

DEMERSON ARRUDA SANGLARD

MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO COM ÊNFASE NA
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

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

T

S325m
2006

Sanglard, Demerson Arruda, 1981-

Melhoramento genético do feijoeiro com ênfase na
piramidação de genes de resistência à mancha-angular /
Demerson Arruda Sanglard. – Viçosa : UFV, 2006.
xii, 84f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão - Resistência a
doenças e pragas. 3. Feijão - Resistência a *Phaeoisariopsis*
griseola. 4. Marcadores genéticos. 5. Mancha-angular.
6. Ferrugem. 7. Antracnose. 8. Biologia molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

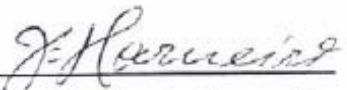
CDD 22.ed. 635.6522

DEMERSON ARRUDA SANGLARD


MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO COM ÊNFASE NA
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR

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

APROVADA: 02 de outubro de 2006



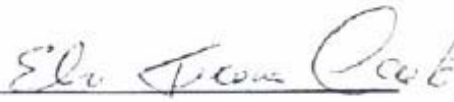
Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Co-orientador)



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)



Dr. Trazilbo José de Paula Júnior



Dra. Eveline Teixeira Caixeta



Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus pais, Demétrio e Sônia.

À minha irmã, Natália.

À querida Cida.

Aos meus amigos.

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

Aos meus maravilhosos pais Demétrio Antônio Sanglard e Sônia Lídia Arruda Sanglard, 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.

À querida Cida, pelo companheirismo, afeto, amor e compreensão, e também pelo incentivo e ajuda durante a graduação e todo o período do mestrado.

À minha irmã Natália pelo carinho durante a vida, e agora mesmo à distância, pelo apoio constante, pela amizade e solidariedade.

Ao meu orientador, professor Maurilio Alves Moreira, 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 Everaldo Gonçalves de Barros, pelas sugestões, pelo zelo incansável com a manutenção das condições necessárias à pesquisa, pelo exemplo de dedicação ao progresso científico. Além disso, pela amizade e valiosos ensinamentos de biologia molecular.

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

Ao Dr. Vilmar Antônio Ragagnin, meu amigo e incentivador, sou grato pelos primeiros ensinamentos nas técnicas de genética molecular de plantas e de interação planta-patógeno.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta e ao Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, que por diversas vezes me auxiliaram com importantes sugestões, às quais muitíssimo contribuíram durante a execução dos trabalhos.

Aos estudantes de iniciação científica Jeziel, Bruno e Edgard, e aos amigos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro e da Soja do BIOAGRO/UFV: Thiago, Márcia Costa, Klever, Carlos Lásaro, Newton, Glauco, Márcia Flores, Mário, Ricardo, Janaina, Maria Andréia, Valéria, José Eduardo, Suellen, Alisson, Fernanda, Denise, Rita, Daniele, Pedro Ivo, Marcos e Marcelo

os quais muito contribuíram, sem medir esforços, para a execução deste trabalho. Além disso, sou grato pelo companheirismo, amizade e auxílio na interpretação dos resultados.

Ao Aloisio, por sua organização ao dispor os materiais necessários à pesquisa e que sempre esteve disponível a me ajudar, e também por sua amizade e companheirismo.

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.

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), pelo auxílio financeiro, indispensável à condução deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

DEMERSON ARRUDA SANGLARD, filho de Demétrio Antônio Sanglard e Sônia Lídia Arruda Sanglard, nasceu em Manhumirim, Minas Gerais, em 12 de junho de 1981.

No município de Manhumirim, cursou, entre os anos de 1987 e 1992, do pré-escolar à 4ª série na Escola Municipal Alfredo Breder. De 1993 a 1999, completou os ensinos fundamental e médio no Colégio Santa Teresinha. Exercendo papel importante em sua formação, de 1991 a 1997, pertenceu à Associação da Guarda Mirim de Manhumirim onde alcançou a patente de sargento.

Em 2000, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, colando grau em janeiro de 2005 como Engenheiro Agrônomo. No período de sua graduação, desenvolveu atividades de pesquisa como bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, atuando nas áreas de Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento Vegetal e de Genética da Interação Planta-Patógeno (2002 a 2005). Além disso, foi estagiário nos Laboratórios de Controle Biológico de Insetos e Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV). Também foi monitor da disciplina Genética Básica na UFV 2004/2005.

Em março de 2005, 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 dissertação em outubro de 2006. Neste mesmo período, iniciou o curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado, também no Programa de Genética e Melhoramento da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Importância da Cultura do feijoeiro	4
3.2. Principais doenças do feijoeiro	4
3.3. Variabilidade genética de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> e seu controle	8
3.4. Seleção assistida por marcadores moleculares e piramidação	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 1	18
OBTENÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Locais de condução dos experimentos	21
2.2. Material genético	21
2.3. Obtenção de famílias derivadas de Pérola x Ouro Negro	22
2.4. Obtenção de genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242	25
2.5. Seleção por meio de inoculações	27
2.5.1. Genótipos derivados de Pérola x Ouro Negro	27
2.5.2. Genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242	27
2.5.3. Obtenção do inóculo de <i>Uromyces appendiculatus</i>	28
2.5.4. Obtenção do inóculo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	28
2.5.5. Obtenção do inóculo de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	28
2.5.6. Avaliação da resistência a <i>Uromyces appendiculatus</i>	29
2.5.7. Avaliação de resistência a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	29
2.5.8. Avaliação da resistência a <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	30
2.6. Seleção por meio de marcadores moleculares	31
2.6.1. Extração de DNA	31
2.6.2. Análise com RAPD	31
2.6.3. Análise com SCAR	32

2.6.4. Eletroforese e fotodocumentação	32
2.6.5. Análise de <i>fingerprinting</i> molecular	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Obtenção de isolinhas derivadas de Pérola x Ouro Negro.....	34
3.1.1. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do primeiro retrocruzamento.....	34
3.1.2. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do segundo retrocruzamento.....	37
3.1.3. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do terceiro retrocruzamento.....	40
3.1.4. Testes de progênie	43
3.2. Obtenção de genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242	47
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 2.....	57
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR EM FEIJÃO TIPO CARIOCA.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. Local de condução dos experimentos	60
2.2. Material genético	60
2.3. Obtenção de populações segregantes	61
2.4. Seleção por meio da inoculação de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	62
2.4.1. Patótipos.....	62
2.4.2. Crescimento do fungo, inoculação e avaliação dos sintomas.....	63
2.5. Seleção por meio da inoculação de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	63
2.5.1. Patótipo.....	64
2.5.2. Crescimento, inoculação do fungo e avaliação dos sintomas.....	64
2.6. Seleção por meio de marcadores moleculares	64
2.6.1. Extração de DNA	65
2.6.2. Análise com RAPD	65
2.6.3. Análise com SCAR	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1. Validação de marcadores e estratégia de cruzamentos.....	69

3.2. Obtenção dos híbridos simples	75
3.3. Obtenção do híbrido triplo	75
3.4. Obtenção das populações F ₂ segregantes.....	76
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

RESUMO

SANGLARD, Demerson Arruda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2006. **Melhoramento genético do feijoeiro com ênfase na piramidação de genes de resistência à mancha-angular.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro.

Uma estratégia para obtenção de cultivares com resistência a um maior número de patótipos e por um maior período de tempo é a “piramidação”, onde o objetivo é incorporar em um único cultivar o maior número possível de genes de resistência. Com o intuito de transferir genes de resistência à ferrugem (*Ur-ON*), antracnose (*Co-10*), e mancha-angular (*Phg-ON*), do cultivar Ouro Negro para o cultivar Pérola, e o gene de resistência à mancha-angular (*Phg-3*) do cultivar Cornell 49-242 para o cultivar Rudá, foram conduzidos dois subprogramas de retrocruzamentos. Para alcançar este objetivo, foram utilizadas inoculações com os patógenos incitadores das doenças, análises de *fingerprinting* molecular, marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e testes de progênie. Por meio do método de retrocruzamentos, foram obtidas quatro famílias RC_3F_5 (Pérola x Ouro Negro) homozigotas para as três doenças e possuindo simultaneamente as bandas de tamanhos específicos ligadas aos locos de resistência: OPX11_{550a}, OPAJ18_{560a}, SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*); SCAR BA16_{669a} e SCAR AA19_{650a} (*Phg-ON*). Também foram obtidas plantas RC_2F_1 (Rudá x Cornell 49-242) resistentes à mancha-angular e possuindo a marca molecular produzida pela amplificação de SCAR N02_{890a} ligado ao gene *Phg-3*. Essas plantas foram cruzadas com uma isolinha denominada Rudá “R”, a qual já possui piramidados cinco genes de resistência, sendo um para a ferrugem (*Ur-ON*), um para a mancha-angular (*Phg-1*) e outros três para antracnose (*Co-4*, *Co-10* e *Co-6*). De acordo com estudos de alelismo realizados anteriormente e as isolinhas disponíveis, foram estabelecidas as possíveis e melhores combinações visando a piramidação de genes de resistência à mancha-angular. Em uma primeira etapa, os cruzamentos foram realizados de forma direcionada em dois esquemas conduzidos separadamente: isolinhas MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8 e MEX-37-3-6-3 x Ruda “R”. Considerando o

primeiro esquema de cruzamento, foi utilizado o patótipo 63.19 de *Phaeoisariopsis griseola* na verificação da natureza híbrida das plantas F₁. As plantas resistentes tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores moleculares OPE04_{500a} e OPAO12_{950a}. Essas plantas F₁ resistentes e que apresentaram marcas moleculares foram intercruzadas com a isolinha Rudá “R”. Deste modo, obtiveram-se plantas F₁ (híbrido triplo), as quais foram inoculadas com o patótipo 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* e monitoradas com os marcadores moleculares: SCAR F10_{1050a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SCAR BA8_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SCAR AZ20_{845a} (*Co-4*), SCAR Y20_{830a} (*Co-6*), SCAR H13_{520a} (*Phg-1*), OPE04_{500a} (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) e OPAO12_{950a} (*Phg-6*²). A geração F₂ segregou para todos estes locos, porém, foram encontradas plantas contendo todas as marcas. No segundo esquema de cruzamento, plantas F₁ MEX-37-3-6-3 x Ruda “R” foram avançadas por meio de autofecundações até a geração F₃. Neste caso, também foram monitorados os genes de resistência por meio de inoculação com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum* e uso dos marcadores moleculares: SCAR F10_{1050a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SCAR BA8_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SCAR AZ20_{845a} (*Co-4*), SCAR Y20_{830a} (*Co-6*), SCAR H13_{520a} (*Phg-1*) e OPE04_{650a} (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*). O material a ser obtido ao final do processo de melhoramento iniciado neste trabalho, após ser testado quanto à resistência e ao desempenho agrônômico, poderá também ser lançado como novo cultivar e servir como banco de genes de resistência para cultivares mais modernos.

ABSTRACT

SANGLARD, Demerson Arruda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October of 2006. **Genetic breeding of the common bean with emphasis in the pyramiding of resistance genes to the angular leaf spot.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and José Eustáquio de Souza Carneiro.

“Pyramiding” is a strategy for the achievement of cultivars resistant to a larger number of pathotypes for a longer period of time and its objective is to incorporate in one single cultivar the largest possible number of resistance genes. In order to transfer rust resistance genes (*Ur-ON*), anthracnose (*Co-10*), and angular leaf spot (*Phg-ON*), from the cultivar Ouro Negro to the cultivar Pérola, and the angular leaf spot resistance gene (*Phg-3*) from the cultivar Cornell 49-242 to the cultivar Rudá, two backcrossing subprograms were conducted. To achieve this goal, inoculations with the pathogens which incite the diseases, analyses of molecular *fingerprinting*, molecular markers linked to the resistant genes and progeny tests were used. By means of the backcrossing method, four families were achieved BC₃F₅ (Pérola x Ouro Negro) homozygotes for the three diseases, which have simultaneously the bands with specific sizes linked to the resistance loci: OPX11_{550a}, OPAJ18_{560a}, SCAR F10_{1050a} and SCAR BA08_{560a} (*Ur-ON* and *Co-10*); SCAR BA16_{669a} and SCAR AA19_{650a} (*Phg-ON*). It was also possible to achieve the plants BC₂F₁ (Rudá x Cornell 49-242) resistant to the angular leaf spot and bearing the molecular mark produced by the amplification of SCAR N02_{890a} linked to the gene *Phg-3*. Those plants were crossed with a line called Rudá “R”, which already has five resistant genes pyramided, one for the rust (*Ur-ON*), other for the angular leaf spot (*Phg-1*) and three others for the anthracnose (*Co-4*, *Co-10* e *Co-6*). According to studies on allelism previously carried out and the available lines, the possible and best combinations were established aiming the pyramiding of resistance genes to the angular leaf spot. In a first phase, the crossings were carried out in a directed form in two schemes separately conducted: lines MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8 and MEX-37-3-6-3 x Rudá “R”. Considering the first crossing scheme, it was used the pathotype 63.19 of *Phaeoisariopsis griseola* for verifying the hybrid nature of the plants F₁. The resistant plants had

their DNA extracted and amplified with the molecular markers OPE04_{500a} and OPAO12_{950a}. The resistant plants F₁ which presented molecular marks were intercrossed with the line Rudá "R". This way, plants F₁ (triple hybrid) were achieved, which were inoculated with the pathotype 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and monitored with the molecular markers: SCAR F10_{1050a} (*Ur-ON* and *Co-10*), SCAR BA8_{560a} (*Ur-ON* and *Co-10*), SCAR AZ20_{845a} (*Co-4*), SCAR Y20_{830a} (*Co-6*), SCAR H13_{520a} (*Phg-1*), OPE04_{500a} (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) and OPAO12_{950a} (*Phg-6*²). The generation F₂ segregated for all these loci, but plants bearing all the marks were found. In the second crossing scheme, plants F₁ MEX-37-3-6-3 x Rudá "R" were improved by means of autofecundation up to the generation F₃. In this case, the resistant genes were also monitored through the inoculation with the pathotype 65 of *C. lindemuthianum* and the use of molecular markers: SCAR F10_{1050a} (*Ur-ON* and *Co-10*), SCAR BA8_{560a} (*Ur-ON* and *Co-10*), SCAR AZ20_{845a} (*Co-4*), SCAR Y20_{830a} (*Co-6*), SCAR H13_{520a} (*Phg-1*) and OPE04_{650a} (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*). The material to be achieved in the end of the improvement process initiated in this work, after being tested as to resistance and agronomic performance, will be able to be launched as a new cultivar and be used as a bank of resistance genes for more modern cultivars.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro em virtude, principalmente, das suas qualidades nutricionais (VIEIRA, 1998). É cultivado em várias regiões do país como cultura de subsistência, empregando-se pouca ou nenhuma tecnologia; entretanto, quando de caráter empresarial, utiliza-se toda tecnologia disponível. Um dos importantes fatores que limitam a produtividade e o desempenho do feijoeiro são as enfermidades. Entre as doenças de maior importância no território nacional, merecem destaque a ferrugem incitada por *Uromyces appendiculatus*, a antracnose incitada por *Colletotrichum lindemuthianum* e a mancha-angular incitada por *Phaeoisariopsis griseola*, sendo todas de origem fúngica. O programa de piramidação de genes de resistência que vem sendo desenvolvido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO/UFV contempla estas três doenças.

No Brasil, até o final da década de 80, a mancha-angular era considerada doença de pequena importância econômica. Segundo VIEIRA (1994), a doença não causava danos apreciáveis porque só aparecia no final do ciclo da cultura, quando a produção já estava praticamente garantida. No entanto, nos últimos anos, a mancha-angular vem ocasionando grandes perdas, com desfolhamento severo, em determinados cultivares. Pensava-se que o número de patótipos de *P. griseola* fosse baixo (ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ, 1979), porém estudos recentes apontam para um número elevado. Foram identificados 13 patótipos de *P. griseola* a partir de isolados coletados somente no estado de Minas Gerais (NIETSCHE et al., 1998). As fontes de resistência conhecidas não conferem resistência a todos os patótipos.

A mancha-angular ocorre praticamente em todas as regiões onde a cultura do feijão é cultivada, principalmente quando a cultura é submetida a condições de temperaturas amenas e altas umidades relativas. Essas condições aliada ao uso de cultivares suscetíveis ao patógeno favorece a ocorrência da doença ocasionando perdas expressivas. A obtenção de novos cultivares resistentes a esta enfermidade é dificultada pela variabilidade

patogênica que *P. griseola* apresenta (SARTORATO e ALZATE-MARIN, 2004; SARTORATO, 2006).

A maioria dos cultivares utilizados em Minas Gerais, com grão tipo carioca, são suscetíveis à mancha-angular. O programa de piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, conduzido no BIOAGRO/UFV, tem utilizado o cultivar Ouro Negro como fonte de resistência para essas três doenças. O cultivar Cornell 49-242 apresenta-se como fonte de resistência à mancha-angular complementar a outras isolinhas já desenvolvidas por esse mesmo programa, sendo que, sua utilização, aumentaria o espectro de resistência aos patótipos de *P. griseola* já caracterizados. Uma vez que a maioria dos cultivares identificados como resistentes a determinados patótipos são, normalmente, cultivares que apresentam características agronômicas desfavoráveis ao seu cultivo comercial e/ou qualidade indesejável para o seu uso na alimentação, uma das maneiras de contornar esse problema, é transferir os genes de resistência presentes nesses cultivares para cultivares elite, ou seja, cultivares com boa aceitação comercial e boa produtividade agrícola.

Em trabalhos anteriores do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, foram priorizadas a indentificação e a caracterização de genes de resistência a antracnose, ferrugem e mancha-angular, e isolinhas resistentes a essas doenças foram obtidas. Trabalhos conduzidos por esse mesmo programa desenvolveram isolinhas já recuperadas para tipo de grão e contendo vários genes de resistência para estas três doenças. Considerando a mancha-angular, isolinhas derivadas das fontes de resistência AND 277, MAR-2, México 54, BAT 332 e Ouro Negro foram obtidas. Atualmente, com o auxílio de marcadores moleculares estreitamente relacionados, esses genes podem ser piramidados em cultivares elite, como Rudá e Pérola que possuem grão tipo carioca e boas características agronômicas. Assim, seria esperado obter um melhor espectro de resistência aos patótipos de *P. griseola* já identificados.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a introgressão de genes de resistência à mancha-angular, em uma isolinha do cultivar de feijão “carioca” Rudá, a qual já possui piramidados genes de resistência à ferrugem, antracnose e à própria mancha-angular.

Os objetivos específicos foram:

- Obter linhagens que contenham os genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular *Ur-ON*, *Co-10* e *Phg-ON*, presentes no genitor doador Ouro Negro, e que sejam geneticamente mais próximas do genitor recorrente Pérola;
- Obter genótipos de feijoeiro com grãos tipo carioca Rudá contendo o gene de resistência à mancha-angular *Phg-3* presente no cultivar Cornell 49-242;
- Validar marcadores moleculares com relação à várias isolinhas e cultivares de interesse;
- Realizar cruzamentos entre uma isolinha do cultivar Rudá, que já possui cinco genes de resistência piramidados, sendo um para a ferrugem (*Ur-ON*), um para a mancha-angular (*Phg-1*) e outros três para antracnose (*Co-4*, *Co-10*, e *Co-6*), com três isolinhas também derivadas de Rudá que possuem isoladamente genes de resistência à mancha-angular: México 54 (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*), MAR-2 (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²), e BAT 332 (*Phg-6*²).
- Selecionar as plantas que possuírem todas as marcas associadas aos genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Phg-1*, *Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*, *Phg-4* e/ou *Phg-5*², e *Phg-6*².

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância da Cultura do feijoeiro

O feijão tem extrema importância econômica e social no Brasil. De acordo com os valores divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2006), na safra (2005/06), a produção de feijão foi de 3,4 milhões de toneladas, superior em 13,2% à da safra anterior, sendo que, a área plantada cresceu 6,4%, tendo sido cultivados 4,2 milhões de hectares. Apesar disso, a produtividade média nacional ainda é muito baixa, cerca de 820 kg/ha.

O feijão representou o quinto grânifero mais produzido, ficando atrás apenas da soja, do milho, do arroz e do trigo. A cultura apresenta ciclo vegetativo em torno de 90 a 100 dias, e o produto deve ser comercializado e industrializado dentro de, no máximo, dois meses para que não se perca a qualidade desejada. (CONAB, 2006)

No Brasil, existem preferências de cor, tipo de grão e qualidade culinária dependendo da região, sendo que ultimamente a demanda por produtos de melhor qualidade. Além de sua importância econômica, o feijão é um dos alimentos básicos da população brasileira e é uma das alternativas de exploração agrícola em pequenas propriedades, de ocupação de mão-de-obra menos qualificada e um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2006).

3.2. Principais doenças do feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é afetado por um grande número de doenças cujos agentes causais são vírus, bactérias, fungos e nematóides (RAVA, 2002). As doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil. Muitas doenças podem causar, dependendo das condições de ambiente, perdas totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006). Mais de 45 diferentes doenças podem ocorrer na cultura do feijão no Brasil, embora apenas cerca de dez sejam realmente importantes (VIEIRA, 1983).

Dentre essas, destacam-se três de origem fúngica: a mancha-angular, a antracnose e a ferrugem.

