

SILVIA NIETSCHÉ

MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM: VARIABILIDADE GENÉTICA
DO PATÓGENO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
LIGADOS À RESISTÊNCIA

MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM: VARIABILIDADE GENÉTICA
DO PATÓGENO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
LIGADOS À RESISTÊNCIA

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

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

JULHO – 2000

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

T

N677m
2000

Nietsche, Silvia, 1972-

Mancha-angular do feijoeiro-comum : variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência / Silvia Nietsche. – Viçosa : UFV, 2000.

56p. : il.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Mancha angular do feijoeiro – Variabilidade genética.
2. Feijão – Herança de resistência à mancha angular.
3. Mancha angular do feijoeiro – Fontes de resistência.
4. Feijão – Genes – Marcadores moleculares. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.6523

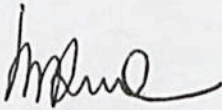
CDD 20.ed. 635.6523

SILVIA NIETSCHÉ

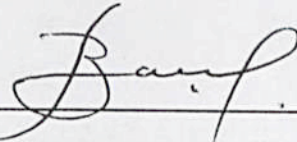
MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM: VARIABILIDADE GENÉTICA
DO PATÓGENO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
LIGADOS À RESISTÊNCIA

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

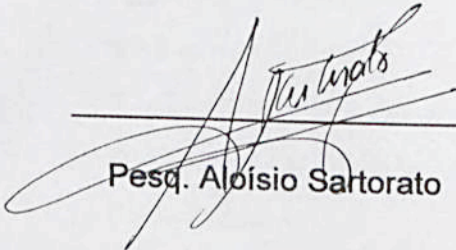
APROVADA: 2 de março de 2000.



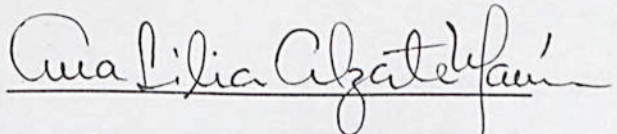
Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)



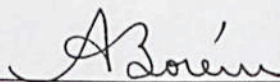
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)



Pesq. Aloísio Sartorato



Pesq. Ana Lília Alzate Marin



Prof. Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Programa de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo. *A Deus.*
Ao meu grande amor

Ao Professor Aluisio Marlon e à minha família, pela confiança, pela presença, pelo estímulo e pela amizade em todo o decorrer do Programa de Doutorado.

Aos Professores Everaldo Gonçalves de Barros e Maurício Alves Moreira, pelas sugestões e orientações e pela amizade.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela liberação de seus laboratórios para a condução dos trabalhos.

A Pesquisadora Ana Lilia, pela amizade e pelo auxílio durante a execução desta tese.

Ao Pesquisador de Empresa – Améz e Fajão Aécio Sertorato, pela amizade e pelas orientações e pelo material cedido para a execução deste trabalho.

Aos amigos Ivan Schneider e Roman Correia Xavier, pelas orientações, pelos ensinamentos e, principalmente, pelo companheirismo durante a execução deste trabalho.

Ao meu amigo Renato Cássio Rocha, por ter sido o meu "braço direito" durante o desenvolvimento dos trabalhos.

A minha colega Evelyn Teixeira Cabrita, pelo empenho e pela amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas Rita, Marta, Paula, Sebastião, Abelmar, Márcia, Cinthia, Pedro Ivo, Samir, Naxion e Márcio, pela agradável convivência.

Ao funcionário José Pinheiro, por ter-se dedicado muito na condução dos experimentos.

Aos funcionários do BIOAGRO José Fostio Santana, Aloísio e Márcia, pela constante ajuda.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Programa de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

Ao Professor Aluizio Borém, pela orientação, pela confiança, pela presença, pelo estímulo e pela amizade em todo o decorrer do Programa de Doutorado.

Aos Professores Everaldo Gonçalves de Barros e Maurílio Alves Moreira, pelas sugestões e orientações e pela amizade.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela liberação de seus laboratórios para a condução dos trabalhos.

À Pesquisadora Ana Lília, pela amizade e pelo auxílio durante a execução desta tese.

Ao Pesquisador da Embrapa – Arroz e Feijão Aloísio Sartorato, pela amizade e pelos ensinamentos e pelo material cedido para a execução deste trabalho.

Aos amigos Ivan Schuster e Ronan Correia Xavier, pelas orientações, pelos ensinamentos e, principalmente, pelo companheirismo durante a execução deste trabalho.

Ao meu amigo Renato Cipriano Rocha, por ter sido o meu "braço direito" durante o desenvolvimento dos trabalhos.

À minha colega Eveline Teixeira Caixeta, pelo empenho e pela amizade durante todo o desenvolvimento desta tese.

Aos meus colegas Rita, Marta, Fábio, Sebastião, Abelmon, Márcia, Cinthia, Pedro Ivo, Samir, Newton e Márcio, pela agradável convivência.

Ao funcionário José Pintinho, por ter-me auxiliado muito na condução dos experimentos.

Aos funcionários do BIOAGRO José Fausto Santana, Aloísio e Márcia, pelo constante apoio.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

DA SILVA NIETSCHE, filha de Curt Walter Nietzsche (*in memoriam*) e Elziane Góes, nasceu em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, a primeiro do mês de maio de 1972.

De 1987 a 1989, cursou o segundo grau no Colégio Cônsul Carlos Renan, na Cidade de Brusque, SC, na modalidade educacional de Formação Integral.

Em 1990, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tendo colado grau em janeiro de 1995.

Em março de 1995, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, defendendo a 203ª tese de Mestrado em Genética e Melhoramento da UFV em 20 de julho de 1997.

Em agosto de 1997, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa da tese em 2 de março de 2000.

Em agosto de 1998 iniciou suas atividades como Professora na Universidade Estadual de Montes Claros, em Montes Claros, MG.

BIOGRAFIA

SILVIA NIETSCHE, filha de Curt Walter Nietzsche (*in memoriam*) e Elfrieda Germer, nasceu em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, a primeiro de fevereiro de 1972.

De 1987 a 1989, cursou o segundo grau no Colégio Cônsul Carlos Renaux, na Cidade de Brusque, SC, na modalidade educacional de Formação Integral.

Em 1990, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tendo colado grau em janeiro de 1995.

Em março de 1995, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, defendendo a 200ª tese de Mestrado em Genética e Melhoramento da UFRV, em 28 de julho de 1997.

Em agosto de 1997, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 2 de março de 2000.

Em agosto de 1999, iniciou suas atividades como Professora na Universidade Estadual de Montes Claros, em Montes Claros, MG.

	Página
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E SCAR LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	38
CONTEÚDO	
IDENTIFICATION OF RAPD AND SCAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE GENE TO ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN.....	39

	Página
INTRODUÇÃO.....	viii
EXTRATO.....	x
ABSTRACT.....	1
INTRODUÇÃO.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Phaeoisariopsis griseola</i> NO BRASIL.....	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF <i>Phaeoisariopsis griseola</i> IN BRAZIL.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
FONTES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO- COMUM NO BRASIL.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
BEAN ANGULAR LEAF SPOT RESISTANCE SOURCES IN BRAZIL.....	29

	Página
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E SCAR LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
IDENTIFICATION OF RAPD AND SCAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE GENE TO ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN	39
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
RESUMO E CONCLUSÕES.....	55

A mancha-angular causada pelo fungo *Phaseolanthracium griseoides* (Sacc.) Ferraris, é atualmente uma das principais doenças do feijoeiro no Brasil. O patógeno apresenta alta variabilidade, e o desenvolvimento de novas variedades depende da identificação de novas fontes de resistência. Trabalhos recentes têm demonstrado a alta diversidade genética desse patógeno e a sua co-evolução com os grupos Andino e Mesohemeriano do feijoeiro. Trabalhos acerca da herança da resistência a *P. griseoides* têm evidenciado uma herança monogênica dominante em alguns casos e recessiva em outros. Os objetivos dessa série de estudos foram investigar a diversidade genética de *P. griseoides*, determinar a herança da resistência e identificar marcadores RAPD e SCAR ligados ao gene de resistência à mancha-angular no cruzamento entre Rudá e Cornell 48-242. Para avaliar a diversidade genética de isolados de *P. griseoides* coletados no Estado de Minas Gerais e em outros estados brasileiros, foi utilizada uma série discriminatória composta por 12 marcadores de feijão e marcadores RAPD. Os resultados acerca da diversidade genética confirmaram a

EXTRATO

NIETSCHE, Silvia, D. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2000.
Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Maurílio Alves Moreira.

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é atualmente uma das principais doenças do feijoeiro no Brasil. O patógeno apresenta alta variabilidade, e o desenvolvimento de novas variedades depende da identificação de novas fontes de resistência. Trabalhos recentes têm demonstrado a alta diversidade genética desse patógeno e a sua co-evolução com os grupos Andino e Mesoamericano de feijoeiro. Trabalhos acerca da herança da resistência a *P. griseola* têm evidenciado uma herança monogênica dominante em alguns casos e recessiva em outros. Os objetivos dessa série de estudos foram investigar a diversidade genética de *P. griseola*, determinar a herança da resistência e identificar marcadores RAPD e SCAR ligados ao gene de resistência à mancha-angular no cruzamento entre Rudá e Cornell 49-242. Para avaliar a diversidade genética de isolados de *P. griseola* coletados no Estado de Minas Gerais e em diversos estados brasileiros, foi utilizada uma série diferenciadora composta de 12 variedades de feijão e marcadores RAPD. Os estudos acerca da diversidade genética confirmaram a

alta variabilidade genética do patógeno no Estado de Minas Gerais e no Brasil. Dentre 49 isolados provenientes do Estado de Minas Gerais, identificaram-se 17 raças fisiológicas. O patótipo 63.31 foi a raça que agrupou o maior número de isolados, estando distribuída em quatro das cinco regiões amostradas. Apenas um isolado apresentou reação de compatibilidade com todos os genótipos da série diferenciadora e foi classificado como do patótipo 63.63, o que indicou a necessidade de inclusão de novos genótipos na série diferenciadora. Por meio do uso do *primer* OPAA 11 e dos dados do fenótipo de virulência, determinou-se a presença do acervo Mesoamericano no Estado de Minas Gerais. Foram estudados 39 isolados provenientes de diversos estados brasileiros, tendo sido identificados 20 patótipos. Além da determinação da diversidade genética, foram testadas nove potenciais fontes de resistência. O cultivar México 54 evidenciou-se como o mais resistente, apresentando reação de incompatibilidade a 20 das 25 raças testadas. Os cultivares AND 277, MAR 2, Cornell 49-242, Bat 332 e G 5686 também se destacaram como boas fontes de resistência. O cultivar Rudá foi suscetível à maioria dos isolados testados. Os resultados do estudo de herança indicaram a presença de um gene dominante controlando a resistência à mancha-angular no cultivar Cornell 49-242. Foram mapeados dois marcadores RAPD (OPN02 890 e OPE04 650) ligados em fase de acoplamento a 3,2 e 12,5 cM do gene de resistência. O fragmento NO02 890 foi transformado em um marcador do tipo SCAR. Foi proposta a designação *Phg-2* para o gene de resistência presente no cultivar Cornell 49-242. As análises efetuadas na série diferenciadora indicaram que alguns genótipos não são bons diferenciadores da mancha-angular. Fatores experimentais podem estar contribuindo para uma classificação incorreta dos patótipos de *P. griseola*.

