RIOS, G.P., ANDRADE, E.M., COSTA, J.L.S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:128-133, 2001.
- SANTOS, S.C., RIOS, G.P. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* nos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 25:607-611, 2000.
- SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, 30:143-149, 2005.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:iv-vi, 1983.
- VASCONCELOS, M.J.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., VIEIRA, C. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. as determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, 19:447-451, 1996.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Doze isolados monopustulares de *Uromyces appendiculatus* provenientes do estado de Minas Gerais foram classificados em sete raças fisiológicas distintas: 21-3, 29-3, 53-3, 53-19 e 63-19. Esta classificação foi realizada com base na série diferenciadora internacional e no sistema binário de nomenclatura propostos no “3<sup>rd</sup> Bean Rust International Workshop”.
- Após três ciclos de retrocruzamentos, sendo os dois últimos assistidos por marcadores moleculares, foi possível selecionar plantas portando, individualmente, os alelos de resistência à ferrugem *Ur-5* e *Ur-11*, e com, aproximadamente, 98% de similaridade genética em relação ao genitor recorrente Rudá (grãos do tipo carioca).
- A partir de cruzamentos entre as plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> obtidas e a linhagem Vi-4899 (*Ur-ON*), foram desenvolvidos híbridos triplos para os locos *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*. Estes geraram a população F<sub>2</sub> da piramidação, composta por 189 plantas. Dezesete destas plantas apresentaram as marcas associadas aos três genes de resistência, das quais oito foram selecionadas quanto ao tipo de grãos. Essas oito plantas serão utilizadas para a obtenção de linhagens homocigotas para os locos de resistência.
- O cultivar BRSMG Talismã foi suscetível a cinco dos 12 patótipos de *U. appendiculatus* com os quais foi testado. Os marcadores moleculares especificamente ligados aos genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* foram polimórficos entre BRSMG Talismã e as fontes de resistência à ferrugem portadoras destes genes.