A mancha-angular do feijoeiro, cujo incitador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma doença que tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores, devido a surtos mais precoces e intensos nos últimos anos. Atualmente, é a principal doença desta cultura no Brasil, sendo encontrada, em maior ou menor intensidade, em todas as regiões em que esta leguminosa é cultivada (SARTORATO e RAVA, 1994; PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998; RAVA, 2002). As perdas de rendimento são maiores, quanto mais precoce for o aparecimento da doença na cultura, podendo comprometer até 80% da produção (SARTORATO e RAVA, 1992), isso dependendo da suscetibilidade dos cultivares, das condições de ambiente e da agressividade dos isolados (SARTORATO e RAVA, 1994). Temperaturas entre 16 e 28°C, sendo 24°C a ótima, favorecem o desenvolvimento da doença (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006). Na Figura 1, são mostrados sintomas de mancha-angular, onde ocorrem necroses do tecido foliar delimitado pelas nervuras.



Figura 1. Sintoma foliar de mancha-angular do feijoeiro incitada por *Phaeoisariopsis griseola*, no cultivar suscetível Pérola.

A antracnose, incitada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Lams.-Scrib., é outra doença grave da cultura do feijoeiro no Brasil, uma vez que pode ocorrer em toda parte aérea da planta e ao encontrar condições favoráveis, causar grandes danos na produção (ZAMBOLIM e CHAVES, 1978). Essa doença é de distribuição ampla, já tendo sido constatada em vários países da Europa, África, Ásia e América. No Brasil, ocorre em praticamente todos os estados, sendo essa ampla abrangência em detrimento do uso de cultivares suscetíveis em regiões onde ocorrem temperaturas amenas variando de 13 a 26 °C sob alta umidade. Perdas severas podem ocorrer principalmente quando sementes contaminadas são usadas para plantio e quando ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (SCHWARTZ, 1994).

Além de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos, tornando-os impróprios para o consumo. A antracnose afeta o feijão em todos os estádios de crescimento, provocando lesões em folhas, caule, ramos, vagens e sementes (SARTORATO e RAVA, 1994). Os sintomas de escurecimento das nervuras das folhas são mostrados na Figura 2.



Figura 2. Sintoma foliar da antracnose do feijoeiro incitada por *Colletotrichum lindemuthianum*, no cultivar suscetível Pérola.

A ferrugem do feijoeiro, incitada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.), está distribuída em todas as regiões onde esta leguminosa é cultivada. É considerada um dos problemas mais importantes ligados à produção do feijão (VARGAS, 1980). O patógeno é um parasita obrigatório, que completa todo o ciclo em um único hospedeiro. As pústulas desenvolvidas na superfície foliar produzem os uredósporos que infectam as plantas, dando origem a novas pústulas, ocasionando infecções sucessivas durante o ciclo vegetativo da planta (VIEIRA, 1983). Temperaturas moderadas variando de 17 a 22 °C e molhamento foliar durante períodos de oito horas contínuas são condições que favorecem o progresso da doença.

O fungo *U. appendiculatus* é reconhecido como um dos patógenos de plantas com maior variabilidade patogênica. Esta variabilidade tem sido constatada por meio das reações de cultivares e linhagens diferenciadoras que, quando inoculadas com diferentes isolados do fungo, apresentam reações que variam de resistência total a alta suscetibilidade, permitindo a separação do patógeno em raças (STAVELY, 1984; MORA-NUÑES et al., 1992; SOUZA, 2006). Os sintomas típicos da ferrugem com presença de pústulas nas folhas, são mostrados na Figura 3.



Figura 3. Sintoma foliar da ferrugem do feijoeiro incitada por *Uromyces appendiculatus*, no cultivar suscetível Pérola.

3.3. Variabilidade genética de *P. griseola* e seu controle

A relação entre fungos e plantas desenvolveu-se em um primeiro estágio da evolução, dirigindo-se para o que se conhece hoje. Fungos e plantas provavelmente surgiram juntos na terra por volta de 700 milhões de anos atrás e interações diversas entre estes dois reinos têm ocorrido desde então, tanto parasítica como mutualística (HECKMAN et al., 2001). O relacionamento entre pessoas e plantas começou a desenvolver-se do modo como conhecemos hoje a cerca de 10.000 anos, quando a domesticação de plantas foi iniciada, uma relação que é fortemente influenciada pela interação fungo-planta (HECKMAN et al., 2001).

O feijoeiro é hospedeiro de vários patógenos. A mancha-angular, cujo incitador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma doença de ampla distribuição geográfica, que, nos últimos anos, incrementou sua incidência e severidade na América Latina (CORREA-VICTORIA et al., 1994). As perdas no rendimento podem alcançar até 80% (RAVA et al., 1985; JESUS JÚNIOR et al., 2001), devidas à desfolhação precoce, ataque inicial às vagens e redução do tamanho do grão (CORREA-VICTORIA et al., 1994).

A eficiência no uso de variedades resistentes à mancha-angular depende do conhecimento sobre a variabilidade patogênica do agente causal e sua distribuição geográfica. A diversidade genética de *P. griseola* tem sido determinada mediante a reação de um grupo padrão de variedades diferenciadoras que contém genótipos dos dois acervos genéticos do feijão, andinos e mesoamericanos (SARTORATO, 2002).

Pesquisas têm demonstrado a importância da variabilidade patogênica na seleção de fontes de resistência à enfermidade, sendo que a variabilidade e a virulência das populações mesoamericanas do patógeno têm sido documentadas em vários países. SARTORATO e RAVA (1984) já observavam a especialização fisiológica do fungo *P. griseola* no Brasil. Mais recentemente, SARTORATO (2004), confirmou a ampla distribuição e a predominância de sete patótipos de *P. griseola* em cinco estados brasileiros.

OROZCO e ARAYA (2005) demonstraram que em locais onde são cultivadas exclusivamente feijões do tipo mesoamericano, ocorre uma pressão

de seleção sobre as populações de *P. griseola* prevalentes, que conduz ao incremento de patótipos correspondentes ao acervo genético do hospedeiro.

Através dos anos, o controle da mancha-angular com fungicidas tem sido recomendado (SARTORATO e RAVA, 1999); no entanto, essa medida possui sérias implicações ambientais e econômicas. Por outro lado, o uso de cultivares resistentes à doença destaca-se, especialmente no contexto da agricultura familiar, a qual não possui condições econômicas de sustentar um programa de combate químico. Por isso, a melhor opção de controle da enfermidade, nessas condições, é o uso de cultivares resistentes ao patógeno. Com esse propósito, desde a metade da década de 90, foi intensificada a avaliação de diferentes fontes de resistência e a identificação de potenciais doadores de genes (PASTOR-CORRALES et al., 1998; NIETSCHKE et al., 1998, 2000a; MAHUKU et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; SARTORATO, 2006).

Como os genes de resistência estão distribuídos em diferentes fontes, a piramidação em variedades comerciais bem adaptadas pode ser uma estratégia para o uso de genes específicos, com o propósito de alcançar uma resistência durável.

3.4. Seleção assistida por marcadores moleculares e piramidação

A biologia molecular tem evoluído rapidamente, proporcionando grande número de técnicas para análise genética de populações. Marcadores moleculares podem ser usados para uma série de propósitos, dos quais, na cultura do feijoeiro, destacam-se a seleção assistida (KELLY et al., 1998).

Os marcadores moleculares podem ser usados no processo de retrocruzamento para facilitar e acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente. Nesse caso, é definido um *fingerprinting* molecular do recorrente, que é comparado com indivíduos obtidos das linhagens criadas ao longo do processo de melhoramento. Somente aquelas linhagens que carregam o alelo de resistência e que possuam um *fingerprinting* semelhante ao do genitor recorrente são utilizadas nos próximos ciclos de retrocruzamento (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Uma outra aplicação dos marcadores na seleção assistida é durante o processo de piramidação de alelos de resistência. Essa é uma estratégia que vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro. No entanto, na prática, é um processo extremamente difícil e trabalhoso, principalmente pela dificuldade em se identificar, de modo preciso, os sintomas de resistência após múltiplas inoculações. Marcadores moleculares ligados aos alelos a serem piramidados podem ser monitorados ao longo do processo de piramidação, constituindo-se em ferramenta de seleção indireta, evitando-se dificuldades inerentes ao processo de seleção via análise de sintomas (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A piramidação de genes de resistência tem sido sugerida como uma estratégia para proporcionar resistência durável a diferentes patótipos de um mesmo patógeno (NELSON, 1979). A identificação de marcadores moleculares fortemente ligados aos genes de resistência tem facilitado o processo de piramidação desses genes (MIKLAS et al., 1993; KELLY et al., 1998).

Na piramidação, existe um potencial para manter a resistência a doenças por um longo período, ou seja, para aumentar a durabilidade da resistência. A base para estabilização da resistência reside na redução da adaptação do patógeno, quando um número de genes de virulência é necessário para “quebrar” a resistência do hospedeiro (VAN DER PLANK, 1984). Além disso, a probabilidade de um patógeno conter todos os genes de virulência correspondentes aos genes de resistência da planta, de modo que, consiga superar a resistência de uma pirâmide, é muito pequena.

Alguns exemplos bastante recentes do uso de marcadores moleculares visando a piramidação podem ser citados. HUANG et al. (1997) piramidaram quatro genes de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* na cultura do arroz, sendo que, linhagens com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas para resistência a esse patógeno. SINGH et al. (2001) piramidaram os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21* de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) no cultivar de arroz PR106.

TAR'AN et al. (2003), trabalhando com lentilha no Canadá, utilizaram marcadores moleculares ligados aos genes *ral 1* e *AbR 1* de resistência *Ascochyta lentis* e um gene de efeito maior para resistência ao isolado 95B36 de *Colletotrichum truncatum*, para realizar a piramidação. MUKESHIMANA et

al. (2005) usaram o marcador RAPD OPG06₅₉₅ ligado a 3,7 cM do gene *bc-3*, o qual combinado ao gene *I*, promove um amplo espectro de resistência ao vírus do mosaico comum (BCMV) em feijoeiro.

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foram identificados vários marcadores RAPD ligados aos genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular, os quais foram utilizados durante o processo de obtenção de diversas isolinhas através de subprogramas de retrocruzamentos.

CORREA et al. (2000) identificaram o marcador OPBA08_{560a} ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 6,0 cM presente no cultivar Ouro Negro. Também, no cultivar Ouro Negro, foram identificados os marcadores OPF10_{1050a} e OPX11_{550a} ligados a 7,7 e 5,8 cM de distância do gene de resistência à ferrugem, respectivamente (FALEIRO et al. 2000).

ARRUDA et al. (2000) identificaram no cultivar TO os marcadores OPY20₈₃₀ e OPB03₁₈₀₀ ligados a distâncias de 0,0 e 3,8 cM do gene *Co-4*. ALZATE-MARIN et al. (1999) identificaram o marcador OPAZ20₉₄₀ ligado ao gene de resistência para antracnose *Co-6* presente no cultivar AB 136 a uma distância de 7,4 cM.

Diversos marcadores para genes de resistência à mancha-angular já foram identificados. CARVALHO et al. (1998), trabalhando com o cultivar AND 277, relataram que o marcador OPH13₄₉₀ está ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência à raça 63.23 de *P. griseola*, a uma distância de 5,5 cM. Os marcadores RAPD OPN02₈₉₀, OPAC14₂₄₀₀, e OPE04₆₅₀ estão ligados em acoplamento, respectivamente, a 5,9; 6,6 e 11,8 cM de distância do gene de resistência ao patótipo 63.19 de *P. griseola* presente em México 54 (SARTORATO et al., 1999). Os marcadores SCAR N02₈₉₀ e OPE04₆₅₀, também estão ligados ao gene de resistência presente em Cornell 49242 a uma distância de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente (NIETSCHKE et al., 2000b). O marcador OPE04₅₀₀, também em fase de acoplamento, está ligado ao gene de resistência ao patótipo 63.39 de *P. griseola*, presente em MAR-2, a uma distância de 5,8 cM (FERREIRA et al., 2000). (CAIXETA et al., 2003) relataram que os marcadores OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀ estão ligados a 5,83 e 5,10 cM, respectivamente, do gene de resistência ao patótipo 61.41 de *P. griseola* do cultivar BAT332.

Recentemente, vários marcadores SCAR foram desenvolvidos para a maioria destes marcadores RAPD (CORREA et al., 2000; NIETSCHE et al., 2000b; QUEIROZ et al., 2004a; QUEIROZ et al., 2004b; SOUSA et al., 2004) e várias isolinhas contendo genes separadamente foram intercruzadas, visando à piramidação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-AYALA, G., SCHWARTZ, H.F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.22, p.221-222, 1979.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.89, p.281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., 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**, v.30, p.333-342, 2005.
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.90, p.758-761, 2000.
- CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., ALZATE-MARIN, A.L. NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., 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** v. 134, n.3, p.297-303, 2003.
- CONAB. Nono levantamento de avaliação da safra 2005/2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em setembro de 2006.
- 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**, v.40, p.804-807, 2000.
- CORREA-VICTORIA, F.J., PASTOR-CORRALES, M.A. e SAETLER, A.W. Mancha angular de la hoja. In: PASTOR-CORRALES, M.A. e SCHWARTZ, H.F. (eds.) **Problemas de producción de frijol en los trópicos**. Cali. CIAT. 1994. p.67-86.
- EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO. Socioeconomia: Dados de mercado. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acessado em agosto de 2006.

- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.399-402, 2000.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. NIETSCHKE, S., PAULA JR., T.J., A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.
- HECKMAN, D.S., GEISER, D.M., EIDELL, B.R., STAUFFER, R.L., KARDOS N.L., HEDGES, S.B. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, v. 293, p.1129-1133, 2001.
- HUANG, N., ANGELES, E.R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.313-320, 1997.
- JESUS JR., W.C., DO VALE, F.X.R., COELHO, R.R., HAU, B., ZAMBOLIN, L., COSTA, L.C., BERGAMIN FILHO, A. Effects of angular leaf spot and rust on yield losses of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v.91, p.1045-1053, 2001.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, p.1-11, 1998.
- MAHUKU, G.S., JARA, C., CAJIAO, C., BEEBE, S. Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. **Euphytica**, v.130, p.303-313, 2003.
- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.745-749, 1993.
- MORA-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.
- MUKESHIMANA, G., PAÑEDA, A., RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C., FERREIRA, J.J., GIRALDEZ, R., KELLY, J.D. Markers linked to the *bc-3* gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. **Euphytica**, v.144, p.291-299, 2005.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant Disease, an Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1979. p. 23-46.

- NIETSCHE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum NO Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.262, p.567-571, 1998.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n.273, p.567-572, 2000a.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, v.148, p.117–121, 2000b.
- OLIVEIRA, E.J., ALZATE-MARIN, A.L., BORÉM, A., MELO, C.L.P., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia brasileira**, v.29, p.220-223, 2004.
- OROZCO, S.C. e ARAYA, C.M.F. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 589-593, 2005.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA C.E., SINGH, S.P. Pathogenic variation in, sources of, and Breeding for Resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing the angular leaf spot in common Beans. **Euphytica**, v.103, p.161-171, 1998.
- PAULA JR., 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**. 2º ed. Viçosa, MG, Editora UFV, 2006. p. 359-414.
- QUEIROZ, V. T.; SOUSA, C. S.; COSTA, M. R.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; SOUZA, T. L. 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**, v.47, p.237-238, 2004 a.
- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, 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**, v. 47, p.249-250, 2004b.
- RAVA, C., SARTORATO, A. e DE CARVALHO, J.R. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.25, p.5-6, 1985.
- RAVA, C.A. Influência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular em feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.65-69, 2002.

- SARTORATO, A. e RAVA, C.A. Especialização fisiológica de *Isariopsis griseola* Sacc. em *Phaseolus vulgaris* L. **Summa Phytopatologica**, v.10, p.58-59, 1984.
- SARTORATO, A. e RAVA, C.A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.247-251, 1992.
- SARTORATO, A. e RAVA, C.A. Mancha angular. In: SARTORATO, A. e RAVA, C.A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.41-68.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.21-22, 1999.
- SARTORATO, A. e RAVA, CA. Controle da mancha-angular do feijoeiro comum pelo método de aplicação convencional de fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.70-72, 1999.
- SARTORATO, A. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.78-81, 2002.
- SARTORATO, A. e ALZATE-MARIN, A.L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.47, p.235-236, 2004.
- SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.192-194, 2006.
- SINGH, S., SIDHU, J. S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H. S., KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.1011-1015, 2001.
- SOUSA, C. S., QUEIROZ, V. T., RAGAGNIN, V. A., SANGLARD, D. A., COSTA, M. R., SOUZA, T. L. P. O., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to different disease resistant genes of common bean. In: **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, Caxambú, MG. Brazil, 2004. (Resumo).
- SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Virulence diversity of *Uromyces appendiculatus* in Minas Gerais state, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 49, p.227-228, 2006.
- STAVELY, J.R. Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. **Plant Disease**, v.68, p.95-99, 1984.

- SCHWARTZ, H.F. Anthracnose. In: HALL, R. (Ed.) **Compendium of bean diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p.16.
- TAR'AN, B., BUCHWALDT, L., TULLU, A., BANNIZA, B., WARKENTIN, T.D., VANDENBERG, A. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Euphytica**, v.134, p.223-230, 2003.
- VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1984. 194p.
- VARGAS, E. **Rust**. In: SCHWARTZ H.F. e GÁLVEZ, G.E. (eds.). Bean production problems: Disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1980. p.17-36.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- VIEIRA, R.F., PAULA JR., T.J. Sementes: veículo de disseminação de patógenos. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**: Viçosa: Editora UFV, 1998. p.451-505.
- ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário** n.4, p.50-63, 1978.

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um importante alimento para a população brasileira e constitui fonte básica de proteína na dieta de milhões de pessoas de diferentes classes sociais. O hábito de consumo de feijão pelo brasileiro, associado à ampla adaptação climática dessa leguminosa faz com que a cultura esteja distribuída por todo o território nacional.

Um dos importantes fatores que limitam a produtividade e o desempenho do feijoeiro são as doenças. Entre as doenças de maior importância no território nacional, merecem destaque a ferrugem, incitada por *Uromyces appendiculatus*, a antracnose, incitada por *Colletotrichum lindemuthianum*, e a mancha-angular, incitada por *Phaeoisariopsis griseola*, sendo todas de origem fúngica.

O cultivar Cornell 49-242 foi desenvolvido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Em estudos de alelismo realizados por CAIXETA (2002; 2005), foi constatada a presença de um único gene denominado *Phg-3*, confirmando os resultados obtidos por NIETSCHE et al. (2000b). Este é resistente a sete de 13 patótipos de *P. griseola* identificados no estado de Minas Gerais (NIETSCHE et al., 1998).

Possuindo resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, o cultivar Ouro Negro apresenta tegumento preto, alta produtividade e boas qualidades culinárias. Esse cultivar, foi introduzido no Brasil como Honduras 35 e recomendado como cultivar Ouro Negro em 1991 (ARAÚJO et al., 1991). Ouro Negro apresentou resistência a 13 patótipos de *U. appendiculatus* coletados no estado de Minas Gerais (FALEIRO et al., 1999). Também possui excelentes características agronômicas, sendo então recomendado pelo SNPA (Sistema Nacional de Pesquisa Agrícola) para o cultivo em vários estados. Além disso, ALZATE-MARIN et al. (2004) relata que o cultivar Ouro Negro foi testado com 24 dos 94 isolados de *U. appendiculatus* mantidos pelo USDA

(*Beltsville United States Department of Agriculture*), mostrando reação de resistência a 22 patótipos, moderada reação para 78 patótipos e suscetível somente ao patótipo 108. O cultivar Ouro Negro também apresenta boa capacidade de combinação em cruzamentos com cultivares do tipo carioca (FALEIRO et al., 2002). Ele possui um gene de resistência à antracnose designado *Co-10* (ALZATE-MARIN et al., 2003). Por meio da técnica de inoculações seqüenciais com patótipos de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, demonstrou-se que os genes de resistência a estes patógenos estão ligados a uma distância de 12,3 cM (FALEIRO et al., 2000). Tais características justificam seu freqüente uso em programas de melhoramento.

SARTORATO (2006), estudando a reação de 28 genótipos de feijoeiro quanto à resistência a oito patótipos de *P. griseola*, concluiu sobre a presença de dois grupos com base em análise de agrupamento, onde os cultivares Cornell 49-242 e Ouro Negro se enquadram como os de maiores graus de resistência.

O cultivar Rudá, foi desenvolvido a partir do cruzamento entre os cultivares Carioca e Rio Tibagi (CIAT, 1986), sendo introduzido no Brasil como linhagem A 285 pela EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO (Goiânia, GO). Esse cultivar tem sido utilizado por pesquisadores do BIOAGRO/UFV como progenitor recorrente e também como *background* genético base do processo de piramidação.

O cultivar Pérola é proveniente de seleção no cultivar Aporé (linhagem LR 720982 CPL53) realizada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO). Após avaliações em 57 ambientes, realizadas na Bahia (Região do Além São Francisco), em Goiás (incluindo o Distrito Federal), Mato Grosso e Minas Gerais, a referida linhagem foi indicada para lançamento com o nome Pérola (SNA, 2006).

Os cultivares Rudá e Pérola possuem características agronômicas desejáveis, tais como alta produtividade, estabilidade de produção e tipo de grão com padrão comercial. Desse modo, os genes incorporados nesses materiais, poderiam ser futuramente transferidos, de forma mais rápida, para outros cultivares a serem lançados.