ABSTRACT

NIETSCHE, Silvia, D. S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2000.
Common bean angular leaf spot pathogen genetic variability and identification of molecular markers associated with resistance. Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and Maurílio Alves Moreira.

Angular leaf spot, caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, is one of the most important bean disease in Brazil. The pathogen has demonstrated to be highly variable and breeding programs dependent on the identification of new resistance genes to develop resistant cultivars. Recent studies demonstrated a high genetic diversity of this pathogen and its co-evolution with the Andean and Mesoamerican common bean groups. Several works has demonstrated that resistance to this pathogen has been attributed to one gene, sometimes dominant or recessive. The objective of this study were to determinate the inheritance of the resistance and to identify RAPD and SCARs markers linked to angular leaf spot resistance gene in the cross between Cornell 49 -2424 and Ruda, and to assay the genetic diversity *P. griseola* isolates from the state of Minas Gerais and from others Brazilian states. A differential series composed of 12 bean varieties and RAPD markers were used. Out of 49 isolates tested in Minas Gerais state, 17 races were identified. Race 63.31 grouped the greatest number of isolates, being distributed in four of

the five studied regions. The virulence phenotypes showed a high virulence of the isolates. One isolate presented a reaction of compatibility with all genotypes of the differential series and was classified as being from race 63.63, which suggests the introduction of the new genotypes in the series. The use of OPAA 11 primer and differential series, suggest the group mesoamerican in Minas Gerais state presence. The genetic diversity of 39 *P. griseola* isolates from the seven Brazilian states were studied. The results confirmed a variability of the pathogen in Brazil: in 30 isolates tested, 20 physiological races were obtained. In this study, not only the determination of the races was carried out, but also nine potential resistance sources were tested. The results confirmed a variability of the pathogen in Minas Gerais state and in Brazil. The Mexico 54 cultivar was the most resistant, presenting incompatibility reaction to 20 of the 25 races tested. AND 277, MAR-2, Cornell 49-242, BAT 332 and G5686 cultivars were good resistance sources. The cultivar Rudá, type, was susceptible to most of the isolates. In the inheritance study, the results indicated that a single gene dominant controls resistance in Cornell 49-242. Two RAPD markers were mapped OPN02₈₉₀ and OPE04₆₅₀ in coupling phase at 3.2 and 12.5 cM from the resistance gene. The NO02₈₉₀ fragment was transformed into a SCAR marker and we proposed the designation *Phg-2* for the angular leaf spot resistance gene in cultivar Cornell 49-242. The use of RAPD markers and the characterization of the pathotypes of *P. griseola* indicate the necessity of the substitution of some genotypes and the standardization of the protocols and methodologies related to the characterization of the genetic variability of *P. griseola*.

bactérias, vírus e nematódeos). Dentre as doenças fúngicas, a mancha-angular, cujo agente causal é o fungo *Phytophthora grisea* (Datta) Favery, é uma das mais importantes, sendo de ocorrência generalizada nas diversas áreas produtoras dessa leguminosa. No Brasil, esta foi uma das primeiras doenças do feijoeiro a serem investigadas (Noack, citado por COSTA et al., 1982). No passado foi considerada uma doença de ciclo de vida de cultura, que causava pequena redução na produção (BONILLA, 1959). Entretanto, mais recentemente, passou a ser considerada uma das principais doenças do feijoeiro, sendo a sua incidência expressiva reduzida nos ambientes...

INTRODUÇÃO

De acordo com ZAUMER (1967), a mancha-angular reduz a vitalidade do feijoeiro, diminuindo, conseqüentemente, sua produtividade. Na Colômbia, a mancha angular pode reduzir de 40% a 60% o rendimento da cultura, além de prejudicar a qualidade biológica da semente (BARI).

De acordo com a FAO... (1992), o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com um consumo "per capita" de 20,3 kg/hab./a. A produção média nacional no período de 1994-1998 foi em torno de 2,7 milhões de toneladas, correspondendo a uma área de 4,9 milhões de hectares, com rendimento médio de 550 kg/ha (IBGE, 1994). No Brasil, o feijoeiro, além de ser a principal leguminosa utilizada na alimentação humana, caracteriza-se por ser um dos produtos agrícolas de maior importância socio-econômica (TULMANN NETO, 1975).

Apesar da grande área de produção de feijão, dados têm evidenciado a baixa produtividade brasileira. Entretanto, em condições ideais, podem ser obtidas produtividades em torno de 3.500 kg/ha. O feijão é uma espécie de origem americana, que desde sua domesticação vem sofrendo intenso processo de seleção. Apesar disso, possui diversas características que precisam ser melhoradas e adaptadas às condições de cultivo brasileiras. Cultivares com baixo potencial produtivo, plantio em solos de baixa fertilidade, baixa utilização de tecnologia e associação simbiótica ineficiente, além da suscetibilidade a diversas pragas e doenças, são os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade nacional (BALARDIN, 1990).

No Brasil, os programas de melhoramento do feijoeiro têm como principais objetivos o aumento da produtividade e a resistência a doenças. O feijoeiro é hospedeiro de grande número de organismos patogênicos (fungos,

bactérias, vírus e nematóides). Dentre as doenças fúngicas, a mancha-angular, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma das mais importantes, sendo de ocorrência generalizada nas diversas áreas produtoras dessa leguminosa. No Brasil, esta foi uma das primeiras doenças do feijoeiro a serem investigadas (Noack, citado por COSTA et al., 1982). No passado foi considerada uma doença de final de ciclo da cultura, que causava pequena redução na produção (BONILLA, 1958). Entretanto, mais recentemente, passou a ser considerada uma das principais doenças do feijoeiro, sendo a ela atribuída expressiva redução nos rendimentos.

De acordo com ZAUMEYER e THOMAS (1957), a mancha-angular reduz a vitalidade do feijoeiro, diminuindo, conseqüentemente, sua produtividade. Na Colômbia, a mancha-angular pode reduzir de 40% a 60% o rendimento da cultura, além de prejudicar a qualidade fisiológica da semente (BARROS et al., 1957). No México, relatos evidenciaram perdas de até 80% (CRISPIN et al., 1976); no Brasil, conforme informações de MORA-BRENES et al. (1983), RAVA et al. (1985) e SARTORATO e RAVA (1992), as perdas chegam a 70%, dependendo das condições de ambiente e da suscetibilidade dos cultivares.

A variabilidade genética apresentada por um patógeno constitui-se num importante fator a ser considerado em um programa de melhoramento visando ao controle de doenças. Evidências preliminares acerca da resistência do feijoeiro-comum à mancha-angular foram apresentadas por BROCK (1951). Posteriormente, a variabilidade patogênica de *P. griseola* foi documentada por vários autores, que demonstraram a grande variabilidade desse patógeno no Brasil, na América Latina e na África (ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ, 1979; SARTORATO e RAVA, 1984; CORREA-VICTORIA, 1987; SARTORATO et al., 1991; PYNDJI, 1993; LACERDA et al., 1994; GUZMÁN e GILBERTSON, 1995; PASTOR-CORRALES e JARA, 1995; PASTOR-CORRALES e PAULA JR., 1996; APARÍCIO, 1998). CORREA-VICTORIA (1987), por meio de análises isoenzimáticas, avaliou 55 isolados provenientes dos EUA, de diversos países da América Latina e da África, dividindo-os em dois grupos. Isolados africanos apresentaram o padrão tipo 1 associado aos cultivares de sementes grandes oriundos da região dos Andes. Isolados dos EUA e da América Latina apresentaram o padrão tipo 2 associado aos cultivares de sementes pequenas

provenientes das Américas do Norte e Central. PASTOR-CORRALES e JARA (1995) também conduziram trabalhos a respeito da diversidade genética de *P. griseola* e da sua co-evolução com o feijoeiro na América Latina. Na caracterização da variabilidade do patógeno, esses autores utilizaram cultivares diferenciadores e marcadores moleculares RAPD. Os resultados obtidos com esse trabalho confirmaram a separação dos fenótipos de virulência em dois grupos: o primeiro, denominado Andino, por infectar somente os cultivares de origem andina e, o segundo grupo, denominado Mesoamericano, por infectar tanto cultivares Andinos quanto Mesoamericanos.

A determinação da variabilidade genética do fungo e o estudo da herança da resistência das principais fontes de resistência de *P. vulgaris* a *P. griseola* são essenciais em programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular. Estudos de herança vêm indicando que a resistência pode ser atribuída a um, dois ou três genes, em alguns casos dominantes e, em outros, recessivos. BARROS et al. (1957), SANTOS FILHO et al. (1976), SINGH e SAINI (1980) e SARTORATO et al. (1993) observaram que, na maioria dos cruzamentos simples, a resistência era recessiva e controlada por dois ou três genes independentes e que, em poucos cruzamentos, a resistência era dominante.