O programa de piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, conduzido no BIOAGRO/UFV, utiliza o cultivar Ouro Negro como uma das fontes de resistência para essas doenças (FALEIRO et al., 2000). O cultivar Cornell 49-242 apresenta-se como fonte de resistência à mancha-angular complementar a outras isolinhas já desenvolvidas pelo programa, podendo ser utilizado na obtenção de resistência de amplo espectro aos patótipos de *P. griseola* (NIETSCHE et al., 2000a).

A transferência de genes de resistência a doenças para cultivares de feijoeiro do tipo carioca tem sido um dos objetivos do melhoramento desta cultura, e para isso a utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento se torna uma ferramenta importante. Linhagens contendo genes de resistência em separado seriam futuramente intercruzadas, configurando o processo de piramidação.

Assim, objetivando transferir genes de resistência à ferrugem, antracnose, e mancha-angular, do cultivar Ouro Negro para o cultivar Pérola, e o gene de resistência à mancha-angular do cultivar Cornell 49-242 para o cultivar Rudá, foram conduzidos dois subprogramas de retrocruzamentos. Para alcançar esse objetivo, foram utilizadas inoculações com os patógenos causadores das doenças bem como marcadores moleculares disponíveis na literatura ligados aos genes de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais de condução dos experimentos

O presente trabalho foi conduzido nas dependências do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG.

As inoculações com os patógenos incitadores da ferrugem, antracnose e mancha-angular foram feitas na câmara de nevoeiro do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG.

Os cruzamentos e as avaliações dos sintomas das doenças foram realizados em casa de vegetação, onde sementes de cada genótipo, em cada geração obtida, foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg da formulação 4-14-8 por m³ de substrato.

As análises moleculares envolvendo extração de DNA, quantificação, reações de amplificação e fotodocumentação, foram conduzidas no Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOAGRO/UFV).

2.2. Material genético

Foram utilizados como genitores recorrentes os cultivares Pérola e Rudá, os quais tiveram como genitores doadores contrastantes, os cultivares Ouro Negro e Cornell 49-242, respectivamente. A Tabela 1 mostra a descrição de algumas características destes cultivares.

Tabela 1. Características dos genitores utilizados nos cruzamentos.

Cultivares	Genes de resistência	Centro de origem	Porte	Tamanho dos grãos	Tipo de grão	Cor da flor
Pérola	-	MA	Semi-ereto	Médio	Carioca	Branca
Rudá	-	MA	Ereto	Médio	Carioca	Branca
Ouro Negro	<i>Ur-ON, Co-10 e Phg-ON</i>	MA	Prostrado	Médio	Preto	Roxa
Cornell 49-242	<i>Phg-3</i>	MA	Prostrado	Pequeno	Preto	Roxa

MA: Mesoamericano; (-): Ausência de genes de resistência caracterizados.

2.3. Obtenção de famílias derivadas de Pérola x Ouro Negro

Inicialmente, foram realizados cruzamentos artificiais em casa de vegetação entre os cultivares Pérola e Ouro Negro. A natureza híbrida das plantas F_1 foi confirmada pelo marcador morfológico cor da flor, sendo que, Ouro Negro possui flores de cor roxa, e Pérola flores brancas. Considerando que o caráter cor da flor é de herança monogênica com relação alélica de dominância completa, e que Ouro Negro foi utilizado como doador de pólen; as plantas F_1 verdadeiramente resultantes de hibridação apresentaram flores roxas. Plantas com flores brancas foram produtos da autofecundação de Pérola. Após a confirmação das plantas F_1 , procedeu-se o cruzamento dessas com o cultivar Pérola, obtendo-se assim, sementes RC_1F_1 (Pérola x Ouro Negro).

As plantas RC_1F_1 (Pérola x Ouro Negro) foram inoculadas sequencialmente com os patógenos causadores da ferrugem, antracnose e mancha-angular. As plantas que se mostraram resistentes às três doenças simultaneamente tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência. Apenas os indivíduos que apresentaram todas as marcas moleculares foram utilizados na análise de *fingerprinting* molecular. Nessa análise, objetivou-se identificar em cada ciclo de retrocruzamentos, genótipos com maior grau de similaridade genética em relação ao genitor recorrente, nesse caso, maior recuperação do genoma de Pérola. Para isso, foram utilizados *primers* que apresentavam polimorfismo em relação aos genitores Pérola e Ouro Negro por meio de um *screening* molecular. Os resultados da análise de proximidade genética dos indivíduos RC_1F_1 (Pérola x Ouro Negro) em relação ao genitor recorrente permitiram a identificação dos que alcançaram maior recuperação.

Os indivíduos RC_1F_1 (Pérola x Ouro Negro) selecionados com base no *fingerprinting* molecular foram então cruzados com o cultivar Pérola, originando assim, a população RC_2F_1 (Pérola x Ouro Negro). Essa foi também inoculada com patógenos incitadores das três doenças e as plantas resistentes tiveram seu DNA extraído. Os indivíduos RC_2F_1 (Pérola x Ouro Negro) que apresentaram todas as marcas moleculares foram submetidos a uma nova análise de *fingerprinting*, onde foram selecionados *primers* distintos em relação

ao *screening* molecular do ciclo anterior. Deste modo, foram identificados indivíduos RC₂F₁ (Pérola x Ouro Negro) relativamente mais próximos de Pérola.

Ao se utilizar de indivíduos mais próximos geneticamente ao genitor recorrente, durante as gerações de retrocruzamentos, pode-se obter, com grande probabilidade, uma recuperação mais acelerada, superando a média teórica esperada para cada ciclo. Sementes provenientes dos indivíduos RC₂F₁ (Pérola x Ouro Negro) selecionados foram semeadas. Posteriormente, as plantas originadas foram, também, cruzadas com o genitor recorrente Pérola, visando à obtenção de sementes RC₃F₁ (Pérola x Ouro Negro).

As plantas RC₃F₁ (Pérola x Ouro Negro), igualmente aos ciclos anteriores, foram inoculadas de maneira seqüencial. As avaliadas como resistentes tiveram seu DNA extraído e amplificado também com os marcadores moleculares já descritos. Foram realizados novos *screening* e *fingerprinting* moleculares, obtendo-se já no terceiro ciclo de retrocruzamento, uma recuperação satisfatória de Pérola.

Deste ponto em diante, as plantas RC₃F₁ (Pérola x Ouro Negro) selecionadas geraram RC₃F₂ (Pérola x Ouro Negro). Considerando que o feijão é uma espécie autógama com baixa frequência de alogamia, a autofecundação dispensou qualquer cuidado em especial. Evidentemente, que, por meio da teoria de retrocruzamentos, a população RC₃F₂ (Pérola x Ouro Negro) ainda apresentava genótipos segregantes quanto aos genes de resistência às três doenças de interesse. Foram realizados testes de progênie, sendo para isso obtidas sementes RC₃F_{2:3} (Pérola x Ouro Negro), as quais foram semeadas em estrutura de famílias, mantendo as informações da genealogia de cada planta durante todo o processo.

Todas as famílias RC₃F_{2:3} (Pérola x Ouro Negro) foram inoculadas com os patógenos incitadores da antracnose, ferrugem e mancha-angular, nessa ordem seqüencial durante o mesmo ciclo. A partir daí, as famílias que se mostraram resistentes às três doenças simultaneamente, não segregando para nenhuma doença, tiveram o DNA das folhas extraído de cada planta dentro de cada família. Foi mantida a informação das plantas pertencentes a cada família resistente e não segregante, durante as ampliações com os mesmos

marcadores moleculares ligados aos genes de resistência utilizados durante todo o processo.

Foram identificadas também, famílias que não segregaram com relação às marcas moleculares, ou seja, dentro de cada família, todas as plantas apresentaram as bandas de interesse para todos os *primers* utilizados. Posteriormente, sementes RC₃F_{2:4} (Pérola x Ouro Negro) oriundas de algumas plantas dentro de cada família homocigota para os genes de interesse foram selecionadas. Essa seleção foi baseada no formato e na cor dos grãos, comparativamente e mais próximos ao *background* Pérola, mantendo-se as informações quanto à genealogia. Essas seleções se fizeram por mais duas gerações, chegando a isolinhas RC₃F_{2:6} (Pérola x Ouro Negro). O esquema de obtenção destes materiais está resumido na Figura 1.

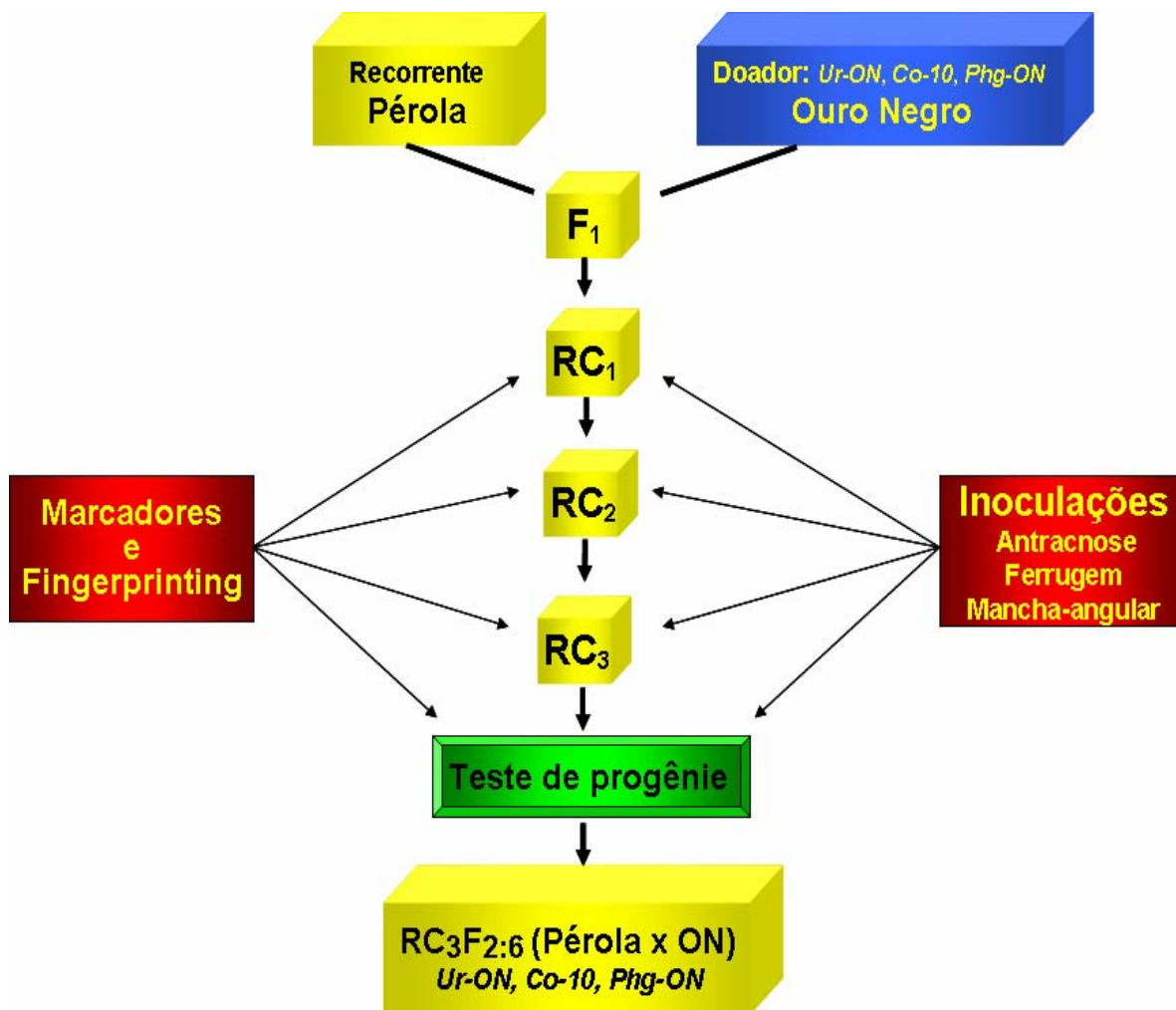


Figura 1. Procedimentos utilizados na transferência simultânea de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular do cultivar Ouro Negro para o cultivar Pérola. Foram utilizados retrocruzamentos monitorados por inoculações e marcadores moleculares.

2.4. Obtenção de genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242

Foram realizados cruzamentos artificiais entre os cultivares Rudá e Cornell 49-242. Os genótipos resistentes RC_2F_1 (Rudá x Cornell 49-242) foram obtidos de forma similar ao cruzamento Pérola x Ouro Negro (item 2.3). As inoculações foram realizadas apenas com o patógeno incitador da mancha-angular. Indivíduos RC_2F_1 (Rudá x Cornell 49-242) selecionados como mais próximos ao cultivar Rudá foram utilizados como doadores de pólen nos

cruzamentos com uma isolinha obtida pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, denominada Rudá “R” (RAGAGNIN et al., 2005). Esta isolinha possui cinco genes de resistência piramidados, sendo um para a ferrugem (*Ur-ON*), um para a mancha-angular (*Phg-1*) e outros três para antracnose (*Co-4*, *Co-10* e *Co-6*). Os cruzamentos com as isolinhas Rudá “R” foram efetuados somente após o segundo ciclo de retrocruzamento devido ao fato de que, seria mais oneroso, monitorar todos os genes, desde gerações mais precoces. Paralelamente, também foram obtidas sementes RC₃F₁ (Rudá x Cornell 49-242), visando futuramente, facilitar inferências quanto ao ganho no espectro de resistência à *P. griseola*. Na Figura 2, está resumido o esquema de obtenção destes materiais.

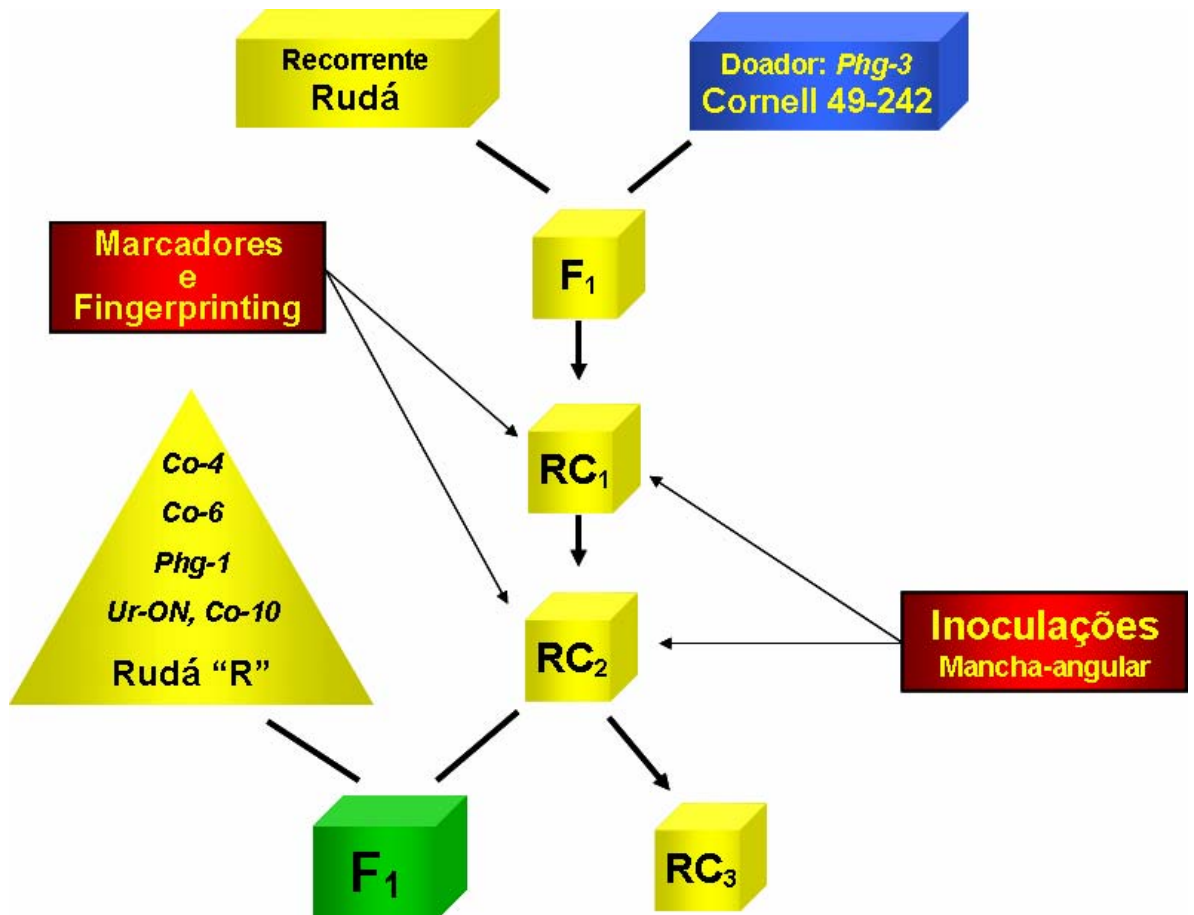


Figura 2. Esquema da obtenção de genótipos com grãos tipo carioca, contendo o gene de resistência à mancha-angular oriundo de Cornell 49-242 e introgressão desse na isolinha Rudá “R”. Os monitoramentos foram feitos por meio de inoculações e marcadores moleculares.

2.5. Seleção por meio de inoculações

2.5.1. Genótipos derivados de Pérola x Ouro Negro

As sementes de cada genótipo foram semeadas em vasos mantidos em casa de vegetação, sendo que, as inoculações para as três doenças foram feitas seqüencialmente em cada geração. A ordem de inoculação das três doenças foi planejada de modo a permitir que fossem feitas em câmara de nevoeiro antes que alcançassem o ponto de tutoramento das plantas. Primeiramente foi inoculado o fungo *C. lindemuthianum*, quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. A avaliação dos sintomas foi feita sete dias após a inoculação. Em seguida, as plantas que se mostraram resistentes à antracnose, foram inoculadas com *U. appendiculatus* na primeira ou segunda folha trifoliolada. Aos 15 e 18 dias após a inoculação foram feitas as avaliações dos sintomas de ferrugem. Em seguida, as plantas resistentes foram inoculadas com *P. griseola*. Nessa etapa, as plantas já se encontravam no estágio de desenvolvimento V4 (presença da terceira folha trifoliolada), sendo inoculado apenas um trifólio. Plantas resistentes simultaneamente às três doenças tiveram uma de suas folhas destacadas para avaliações moleculares.

2.5.2. Genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242

As sementes de cada genótipo foram semeadas em vasos mantidos em casa de vegetação. A cada geração, foram realizadas inoculações apenas para mancha-angular, utilizando o mesmo patótipo de *P. griseola* da seleção dos genótipos derivados de Pérola x Ouro Negro.

As inoculações foram efetuadas quando a primeira folha trifoliolada completava cerca de 2/3 do seu desenvolvimento. Plantas resistentes tinham uma de suas folhas destacadas para posteriores avaliações moleculares. As suspensões contendo os inóculos foram aplicadas em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de atomizador De Vilbiss nº15 impulsionado por compressor elétrico.

2.5.3. Obtenção do inóculo de *Uromyces appendiculatus*

Para a inoculação de *U. appendiculatus* com o patógeno da ferrugem foram utilizados uredósporos do patótipo 11, identificado por FALEIRO et al. (1999). Porém, SOUZA (2005) reclassificou esse patótipo como raça 61-3 com base no novo procedimento internacional (STEADMAN et al., 2002).

As culturas monospóricas estavam armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa na micoteca do BIOAGRO/UFV. Os uredósporos foram multiplicados no hospedeiro suscetível cultivar US Pinto 111. O inóculo foi preparado utilizando uma concentração de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ uredósporos/mL (DAVISON e VAUGHAN, 1964), suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, visando uma melhor dispersão dos uredosporos.

2.5.4. Obtenção do inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum*

Para a avaliação da resistência à *C. lindemuthianum* foi utilizado o patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, o qual foi caracterizado por RAVA et al. (1994). O inóculo foi preparado segundo a metodologia de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). A esporulação do patógeno para a obtenção do inóculo foi conseguida transferindo-se o micélio, em condições assépticas, do meio BDA para tubos de ensaios contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Em seguida, esses tubos foram mantidos por sete dias à temperatura de 23°C. A concentração final do inóculo utilizada foi de $1,2 \times 10^6$ esporos/mL.

2.5.5. Obtenção do inóculo de *Phaeoisariopsis griseola*

A caracterização da resistência à mancha-angular foi realizada utilizando o patótipo 63.23, classificado por NIETSCHE (1998 e 2000). O inóculo consistiu de uma suspensão de conídios preparada raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade crescendo a 24°C sobre placas contendo uma mistura água destilada, molho de tomate, ágar e carbonato de cálcio (CaCO_3). Essa suspensão foi filtrada em gase e posteriormente ajustada para concentração final de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL.

2.5.6. Avaliação da resistência a *Uromyces appendiculatus*

Os uredósporos foram aspergidos em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $>95\%$), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas.

Na avaliação dos sintomas foram considerados seis graus de reação segundo a escala proposta no "The Bean Rust Workshop": 1- ausência de pústulas, 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro $< 300 \mu\text{m}$, 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300 a 499 μm , 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500 a 800 μm e 6- pústulas esporulando com diâmetro $> 800 \mu\text{m}$ (STAVELY et al., 1983). As plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis. O grau de reação foi determinado mediante a observação visual das pústulas na face superior das folhas primárias, sendo utilizado, como auxílio nas observações, o diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985).

2.5.7. Avaliação de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*

O inóculo foi aplicado em ambas as superfícies das folhas com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por cinco dias na câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas. A avaliação dos sintomas da antracnose foi realizada 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 a 9, descrita por PASTOR-CORRALES (1992). 1- ausência de sintomas, 2- até 1% das nervuras apresentando manchas nevróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas, 3- maior freqüência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas, 4- até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas,

perceptíveis em ambas as faces das folhas, 5- maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas, 6- manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos e pecíolos, 7- manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe, presença de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolos, 8- manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas. Lesões abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo, 9- maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.5.8. Avaliação da resistência a *Phaeoisariopsis griseola*

A inoculação foi realizada em ambas as superfícies da folha com uma suspensão do patógeno, previamente preparada e ajustada. Os procedimentos de inoculação e transferência para a câmara de nevoeiro e para a casa de vegetação foram idênticos aos realizados no ensaio de ferrugem. A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 15, 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995): 1- plantas sem sintomas da doença; 2- presença de até 3% de lesões; 3- presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4- presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5- presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas aos tecidos; e 9- sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.6. Seleção por meio de marcadores moleculares

Durante as várias etapas do trabalho foram realizadas seleções assistidas por marcadores moleculares ligados aos genes de resistência às doenças. Na Tabela 2, estão descritos os marcadores utilizados.

Tabela 2. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular utilizados nos processos de seleção.

Marcador*	Distância [#] (cM)	Gene de Resistência	Fontes de Resistência	Referência
SCAR-BA08 _{560a}	6,0	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
SCAR-F10 _{1050a}	6,9	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
OPX11 _{550a}	5,8	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2000)
OPF10 _{1050a}	6,9	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2000)
OPAJ18 _{560a}	11,1	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPAA19 _{650a}	10,0	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2001)
OPBA16 _{669a}	10,4	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2003)
SCAR-BA16 _{669a}	9,7	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004)
SCAR-AA19 _{650a}	10,1	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004)
SCAR-N02 _{890a}	3,2	<i>Phg-3</i>	Cornell 49-242	NIETSCHE et al. (2000)
OPE04 _{650a}	12,5	<i>Phg-3</i>	Cornell 49-242	NIETSCHE et al. (2000)

*a: acoplamento; [#]cM: distância genética (centi-Morgan) dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência.

2.6.1. Extração de DNA

Em cada geração folhas de plantas selecionadas foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi feita de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

2.6.2. Análise com RAPD

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção por meio da análise da presença de marcadores moleculares ligados à resistência foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com WILLIAMS et al. (1990) e

WELSH et al (1990). Os *primers* foram adquiridos da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de *primer*, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. Os *primers* utilizados estão descritos no Tabela 2. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

2.6.3. Análise com SCAR

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR em mistura de reação de 25 µL contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto para o *primer*, que foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* específico. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C (SCAR AA19), 58°C (SCAR BA16), 60°C (SCAR BA08), 65°C (SCAR F10 e SCAR N02) por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos.

2.6.4. Eletroforese e fotodocumentação

Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submersas em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). No caso de marcadores do tipo RAPD, a separação eletroforética foi realizada durante um período de quatro horas aproximadamente a 100 volts, enquanto que para os marcadores SCAR foi utilizado um período de aproximadamente duas horas a 180 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.6.5. Análise de *fingerprinting* molecular

Para a identificação dos *primers* polimórficos, necessários na determinação das distâncias genéticas durante os três ciclos de retrocruzamentos, foram testados aleatoriamente entre os genitores, aproximadamente 150 *primers* RAPD.

Nas avaliações da similaridade genética em relação aos genitores recorrentes Pérola e Rudá, realizadas em cada uma das distintas populações, foram utilizados 14 *primers* RAPD. Somente os produtos de amplificação de fácil visualização e distinção foram usados no estudo de *fingerprinting* molecular.

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

Utilizou-se o Programa Genes versão Windows (CRUZ, 2001) para calcular as distâncias genéticas (D_{ij}) com base no complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973):

$$D_{ij} = \frac{b + c}{a + b + c + d} \text{ em que,}$$

D_{ij} = distância genética entre a linhagem ou genitor i e a linhagem ou genitor j ;

a = número de encontros 1, 1;

b = número de encontros 1, 0;

c = número de encontros 0, 1;

d = número de encontros 0, 0.

Para cálculo das distâncias genéticas relativas (DR_{ij}), a maior D_{ij} entre os genitores foi transformada para 100% e as demais D_{ij} , corrigidas proporcionalmente. As análises de divergência genética foram expressas em similaridade genética em relação aos cultivares recorrentes, Pérola e Rudá.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de isolinhas derivadas de Pérola x Ouro Negro

A partir do cruzamento entre os cultivares Pérola e Ouro Negro obtiveram plantas F_1 que foram retrocruzadas com o cultivar Pérola. Esse procedimento foi repetido por três ciclos de retrocruzamentos quando a recuperação satisfatória do cultivar Pérola foi alcançada. Em seguida foram realizados testes de progênie e avanço de gerações através do método de *bulk* dentro de família.

3.1.1. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do primeiro retrocruzamento

No primeiro retrocruzamento foram obtidas 40 sementes. Essas foram semeadas e as plantas F_1 inoculadas com os patógenos incitadores de ferrugem, antracnose e mancha-angular. Com base nas inoculações, foram obtidas 24 plantas resistentes às três doenças, das quais foi extraído o DNA de folhas para amplificação com os marcadores moleculares OPX11_{550a}, OPAJ18₅₆₀, OPF10_{1050a}, OPBA08_{560a}, OPBA16_{669a} e OPAA19_{650a} ligados aos genes de resistência. Dessa análise, foram obtidas 12 plantas com presença de todas as marcas moleculares. Na Figura 3, são exemplificadas amplificações com os marcadores OPF10_{1050a} e OPAJ18_{560a}.

Utilizando as 12 plantas RC_1F_1 selecionadas, foi feita a análise de *fingerprinting* molecular, utilizando-se os *primers* RAPD OPC-19, OPA-06, OPH-10, OPBF-13, OPBF-16, OPBF-20, OPBF-20, OPBH-08, OPAS-06, OPAU-20, OPN-07, OPAC-05, OPAK-12, e OPAT-04. Esses produziram 33 bandas polimórficas e 56 bandas monomórficas. Com base nos dados de *fingerprinting*, foi obtida a matriz de dados binários com a qual se realizou o cálculo da similaridade genética de indivíduos RC_1F_1 em relação ao genitor recorrente Pérola (Tabela 3).

As distâncias genéticas de indivíduos RC_1F_1 determinadas pela análise de similaridade genética relativa variaram de 40 a 21% em relação à Pérola. Em média, a recuperação teórica esperada em relação ao genitor recorrente é de 75%, entretanto, foram identificados os indivíduos 7, 12, e 19; os quais

alcançaram 79% (Figura 4). Estes indivíduos foram utilizados como doadores de pólen em cruzamentos com o genitor recorrente Pérola, obtendo-se, desse modo, a população do segundo retrocruzamento.

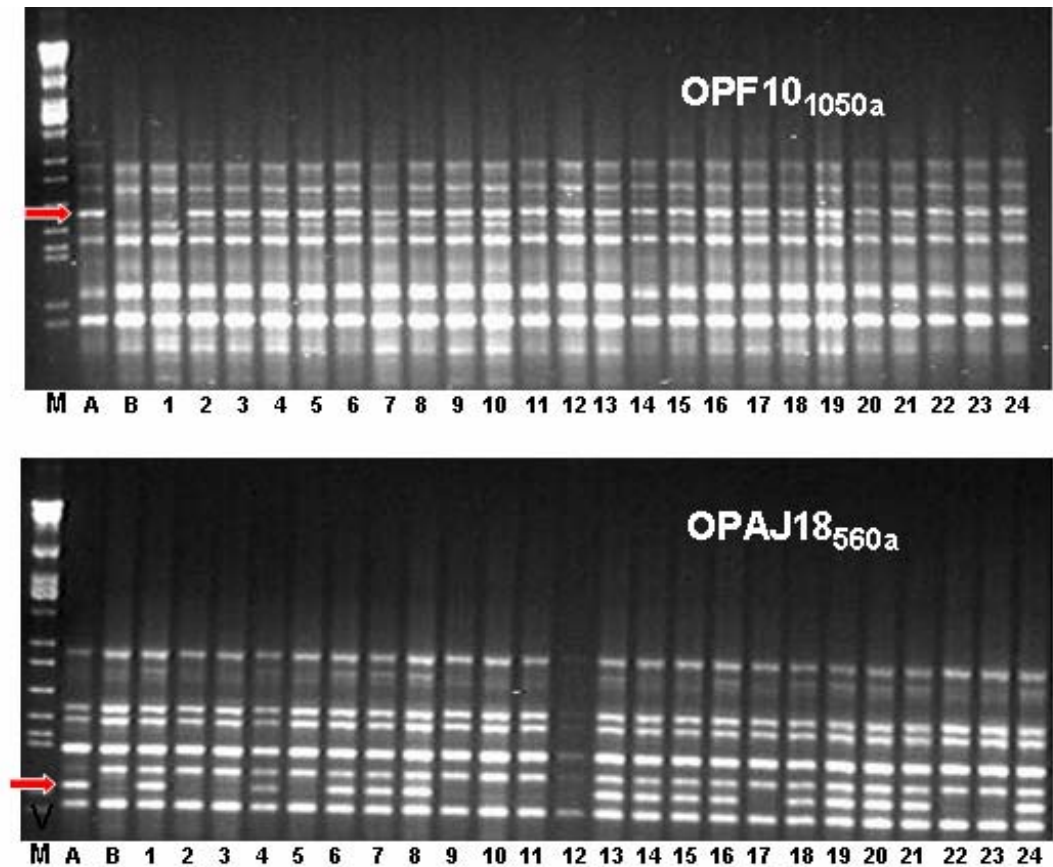


Figura 3. Produtos da amplificação do DNA com os *primers* OPF-10₁₀₅₀ e OPAJ-18₅₆₀. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Ouro Negro e Pérola estão representados nas colunas A e B, respectivamente, seguidos da população do primeiro retrocruzamento (números). As setas indicam as bandas de tamanhos específicos ligadas aos locos de resistência à ferrugem e antracnose.

Tabela 3. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₁F₁ e genitores.

Nº	ON	Pérola	4	6	7	8	12	13	16	18	19	20	21
Pérola 1,00													
4	0,65	0,29											
6	0,65	0,29	0,12										
7	0,70	0,21	0,29	0,18									
8	0,72	0,33	0,20	0,13	0,33								
12	0,70	0,21	0,29	0,18	0,00	0,33							
13	0,55	0,31	0,16	0,11	0,11	0,24	0,11						
16	0,60	0,36	0,12	0,12	0,24	0,20	0,24	0,11					
18	0,52	0,40	0,17	0,11	0,17	0,25	0,17	0,05	0,06				
19	0,70	0,21	0,29	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,17			
20	0,56	0,38	0,20	0,14	0,20	0,16	0,20	0,08	0,14	0,08	0,20		
21	0,60	0,36	0,24	0,12	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,11	0,18	0,03	
24	0,57	0,33	0,17	0,06	0,11	0,19	0,11	0,05	0,11	0,05	0,11	0,08	0,06

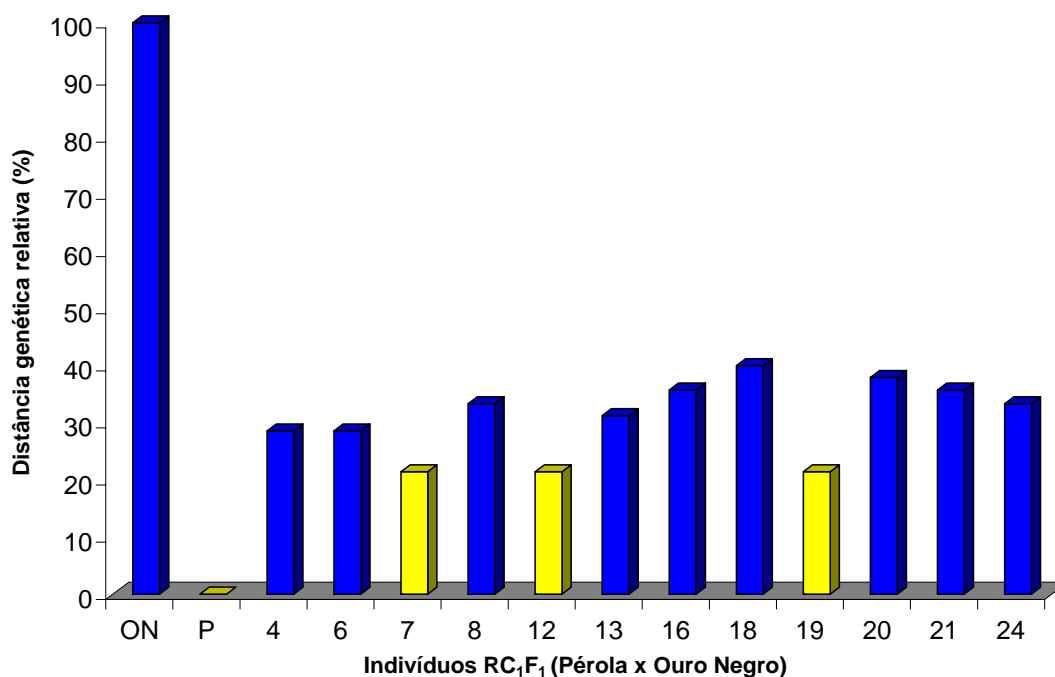


Figura 4. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₁F₁, o genitor resistente Ouro Negro (ON) e o genitor recorrente Pérola (P). As colunas amarelas representam as plantas mais próximas ao genitor recorrente Pérola.

3.1.2. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do segundo retrocruzamento

No segundo retrocruzamento foram obtidas 46 sementes. Essas sementes foram semeadas e as plantas F_1 inoculadas com os patógenos incitadores de ferrugem, antracnose e mancha-angular. Com base nas inoculações, foram identificadas 17 plantas resistentes às três doenças, das quais foi extraído o DNA de uma de suas folhas para amplificação com os marcadores moleculares OPX11_{550a}, OPAJ18₅₆₀, SCAR F10_{1050a}, SCAR BA08_{560a}, SCAR BA16_{669a} e SCAR AA19_{650a}. Nessa etapa do trabalho, o Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV já dispunha da maioria dos marcadores utilizados no ciclo anterior convertidos em SCAR. De acordo com as amplificações, foram encontradas 11 plantas com a presença todas as marcas moleculares. Na Figura 5, são apresentadas as amplificações com os marcadores SCAR BA16_{669a}, SCAR AA19_{651a} e OPX11_{550a}.

A partir das 11 plantas RC_2F_1 selecionadas, foi realizada a análise de *fingerprinting* utilizando os *primers* OPAO-10, OPV-02, OPAS-06, OPAS-13, OPAV-12, OPV-08, OPBF-13, OPBF-20, OPAU-20, OPAW-12, OPBF-16, OPBF-06, OPBE-06, e OPH-01, que produziram 36 bandas polimórficas e 49 bandas monomórficas. Com base nos dados de *fingerprinting*, foi obtida a matriz de dados binários com a qual se realizou a análise de proximidade genética de indivíduos em relação ao genitor recorrente (Tabela 4).

Em média, a recuperação teórica esperada em relação ao genitor recorrente é de 87,5% no segundo retrocruzamento, entretanto, foram identificados os indivíduos 6, 9 e 11 que tiveram recuperações entre 91% e 93% (Figura 6). A continuidade dos retrocruzamentos foi feita com as sementes originadas dos indivíduos identificados com maior grau de recuperação do genitor recorrente.

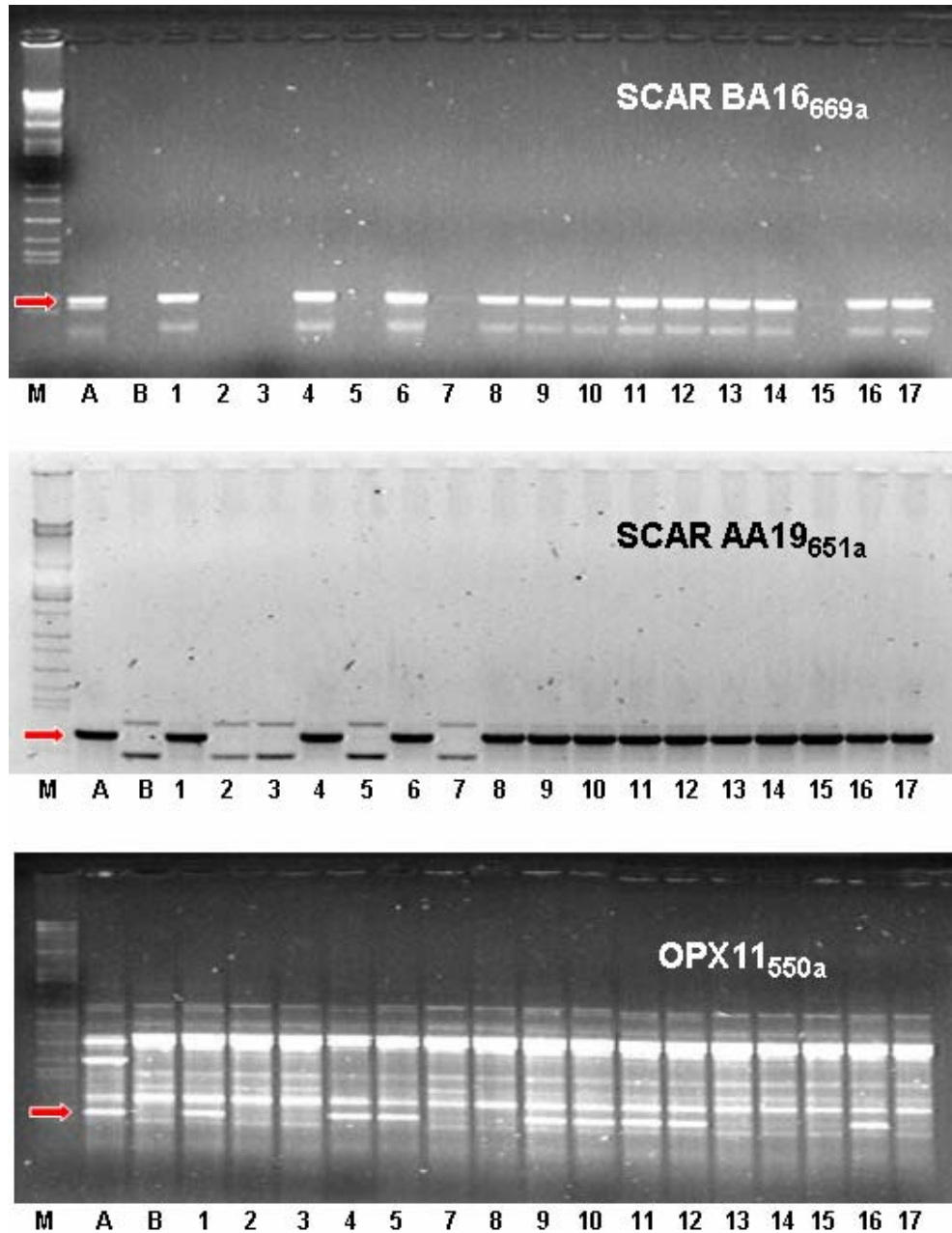


Figura 5. Produtos das ampliações com os *primers* SCAR BA16_{669a}, SCAR AA19_{651a} e OPX11_{550a}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Ouro Negro e Pérola estão representados nas colunas A e B, respectivamente, seguidos da população do segundo retrocruzamento (números). As setas indicam as bandas de tamanhos específicos ligadas aos locos de resistência à mancha-angular e ferrugem.

Tabela 4. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₂F₁ e genitores.

Nº	ON	Pérola	1	4	5	6	8	9	10	11	12	13
Pérola	1,00											
1	0,82	0,23										
4	0,79	0,11	0,14									
5	0,79	0,11	0,14	0,04								
6	0,80	0,09	0,16	0,02	0,02							
8	0,84	0,09	0,27	0,11	0,11	0,08						
9	0,89	0,07	0,25	0,09	0,09	0,06	0,02					
10	0,89	0,10	0,23	0,11	0,07	0,09	0,09	0,07				
11	0,94	0,07	0,21	0,14	0,09	0,11	0,12	0,10	0,02			
12	0,79	0,11	0,14	0,04	0,00	0,02	0,11	0,09	0,07	0,09		
13	0,79	0,11	0,14	0,04	0,00	0,02	0,11	0,09	0,07	0,09	0,00	
14	0,79	0,14	0,12	0,06	0,02	0,04	0,13	0,11	0,09	0,12	0,02	0,02

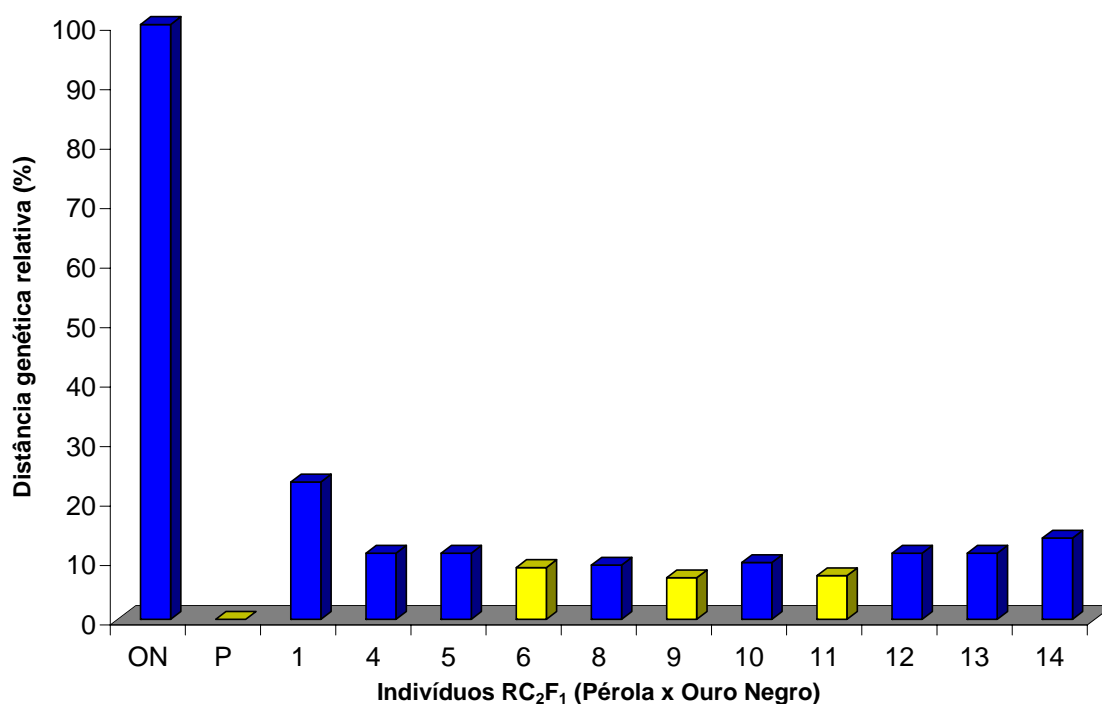


Figura 6. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₂F₁, o genitor resistente Ouro Negro (ON) e o genitor recorrente Pérola (P). As colunas amarelas representam as plantas mais próximas ao genitor recorrente Pérola.