Trabalhos mais recentes sobre a herança da resistência à mancha-angular evidenciaram que, nos cruzamentos das linhagens AND 277, MAR 2 e Mexico 54 com o cultivar suscetível Rudá, foi determinada herança monogênica e dominante nos três cruzamentos (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA, 1998; SARTORATO et al., 1999).

Marcadores moleculares têm sido utilizados em programas de melhoramento para monitorar a transferência de genes específicos de um cultivar para outro. Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990, WELSH e Mc CLELLAND, 1990) têm sido amplamente utilizados para identificar e selecionar genótipos com importantes genes de resistência a vários patógenos (HALEY et al., 1993; JOHNSON et al., 1995; YOUNG e KELLY, 1996; CARVALHO et al., 1998; FERREIRA, 1998; ALZATE-MARIN et al., 1999; SILVA et al., 1998; SARTORATO et al., 1999).

Os marcadores do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (KESSELI et al., 1992) são altamente específicos e não apresentam os

problemas de reproducibilidade dos marcadores RAPD; em muitos casos, marcadores podem ser detectados sem a necessidade da sua separação por eletroforese (MELOTTO et al., 1996). Esses marcadores representam locos únicos geneticamente definidos, identificados por amplificação de PCR de DNA genômico, com pares de *primers* específicos de oligonucleotídios.

O objetivo geral do presente trabalho consistiu no estudo da herança da resistência do feijoeiro-comum à mancha-angular e na análise da variabilidade genética de isolados de *P. griseola* coletados em diferentes estados do Brasil. Os objetivos específicos foram:

- Classificar em patótipos os isolados de *P. griseola* de cinco localidades do Estado de Minas Gerais, por meio do uso de uma série diferenciadora.
- Verificar a que acervos os isolados coletados pertencem.
- Classificar em patótipos os isolados de *P. griseola* coletados em diferentes estados brasileiros, por meio do uso de uma série diferenciadora.
- Avaliar a reação de algumas fontes de resistência à mancha-angular.
- Avaliar o comportamento da série diferenciadora internacionalmente aceita, bem como a sua contribuição nos estudos de diversidade genética de *P. griseola*.

Os artigos desta tese seguem os padrões da Revista Brasileira de Fitopatologia, com adaptações às normas da Universidade Federal de Viçosa para feita de tese.

BALARDIN, R. S. A cultura do feijão em Santa Catarina. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Curso de Tecnologia em Santa Catarina, 1990. 252p.

BARROS, O., GARDENOBA, R., SILESA, R. L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. *Phytopathology*, v. 47, n.1, p. 2, 1957.

BONILLA, H. A. Algunas enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, v.7, n. 1, p. 19-75, 1958.

BROCK, R. D. Resistance in angular leaf spot among varieties of beans. *Journal of the Australian Institute of Agriculture Science*, v. 17, n. 1, p. 25-30, 1951.

CARVALHO, G.A., PAULA JUNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHÉ, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança de resistência do linhagem AND 277 de feijão-comum à raça 83-23 de *Phaeoisriopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 482-485, 1998.

CORREA-VICTORIA, F. J. Pathogenic variation, production of toxin metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisriopsis griseola* (Beauv.) Ferr. East Lansing: Michigan State University, 1987. 154p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Michigan State University, 1997.

COSTA, A. F., MIRANDA, P., MAFRA, R. C. Levantamento e estudos das principais doenças do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de Pernambuco. In: *REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FEIJÃO*, 1, 1992, Goiânia, Goiás. Anais... Goiânia, Goiás, 1992, p. 58-63.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRISPIN, A., SIFUENTES, J. A., AVILA, J. C. Enfermedades y plagas del frijol en México. México: INIA, 1978. 41 p. (Boletín de Divulgación, 33).

ALVAREZ-AYALA, G., SCHWARTZ, H. F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 22, n. 1, p. 86-88, 1979.

ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G. A., PAULA JÚNIOR., 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 beans. **Phytopathology**, v. 89, n. 2, p. 281- 285, 1999.

APARICIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisriopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Colombia: Universidad Del Valle, 1998. 120p. Trabajo (Grado) – Universidad Del Valle, 1998.

BALARDIN, R. S. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia em Santa Catarina, 1990. 252p.

BARROS, O., CARDENOSA, R., SKILES, R. L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v. 47, n.1, p. 3, 1957.

BONILLA, H. A. Algunas enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Valle del Cauca. **Acta Agronômica**, v.7, n. 1, p. 19-75, 1958.

BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agriculture Science**, v. 17, n. 1, p. 25-30, 1951.

- CARVALHO, G.A., PAULA JUNIOR., T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 482-485, 1998.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** East Lansing: Michigan State University, 1987. 154p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Michigan State University, 1987.
- COSTA, A. F., MIRANDA, P., MAFRA, R. C. Levantamento e estudos das principais doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de Pernambuco. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1, 1982, Goiânia, Goiás. **Anais....** Goiânia, Goiás: UFG, 1982. p. 56-63.
- CRISPIN, A., SIFUENTES, J. A., AVILA, J. C. **Enfermedades y plagas del frijol en México.** México: INIA, 1976. 41 p. (Folleto de Divulgacion, 33).
- FAO PRODUCTION YEARBOOK. Rome: FAO 1992. v. 56, 250p.
- FERREIRA, C.F. **Herança da resistência do feijoeiro à mancha-angular e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 38p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, n. 5, p. 600-607, 1995.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, 1990 a 1994. 85p.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theor. Appl. Genet**, v. 86, n. 5, p. 505-512, 1993.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINE-CRUZADO, J.C. Coupling and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theor. Appl. Genet**, v. 90, n. 4, p. 659-664, 1995.
- KESSELI, R.V., PARAN, I, MICHELMORE, R.W. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. p31-36. In: **Proc. Symp. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding.** Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, ASA; Madison, WI. 1992.

- LACERDA, J. T., COELHO, R. S. B., MARIANO, R. L. R. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco. **Grupo Paulista de Fitopatologia**, v. 20, n.2, p. 93-96, 1994.
- MELLOTO, M., AFANADOR, L., KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. *Genome*, v. 39, n. 1, p. 1216-1219, 1996.
- MORA-BRENES, B. M., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 599, 1983.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C, E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comun en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M., PAULA JUNIOR, T. J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, 1996, Goiania, Goiás. **Resumos...** Goiânia, Goiás: EMBRAPA, 1996. p 350-60.
- PYNDJI, M. M. Pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in the Great Lakes region. In: PAN AFRICAN BEAN PATHOLOGY WORKING GROUP MEETING, 1992, Thinka, Kenya. **Proceedings...** Thinka, Kenya: CIAT, 1993. p. 7-12. (CIAT African Workshop Series, 23).
- RAVA, C. A., SARTORATO, A., CARVALHO, J. R. P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 28, n. 1, p. 5-6, 1985.
- SANTOS FILHO, H. P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v. 23, n. 127, p. 226-230, 1976.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. Especialização fisiológica de *Isariopsis griseola* Sacc. em *Phaseolus vulgaris* L. **Summa Phytopathologica**, v. 10, n. 3/4, p. 58-59, 1984.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 43-46, 1991.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 247-251. 1992.

- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 5, p. 30, 1993.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvent Cooperative**, v. 42, n. 2, p. 21-22, 1999.
- SILVA, M. A., SHUSTER, I., GUIMARÃES, C. T. , BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Avaliação de marcador do tipo SCAR obtido de DNA genômico de soja. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.10, p.230, 1998.
- SINGH, A. K., SAINI, S. S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*I. griseola* Sacc.) in bean (*P. vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 29, n.1, p. 175-176, 1980.
- TULMANN NETO, A. **Contribuição ao melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando aumentar a quantidade e a qualidade da proteína**. Piracicaba: ESALQ, 1975. 150p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiróz, 1975.
- WELSH, J., Mc CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 2, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, J. K., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 3, p. 6531-6535, 1990.
- ZAUMEYER, W. J., THOMAS, H. R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington, D.C.: U.S.D.A., 1957. 151p. (Technical Bulletin 868).
- YOUNG, R., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v. 80, n. 2, p. 650-654, 1996.

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Phaeoisariopsis griseola* NO BRASIL

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Phaeoisariopsis griseola* IN

RESUMO

A mancha-angular do feijoeiro-comum, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, é uma enfermidade de ocorrência comum no Brasil. Em razão da crescente importância dessa doença em Minas Gerais e no Brasil, o constante monitoramento da variabilidade do patógeno é uma estratégia importante em programas de melhoramento visando à resistência à doença. Estudou-se a variabilidade patogênica de 72 isolados de *P. griseola*, utilizando a série diferenciadora internacional. A primeira folha trifoliolada de cada planta, com 15 dias de idade, foi inoculada com uma suspensão de 2×10^4 conídios/ml, sendo as avaliações realizadas 15 dias após a inoculação. Foram identificados 26 patótipos, confirmando a grande variabilidade apresentada por esse fungo no Brasil. De todos os patótipos determinados, destacaram-se como de maior frequência os seguintes: 63.31, 63.23, 63.39, 63.55 e 63.47. Apenas um dos isolados analisados infectou todos os cultivares da série diferenciadora, tendo sido classificado como patótipo 63.63. Apenas o isolado Pg 14, proveniente da Colômbia e utilizado como controle, apresentou fenótipo de virulência do tipo Andino. Os resultados obtidos através do uso da série diferenciadora e as análises moleculares com o *primer* OPA 11 evidenciaram a presença apenas do grupo Mesoamericano de *P. griseola* em Minas Gerais.

Palavras-chave: mancha-angular, variabilidade, resistência e marcadores RAPD.