3.1.3. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do terceiro retrocruzamento

No terceiro retrocruzamento foram obtidas 54 sementes. Essas foram semeadas e as plantas F_1 inoculadas com as três doenças. Com base nas inoculações foram selecionadas 23 plantas resistentes, sendo então extraído o DNA de uma de suas folhas. Após as ampliações com os mesmos *primers* utilizados no ciclo anterior, 15 plantas foram selecionadas possuindo todas as marcas. Os *primers* SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a} são utilizados como exemplo de seleção assistida neste terceiro ciclo de retrocruzamentos (Figura 7).

No *fingerprinting* molecular utilizando as 15 plantas selecionadas, foram usados os *primers* OPAR-08, OPBD-17, OPBC-12, OPB-17, OPC-12, OPB-11, OPC-02, OPC-14, OPA-06, OPN-07, OPAC-05, OPAK-12, OPAT-04 e OPC-19 que produziram 34 bandas polimórficas e 60 bandas monomórficas.

Com base nos dados de *fingerprinting*, foi obtida mais uma matriz de dados binários, com a qual se realizou novamente uma análise de proximidade genética dos indivíduos em relação ao genitor recorrente (Tabela 5).

As distâncias genéticas de indivíduos RC_3F_1 , determinadas pela análise de similaridade genética relativa, variou 8 a 2% em relação ao cultivar Pérola. Em média, a recuperação teórica esperada em relação ao genitor recorrente é de 93,75% para o terceiro retrocruzamento, entretanto foram identificados os indivíduos 2, 4, 7, 8, 9 e 15 que alcançaram recuperações entre 96% e 98% (Figura 8).

Após apenas três ciclos de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares, foram desenvolvidas sementes genéticas RC_3F_1 portando os alelos de resistência à ferrugem (*Ur-ON*), antracnose (*Co-10*) e mancha-angular (*Phg-ON*), e com boa recuperação do *background* genético carioca do cultivar Pérola. A partir destes indivíduos selecionados, foram obtidas sementes RC_3F_2 , visando à realização de testes de progênies.

Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes 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-*

OM). Além disso, os dados aqui apresentados confirmam a proposta de OPENSHAW et al. (1994), a qual diz 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.

Assim, 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 foram eficientes para uma amostragem representativa do genoma recorrente.

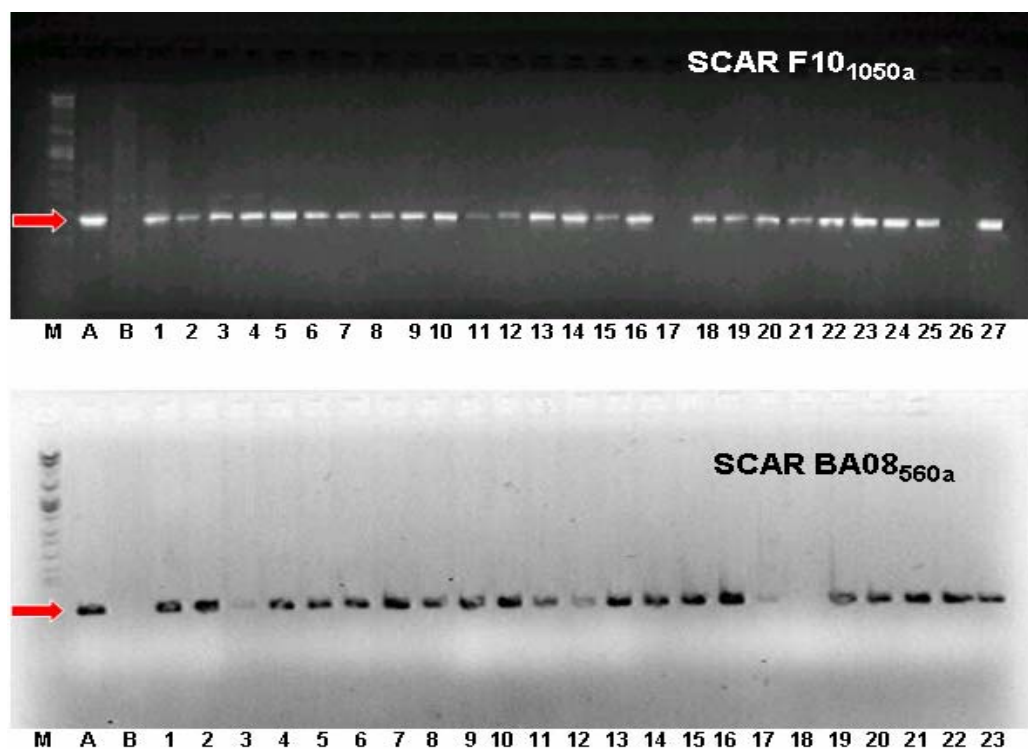


Figura 7. Produtos das ampliações com os primers SCAR F10_{1050a} e SCAR BA-08_{560a}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Ouro Negro e Pérola estão representados nas colunas A e B, respectivamente, seguidos da população do terceiro retrocruzamento (números). As setas indicam as bandas únicas ligadas aos locos de resistência à ferrugem e antracnose.

Tabela 5. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₃ F₁ e genitores.

	ON	Pérola	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Pérola	1,00															
1	0,92	0,08														
2	0,96	0,04	0,13													
3	0,92	0,08	0,17	0,08												
4	0,98	0,02	0,13	0,04	0,13											
5	0,92	0,08	0,17	0,08	0,00	0,13										
6	0,92	0,08	0,08	0,08	0,17	0,04	0,17									
7	0,96	0,04	0,13	0,04	0,13	0,08	0,13	0,21								
8	0,96	0,04	0,13	0,04	0,04	0,08	0,04	0,21	0,04							
9	0,96	0,04	0,13	0,04	0,13	0,08	0,13	0,21	0,04	0,08						
10	0,88	0,13	0,13	0,13	0,21	0,08	0,21	0,13	0,13	0,17	0,08					
11	0,88	0,13	0,13	0,13	0,21	0,08	0,21	0,13	0,13	0,17	0,08	0,13				
12	0,92	0,08	0,08	0,08	0,17	0,04	0,17	0,17	0,08	0,13	0,13	0,08	0,04			
13	0,88	0,13	0,13	0,13	0,21	0,08	0,21	0,13	0,13	0,17	0,08	0,13	0,13	0,17		
14	0,92	0,08	0,08	0,08	0,17	0,04	0,17	0,17	0,08	0,13	0,13	0,08	0,04	0,00	0,17	
15	0,96	0,04	0,13	0,04	0,13	0,08	0,13	0,21	0,04	0,08	0,13	0,08	0,04	0,08	0,17	0,08

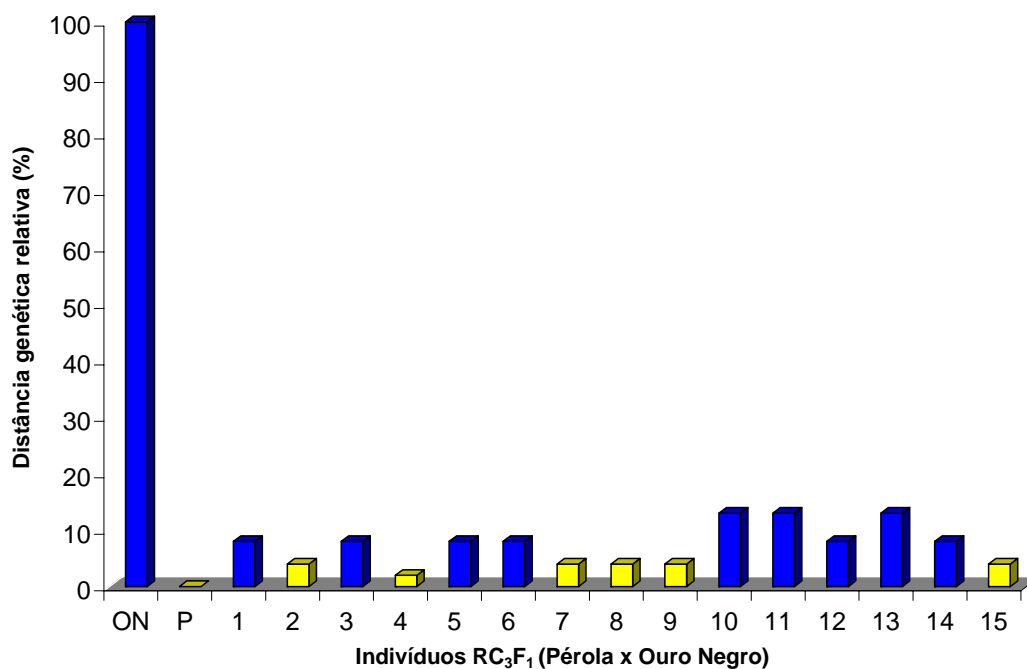


Figura 8. Distância genética relativa (%) entre plantas F₁RC₃, o genitor resistente Ouro Negro (ON) e o genitor recorrente Pérola (P). As colunas amarelas representam as plantas mais próximas ao genitor recorrente Pérola.

3.1.4. Testes de progênie

A partir das plantas RC_3F_1 selecionadas como mais recuperadas em relação ao *background* Pérola, foi dada continuidade este trabalho. Foram obtidas sementes RC_3F_2 , as quais foram semeadas em casa de vegetação conforme mostrado anteriormente. Essas plantas ainda segregaram para os genes de resistência transferidos até então via retrocruzamentos, sendo necessária mais uma geração de autofecundações para que se pudesse identificar materiais em homozigose.

Dessa forma, foram obtidas sementes $RC_3F_{2:3}$ e mantendo a informação de suas genealogias. Essas foram plantadas em estrutura de famílias, sendo posteriormente inoculadas com *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, utilizando-se os patótipos 61-3, 89 e 63.23, respectivamente; sendo esses, os mesmos usados nos ciclos anteriores. Para formação de cada família, foram semeadas 15 sementes distribuídas em número de três por vaso. Germinaram pelo menos 12 sementes dentro de cada família.

A verificação da homozigose para o gene *Co-10* das famílias $RC_3F_{2:3}$ (Pérola x Ouro Negro) após a inoculação com o patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, se deu a partir da análise dos sintomas de antracnose de cada planta. Das 31 famílias $RC_3F_{2:3}$ avaliadas, 10 apresentaram todas as plantas resistentes ao patótipo 89, permitindo inferir que essas famílias possuem o loco do gene *Co-10* em homozigose (Tabela 6).

Em seguida, as 10 famílias identificadas como resistentes a *C. lindemuthianum*, foram inoculadas com o patótipo 61-3 de *U. appendiculatus*. Após a avaliação dos sintomas, foram identificadas nove famílias não segregantes para o loco do gene *Ur-ON* (Tabela 7). Comparando as inoculações com o patótipo 89 de *C. lindemuthianum* e 61-3 de *U. appendiculatus*, podemos verificar que, ao selecionar para resistência à antracnose, também se fez indiretamente para a ferrugem, dado que houve apenas uma família que segregou para essa última. Essa co-segregação já havia sido observada também durante as seleções nos três ciclos de retrocruzamentos. Esses resultados estão de acordo com FALEIRO et al. (2003), que concluíram sobre a ligação genética utilizando 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) resultantes do cruzamento entre Ouro

Negro e Rudá. Foi demonstrado que vários genes de resistência à ferrugem encontram-se no mesmo grupo de ligação que contém os genes de resistência à antracnose, sendo os de mancha-angular em outro.

Tabela 6. Análise da segregação da resistência ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum* em famílias RC₃F_{2:3} (Pérola x Ouro Negro). Em destaque são mostradas as famílias não segregantes.

Famílias RC ₃ F _{2:3}	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistentes	Suscetível	
P-32-8-34-20	7	8	Rr
P-32-8-56-72	14	0	RR
P-18-15-78-23	13	0	RR
P-18-15-56-4	6	8	Rr
P-18-16-25-9	2	13	Rr
P-19-11-4-15	15	0	RR
P-19-7-33-44	4	10	Rr
P-19-18-109-23	0	15	rr
P-19-45-111-12	9	6	Rr
P-31-4-88-16	13	0	RR
P-43-25-26-13	11	3	Rr
P-9-61-43-19	2	13	Rr
P-9-43-37-15	13	0	RR
P-9-63-48-32	0	12	rr
P-9-25-19-4	0	14	rr
P-29-1-84-71	8	6	Rr
P-29-40-24-2	13	0	RR
P-40-79-35-7	4	8	Rr
P-14-41-6-27	15	0	RR
P-14-34-68-3	0	14	rr
P-14-8-32-5	0	15	rr
P-5-46-87-6	12	0	RR
P-21-65-43-7	0	14	rr
P-45-3-29-44	15	0	RR
P-17-9-23-42	14	0	Rr
P-17-5-22-7	5	10	Rr
P-17-5-58-19	0	12	rr
P-34-56-41-6	13	0	RR
P-36-14-16-14	8	4	Rr
P-8-57-74-3	11	2	Rr
P-12-23-56-41	13	0	RR

Tabela 7. Análise da segregação da resistência ao patótipo 61-3 de *U. appendiculatus* em famílias RC₃F_{2:3} (Pérola x Ouro Negro). Em destaque é mostrada a única família segregante.

Famílias	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistentes	Suscetível	
P-32-8-56-72	14	0	RR
P-18-15-78-23	13	0	RR
P-19-11-4-15	15	0	RR
P-31-4-88-16	13	0	RR
P-9-43-37-15	13	0	RR
P-29-40-24-2	13	0	RR
P-14-41-6-27	3	12	Rr
P-5-46-87-6	12	0	RR
P-45-3-29-44	15	0	RR
P-34-56-41-6	13	0	RR
P-12-23-56-41	13	0	RR

Utilizando o patótipo 63.23 de *P. griseola*, ainda foram realizadas inoculações nas nove famílias selecionadas como homozigotas até então quanto à resistência a ferrugem e antracnose. Foram identificadas seis famílias que apresentaram todas as plantas resistentes (Tabela 8). No mesmo trabalho realizado por FALEIRO et al. (2003), foi verificado que os genes de resistência às raças fisiológicas 32, 47, 49, 52, e 56 de *U. appendiculatus* estão proximamente ligados, o que também foi verificado para os genes de resistência às raças 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum* e às raças 31.55 e 63.31 de *P. griseola*. Durante a execução deste trabalho utilizando o patótipo 63.23, foram observadas segregações independentes da resistência à mancha-angular em relação à ferrugem e à antracnose. A grande diversidade de genes de resistência, bem como a organização genômica desses, poderia ser explicada pela ocorrência de pareamentos desiguais de cromossomos homólogos na meiose, levando à evolução de famílias multigênicas por duplicação do segmento contendo o gene ancestral (PRYOR e ELLIS, 1993).

As seis famílias contendo plantas resistentes às três doenças, tiveram o DNA de uma de suas folhas extraído. Mantendo a informação de cada planta dentro de cada família, realizaram-se reações de amplificação com os

marcadores moleculares OPX11_{550a}, OPAJ18₅₆₀, SCAR F10_{1050a}, SCAR BA08_{560a}, SCAR BA16_{669a} e SCAR AA19_{650a}, os quais foram os mesmos utilizados no segundo e terceiro ciclos de retrocruzamentos deste trabalho.

Tabela 8. Análise da segregação da resistência ao patótipo 63.23 de *P. griseola* em famílias RC₃F_{2:3} (Pérola x Ouro Negro). Em destaque são mostradas as avaliadas como não segregantes.

Famílias	Avaliação da resistência (Nº de plantas)		Genótipo
	Resistentes	Suscetível	
P-32-8-56-72	7	7	Rr
P-18-15-78-23	13	0	RR
P-19-11-4-15	4	11	Rr
P-31-4-88-16	13	0	RR
P-9-43-37-15	13	0	RR
P-29-40-24-2	5	8	Rr
P-5-46-87-6	11	1	Rr
P-45-3-29-44	15	0	RR
P-34-56-41-6	13	0	RR
P-12-23-56-41	13	0	RR

O uso de marcadores moleculares ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo introduzir dois ou mais genes de resistência, quando o fenótipo é de determinação complexa, ou quando o processo de avaliação requer destruição da planta (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Com base em inoculações e marcadores moleculares, foram identificadas quatro famílias contendo todas as marcas em todas as suas plantas. Seguindo o método *bulk* dentro de famílias, foram feitas seleções para tipo de grão tendo como padrão o cultivar Pérola, que possui cor creme com estrias marrom claras, fundo claro, sem halo, de tamanho médio e não achatadas.

Segundo MARQUES JR. 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.

A variabilidade genética na população segregante modifica-se com as gerações de autofecundação. A variância genética aditiva em uma população sem seleção aumentaria entre linhas, sendo, contudo, reduzida dentro de linhas. A seleção dentro de fileiras é justificável somente nas primeiras gerações de autofecundação, quando a variabilidade genética ainda é razoável. Com o avanço das gerações, a variabilidade genética aditiva é gradativamente exaurida dentro das linhas e a seleção dentro destas torna-se mais ineficiente. Uma das principais razões para o registro da genealogia das seleções no método genealógico é permitir a maximização da diversidade entre as linhas selecionadas (BORÉM e MIRANDA, 2005). Atualmente, isolinhas RC₃F_{2:6} (Pérola x Ouro Negro) têm sido levadas a campo, visando à multiplicação de suas sementes em quantidade suficiente para, futuramente, instalar experimentos com rigor estatístico.

De acordo com SARTORATO (2006), realizando inoculações com o patótipo 63.63 de *P. griseola*, o cultivar Ouro Negro foi o único a apresentar plantas com reação de resistência. Até recentemente, este patótipo apresentava compatibilidade a todos os genótipos de feijoeiro comum testados. Consequentemente, recomenda-se a utilização de Ouro Negro em programas de melhoramento que visem à resistência do feijoeiro comum à mancha-angular.

3.2. Obtenção de genótipos derivados de Rudá x Cornell 49-242

Foram feitos cruzamentos entre os cultivares Cornell 49-242 (genitor doador) e Rudá (genitor recorrente) obtendo-se 32 sementes F₁. Essas foram plantadas em casa de vegetação e, posteriormente, utilizadas como doadoras de pólen no cruzamento com o genitor recorrente Rudá. Desses cruzamentos, obteve-se 51 plantas RC₁F₁, as quais foram inoculadas com o patótipo 63.23 de *P. griseola*.

O gene *Phg-3* presente em Cornell 49-242 (CAIXETA et al., 2005), confere resistência ao patótipo 63.23, sendo que, as plantas RC₁F₁ resistentes tiveram seu DNA extraído e amplificado com o marcador SCAR N02_{950a}, ligado

a 3,2 cM do gene *Phg-3* (Figura 9). Foram identificados 22 indivíduos que possuíam a marca molecular, sendo esses, submetidos à análise de *fingerprinting* molecular, visando identificar aqueles que possuíam maior recuperação em relação ao genitor recorrente. Para isso, foram utilizados 14 *primers* do tipo RAPD, tomados aleatoriamente, OPC19, OPBE06, OPAU20, OPAK20, OPAX13, OPAX14, OPAY20, OPAZ13, OPBA04, OPBC03, OPBC15, OPBA09, OPBB09 e OPT16, que produziram 41 bandas monomórficas e 39 polimórficas. A partir destes dados, foi gerada uma matriz de distâncias genéticas.

Mais uma vez, foi possível identificar indivíduos mais próximos ao genitor recorrente. As distâncias genéticas de indivíduos RC_1F_1 , determinadas pela análise de similaridade genética relativa, variaram de 51% a 22% em relação ao cultivar Rudá (Tabela 9).

Ao final, foram selecionadas três plantas com 78% de similaridade genética ao cultivar Rudá, as quais deram origem à população RC_2F_1 (Figura 10). Plantas RC_2F_1 resistentes ao patótipo 63.23 de *P. griseola* e possuindo as marcas moleculares foram intercruzadas com a isolinha Rudá "R".