ABSTRACT

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Phaeoisariopsis griseola* IN BRAZIL

Angular leaf spot, caused by *Phaeoisariopsis griseola* is a very common bean disease in Brazil. Due to the great importance of this disease, the constant monitor of the pathogen variability is an important strategy in a breeding program aiming the development of resistant cultivars. The pathogenic variability of 72 isolates was studied using the international differential set. The first trifoliolate leaf of each plant was inoculated with suspension of a 2×10^4 spores/ml. Evaluations were carried out 15 days after inoculation. Twenty six pathotypes were identified which demonstrate the great variability of the fungus in Brazil. Pathotypes, 63.31, 63.23, 63.39, 63.55 and 63.47 were the most frequent. Pathotype 63.63 was the most virulent. Only isolate Pg 14, from Colombia, used as control, presented the virulence phenotype of the Andean group. The virulence test and molecular marker, using primer OPAA 11 confirmed the Middle American phenotype pool in Brazil.

Key words: angular leaf spot, variability, resistance and RAPD markers.

INTRODUÇÃO

A mancha-angular do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cujo agente causador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, encontra-se amplamente distribuída nas zonas tropicais e subtropicais do mundo (Pastor-Corrales & Schwartz, 1994). No Brasil, o maior produtor e consumidor de feijão do mundo, a mancha-angular é uma das enfermidades mais importantes. Além do Brasil, em países como Bolívia e México, bem como na América Central e na África, a doença vem gradativamente causando danos econômicos aos produtores (Pastor-Corrales et al., 1998). Quando as condições ambientais são favoráveis e o patógeno está presente, as perdas na produtividade podem alcançar até 70% (Schwartz et al., 1982). O melhoramento genético do feijoeiro visando à resistência à mancha-angular é prioridade nesses locais, mas tem sido dificultado pela alta variabilidade genética apresentada pelo patógeno (Villegas, 1959; Alvarez-Ayala e Schwartz, 1979; Buruchara, 1983; Sartorato & Rava, 1984; Sartorato et al., 1991; Lacerda et al., 1994; Pastor-Corrales & Jara, 1995; Aparício, 1998).

Um dos importantes trabalhos sobre a variabilidade patogênica de *P. griseola* no Brasil, através do uso da série diferenciadora, foi realizado por Pastor-Corrales e Paula JR. (1996). Nesse trabalho, foram avaliados 27 isolamentos monospóricos provenientes de quatro estados brasileiros, onde foram detectados 21 patótipos diferentes, cujas principais raças encontradas foram 7.39, 15.23, 15.39, 31.39 e 63.31, indicando que a diversidade de patótipos de *P. griseola* no Brasil é bastante ampla. Outro trabalho de destaque foi reportado por Aparício (1998), autora que estudou cerca de 66 isolamentos monospóricos provenientes do Brasil e determinou a presença de 30 patótipos diferentes. As raças mais freqüentes determinadas foram 15.39, 31.23, 63.31, 63.23 e 31.39, respectivamente 9, 7, 5, 3 e 3 isolados para cada raça. Ambos os trabalhos realizados indicaram a alta diversidade de patótipos e a presença do acervo Mesoamericano no Brasil.

Devido à crescente importância dessa enfermidade, diferentes grupos vêm estudando o patógeno na tentativa de caracterizar sua variabilidade genética, bem como identificar novas fontes de resistência. O conhecimento

dessa variabilidade e a identificação de novos genes de resistência são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias apropriadas para obtenção de variedades resistentes ao patógeno (Pyndji, 1993). O estudo da diversidade de *P. griseola* é efetuado por meio do uso de uma série diferenciadora (Centro...- CIAT, 1994; Sartorato, 1989; Pastor-Corrales & Jara, 1995), de isoenzimas (Correa-Victoria, 1987), de marcadores RAPD (Guzmán e Gilbertson, 1995) e do uso combinado da série diferenciadora e de marcadores RAPD (Pastor-Corrales & Jara, 1995; Nietsche, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade genética de *P. griseola* no Brasil, bem como monitorar a freqüência das raças através do uso da série diferenciadora.

Quadro 1 – Isolatos de *Phaeoisariopsis griseola* e sua origem coletados de plantas de milho comum, em diversas localidades

Nº	Isolado	Tamanho (bp)	Localidade
1	P-11	P	Colômbia
2	248	P	Recife-PE
3	38-4	P	Ipanama-AL
4	35	P	Sertão-AL
5	67	P	Catuari-PE
6	122-3	P	Campina Grande-PB
7	122-2	P	Campina Grande-PB
8	123-4	P	Sta. Mª Joia-ES
9	140-3	P	Venda Nova-ES
10	190-7	P	Afonso Claudio-ES
11	190-1	P	Goiania-GO
12	211-3	P	Afonso Claudio-ES
13	210-1	P	Anápolis-GO
14	210-2	P	Anápolis-GO
15	190-5	P	Anápolis-GO
16	217-1	P	Barralva-BA
17	210-4	P	Barralva-BA
18	210-6	P	Puzos-PB
19	210-8	P	Mato Grosso do Sul-MS
20	210-4	G	Mato Grosso do Sul-MS
21	210-5	P	Goiânia-GO
22	210-9	P	Juazeiro-SC
23	210-7	P	Recife-PE
24	210-2	P	Juazeiro-SC
25	210-8	P	Juazeiro-SC
26	210-2	P	Juazeiro-SC
27	210-1	P	Juazeiro-SC

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de culturas monospóricas

Os isolados provenientes de diferentes estados do Brasil foram cedidos pela Embrapa – Arroz e Feijão e coletados de variedades de feijão que apresentavam os sintomas da mancha-angular em condições de campo de diversas regiões produtoras de feijão de Minas Gerais (Quadros 1 e 2). Na obtenção das culturas monospóricas, utilizou-se a metodologia descrita por Correa-Victoria (1987) e Pyndji (1991).

Quadro 1 – Isolados de *Phaeoisariopsis griseola* e sua origem coletados de plantas de feijoeiro-comum, em diferentes localidades

Nº	Isolados	Tamanho Grão ¹	Localidade
1	Pg 14	P	Colômbia
2	Jupi	P	Recife-PE
3	38-4	P	Ipanema-AL
4	35	P	Santana-AL
5	67	P	Caruaru-PE
6	122-6	P	Campina Grande-PB
7	122-3	P	Campina Grande-PB
8	145-8	P	Sta. M ^a Jetiba-ES
9	144-3	P	Venda Nova-ES
10	155-7	P	Afonso Cláudio-ES
11	158-1	P	Goiânia- GO
12	161-3	P	Afonso Cláudio-ES
13	164-4	P	Anápolis-GO
14	168-7	P	Anápolis-GO
15	168-5	P	Anápolis-GO
16	197-3	P	Barreiras-BA
17	204-4	P	Barreiras-BA
18	221-10	P	Puxinanã-PB
19	210-1	P	Mato Grosso do Sul-MS
20	216-4	G	Mato Grosso do Sul-MS
21	386-1	P	Goiânia-GO
22	517-1	P	Ituporanga-SC
23	568-1	P	Rio Verde-GO
24	581-3	P	Urussanga-SC
25	581-1	P	Urussanga-SC
26	586-2	P	Urussanga-SC
27	594-2	P	Anápolis-GO

^{1/} Tamanho do grão: P = pequeno e G = grande.

Quadro 2 – Isolados de *Phaeoisariopsis griseola* e sua origem coletados de plantas de feijoeiro-comum em diferentes localidades

Nº	2	Tamanho do Grão ¹	Localidade* da Coleta
1	7-3	G	Lavras
2	8-2	P	Lavras
3	10-2	P	Lavras
4	12-3	P	Lavras
5	21-3	P	Lavras
6	24-2	P	Lavras
7	29-3	P	Lambari
8	32-5	P	Lavras
9	33-1	P	Patos de Minas
10	36-3	P	Patos de Minas
11	40-1	P	Lavras
12	42-2	P	Lavras
13	41-1	P	Lavras
14	47-1	P	Coimbra
15	48-1	P	Coimbra
16	57-4	P	Coimbra
17	59-3	P	Coimbra
18	58-1	G	Coimbra
19	75-2	P	Coimbra
20	83-1	P	Coimbra
21	94-1	P	Coimbra
22	101-1	P	Coimbra
23	105-2	P	Coimbra
24	104-1	P	Coimbra
25	110-4	P	Pocrane
26	110-3	G	Pocrane
27	110-2	P	Pocrane
28	111-2	P	Pocrane
29	111-1	P	Florestal
30	113-2	P	Pocrane
31	112-1	P	Pocrane
32	113.1	P	Pocrane
33	116-1	P	Pocrane
34	117-1	P	Lambari
35	119-2	P	Montes Claros
36	122-5	P	Lavras
37	122-4	P	Lavras
38	122-2	P	Lavras
39	124-2	P	Lavras
40	125-1	P	Lavras
41	144-1	P	Coimbra
42	184-6	P	Paracatu
43	291-6	P	Unaí
44	316-6	P	Lavras
45	316-1	P	Lavras

¹ Tamanho do grão: P= pequeno e G= grande.

Preparo do inóculo

De cada tubo contendo a cultura do patógeno, obteve-se uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de 2 ml de água estéril. Foi depositado 0,8 ml dessa suspensão no centro de placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, a 24°C. O inóculo foi preparado a partir das placas, adicionando-se água destilada e raspando suavemente a superfície da placa para remover os conídios; em seguida, procedeu-se à sua filtragem em gaze. Da suspensão obtida, ajustou-se a concentração final para 2×10^4 conídios/mL (Pastor-Corrales & Jara, 1995).

Inoculação e avaliação

Para análise do fenótipo de virulência, foi plantado um total de seis plantas de cada diferenciadora (Quadro 3) para cada isolado monospórico de *P. griseola*. Dezoito dias após o plantio, a primeira folha trifoliolada de cada planta foi inoculada com a suspensão de conídios nas faces abaxial e adaxial, com o auxílio de um DeVilbis nº 15. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por um período de 48 horas, sendo, posteriormente, transferidas para casa de vegetação.

As avaliações foram efetuadas 15 dias após a inoculação, por meio de uma escala de severidade de nove graus adaptada do CIAT (1987) e descrita a seguir: 1 – plantas sem sintomas da doença; 2 – presença de até 3% de lesões; 3 – presença de até 5% de lesões não-esporuladas; 4 – presença de lesões esporuladas, que cobrem aproximadamente 10% da área foliar; 5 – presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, que cobrem aproximadamente 10-15% da área foliar; 6 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 15-20% da área foliar; 7 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 20- 25% da área foliar; 8 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 25-30% da área foliar – geralmente associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; e 9 – sintomas severos da doença, resultando em queda

prematura de folhas e morte. Plantas apresentando graus de severidade maiores que 3 foram consideradas suscetíveis.

Na nomenclatura dos patótipos de *P. griseola*, foi utilizada uma escala de valores binários, apresentada no Quadro 3 (Pastor-Corrales & Jara, 1995).

Quadro 3 – Genótipos de feijoeiro-comum como diferenciadores para caracterizar patótipos de *Phaeoisariopsis griseola*

Genótipo Diferenciador	Tamanho da Semente ¹	Acervo Genético	Valor Binário ² Quando Suscetível
A. Don Timóteo	G	Andino	1
B. G 11796	G	Andino	2
C. Bolón Bayo	G	Andino	4
D. Montcalm	G	Andino	8
E. Amendoim	G	Andino	16
F. G 5686	G	Andino	32
G. PAN 72	P	Mesoamericano	1
H. G 2858	M	Mesoamericano	2
I. Flor de Mayo	P	Mesoamericano	4
J. México 54	M	Mesoamericano	8
K. BAT 332	P	Mesoamericano	16
L. Cornell 49-242	P	Mesoamericano	32

^{1/} G= grande, M= médio e P= pequeno.

^{2/} Valor binário para nomear os patótipos de *P. griseola*. Por exemplo, se um isolado ataca os cultivares diferenciadores F (grupo Andino, valor binário = 32), G (grupo Mesoamericano, valor binário = 1) e K (grupo Mesoamericano, valor binário = 16), a raça denomina-se 32.17. Obtém-se a designação do patótipo, somando seus valores binários para cada diferenciadora, no caso de reação de compatibilidade.

Caracterização molecular

A massa micelial de *P. griseola* foi produzida em meio descrito por Kado & Heskett (1970), e a extração de DNA foi efetuada segundo a metodologia desenvolvida por Raeder & Broda (1987). Uma amostra ao acaso de 28 dos 73 isolados estudados foi selecionada para efetuar a caracterização molecular. Foram construídos "bulks" de isolados com os patótipos mais freqüentes no Brasil (Quadro 4). Quatro patótipos foram selecionados: 63.23, 63.39, 63.31 e 63.55, sendo cada "bulk" construído com 7, 6, 7 e 7 isolados monospóricos,

respectivamente. Para construção desses "bulks", quantidades equimolares de DNA de cada isolado do mesmo patótipo foram misturadas. Para caracterização da diversidade genética entre os "bulks" das raças de *P. griseola*, utilizou-se a técnica RAPD (Williams et al., 1990). Os oligonucleotídeos iniciadores, que evidenciaram polimorfismos entre os quatro patótipos, foram utilizados na amplificação de cada isolado pertencente aos quatro "bulks".

Quadro 4 – Isolados e origem geográfica de *Phaeoisariopsis griseola*

Nº de isolados	Isolado	Origem Geográfica
1	94-1	Coimbra
2	158-1	Goiânia – GO
3	47-1	Coimbra
4	83-1	Coimbra
5	104-1	Coimbra
6	57-4	Coimbra
7	144-1	Coimbra
8	21-3	Lavras
9	12-3	Lavras
10	10-2	Lavras
11	7-3	Lavras
12	41-1	Lavras
14	113-1	Pocrane
15	113-2	Pocrane
16	110-4	Pocrane
17	112-1	Pocrane
18	122-5	Campo Grande – PB
19	110-3	Pocrane
20	291-6	Unai
21	110-2	Pocrane
22	41-1	Lavras
23	568-1	Rio Verde – GO
24	36-2	Patos de Minas
25	594-2	Anápolis – GO
26	184-6	Paracatu
27	29-3	Lambari
28	58-1	Coimbra

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Classificação dos isolados utilizando cultivares diferenciadores

Todos os isolamentos monospóricos provenientes dos 10 estados brasileiros amostrados apresentaram fenótipos de virulência tipicamente do cultivar Mesoamericano. Apenas o isolado Pg 14, proveniente da Colômbia e utilizado como controle, caracterizou-se com padrão típico Andino, com a ressalva de que este isolado pode ser utilizado como padrão em estudos de diversidade através do uso de *primers* específicos (Guzmán et al., 1999). Nos Quadros 5 e 6, apresentam-se os patótipos observados e os respectivos fenótipos de virulência. Dos 72 isolados, foram caracterizados 26 patótipos diferentes. As raças mais freqüentes foram 63.31, 63.23, 63.55, 63.39 e 63.47, respectivamente com 14, 12, 9, 8 e 6 patótipos cada. De acordo com os dados, em cada três isolados, um patótipo de *P. griseola* foi identificado, confirmando sua alta variabilidade genética. Tais resultados confirmam a alta variabilidade desse patógeno, já reportada por diversos autores (Buruchara, 1983; Sartorato & Rava, 1984; Sartorato et al., 1991; Lacerda et al., 1994; Pastor-Corrales & Jara, 1995; Pastor-Corrales & Paula JR., 1996; Aparício, 1998). Todos os trabalhos citados se referem ao estudo da variabilidade do patógeno no Brasil e na América Latina, destacando-se a grande diversidade de raças. Nietzsche (1997) publicou resultados de estudos acerca da variabilidade genética de *P. griseola* no Estado de Minas Gerais. Os referidos autores classificaram 13 diferentes patótipos provenientes de 30 isolados monospóricos, coletados em cinco regiões produtoras de feijão de Minas Gerais. Os principais patótipos encontrados foram 31.21, 31.23, 63.23, 63.39 e 63.55, sendo o patótipo 63.23 o mais freqüente. Todos os isolados apresentaram reação de compatibilidade com variedades andinas e mesoamericanas, caracterizando-os como pertencentes ao acervo Mesoamericano (Pastor-Corrales & Jara, 1995). Os isolados provenientes de diferentes estados brasileiros atacam variedades andinas e mesoamericanas, um tipo de comportamento que demonstra que, no Brasil, há predominância do grupo Mesoamericano. Isso se deve, principalmente, ao fato de, no Brasil, a maioria dos cultivares pertencer a esse grupo.

Dos 26 patótipos determinados, apenas cinco deles apresentaram reação de compatibilidade com as variedades diferenciadoras Cornell 49-242 e Bat 332, simultaneamente. Esse dado também foi observado por Aparício (1998). Esses resultados indicaram que as variedades Cornell 49-242 e BAT 332 podem ser utilizadas como fontes de genes de resistência complementares à mancha-angular em um programa de melhoramento.

As variedades que apresentaram menor reação de compatibilidade com os isolados testados foram Mexico 54, Cornell 49 242 e Bat 332, apresentando reação de resistência a 20, 13 e 11 patótipos. Dentro do grupo Andino, pode-se ressaltar a variedade G5686, que apresentou resistência a 14 patótipos de *P. griseola*, podendo ser utilizada como fonte de resistência de genes a isolados do grupo Mesoamericano.

Até o presente momento já foram caracterizados 196 isolados de *P. griseola* no Brasil (Pastor-Corrales & Jara, 1995; Pastor-Corrales & Paula JR., 1996; Nietsche, 1997; Aparício, 1998), sendo identificados 57 patótipos. Os patótipos mais freqüentes foram 63.23, 63.31, 63.39, 31.23 e 15.39. Tais resultados indicaram a grande variabilidade genética de *P. griseola* no Brasil, bem como a sua necessidade de monitoramento para o desenvolvimento de novos cultivares resistentes. De acordo com Pastor-Corrales & Jara (1995), o comportamento dos isolados brasileiros caracteriza-se por pertencer ao grupo Mesoamericano. Nos trabalhos desenvolvidos por Pastor-Corrales & Paula JR. (1996), Nietsche (1997), Nietsche et al. (1999), Aparício (1998) e Pastor-Corrales et al. (1998), os genótipos Bolon Bayo e G11796 demonstraram reação de compatibilidade em torno de 97,3% e 86%, respectivamente, em relação a todos os isolados testados. Nietsche (1997) e Nietsche et al. (1999) estudaram 98 isolados brasileiros, relatando reação de compatibilidade desses genótipos de 96,25%. Esses resultados são confirmados no trabalho de Aparício (1998), em que as variedades G 11796 e Bolon Bayo apresentaram 92% e 98,5% de reação de compatibilidade com os isolados brasileiros testados. Essa autora ainda estudou 22 isolados provenientes da Bolívia, detectando uma compatibilidade de 100% dos isolados nos genótipos G 11796 e Bolon Bayo. Recentemente, Pastor-Corrales et al. (1998) confirmaram o comportamento desses genótipos andinos, obtendo 92,8% de

compatibilidade com os isolados testados. De acordo com todos os resultados relatados até o momento, pode-se verificar que as linhagens G 11796 e Bolon Bayo não estão sendo eficientes na diferenciação de patótipos de *P. griseola*. Além desse fato, essas linhagens apresentaram a desvantagem de não florescer em determinadas regiões do Brasil, como Minas Gerais e Goiás e os estados das Regiões Norte e Nordeste brasileiras. Uma das variedades que vêm despertando interesse como fonte de resistência à mancha-angular é a linhagem AND 277 (Sartorato et al., 1993). Esta linhagem se caracteriza por apresentar excelente fonte de resistência, pertencente ao grupo Andino, e pode ser amplamente utilizada pelos pesquisadores, pois não apresenta problemas de sensibilidade ao fotoperíodo. Até o presente momento, a caracterização da variabilidade patogênica de *P. griseola* tem apresentado problemas. Isolado caracterizado como patótipo em um local está sendo caracterizado como outro patótipo em outras condições ambientais. A partir dessas observações, acredita-se que as condições experimentais e de avaliação devem ser urgentemente uniformizadas, para que a caracterização de patótipos de *P. griseola* seja amplamente utilizada pelos pesquisadores.

Os resultados obtidos neste trabalho e em outros são de importância para programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular, pelo fato de que a caracterização de raças de *P. griseola* pode contribuir para determinar as principais fontes de resistência e entender a distribuição do patógeno no Estado de Minas Gerais e no Brasil.