Figura 9. Produtos da amplificação com o *primer* SCAR N02_{950a}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Cornell 49-242 e Rudá estão representados nas colunas C e R, respectivamente, seguidos da população do primeiro retrocruzamento (números). A seta indica a banda única ligada ao loco de resistência à mancha-angular.

Tabela 9. Distância genética relativa (%) entre plantas RC₁F₁ e genitores.

Nº	Cornell	Rudá	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Rudá	1,00																						
1	0,65	0,34																					
2	0,62	0,37	0,12																				
3	0,65	0,34	0,29	0,18																			
4	0,66	0,34	0,20	0,13	0,33																		
5	0,61	0,37	0,29	0,18	0,00	0,33																	
6	0,69	0,31	0,16	0,11	0,11	0,24	0,11																
7	0,69	0,31	0,12	0,12	0,24	0,20	0,24	0,11															
8	0,70	0,29	0,17	0,11	0,17	0,25	0,17	0,05	0,06														
9	0,78	0,22	0,29	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,17													
10	0,72	0,28	0,20	0,14	0,20	0,16	0,20	0,08	0,14	0,08	0,20												
11	0,57	0,43	0,24	0,12	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,11	0,18	0,03											
12	0,57	0,22	0,17	0,06	0,11	0,19	0,11	0,05	0,11	0,05	0,11	0,08	0,06										
13	0,57	0,49	0,12	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,11	0,18	0,11	0,08	0,06	0,05									
14	0,78	0,24	0,29	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,40	0,17	0,11	0,17	0,25	0,17								
15	0,72	0,43	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,17	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,17	0,05	0,06	0,24						
16	0,57	0,31	0,12	0,12	0,24	0,20	0,24	0,18	0,30	0,33	0,00	0,11	0,24	0,17	0,05	0,06	0,24						
17	0,47	0,34	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,36	0,24	0,12	0,18	0,13	0,18	0,11	0,05	0,11	0,08					
18	0,57	0,43	0,19	0,11	0,05	0,18	0,24	0,20	0,24	0,11	0,17	0,11	0,17	0,25	0,17	0,05	0,00	0,11	0,24				
19	0,61	0,34	0,00	0,11	0,24	0,17	0,33	0,10	0,20	0,14	0,20	0,16	0,20	0,08	0,14	0,08	0,20	0,13	0,18	0,14			
20	0,72	0,22	0,20	0,24	0,18	0,00	0,33	0,20	0,24	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,05	0,11	0,05	0,11	0,08	0,11		
21	0,46	0,34	0,00	0,11	0,24	0,17	0,24	0,20	0,24	0,12	0,18	0,13	0,18	0,11	0,18	0,11	0,11	0,18	0,11	0,18	0,17	0,16	
22	0,67	0,32	0,18	0,00	0,33	0,00	0,11	0,24	0,40	0,18	0,11	0,08	0,06	0,11	0,19	0,11	0,11	0,24	0,17	0,18	0,13	0,18	0,11

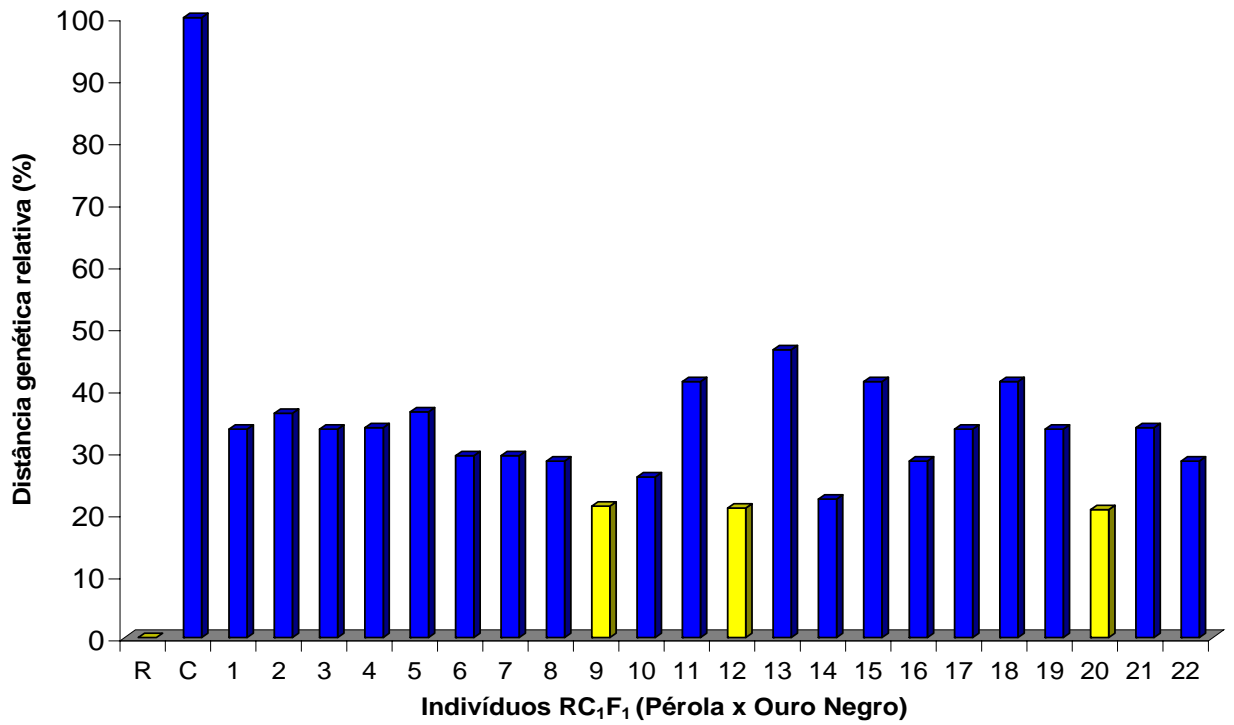


Figura 10. Distância genética relativa (%) entre plantas RC_1F_1 , o genitor resistente Cornell 49-242 (C) e o genitor recorrente Rudá (R). As colunas amarelas representam as plantas mais próximas ao genitor recorrente Rudá.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso de cultivares de feijoeiro resistentes é uma importante estratégia de controle da antracnose, ferrugem e mancha-angular. O programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem utilizado o método dos retrocruzamentos para a introgressão de genes de resistência a estas doenças, sendo conduzidos subprogramas de retrocruzamentos paralelos para cada fonte de resistência.

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de genótipos resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular, provenientes dos cruzamentos entre Pérola x Ouro Negro e Rudá x Cornell 49-242.

Por meio de inoculações, juntamente com uso de marcadores moleculares, foram obtidas quatro famílias resistentes à ferrugem (*Ur-ON*), à antracnose (*Co-10*), e à mancha-angular (*Phg-ON*), derivadas do cruzamento entre Pérola x Ouro Negro. Essas foram avançadas pelo método de *bulk* dentro de família e se encontram na geração $RC_3F_{2.6}$. Também foram obtidas plantas RC_2F_1 derivadas do cruzamento entre Cornell 49-242 x Rudá resistentes à mancha-angular (*Phg-3*), as quais foram utilizadas na implementação da pirâmide já existente na isolinha Rudá "R".

Foi demonstrada a utilidade dos marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos, auxiliando na seleção de indivíduos que possuem os genes de interesse e que estes sejam mais próximos do background genético de interesse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v.133, p.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 Phytopathology**, v.152, p.60 - 64, 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**, v.30, p.333-342, 2005.
- ARAÚJO, G.A.A., VIEIRA, C., SOUZA FILHO, B.F. **‘Ouro Negro’: Nova Variedade de Feijão-Preto para os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1991. (Boletim Técnico N^o. 1).
- BORÉM, A. e MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 4^a edição, 2005. 525p.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 90p. Tese, (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica** v. 145, n. 3, p. 237-245, 2005.
- CASTAÑO, J. **Manual standard para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol**. Cali, Colômbia: CIAT, 1985. 22 p. (Mimeo.).
- CIAT - CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Informe Annual 1986: programa de frijol**. Cali: CIAT, 1986. 339 p.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1999.

- 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**, v.40, p.804-807, 2000.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHE, S., MOREIRA, M.A., BARROS E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.27-32, 2001.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 442 p.
- DAVISON, A.D., VAUGHAN, E.K. Effect of uredospore concentration on determination of races of *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*. **Phytopathology**, v.54, p.336-338, 1964.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EMBRAPA Arroz e Feijão. Cultivares: Dados de mercado. Disponível em: <[http:// www.cnpaf.embrapa.br](http://www.cnpaf.embrapa.br)>. Acessado em agosto de 2006.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA Jr., T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of physiological races of *Uromyces appendiculatus* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.166-169, 1999.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.399-402, 2000.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Inheritance of rust resistance and identification of rapd markers linked to the resistance gene block in common bean cv. Ouro Negro. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.44, p.105-106, 2001.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CRUZ, C.D., BRONMONSCHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Selection of common bean lines based on yield, grain type, growth habit and disease resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.507-514, 2002.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BRONMONSCHENKEL, 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**, v.28, p.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**, v.138, p.213-218, 2004.
- 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**, v.82, p.135-154, 2003.
- 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**, v.44, p.411-420, 1997.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.262, p.567-571, 1998.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n.273, p.567-572, 2000a.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000b.
- OPENSHAW, S.J., JARBOE, S. G., BEAVIS, W.D. 1994. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.). **ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data**. Corvallis, OR: Oregon State University.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p.240-250. (Doc. nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, p.15-22, 1995.
- PIO-RIBEIRO, G., CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, v.19, p.95-118, 1975.
- PRYOR, T. e ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, v.10, p.281-305, 1993.

- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. 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**, v.47, p.237-238, 2004.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., SANGLARD, D.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of molecular markers to pyramiding multiple genes for resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot in the common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.48, p.94-95, 2005.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.167-172, 1994.
- 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**, v.44, p.13-14, 2001.
- SARTORATO, A. e RAVA, C.A. Determinação da resistência parcial do feijoeiro comum a *Isariopsis griseola*. Anais, **4ª Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**. Londrina PR. 1993.
- SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.192-194, 2006.
- SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. Feijão Pérola. Disponível em: <<http://www.snagricultura.org.br/artigos>>. Acessado em junho de 2006.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.
- SOUZA, T.L.P.O. **Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo carioca**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 113p. (Tese de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 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**, v.26, p. 4-6, 1983.
- STEADMAN, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A., BEAVER, J.S. An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common bacterial blight international workshops, march 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.45, p.120-125, 2002.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 24:7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic
markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

CAPÍTULO 2

PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR EM FEIJÃO TIPO CARIOCA

1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças consideradas de maior importância para a cultura do feijão no território nacional, merecem destaque a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular, cujos respectivos incitadores são os fungos *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*; *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. e *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.). Estes apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas ou patótipos”, o que dificulta o controle dessas enfermidades.

O uso de cultivares resistentes mostra-se como o meio de controle mais econômico, efetivo e que traz menor impacto ao ambiente. No entanto, a existência de raças fisiológicas e a constante evolução do patógeno demandam uma permanente busca por novas fontes de resistência. A piramidação ou a associação de genes de resistência em um mesmo cultivar tem sido proposta como forma de obter resistência duradoura e de amplo espectro (JOHNSON, 1984; SANJAY, et al., 2001; KELLY et al., 2003; SERVIN, et al., 2004).

No processo de piramidação, os marcadores moleculares de DNA constituem ferramenta imprescindível, pois permitem o monitoramento simultâneo de vários genes de interesse em um mesmo *background* genético. As seguintes etapas são fundamentais para a implementação de um programa de piramidação de genes de resistência auxiliado por marcadores moleculares: (i) seleção de genitores contrastantes para genes de resistência às doenças de interesse e identificação das raças do patógeno de maior importância para a região a qual se destinam as novas cultivares; (ii) estudos de herança da resistência às raças selecionadas a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência e o cultivar suscetível de interesse; (iii) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência; (iv) obtenção de isolinhas contendo os genes de resistência e as marcas moleculares

correspondentes, mais comumente, por meio de retrocruzamentos; e (v) validação dos marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos genes de resistência, evitando problemas posteriores com os falsos positivos. Após todos estes procedimentos, as isolinhas obtidas são intercruzadas para a piramidação dos alelos de resistência (ALZATE-MARIN et al., 2005).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, iniciado em 1992, foram desenvolvidas isolinhas com grãos do tipo carioca contendo os genes: *Ur-ON* e *Co-10*, que conferem resistência à ferrugem e à antracnose, respectivamente, provenientes de Ouro Negro; *Co-4* e *Co-6*, que conferem resistência à antracnose, provenientes de TO e AB 136; *Phg-1*, que confere resistência à mancha-angular, proveniente de AND 277. RAGAGNIN et al. (2005) intercruzaram estes materiais concentrando os genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1* em quatro isolinhas que foram denominadas Rudá "R".

Visando à introgressão da pirâmide gênica desenvolvida no *background* genético carioca, Rudá "R" foi posteriormente utilizado como genitor doador em retrocruzamentos com o cultivar de feijão preto Diamante Negro (COSTA et al. 2006), que já possui resistência ao crestamento-bacteriano e ao mosaico-comum.

No intuito de incrementar e tornar mais eficaz a pirâmide de resistência à antracnose, ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo *Co-4²* e também introduziu o alelo *Co-5* nas isolinhas carioca piramidadas. O alelo *Co-4²* é o mais efetivo entre os já caracterizados, sendo o único capaz de conferir resistência à raça 2047 de *C. lindemuthianum*.

Em face à grande variabilidade apresentada por *U. appendiculatus* e visando o controle genético eficiente e duradouro, SOUZA (2005) agrupou os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* no *background* carioca Rudá. Atualmente, o programa do BIOAGRO/UFV tem concentrado esforços na introgressão de novos genes de resistência à mancha-angular nos materiais genéticos desenvolvidos até então.

Em ensaios preliminares realizados por RAGAGNIN, V. A. (comunicação pessoal) conduzidos na Estação Experimental da UFV em Coimbra-MG, foi observado que as isolinhas Rudá "R" não obtiveram, em condições de campo, desempenho satisfatório para a resistência à *P. griseola*. Possíveis razões

para esse fato, seriam a grande variabilidade do patógeno, a ineficácia de um único gene de resistência (*Phg-1*) incorporado nessa isolinha e o surgimento de novas raças ainda não caracterizadas. Para contornar esses problemas, é importante a introgressão de novos genes advindos de materiais que possuam resistência vertical completa ou do tipo oligogênica e que estes sejam estrategicamente inter cruzados, de modo a otimizar o espectro da resistência.

NIETSCHÉ et al. (2000a) avaliaram a reação de nove cultivares de feijoeiro a 60 isolados de *P. griseola*, classificados em 25 raças e demonstraram que as linhagens México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49242, G5686, e BAT332 são importantes fontes de resistência. Posteriormente, OLIVEIRA et al. (2005) selecionaram famílias homozigotas para os genes de resistência à mancha-angular, derivadas de três subprogramas de retrocruzamentos utilizando como genitores doadores MAR-2, México 54 e BAT 332 e tendo como *background* genético o cultivar Rudá.

Deste modo, objetivando introgridir genes de resistência à mancha-angular foram realizados neste trabalho cruzamentos entre Rudá "R" e outras três isolinhas derivadas de México 54, MAR-2 e BAT 332, as quais possuem isoladamente genes de resistência à mancha-angular. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência foram validados e inoculações foram efetuadas. Acredita-se que o inter cruzamento desses materiais pode aprimorar o espectro de resistência aos patótipos de *P. griseola*, mantendo a base de genes já piramidados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os cruzamentos foram realizados em condições de casa-de-vegetação, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, onde sementes de cada genótipo, em cada geração obtida, foram semeadas diretamente em vasos de plástico de 2,5 L e de barro de 6 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg da formulação 4-14-8 (NPK) por m³ de substrato.

A parte referente à seleção assistida dos locos de resistência aos patógenos, utilizando marcadores moleculares, foi realizada no laboratório de biologia molecular de plantas do BIOAGRO/UFV.

2.2. Material genético

De acordo com estudos de alelismo realizados por CAIXETA et al. (2005), e testes de validação dos marcadores moleculares utilizando as isolinhas disponíveis até o momento, foram estabelecidas as possíveis e melhores combinações visando à piramidação de um maior número de genes de resistência à mancha-angular neste trabalho. Na Tabela 1 estão descritas as isolinhas utilizadas.

Tabela 1. Isolinhas com resistência à mancha-angular selecionadas para piramidação.

Isolinha	Genealogia	Geração	Genes de Resistência
MAR-138A-1-11-4 ¹	Rudá/MAR-2	RC ₂ F _{2:6}	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²
MEX-37-3-6-3 [*]	Rudá/Mexico 54	RC ₂ F _{2:6}	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>
BAT-67-15-8 [*]	Rudá/BAT 332	RC ₃ F _{2:5}	<i>Phg-6</i> ²
Rudá "R"	Rudá/AND 277/TO/ AB 136/Ouro Negro	F ₇	<i>Phg-1</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>

^{*} Isolinhas obtidas por OLIVEIRA et al. (2005).

2.3. Obtenção de populações segregantes

Em uma primeira etapa, as combinações foram realizadas de forma direcionada em dois esquemas de cruzamentos conduzidos separadamente, em que foram cruzadas as isolinhas MAR-138A-1-11-4 x BAT- 67-15-8 e Rudá “R” x MEX-37-3-6-3.

A isolinha MAR-138A-1-11-4 foi utilizada como genitor doador de pólen, pois é resistente a alguns patótipos de *P. griseola* que BAT-67-15-8 apresenta suscetibilidade. Assim, as plantas F₁ provenientes desse cruzamento foram avaliadas em relação à resistência à mancha-angular, com o objetivo de confirmar os híbridos. No cruzamento Rudá “R” x MEX-37-3-6-3, a isolinha Rudá “R” foi utilizada como doadora, pois já possui piramidados genes de resistência à *C. lindemuthianum*. Deste modo, as plantas F₁ Ruda “R” x MEX-37-3-6-3 foram inoculadas para antracnose, com o intuito de confirmar a sua natureza híbrida e diminuir número de indivíduos a serem analisados molecularmente. As plantas que se mostraram resistentes nas duas combinações de cruzamentos, foram avaliadas quanto à presença dos genes, por meio de marcadores moleculares ligados a esses.

Foram selecionadas as plantas F₁ derivadas de MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8 resistentes em inoculação de *P. griseola* e possuindo as marcas moleculares. Essas foram cruzadas com a isolinha Rudá “R”, obtendo-se assim, sementes F₁ híbrido triplo [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá “R”], sendo que, Rudá “R” foi utilizado como genitor doador de pólen. As plantas obtidas desse intercruzamento (híbrido triplo) foram avaliadas quanto à presença dos genes, por meio de inoculação para *C. lindemuthianum* e de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência.

A partir da obtenção do híbrido triplo, foram avançadas mais duas gerações utilizando o método genealógico, obtendo-se assim, plantas F₃ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT- 67-15-8) x Rudá “R”]. Em todas as gerações foram utilizados marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, para que se procedessem as seleções de todos os genes de interesse em um único genótipo.

Devido à importância da isolinha derivada de México 54 como fonte de resistência à *P. griseola*, as plantas F₁ Ruda “R” x MEX-37-3-6-3 foram

avançadas através de autofecundações até a geração F₃. Neste caso, também foram monitorados os genes de resistência por meio de inoculação e uso de marcadores moleculares.

2.4. Seleção por meio da inoculação de *Phaeoisariopsis griseola*

As inoculações com *P. griseola* foram realizadas em duas etapas durante a condução do trabalho. Inicialmente, na identificação de híbridos simples verdadeiros, proveniente do cruzamento das isolinhas MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8. Posteriormente, foram úteis na eliminação de plantas F₂ (híbrido triplo) segregantes, que não possuíam o gene *Phg-1* advindo da isolinha Rudá “R”.

2.4.1. Patótipos

Conforme a reação das isolinhas utilizadas neste trabalho com diferentes patótipos de *P. griseola* (Tabela 2), foram selecionados os patótipos para auxiliar no processo de monitoramento dos genes de resistência durante os intercruzamentos.

Tabela 2. Reação à *P. griseola* de isolinhas utilizadas no processo de piramidação.

Isolinhas	Patótipos de <i>P. griseola</i> *						
	63.23 (158-1)	63-19 (48-1)	63-31 (592-3)	31-39 (122-1)	31-23 (55-1)	31-17 (97-2)	63-39 (29-3)
Rudá ^a	S	S	S	S	S	S	S
Ouro Negro ^b	R	R	R	R	R	R	R
MAR-138A-1-11-4	S	R	R	R	R	R	R
BAT- 67-15-8	S	S	S	R	S	S	R
MEX-37-3-6-3	R	R	S	R	R	R	R
R-127-10-14	R	R	R	R	R	R	R

R: Resistente S: Suscetível, com base em 12 plantas de cada isolinha e escala de avaliação proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995); a: Testemunha suscetível; b: Testemunha resistente; *Valores entre parênteses referem-se ao n^o do isolado utilizado e caracterizado por NIETSCHE (1998 e 2000a).

O patótipo 63.19 (isolado 48-1) de *P. griseola* foi usado na seleção dos híbridos simples (MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8). Este patótipo foi escolhido previamente pelo fato de que, a isolinha MAR-138A-1-11-4 usada como doadora de pólen, comportou-se como resistente (graus 1 e 2), sendo que, a isolinha utilizada como genitor feminino (receptora) BAT- 67-15-8, foi considerada suscetível (graus 7 a 9). Deste modo, as plantas F₁ que fossem verdadeiramente produtos de hibridação, deveriam apresentar reações de resistência. Também foram levados em conta, a maior facilidade de repicagem do isolado em relação aos demais testados, sendo que este, apresenta maior rapidez para alcançar o ponto ideal de esporulação em meio de cultura.

Com relação ao monitoramento das plantas F₂ (híbrido triplo), foi utilizado o patótipo 63.23 (isolado 158-1), dado que as isolinhas MAR-138A-1-11-4 e BAT-67-15-8 apresentaram reações de suscetibilidade a este patótipo (graus entre 8 e 9). Os dois isolados usados no trabalho, são os que apresentam as melhores condições de manutenção, o que facilitou, em termos práticos, as avaliações realizadas.

2.4.2. Crescimento do fungo, inoculação e avaliação dos sintomas

Esses procedimentos foram realizados conforme os itens 2.5.5 e 2.5.8 do capítulo 1.

2.5. Seleção por meio da inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum*

A inoculação com *C. lindemuthianum* foi efetuada nas plantas da geração F₁ híbrido triplo [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá "R"], com o objetivo de confirmar se os híbridos eram verdadeiros e diminuir o número de plantas a serem analisadas molecularmente. A isolinha Rudá "R" já possui com relação à antracnose três genes *Co-4*, *Co-6* e *Co-10* piramidados e foi utilizada como genitora doadora nos cruzamentos com os híbridos simples MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8. As plantas que apresentaram resistência à antracnose foram selecionadas para análise com marcadores moleculares objetivando agrupar todos os genes de resistência em um único genótipo. Foram realizadas também, inoculações nas gerações F₁ e F₂ de Rudá "R" x MEX-37-3-6-3, em que Rudá "R" havia sido doador de pólen.

2.5.1. Patótipo

O patótipo 65 de *C. lindemuthianum* utilizado neste trabalho foi classificado por RAVA et al. (1994). Esta cultura é mantida na micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Este patótipo foi escolhido de acordo com os resultados de uma inoculação prévia realizada nas isolinhas Rudá "R", MAR-138A-1-11-4, BAT-67-15-8 e MEX-37-3-6-3, a qual mostrou que a isolinha Rudá "R" comporta-se como resistente (grau 1) e as isolinhas MAR-138A-1-11-4, BAT-67-15-8 e MEX-37-3-6-3 comportam-se como suscetíveis (grau 9).

2.5.2. Crescimento, inoculação do fungo e avaliação dos sintomas

Esses procedimentos foram realizados conforme os itens 2.5.4 e 2.5.7 do capítulo 1.

2.6. Seleção por meio de marcadores moleculares

Marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) ligados aos genes de resistência a essas doenças foram utilizados nas gerações F₁, F₂ e F₃ para auxiliar a seleção de plantas contendo todos os genes de resistência. Na Tabela 3 estão descritos os marcadores moleculares utilizados no processo de seleção.

Tabela 3. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular; utilizados nos processos de seleção.

Marcador*	Distância [#] (cM)	Gene de Resistência	Fontes de Resistência	Referência
SCAR-Y20 _{830a}	1,20	<i>Co-4</i>	TO	QUEIROZ et al. (2004b)
SCAR-AZ20 _{845a}	7,10	<i>Co-6</i>	AB 136	QUEIROZ et al. (2004b)
SCAR-BA08 _{560a}	2,20	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
SCAR-F10 _{1050a}	6,50	<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
SCAR-H13 _{520a}	5,60	<i>Phg-1</i>	AND 277	QUEIROZ et al. (2004a)
OPE04 _{500a}	5,80	<i>Phg-5</i> ²	MAR-2	FERREIRA et al. (2000)
OPE04 _{650a}	11,80	<i>Phg-2</i>	México 54	SARTORATO et al. (1999)
OPAO12 _{950a}	5,83	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	CAIXETA et al. (2003)

*a: acoplamento; [#]cM: distância genética (centi Morgan) dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência.

2.6.1. Extração de DNA

A cada geração analisada com marcadores moleculares, uma folha de cada planta coletada e armazenada em freezer a -80 °C, até ser utilizada para extração do DNA. A extração foi feita de acordo com o protocolo descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

2.6.2. Análise com RAPD

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os *primers* foram adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de *primer*, uma unidade da enzima Taq polimerase e 3 µl de DNA na concentração de 10ng/µl. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus,

modelo 9600, programado para 40 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 1 minuto a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3,0 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml), submersa em tampão SB (4g/L de hidróxido de sódio e 25g/L de ácido bórico) pH igual a 8,00. A separação eletroforética foi realizada durante um período de aproximadamente quatro horas, a 80 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.6.3. Análise com SCAR

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR em uma mistura de reação de 15 µl, contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios de RAPD, exceto em relação aos *primers*, que para esta técnica foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* SCAR específico. O termociclador foi programado para 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 65 °C (SCAR Y20 e SCAR F10) ou 60 °C (SCAR AZ20 e SCAR BA08) ou 59 °C (SCAR H13) por 60 segundos; 72 °C por 90 segundos; e um passo final de 72 °C por 7 minutos.

As Figuras 1 e 2 resumem as etapas executadas em todo processo de condução do trabalho, desde o cruzamento entre as isolinhas genitoras, até a obtenção de plantas F₃ possuindo todas as marcas moleculares almejadas.

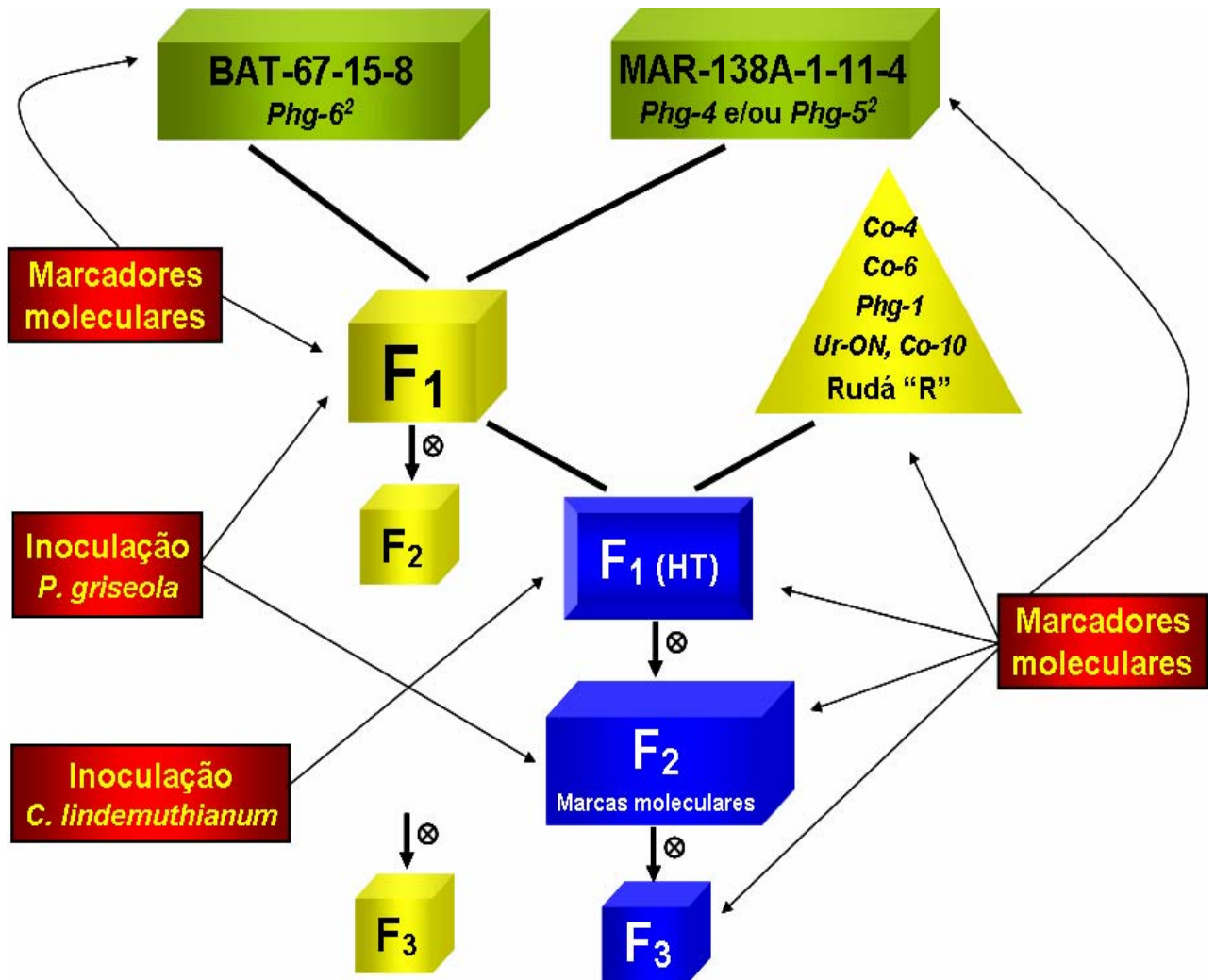


Figura 1. Procedimentos para incorporação dos genes oriundos de BAT-67-15-8 (*Phg-6²*) e MAR-138A-1-11-4 (*Phg-4* e/ou *Phg-5²*) na isolinha de feijoeiro Rudá "R".

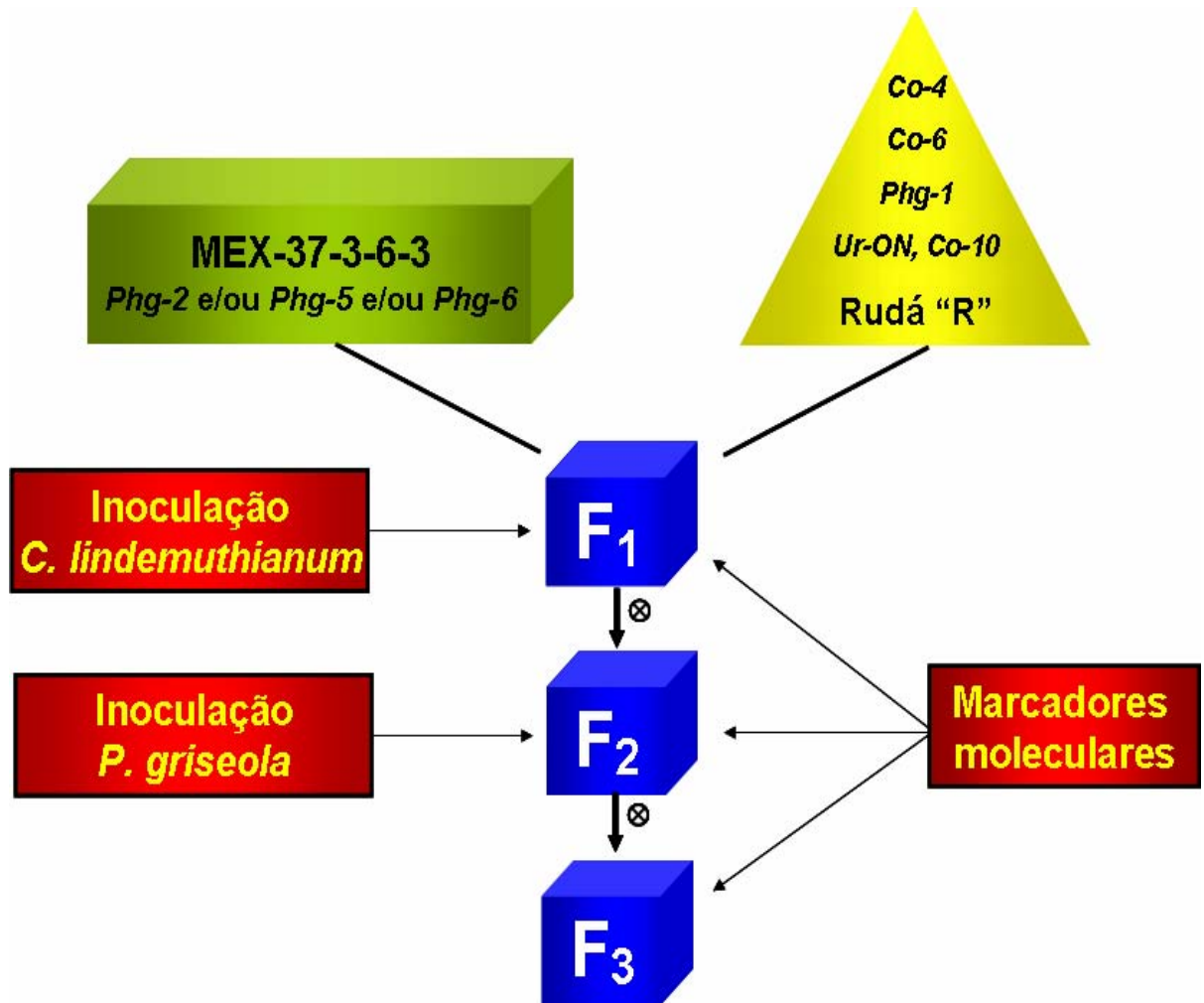


Figura 2. Procedimentos para incorporação do(s) gene(s) de MEX-37-3-6-3 (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*) na isolinha de feijoeiro Rudá "R".

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação de marcadores e estratégia de cruzamentos

Para que os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência pudessem ser utilizados neste trabalho, foram necessárias avaliações prévias de validação dos mesmos, perante as isolinhas a serem intercruzadas, ou seja, eliminação de falsos positivos. Com o intuito de futuramente transferir genes de resistência, monitorados por esses marcadores moleculares, foram analisados também outros cultivares e linhagens de interesse. Os resultados das amplificações utilizando-se marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR estão nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Esses resultados permitiram a escolha das fontes de resistência a serem usadas na piramidação monitoradas por marcadores moleculares, de forma a obtermos a melhor combinação possível de genes de resistência neste trabalho. Havia o interesse inicial, de utilizarmos o *background* genético do cultivar Pérola como base para incorporação dos genes de resistência à mancha-angular. Porém, tanto Pérola, assim como a isolinha Pérola "R" apresentaram as bandas amplificadas com os marcadores OPE04_{500a}, OPE04_{650a} e OPAO12_{950a}, inviabilizando seu uso no monitoramento dos respectivos genes de resistência, aos quais estão ligados.

As amplificações utilizando o cultivar BRSMG-Talismã mostraram que é possível utilizar a maioria dos marcadores moleculares testados como forma de monitoramento, dado que, foram encontrados diversos polimorfismos entre este e as fontes de resistência. Conseqüentemente, genes com amplo espectro de resistência poderiam ser simultaneamente introgrididos. Em trabalhos realizados por SOUZA et al. (2005b), o cultivar BRSMG Talismã apresentou susceptibilidade a diversos patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. Estes resultados indicam a ausência de alelos de resistência no cultivar BRSMG-Talismã (ALZATE-MARIN et al., 2001).

A isolinha Rudá "R" possui os seguintes genes e marcadores moleculares correspondentes: *Ur-ON* (SCF10_{1050a} e SCBA08_{560a}), *Co-4* (SCY20_{830a}), *Co-6* (SCAZ20_{845a}), *Co-10* (SCF10_{1050a} e SCBA08_{560a}) e *Phg-1* (SCH13_{520a}). A isolinha MAR-138A-1-11-4 possui *Phg-4* e/ou *Phg-5²* (OPE04_{500a}) e BAT-67-15-8 possui *Phg-6²* (OPAO12_{950a}). Considerando o

produto final almejado no processo de piramidação, que envolve o intercruzamento [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R], não ocorreram falsos positivos por parte dos marcadores para cada gene de interesse agrupado. No cruzamento entre Rudá “R” x MEX-37-3-6-3, os marcadores ligados aos genes presentes na isolinha Rudá”R” não produzem bandas em MEX-37-3-6-3. O marcador SCN02_{890a} que monitora o(s) gene(s) de resistência da isolinha MEX-37-3-6-3 amplifica em Rudá “R”, não sendo possível sua utilização. Apenas o marcador OPE04_{650a}, o qual também marca o(s) gene(s) de resistência de MEX-37-3-6-3, pôde ser utilizado, dado que gerou polimorfismo ao não produzir banda em Rudá”R”.

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos com a amplificação do DNA de isolinhas e cultivares elite de interesse no processo de piramidação, utilizando marcadores moleculares RAPD.

Material Genético	Genes de Resistência	Marcadores Moleculares			
		OPE04 ₅₀₀	OPE04 ₆₅₀	OPAO12 ₉₅₀	OPX11 ₅₅₀
MAR-2	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	+	-	-	n
BAT 332	<i>Phg-6</i> ²	-	-	+	n
México 54	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	-	+	-	n
Cornell 49-242	<i>Phg-3</i>	-	+	-	n
AND 277	<i>Phg-1</i> , <i>Phg-2</i> ² , <i>Phg-3</i> ² e <i>Phg-4</i> ²	-	-	-	n
Ouro Negro	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-ON</i>	-	+	-	+
Diamante Negro	?	-	+	-	+
Valente	?	-	-	-	n
BRSMG-Talismã	?	-	-	-	n
Pérola	?	+	+	+	-
Pérola “R”	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-1</i>	+	+	+	+
Rudá “R”	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-1</i>	-	-	-	+
MAR-138A-1-11-4	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	+	-	-	-
BAT- 67-15-8	<i>Phg-6</i> ²	-	-	+	-
MEX-37-3-6-3	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	-	+	-	-
Rudá	?	-	-	-	-
Ouro Vermelho	?	-	+	-	n
Vermelhinho	?	-	-	+	n

(+): presença da marca, (-): ausência da marca; n: Reações não realizadas; (?): Genes não caracterizados ou sua ausência.

Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos com a amplificação do DNA de isolinhas e cultivares elite de interesse no processo de piramidação, utilizando marcadores moleculares SCAR.

Material Genético	Genes de Resistência	Marcadores Moleculares							
		SCF10 ₁₀₅₀	SCBA08 ₅₆₀	SCAA19 ₆₅₀	SCBA16 ₅₆₀	SCN02 ₈₉₀	SCH13 ₅₂₀	SCY20 ₈₃₀	SCAZ20 ₈₄₅
MAR-2	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	-	-	+	-	+	-	-	+
BAT 332	<i>Phg-6</i> ²	+	+	+	+	-	-	-	-
México 54	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	-	-	+	-	+	-	-	+
Cornell 49242	<i>Phg-3</i>	+	+	-	+	+	-	-	-
AND 277	<i>Phg-1</i> , <i>Phg-2</i> ² , <i>Phg-3</i> ² e <i>Phg-4</i> ²	-	-	+	+	+	+	-	-
Ouro Negro	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-ON</i>	+	+	+	+	-	-	-	+
Diamante Negro	?	-	-	-	-	-	-	-	-
Valente	?	+	+	-	-	-	-	-	+
BRSMG-Talismã	?	-	-	-	+	+	+	-	+
Pérola	?	-	-	-	-	+	-	-	-
Pérola "R"	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Rudá "R"	<i>Ur-ON</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
MAR-138A-1-11-4	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	-	-	+	-	+	-	-	-
BAT-68-9-6	<i>Phg-6</i> ²	-	-	+	+	-	-	-	-
MEX-37-3-6-3	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
Rudá	?	-	-	-	-	-	-	-	-
Ouro Vermelho	?	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelhinho	?	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): presença da marca, (-): ausência da marca; (?): Genes não caracterizados ou sua ausência.

Heranças do tipo dominante e monogênica foram observadas em trabalhos de identificação de marcadores moleculares, em que se utilizou o cultivar suscetível Rudá cruzado com fontes de resistência à mancha-angular AND 277 (CARVALHO et al., 1998); MAR-2 (FERREIRA et al., 2000); México 54 (SARTORATO et al., 2000); Cornell 49-242 (NIETSCHE et al., 2000) e BAT 332 (CAIXETA et al., 2003). Porém, NIETSCHE et al. (2000a), utilizando diversos patótipos de *P. griseola*, relataram diferentes espectros de resistência com relação a estas fontes de resistência, indicando que esses genótipos deveriam possuir diferentes fatores de resistência.

Trabalhando com as mesmas cinco fontes de resistência à mancha-angular, AND 277, MAR-2, México 54, Cornell 49-242 e BAT 332; CAIXETA et al., (2002; 2005) realizaram estudos de alelismo. O objetivo foi obter uma análise conjunta visando melhor entendimento da relação de independência desses genes. A utilização de diferentes cruzamentos e diferentes patótipos demonstrou uma maior complexidade que a relatada anteriormente na caracterização da herança da resistência desses genótipos. Na Tabela 6 são mostradas as fontes e seus respectivos genes (alelos) caracterizados.

Tabela 6. Fontes de resistência com seus respectivos genes determinados pelo teste de alelismo.

Fonte de resistência	Locos	Genes (alelos)
Cornell 49-242	A	<i>Phg-3</i>
México 54	B, D, E	<i>Phg-2, Phg-5, Phg-6</i>
MAR-2	C, D	<i>Phg-4, Phg-5²</i>
BAT 332	E	<i>Phg-6²</i>
AND 277	A, B, C	<i>Phg-1^a, Phg-2², Phg-3², Phg-4²</i>

^aGene caracterizado por CARVALHO et al. (1998), demais genes foram detectados por CAIXETA et al. (2002; 2005).