Análise da variabilidade genética usando marcadores moleculares RAPD

Foi realizada a análise da variabilidade genética, usando-se marcadores RAPD, dos patótipos relacionados no Quadro 4. Foram utilizados os *primers* OPA07, OPG05 e OPAA 11, que produziram bandas fortes e polimórficas entre os *bulks* dos quatro patótipos. Os dados obtidos com a análise dos *primers* polimórficos nos *bulks* de isolados de *P. griseola* determinaram a ausência de bandas características de determinada raça. Esse resultado indicou a dificuldade de caracterização de patótipos de *P. griseola* via técnica de RAPD.

Quadro 5 – Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* coletados em diferentes estados do Brasil

Nº	Isolado	Fenótipo de Virulência das Variedades												Raça	Local	
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L			
1	14	a	b	c	d	e		g		i					31.5	Colômbia
2	Jupi	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k	l	63.55	Recife – PE
3	38-4	a	b	c	d	e		g	h	i				l	31.39	Ipanema – AL
4	35	a		c	d		f	g	h	i			k		39.23	Santana – AL
5	67	a	b	c	d	e		g	h	i				l	45.39	Caruaru – PE
6	122-6	a	b	c	d	e	f	g	h	i				l	63.39	Campo Grande – PB
7	122-3	a	b	c	d			g						l	15.33	Campo Grande – PB
8	145-8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k			63.31	San. M ^a . Jetiba – ES
9	144-3	a	b	c	d	e	f	g	h				k		63.19	Venda Nova – ES
10	155-7	a	b	c	d	e		g	h	i			k	l	31.55	Afonso Cláudio – ES
11	158-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k		63.23	Goiânia – GO
12	161-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i				l	63.39	Afonso Cláudio – ES
13	164-4	a	b	c	d	e		g	h	i	j	k			31.31	Anápolis – GO
14	168-7	a	b	c	d	e			h	i	j	k			31.31	Anápolis – GO
15	168-5	a	b	c	d	e			h	i	j	k			31.31	Anápolis – GO
16	197-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j			l	63.47	Barreiras – BA
17	204-4	a	b		d			g	h				k		11.19	Barreiras – BA
18	210-1	a	b	c		e	f	g	h	i				l	55.39	Dourados – MS
19	216-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k			63.31	Dourados – MS
20	221-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j			l	63.47	Puxinanã – PB
21	386-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k		63.23	Goiás – GO
22	517-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k		63.23	Ituporanga – SC
23	568-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k	l	63.55	Rio Verde – GO
24	581-3	a		c	d	e		g	h	i			k	l	29.55	Urussanga – SC
25	581-1	a	b	c	d	e	f	g	h					l	63.35	Urussanga – SC
26	586-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k			63.31	Urussanga – SC
27	594-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i			k	l	63.55	Anápolis – GO

¹ A = Don Timóteo, B = G 11796, C = Bolón Bayo, D = Montcalm, E = Amendoim, F = G 5686, G = PAN 72, H = G 2858, I = Flor de yo, J = Mexico 54, K = BAT 332 e L = Cornell 49-242.

Quadro 6 – Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* coletados em diferentes localidades

Nº	Isolado	Fenótipo de virulência das variedades												Raça	Local
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
1	7-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Lavras
2	8-2	a	b	c	d	e		g	h	i			l	31.39	Lavras
3	10-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Lavras
4	12-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Lavras
5	21-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Lavras
6	24-2	a	b	c	d	e		g	h	i				31.7	Lavras
7	29-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k	l	63.55	Lambari
8	32-5	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63.7	Lavras
9	33-1	a	b	c	d	e		g				k		31.17	Patos de Minas
10	36-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k	l	63.55	Patos de Minas
11	40-1	a	b	c	d	e		g					l	31.33	Lavras
12	42-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Lavras
13	41-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Lavras
14	47-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
15	48-1	a	b	c	d	e	f	g	h			k		63.19	Coimbra
16	57-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
17	59-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
18	58-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k	l	63.55	Coimbra
19	75-2	a	b	c	d	e		g		i		k		31.21	Coimbra
20	83-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
21	94-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
22	101-1	a	b	c	d	e		g	h	i		k		31.23	Coimbra
23	105-2	a	b	c	d	e		g		i		k	l	31.53	Coimbra
24	104-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
25	110-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
26	110-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
27	110-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
28	111-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
29	111-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Florestal
30	113-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
31	112-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Pocrane
32	113-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Pocrane
33	116-1	a		c	d	e	f	g			j		l	61.41	Pocrane
34	117-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Lambari
35	119-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Montes Claros
36	122-5	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	31.39	Lavras
37	122-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Lavras
38	122-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k	l	63.55	Lavras
39	124-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Lavras
40	125-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Lavras
41	144-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Coimbra
42	184-6	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63.39	Paracatu
43	291-6	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Unai
44	316-6	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Lavras
45	316-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Lavras

¹⁷ A = Don Timóteo, B = G 11796, C = Bolón Bayo, D = Montcalm, E = Amendoim, F = G 5686, G = PAN 72, H = G 2858, I = Flor de yo, J = Mexico 54, K = BAT 332 e L = Cornell 49-242.

Dos três *primers* que demonstraram polimorfismo, foi testado o *primer* OPAA11 (Figura1). Esse *primer* é de grande interesse em estudos de diversidade genética de *P. griseola*. Guzmán et al. (1999) relataram o uso eficiente desse *primer* na separação dos grupos Andinos e Mesoamericanos de *P. griseola*. Naquele trabalho, os autores demonstraram que o uso do *primer* OPAA 11 possibilita, em uma única reação, separar isolados provenientes do acervo de evolução Andino daqueles do grupo Mesoamericano. A banda característica do grupo Andino apresenta aproximadamente 400 pb e a banda do grupo Mesoamericano, aproximadamente 700 pb, e está ligada a isolados Mesoamericanos. De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, indicando um padrão de amplificação com os 28 isolados selecionados de *P. griseola*, observa-se apenas a banda de 700 pb ligada a isolados de origem Mesoamericana. Esses resultados confirmam os de trabalhos anteriores efetuados por Nietzsche (1997) e Aparício (1998), que, realizando estudos de diversidade genética de *P. griseola* com o auxílio de marcadores RAPD, detectaram a presença do grupo Mesoamericano no Estado de Minas Gerais e no Brasil. A partir do desenvolvimento de *primers* específicos, como o *primer* OPAA 11, que separam os grupos Andinos dos Mesoamericanos, os estudos de variabilidade genética serão mais rápidos e eficientes.

A caracterização de patótipos efetuada via marcadores RAPD e a série diferenciadora evidenciaram a dificuldade de se correlacionarem os resultados obtidos com ambas as técnicas. Os métodos para caracterização de patótipos via marcadores moleculares devem ser melhorados, e técnicas mais apuradas podem vir a auxiliar no monitoramento dos patótipos. Já o uso da série diferenciadora desenvolvida por Pastor-Corrales & Jara (1995) não apresenta eficiência suficiente para discriminar os patótipos. Problemas de condições experimentais e de alguns cultivares podem estar contribuindo para uma caracterização menos apurada da variabilidade genética de *P. griseola*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-AYALA, G., SCHWARTZ, B. F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Ascochyta blight*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, v. 22, n. 1, p. 66-68, 1979.
- APARÍCIO, S. H. E. Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoaskaria griseola* de Brasil y Bolivia. Cali, Colombia: Universidad Del Valle, 1994. 120p. Trabajo (Grado) - Universidad Del Valle, 1994.
- BURUCHARA, R. A. Definition of pathogenic variation in *Ascochyta blight* Sacc. and *Pseudomonas solanaceae* pv. *Phaseolicola* (Burk., 1938) Young, Dye and Wilbur 1973. Nairobi, Universidade de Nairobi, 1983. 188p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Nairobi, 1983.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT. Annual Report of Bean Program. Cali, Colombia: 1994. p. 31-32.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT. Standard systems for the evaluation of bean genotypes. Cali, Colombia: 1987. 51p.
- CORREA VICTORIA, F. J. Pathogenic variation, production of toxic

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 λ

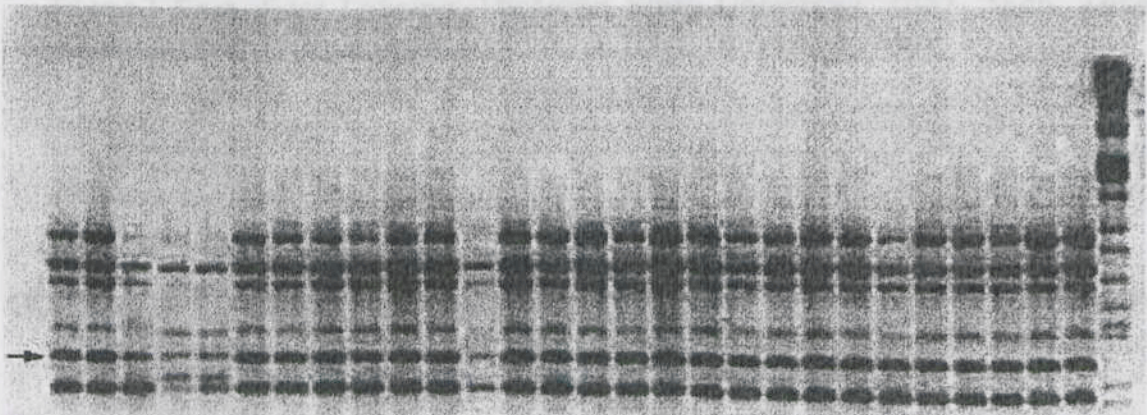


Figura 1 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o *primer* OPAA11. A última coluna corresponde ao DNA do fago lâmbda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de tamanho dos fragmentos de DNA). As colunas 1-28 referem-se aos produtos de amplificação do DNA dos isolados dos patótipos de *P. griseola* listados no Quadro 4. A seta indica uma banda de 700 pb ligada a isolados de origem mesoamericana.

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, n. 1, p. 86-88, 1979.
- APARÍCIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Colombia: Universidad Del Valle, 1998. 120p. Trabajo (Grado) – Universidad Del Valle, 1998.
- BURUCHARA, R. A. **Determination of pathogenic variation in *Isariopsis griseola* Sacc. and *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (Burk., 1926) Young, Dye and Wilkie 1978**. Nairobi: Universidade de Nairobi, 1983. 188p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Nairobi, 1983.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. – CIAT. **Annual Report of Bean Program**. Cali, Colombia: 1994. p. 31-39.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali, Colombia: 1987. 54p.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** East Lansing: Michigan State University, 1987. 154p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Michigan State University, 1987.
- GUZMÁN, P., GEPTS, P., TEMPLE, S., MKANDAWIRE, A. B. C., GILBERTSON, R. L. **Detection and Differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* Isolates with the Polymerase Chain Reaction and Group-Specific Primers**. **Plant Disease**, v. 83, n. 1, p. 37-42, 1999.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L. **Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. **Phytopathology**, v. 85, n. 5, p. 600-607, 1995.
- KADO, C. I., HESKETT, M. G. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas***. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- LACERDA, J. T., COELHO, R. S. B., MARIANO, R. L. R. **Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco**. **Grupo Paulista de Fitopatologia**, v. 20, n. 2, p. 93-96, 1994.

- NIETSCHE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- NIETSCHE, S., BOREM, A., ROCHA, R. C., CAIXETA, E. T., BARROS, E. G.S MOREIRA, M.A. Variabilidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Estado de Minas Gerais. In: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, 1999, Gramado, Rio Grande do Sul. **Resumos...** Gramado, Rio grande do Sul: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. v. 21, n. 11, p. 245.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comun en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A., SCHWARTZ, H. F. **Problemas de produccion del frijol en los trópicos**. 2. ed. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1994. p. 734.
- PASTOR-CORRALES, M., JARA, C., SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.3, p.161-171, 1998.
- PASTOR-CORRALES, M., PAULA JUNIOR, T. J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, 1996, Goiânia, Goiás. **Resumos...** Goiânia, Goiás: EMBRAPA, 1996. v.1, 350p.
- PYNDJI, M. M. Pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in the Great Lakes region. In: PAN AFRICAN BEAN PATHOLOGY WORKING GROUP MEETING, 1992, Thinka, Kenya. **Proceedings...** Thinka, Kenya: CIAT, 1993. p.7-12. (CIAT African Workshop Series, 23).
- PYNDJI, M. M. Variabilité pathogénique de *Phaeoisariopsis griseola* dans la region des Grands Lacs. In: NYABYENDA, P. SCHEIDEGGER, U. (Eds.). **Actes du sixieme Séminaire Regional sur l' Amélioration du Haricot dans la region des Grands Lacs**. Kigali, Rwanda: CIAT, 1991.76p. (African Workshop Series, 17).
- RAEDER, V., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1987.
- SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1989. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989.

SARTORATO, A., RAVA, C. A. Especialização fisiológica de *Isariopsis griseola* Sacc. em *Phaseolus vulgaris* L. **Summa Phytopathologica**, v. 10, n. 3/4, p. 58-59, 1984.

SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 43-46, 1991.

SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.5, p. 30, 1993.

SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A., SINGH, S.P. New sources of resistance to antrachnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), **Euphytica**, v.31, n.1, p. 741-754. 1982.

VILLEGAS, J. M. **Variabilidad del *Isariopsis griseola* Sacc. agente causal de la mancha angular del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Colômbia: Manizales Universidade de Caldas, 1959. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Manizales Universidade de Caldas, 1959.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELICK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 4, p. 6531-6535. 1990.

FONTES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM NO BRASIL

BEAN ANGULAR LEAF SPOT RESISTANCE SOURCES IN BRAZIL

RESUMO

Angular leaf spot, caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Datta)

A mancha-angular, cujo agente causador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, é de ocorrência generalizada em todas as regiões produtoras de feijão. As perdas na produção dependem da suscetibilidade dos cultivares, das condições ambientais, da patogenicidade do patógeno e da época em que a doença ocorre. Atualmente, essa enfermidade tem sido considerada uma das principais doenças da parte aérea do feijoeiro-comum em Minas Gerais. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resistência de genótipos de feijão aos patótipos de *Phaeoisariopsis griseola* e identificar as principais fontes de resistência ao patógeno. Estudou-se a reação de nove genótipos de feijoeiro (MAR 1, MAR 2, MAR 3, Rudá, AND 277, G 5686, BAT 332, Cornell 49-242 e Mexico 54) inoculados com 25 patótipos de *P. griseola*. As plantas com 15 dias de idade foram inoculadas e mantidas em condições de umidade relativa > 95% e temperatura entre 20 e 22°C, por 48 horas. As avaliações foram realizadas 18 dias após a inoculação. A linhagem Mexico 54 mostrou-se resistente a 20 patótipos, demonstrando ser a melhor fonte de resistência entre os genótipos testados. As linhagens AND 277, MAR 2, Cornell 49-242, G5686 e BAT 332 foram resistentes a 17, 16, 12, 13 e 10 patótipos, respectivamente. O cultivar Rudá apresentou reação de compatibilidade a 23 patótipos. Apenas o patótipo 63.63 infectou todos os genótipos de *Phaseolus vulgaris*. Esse resultado indicou a necessidade de introdução de novas fontes de resistência nos programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular.

Palavras-chave: *Phaeoisariopsis griseola*, *Phaseolus vulgaris* e patótipos.

ABSTRACT

BEAN ANGULAR LEAF SPOT RESISTANCE SOURCES IN BRAZIL

Angular leaf spot, caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, is one of the most important bean disease in Brazil. The pathogen has demonstrated to be highly variable and breeding programs dependent on the identification of new resistance genes to develop resistant cultivars. The objective of this study was to evaluate the resistance of bean genotypes to different races of *Phaeoisariopsis griseola* present in Brazil. The reaction of nine potential resistant bean sources (MAR 1, MAR 2, MAR 3, AND 277, G 5686, BAT 332, Cornell 49-242 and Mexico 54) inoculated with 25 pathotypes. The first trifoliate leaf of each plant was inoculated with a 2×10^4 spores/mL suspension. Plants were maintained at 20-22°C and 95 % relative humidity for 48 hours. The evaluations carried out 15 days after inoculation. The variety Mexico 54 presented a resistance reaction to 20 races therefore being considered the best resistance source tested. The varieties AND 277, MAR 2, Cornell 49-242, G5686 and BAT 332 were resistant to 17, 16, 12, 13 and 10 respectively races. The Rudá variety presented a reaction of susceptibility to most races. These results demonstrated the need of the introduction of resistance genes to angular leaf spot in commercial varieties.

Key words: *Phaeoisariopsis griseola*, *Phaseolus vulgaris* and pathotypes.

INTRODUÇÃO

Em décadas passadas, a mancha-angular do feijoeiro-comum, cujo agente causador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, era considerada uma doença de importância secundária, pois sua maior ocorrência era no final do ciclo da cultura. Recentemente, esse patógeno vem sendo responsável por consideráveis perdas, que chegam, em alguns casos, até 70% (Mora-Brenes et al., 1983; Rava et al., 1985). O melhoramento, visando à resistência à doença, é considerado uma das estratégias mais seguras no controle da mancha-angular (Guzmán & Gilbertson, 1995). Além disso, a utilização de cultivares com alto nível de resistência, associada a práticas culturais apropriadas, proporciona alta proteção à cultura (Sartorato et al., 1991). O estudo da variabilidade genética do patógeno e a identificação de genótipos com adequado nível de resistência são imprescindíveis em programas de melhoramento. Singh & Sharma (1975), Santos Filho et al. (1976), Singh & Saini (1980) e Sartorato et al. (1991) estudaram o comportamento de diversas variedades de feijoeiro, com o objetivo de identificar fontes de resistência à mancha-angular. Estudos recentes, realizados por Pastor-Corrales & Paula JR. (1996), utilizando a série diferenciadora desenvolvida por Pastor-Corrales & Jara (1995), demonstraram que o cultivar diferenciador G 5686 foi o que apresentou maior resistência a isolados brasileiros de *P. griseola*. Trabalhos realizados por Aparício (1998), estudando a variabilidade do patógeno de diversos estados brasileiros; e Nietzsche et al. (1998), avaliando a diversidade do patógeno no Estado de Minas Gerais, determinaram que as variedades Mexico 54, Cornell 49-242, BAT 332 e G 5686, pertencentes à série diferenciadora, são importantes fontes de resistência. Além dessas, Sartorato et al. (1993) e Nietzsche et al. (1998) relataram que as linhagens MAR 2 e AND 277, respectivamente, podem ser utilizadas em programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular. O objetivo do presente trabalho foi identificar genótipos que possam ser utilizados como fontes de resistência em programas de melhoramento no Estado de Minas Gerais e no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do inóculo

De cada tubo contendo a cultura do patógeno, obteve-se uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de 2 ml de água estéril. Foi depositado 0,8 ml dessa suspensão no centro de placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias a 24°C. O inóculo foi preparado a partir das placas, adicionando-se água destilada e raspando suavemente a superfície da placa, para remover os conídios; em seguida, procedeu-se à sua filtração em gaze. Com a suspensão obtida, ajustou-se a concentração final para 2×10^4 conídios/mL (Pastor-Corrales & Jara, 1995).

Inoculação e avaliação

Para determinação da resistência, foi plantado um total de seis plantas de cada genótipo (Quadro 1) para cada patótipo de *P. griseola*. Dezoito dias após o plantio, a primeira folha trifoliolada de cada planta foi inoculada com a suspensão de conídios nas faces abaxial e adaxial, com o auxílio de um DeVilbiss nº 15. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por um período de 48 horas, sendo, posteriormente, transferidas para casa de vegetação.