Posteriormente aos estudos de alelismo, OLIVEIRA et al. (2005) selecionaram famílias com grãos tipo carioca que possuíam genes de resistência à mancha-angular, derivados dos cultivares México 54, MAR-2 e BAT 332 em cruzamentos utilizando *background* genético Rudá. Em todos os cruzamentos, os valores obtidos de qui-quadrado sugeriram taxas de segregação de 3:1, indicando resistência monogênica dominante para as raças

63.19, 63.39 e 61.41, considerando como fontes México 54, MAR-2 e BAT 332, respectivamente. Essas fontes originaram as isolinhas MAR-138A-1-11-4, BAT-67-15-8 e MEX-37-3-6-3, as quais foram utilizadas na piramidação durante a execução do presente trabalho.

De acordo com os estudos de alelismo realizados por CAIXETA (2002) e CAIXETA et al. (2005), o cultivar México 54 possui três genes (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*) e MAR-2 possui dois genes (*Phg-4* e *Phg-5*²). Entretanto, os dados obtidos por OLIVEIRA et al. (2005) indicam o monitoramento de apenas um dos genes em cada subprograma de retrocruzamento. Devido à ausência de raças do patógeno ou marcadores moleculares específicos capazes de identificar cada um dos genes presentes tanto em México 54 como em MAR-2, não há como afirmar qual deles havia sido monitorado durante o processo de obtenção das isolinhas derivadas. Desse modo, existe a possibilidade de que as isolinhas obtidas possuam dois ou mais genes, e que esses, provavelmente, estejam ligados.

Ainda considerando o mesmo estudo de alelismo, quando utilizada a raça 63.39 de *P. griseola*, não foi observada segregação da população F₂ do cruzamento entre México 54 x MAR-2, comprovando a presença de um loco em comum nestes cultivares. Estes dois cultivares apresentam diferentes reações, quando testados contra um conjunto de raças do patógeno, sugerindo que, os fatores presentes naquele loco em comum não são o mesmo alelo e sim formas alélicas distintas. Deste modo, México 54 possui o alelo *Phg-5* e MAR-2 o alelo *Phg-5*², existindo a possibilidade das isolinhas derivadas destes cultivares possuírem apenas formas alélicas de um mesmo gene, o que seria inviável do ponto de vista da piramidação.

O marcador molecular SCAR N02_{890a} obtido por SARTORATO et al. (2000), quando testado tanto nas fontes de resistência México 54 e MAR-2, quanto nas suas isolinhas derivadas, não se mostrou polimórfico (Tabela 5). Outros marcadores que poderiam ser utilizados no monitoramento dos cruzamentos entre isolinhas derivadas de México 54 e MAR-2 seriam OPE04_{500a} e OPE04_{650a}, identificados por FERREIRA et al. (2000) e SARTORATO (1999), respectivamente. A banda amplificada no DNA do cultivar México 54 não aparece em MAR-2 e vice-versa. Entretanto, as posições das bandas de tamanhos específicos ligadas a cada loco de

resistência, aparecem muito próximas, o que impossibilitou sobre a inferência de genótipos que possuam as duas marcas simultaneamente (Figura 3).

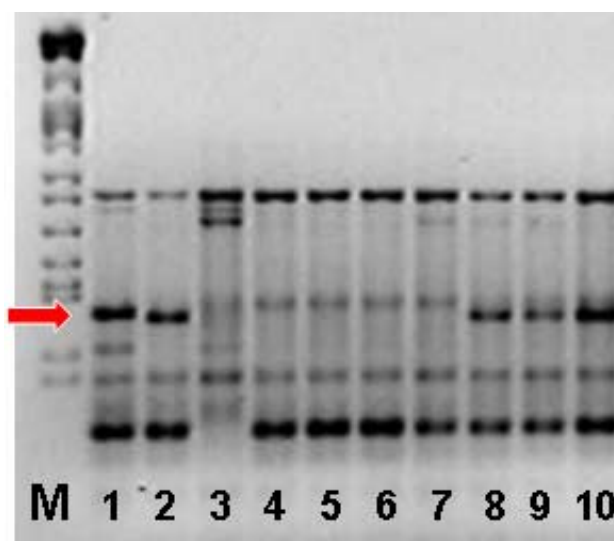


Figura 3. Produtos das ampliações com os marcadores OPE04_{500a} e OPE04_{650a}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genótipos México 54, MAR-2 e Rudá "R" estão representados nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente, seguidos da população F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT- 67-15-8) x Rudá R] (colunas 4 - 10). A seta indica as bandas únicas ligadas aos locos de resistência à mancha-angular, de difícil distinção.

Atualmente, o Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem investido esforços na conversão demarcadores moleculares do tipo RAPD em SCAR, o que confere uma grande vantagem, pois gera bandas específicas e não apresenta os problemas de reprodutibilidade da técnica de RAPD (PARAN e MICHELMORE, 1993). Desta maneira, talvez seja possível que os marcadores OPE04_{500a} e OPE04_{650a} sejam convertidos em SCAR e capazes de distinguir quanto aos genes advindos das isolinhas derivadas de MAR-2 e México 54, respectivamente. A isolinha derivada de BAT 332, provavelmente, só apresenta o gene *Phg-6²*, o que facilita sua utilização no processo de piramidação.

Durante a execução do trabalho foram realizados também cruzamentos entre os híbridos simples (MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) e (Rudá "R" x MEX-37-3-6-3), visando ganho de tempo no processo de melhoramento, considerando que, posteriormente, se consiga melhor esclarecimento quanto à discriminação dos fatores de resistência das isolinhas MAR-138A-1-11-4 e MEX-37-3-6-3.

Deste modo, estes resultados são importantes na transferência de genes de resistência para cultivares de feijão de grão tipo carioca, considerados mais modernos, assim como, para cultivares elite de grão preto e vermelho.

3.2. Obtenção dos híbridos simples

Todos os materiais inter cruzados neste trabalho foram avaliados molecularmente quanto a todos os marcadores ligados a seus respectivos genes de resistência. Dos cruzamentos da isolinha MAR-138A-1-11-4 (*Phg-MAR*) com a isolinha BAT-67-15-8 (*Phg-6²*) e isolinha Rudá "R" (*Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1*) com isolinha MEX-37-3-6-3 (*Phg-MEX*), foram obtidas 96 e 115 sementes, respectivamente. Os indivíduos resultantes do cruzamento MAR-138A-1-11-4 x BAT- 67-15-8 foram inoculados com o patótipo 63.19 de *P. griseola*, obtendo-se 76 plantas resistentes. Essas tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores OPE04_{500a} e OPA012_{950a}, sendo obtidas 68 plantas com as duas marcas simultaneamente. Os indivíduos oriundos do cruzamento Rudá "R" x MEX-37-3-6-3 foram inoculados com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*, selecionando-se 85 plantas resistentes. Dessas plantas também foi extraído o DNA, identificando-se 36 plantas possuindo as marcas moleculares de SCAR F10_{1050a}, SCAR BA08_{560a}, SCAR Y20_{830a}, SCAR AZ20_{845a}, SCAR H13_{520a} e OPE04_{650a}. Inferiu-se que as plantas que apresentaram suscetibilidade à mancha-angular e antracnose foram produtos de autofecundação, sendo portanto, descartadas.

3.3. Obtenção do híbrido triplo

Plantas F₁ (MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) resistentes à mancha-angular e possuindo as marcas moleculares, foram inter cruzadas com Rudá "R" gerando 375 sementes F₁ (híbrido triplo). Foram selecionadas 200

sementes com maior vigor e que se adequavam ao padrão típico de feijão carioca. Obteveram-se 186 plantas adultas, que foram inoculadas com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*. Foram selecionadas 125 plantas resistentes à antracnose, sendo que essas tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores SCAR F10_{1050a}, SCAR BA08_{560a}, SCAR Y20_{830a}, SCAR AZ20_{845a}, SCAR H13_{520a}, OPE04_{500a} e OPA012_{950a}. Devido a problemas de reprodutibilidade e rotina no laboratório, não foram utilizados os marcadores moleculares OPAC14_{2400a} ligado a 6,6 cM do gene *Phg-MEX* de México 54 (SARTORATO et al., 1999) e OPAA07_{950a} ligado a 5,1 cM do gene *Phg-6²* de BAT 332 (CAIXETA et al., 2003). Das 125 plantas F₁ (híbrido triplo) analisadas, 27 apresentaram todas as marcas para todos os genes de resistência envolvidos na piramidação. Essas plantas foram então selecionadas e submetidas à autofecundação.

Considerando-se que os genes apresentam segregação independente, com exceção do *Co-10* e *Ur-ON*, os quais estão ligados (FALEIRO et al., 2000), os genitores F₁ (MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) e Rudá "R", utilizados nesta etapa, possuiriam os seguintes genótipos:

MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8 = *co-4/co-4*, *co-6/co-6*, *co-10/co10*, *phg-1/phg-1*, *Phg-MAR/ phg-MAR*, *Phg-6²/ phg-6²*.

Rudá "R" = *Co-4/Co-4*, *Co-6/Co-6*, *Co-10/Co10*, *Phg-1/Phg-1*, *phg-MAR/ phg-MAR*, *phg-6²/ phg-6²*.

A partir do cruzamento entre os genitores F₁ (MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) e Rudá "R", seriam possíveis quatro genótipos, dos quais, apenas o genótipo *Co-4/co-4*, *Co-6/co-6*, *Co-10/co10*, *Phg-1/phg-1*, *Phg-MAR/ phg-MAR*, *Phg-6²/phg-6²* era de interesse, sendo então, identificado por meio dos marcadores moleculares.

3.4. Obtenção das populações F₂ segregantes

A autofecundação dos 27 indivíduos F₁ híbridos triplos [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá "R"] selecionados gerou um total de 776 sementes F₂. Dessas foram semeadas 450, obtendo-se 405 plantas adultas, as quais foram inoculadas com o patótipo 63.23 de *P. griseola*. Do total de 405 plantas, 113 se mostraram suscetíveis à mancha-angular, sugerindo que não possuíam

o gene de resistência *Phg-1*. Este procedimento possibilitou uma economia significativa de tempo e de recursos, nas análises moleculares das planta F₂, em função da redução do número de plantas a serem analisadas com os marcadores.

Foram avaliadas 292 plantas F₂ utilizando os mesmos marcadores moleculares citados anteriormente no item 3.3. De início, as reações de amplificação foram feitas com os marcadores do tipo SCAR, pois, necessitam de um volume menor de reagentes em relação aos do tipo RAPD, de modo que, após a utilização de um primeiro marcador, os indivíduos com ausência da banda de interesse não eram avaliados com o seguinte. A partir dessas análises, foram identificados 63 indivíduos possuindo todas as marcas moleculares (Figura 4), os quais deram origem à geração F₃.

A partir da autofecundação do F₁ híbrido triplo [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá "R"], o qual teria o genótipo *Co-4/co-4*, *Co-6/co-6*, *Co-10/co10*, *Phg-1/phg-1*, *Phg-MAR/ phg-MAR*, *Phg-6²/phg-6²*, seriam possíveis 729 genótipos distintos. Desses, apenas 64 seriam de interesse, sendo os possíveis genótipos das plantas selecionados através dos marcadores moleculares, os quais são exemplificados na Figura 4.

No caso da população derivada do cruzamento Rudá "R" x MEX-37-3-6-3, partindo de 36 plantas F₁ possuindo todas as marcas moleculares, foram obtidas cerca de 930 sementes F₂. Foram semeadas 300 sementes, obtendo-se 291 plantas adultas. Essas plantas também foram inoculadas com o patótipo 63.23 de *P. griseola*, avaliando-se 209 como sendo resistentes. Essas plantas tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores SCAR F10_{1050a}, SCAR BA08_{560a}, SCAR Y20_{830a}, SCAR AZ20_{845a}, SCAR H13_{520a} e OPE04_{650a}, obtendo-se 54 plantas com todas as marcas moleculares, as quais deram origem à população F₃.

Considerando o híbrido simples Rudá "R" x MEX-37-3-6-3 de genótipo *Co-4/co-4*, *Co-6/co-6*, *Co-10/co10*, *Phg-1/phg-1*, *Phg-MEX/phg-MEX*, seriam possíveis 243 genótipos distintos na geração F₂, sendo que, dessas, 32 seriam de interesse para o avanço na próxima geração levando todas as formas alélicas de interesse.

Durante a obtenção das duas populações F₂ segregantes, houve concordância entre a segregação esperada e a observada pelas marcas

moleculares, ou seja, o número de indivíduos eliminados a cada marcador molecular utilizado, coincidiu com a segregação devido à herança monogênica e relação intra-alélica de dominância completa (3 resistentes: 1 suscetível). Por se tratar da autofecundação de indivíduos heterozigotos para os genes de interesse, a probabilidade total das combinações genotípicas que levassem todos os alelos adiante, seria de $(3/4)^n$, onde n é igual ao número de genes de interesse.

A resistência aos patógenos é considerada uma das mais desejadas formas de controle de doenças de plantas. Até o momento não foi caracterizada nenhuma variedade imune a *P. griseola*. Porém, de um total de 25 patótipos mais freqüentes e oriundos de diversos estados brasileiros, as variedades BAT 332, Cornell 49-242, MAR-2 e AND 277 apresentaram reações de incompatibilidade a 10, 12, 16 e 17 patótipos, respectivamente (NIETSCHE et al., 2000). Além disso, BAT 332 e Cornell 49-242 apresentam-se como fontes de resistência complementares, de modo que, se combinadas, poderiam apresentar resistência a 23 raças. Considerando conjuntamente os trabalhos (APARÍCIO et al., 1998; NIETSCHE et al., 1998; 2000; SARTORATO, 2004; GARCIA et al., 2006) o cultivar México 54 é resistente a 44 dos 53 patótipos de *P. griseola* já caracterizados.

Assim, as isolinhas derivadas destes cultivares as quais foram inter cruzadas neste trabalho, futuramente poderão apresentar um maior espectro de resistência aos patótipos de *P. griseola*.

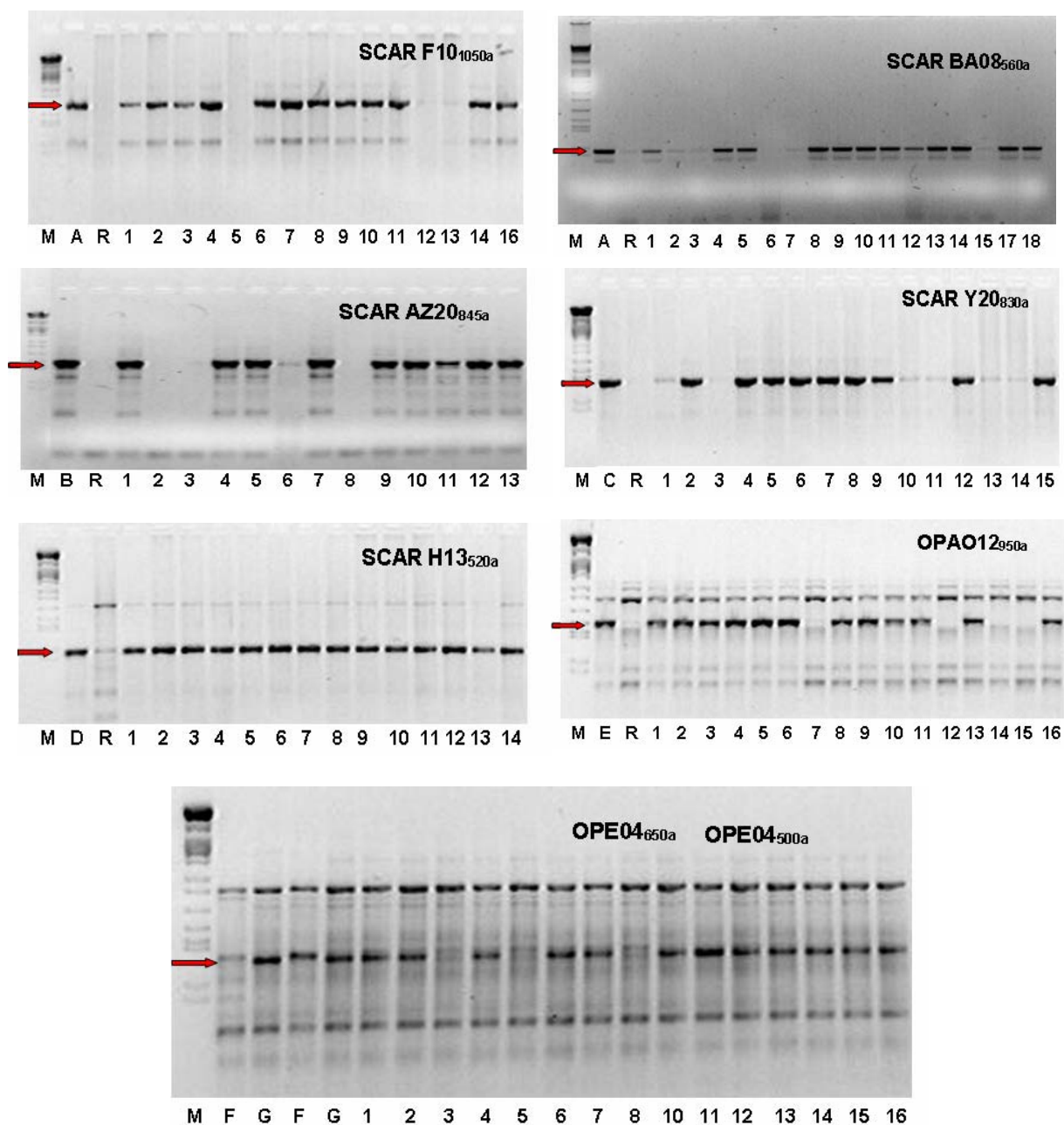


Figura 4. Produtos das amplificações com os marcadores SCARF10_{1050a}, SCARBA08_{560a}, SCARAZ20_{845a}, SCARY20_{830a}, SCARH13_{520a}, OPAO12_{950a}, OPE04_{500a} e OPE04_{650a}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (marcador de tamanho). Os genitores Rudá, Ouro Negro, AB136, TO, AND 277, BAT 332, México 54 e MAR-2 estão representados pelas colunas (R), (A), (B), (C), (D), (E), (F) e (G) respectivamente, seguidos da população F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT- 67-15-8) x Rudá R]. As setas indicam as bandas únicas ligadas aos locos de resistência.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Assim, foram introgrididos pelo menos dois novos genes de resistência à mancha-angular na isolinha Rudá “R” advindos dos cultivares MAR-2 e BAT 332. Foram também obtidas isolinhas nas quais foi introgridido pelo menos um dos genes de resistência presentes no cultivar México 54.

A seleção de isolinhas de feijão com grãos do tipo carioca, resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular confirmou a importância do uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de piramidação de genes de resistência. Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização de marcadores moleculares facilitou o processo de introgressão destes genes de resistência para os genótipos piramidados com grão do tipo carioca. Futuramente, seria esperado um maior espectro de resistência aos patótipos de *P. griseola*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.265-273, 1995.
- APARÍCIO, B.H.E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Universidad Del Valle, Facultad de Ciencias, 1998. 120p. (Trabajo de Grado) - Universidad Del Valle, 1998.
- 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., 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**, v.30, p.333-342, 2005.
- ARRUDA, K.M.A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 77p. Tese, (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 90p. Tese, (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., 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** v. 134, n.3, p.297-303, 2003.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica** v. 145, n. 3, p. 237-245, 2005.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JR., T.J., ALZATE-MARIN, A.L. NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.
- CONAB. Nono levantamento de avaliação da safra 2005/2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em setembro de 2006.

- 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**, v.40, p.804-807, 2000.
- COSTA, M.R., TANURE, J.P.M., ARRUDA, K.M.A., CARNEIRO, J.E.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Pyramiding of anthracnose angular leaf spot and rust resistance genes in black and red bean cultivars. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.49, p.187-188, 2006.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. NIETSCHKE, S., PAULA-JR, T.J., A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.
- GARCIA, R.A.V., CARNEIRO, M.S., SARTORATO, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.49, p.209-210, 2006.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopatology**, v.22, p.309-330, 1984.
- 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**, v.82, p.135-154, 2003.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, 27:685-689, 1997.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant Disease, An Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1979. p.23-46.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.262, p.567-571, 1998.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n.273, p.567-572, 2000a.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000b.

- PARAN, I., MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR – based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993. 1993.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. **Fitopatología Colombiana**, v.19, p.15-22, 1995.
- OLIVEIRA, E.J., ALZATE-MARIN, A.L., BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Molecular marker-assisted selection for development bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding**, v.124, p.572-575, 2005.
- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R.; SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. 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**, v.47, p.237-238, 2004a.
- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, 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**, v. 47, p.249-250, 2004b.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., SANGLARD, D.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Use of molecular markers to pyramiding multiple genes for resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot in the common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.48, p.94-95, 2005.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.167-172, 1994.
- SANJAY, K., VERULKAR, S., CHANDEL, G., ZHANG, Y., HUANG, B., BENNETT, J. Genetic analysis and pyramiding of two gall midge resistance genes (*Gm-2*) and (*Gm-6t*) in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v.122, p. 327–334, 2001.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.21-22, 1999.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.637-642, 2000.

- SARTORATO, A. e ALZATE-MARIN, A.L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.47, p.235-236, 2004.
- SERVIN, B., MARTIN, O.C., MÉZARD, M., HOSPITAL, F. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. **Genetics**, v.168, p.513–523, 2004.
- SOUZA, T.L.P.O. **Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo carioca**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 113p. (Tese de Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2005a.
- SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., MELO, C.L.P., ARRUDA, K.M.A., CARNEIRO, J.E.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Phenotypic and molecular characterization of cultivar BRSMG-Talismã regarding the principal common bean pathogens. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.247-252, 2005b.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.