As avaliações foram efetuadas 15 dias após a inoculação, por meio de uma escala de severidade de nove graus adaptada do CIAT (1987) e descrita a seguir: 1 – plantas sem sintomas da doença; 2 – presença de até 3% de lesões; 3 – presença de até 5% de lesões não-esporuladas; 4 – presença de lesões esporuladas, que cobrem aproximadamente 10% da área foliar; 5 – presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, que cobrem aproximadamente 10-15% da área foliar; 6 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 15-20% da área foliar; 7 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 20-25% da área foliar; 8 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 25-30% da área foliar – geralmente

associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; e 9 – sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte. Plantas apresentando graus de severidade maiores que 3 foram consideradas suscetíveis.

Quadro 1 – Principais características das linhagens/cultivares de feijoeiro-comum utilizados no ensaio de resistência à mancha-angular

Linhagem/ Cultivar	Tamanho da semente ¹	Centro de origem	Grupo comercial	Brilho	Peso de 100 sementes (g)
MAR 1	M	Mesoamericano	Mulatinho	Opaco	27
MAR 2	M	Mesoamericano	Carioca	Brilhante	30
MAR 3	M	Mesoamericano	Carioca	Opaco	26
AND 277	G	Andino	Manteigão	Opaco	38
Rudá	P	Mesoamericano	Carioca	Opaco	22
México 54	M	Mesoamericano	Mulatinho	Brilhante	32
Cornell 49-242	P	Mesoamericano	Preto	Opaco	22
BAT 332	P	Mesoamericano	Mulatinho	Opaco	13
G 5686	G	Andino	Manteigão	Opaco	49

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostrados no Quadro 2 evidenciaram que as linhagens/cultivares foram resistentes a diferentes patótipos de *P. griseola* e apresentaram reação de suscetibilidade a pelo menos um dos patótipos. Até o momento, não foi caracterizado nenhum genótipo do tipo resistência completa aos patótipos de *P. griseola*. Dos nove genótipos avaliados no presente estudo, a linhagem Mexico 54 foi resistente a 20 dos 25 patótipos testados, confirmando os resultados obtidos por Aparício (1998) e Nietzsche et al. (1998). Esses autores afirmaram que a linhagem Mexico 54 caracteriza-se como a principal fonte de resistência à mancha-angular no Brasil. Com os resultados obtidos por Nietzsche (1997) e Aparício (1998) e os do presente trabalho, já foram caracterizados 53 patótipos de *P. griseola*, sendo o cultivar Mexico 54 resistente a 44 patótipos. Dos 25 patótipos testados, as linhagens BAT 332, G5686, MAR 2, AND 277 e Cornell 49-242 apresentaram reação de incompatibilidade a 10, 13, 16, 17 e 12 patótipos, respectivamente. Além da linhagem Mexico 54 de origem mesoamericana, a linhagem AND 277, de origem andina, é uma excelente opção como fonte de resistência em programas de melhoramento. Pode-se observar, no Quadro 2, que o cultivar Cornell 49-242 e a linhagem BAT 332 apresentam-se como fontes de resistência complementares e que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento para obter resistência de amplo espectro aos principais patótipos de *P. griseola*. Se considerar os genes de resistência presentes na linhagem BAT 332 e no cultivar Cornell 49-242, pode-se obter resistência a 23 patótipos. O cultivar Rudá, por sua vez, foi resistente apenas às raças 39.23 e 15.33. Esse resultado, associado aos de Nietzsche et al. (1998), indica que as variedades comerciais do tipo "carioca" se caracterizam por ser altamente suscetíveis aos patótipos de *P. griseola*.

As linhagens andinas AND 277 e G 5686 se caracterizaram como boas fontes de genes de resistência. Esses resultados confirmam os estudos efetuados por Sartorato et al. (1993) e Pastor-Corrales & Paula JR. (1996). Esses autores demonstraram que as linhagens AND 277 e G 5686 se

caracterizam como boas fontes de resistência a patótipos do grupo Mesoamericano.

Os resultados do presente trabalho incluíram patótipos de diferentes estados brasileiros. Dos 60 isolados caracterizados em 25 patótipos, 37 foram provenientes de Minas Gerais, 5 de Goiás, 4 da Paraíba, do Espírito Santo e de Santa Catarina, 2 de Alagoas e da Bahia e 1 de Mato Grosso e de Pernambuco. Os resultados indicaram que as linhagens Mexico 54, AND 277, Cornell 49242, MAR 2, G5686 e BAT 332 demonstraram ser importantes fontes de resistência não apenas no Estado de Minas Gerais, mas apresentaram o mesmo comportamento quando avaliadas com patótipos provenientes de outros estados.

Até o presente momento já foram caracterizados 196 isolados de *P. griseola* no Brasil (Pastor-Corrales & Jara, 1995; Pastor-Corrales & Paula JR, 1996; Nietsche, 1997; Aparício, 1998), sendo identificados 57 patótipos. Dos genótipos testados, observou-se que, nas condições brasileiras, as principais fontes de resistência à mancha-angular são: Mexico 54, AND 277, MAR 2, Cornell 49-242, BAT 332 e G 5686. Destas, quatro pertencem ao grupo Mesoamericano, e as linhagens AND 277 e G 5686 são do grupo Andino. Uma das variedades que vêm despertando interesse como fonte de resistência à mancha-angular é a linhagem AND 277 (Sartorato et al., 1993). Esta linhagem se caracteriza por excelente fonte de resistência; pertence ao grupo Andino e pode ser amplamente utilizada pelos pesquisadores, pois não apresenta problemas de sensibilidade ao fotoperíodo. Com o constante monitoramento, espera-se que novos patótipos de *P. griseola* venham a ser caracterizados. Dessa forma, novas fontes de resistência poderão ser incluídas nos programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular.

Quadro 2 – Reação de nove linhagens/cultivares de feijoeiro-comum a 25 patótipos de *P. griseola*

Patótipos	Fonte de Resistência									AND 277	Nº de Isolados de cada Raça
	MAR 1	MAR 2	MAR 3	BAT 332	Cornell 49-242	Méx. 54	G 5686	Rudá			
61.35	S ¹	R	S	R	S	R	S	R	S	S	1
31.21	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	1
63.23	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	9
63.39	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	8
63.63	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	2
31.23	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	1
31.30	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	1
29.7	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	1
63.19	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	2
63.21	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	1
31.53	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	1
63.31	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	10
63.7	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
31.17	-	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
63.55	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	4
31.39	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	3
15.33	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
31.55	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
39.23	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
27.45	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
11.19	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
55.39	-	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
31.31	S	-	R	S	S	R	S	R	S	R	1
29.55	-	R	R	S	S	R	S	R	S	R	1
63.47	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	6

¹ R= resistente e S= suscetível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARÍCIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Colombia: Universidad Del Valle, 1998. 120p. Trabajo (Grado) – Universidad Del Valle, 1998.
- CENTRO INTERNATIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali, Colombia: 1987. 54 p.
- MORA-BRENES, B., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p. 599, 1983.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R. L. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v.85, n.5, p. 600-607, 1995.
- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- NIETSCHKE, S., BOREM, A., CARVALHO, G.A., PAULA-JÚNIOR, T. J., BARROS, E. G.S MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n. 3, p.262, 567-571, 1998.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comun en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, n.1, p.15-22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M., PAULA JUNIOR, T. J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, 1996,Goiania, Goiás. **Resumos...** Goiania, Goiás: EMBRAPA, 1996. v.1, 350p.
- RAVA, C. A., SARTORATO, A., CARVALHO, J. R. P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, n.1, p. 5-6, 1985.
- SANTOS FILHO, H. P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.23, n. 127, p. 226-230, 1976.

SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M., BERGAMIN FILHO, A.
Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis*
griseola Sacc. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n. 1, p. 43-46, 1991.

SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S.
Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa**
Phytopathologica, v.19, n.5, p. 30, 1993.

SINGH, A. K., SAINI, S. S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*I.*
griseola Sacc.) in bean (*P. vulgaris* L.). **Euphytica**, v.29, n. 1, p. 175-176,
1980.

SINGH, B., SHARMA, V. R. Screening of bean lines for resistance to angular
leaf spot caused by *Isariopsis griseola*. **Indian Phytopathology**, v.28, n. 3,
p. 435-436, 1975.

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD E SCAR LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO-COMUM

IDENTIFICATION OF RAPD AND SCAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE GENE TO ANGLE SPOT IN COMMON BEAN

RESUMO

A mancha-angular, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, é uma das mais importantes doenças do feijoeiro-comum no Brasil. O presente trabalho teve como objetivos determinar a herança da resistência e identificar marcadores RAPD e SCAR ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum em populações segregantes no cruzamento entre os cultivares Cornell 49-242 (resistente) e Rudá (suscetível). Os genitores, as populações F_1 e F_2 e os retrocruzamentos (RC_R e RC_S) foram inoculados com o patótipo 31-17 de *P. griseola*, em condições controladas de casa de vegetação. Os resultados obtidos indicaram que a resistência do cultivar Cornell 49-242 a este patótipo é determinada por um gene dominante. Na população F_2 foram identificados dois marcadores RAPD, OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀ ligados, em fase de acoplamento, ao gene de resistência no cultivar Cornell 49-242. Na análise de co-segregação, verificou-se que esses marcadores RAPD estão ligados ao gene de resistência a uma distância de 3,2 cM e 12,5 cM, respectivamente. O marcador OPN02₈₉₀ foi transformado em um marcador do tipo SCAR.

Palavras-chave: herança da resistência, *Phaeoisariopsis griseola* e marcadores moleculares.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF RAPD AND SCAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE GENE TO ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN

Angular leaf spot, caused by *Phaeoisariopsis griseola*, is one of the most important bean diseases in Brazil. The objectives of this study were to determine the inheritance of disease resistance and to identify RAPD and SCAR markers linked to angular leaf spot resistance gene in the cross between the Middle American cultivars Cornell 49 242 (resistant) and Ruda (susceptible). The genitors, F₁, F₂ and backcross-derived plants (BC₁-R and BC₁-S) were inoculated with the patotype 31-17 of *P. griseola* under environmentally-controlled greenhouse conditions. The results indicated that a single dominant gene control disease resistance in Cornell 49-242. In the F₂ population, the RAPD OPN02₈₉₀ and OPE04₆₅₀ markers were found to be linked with the resistance gene present in the cultivar Cornell 49-242 in coupling phase, at 3,2 cM and 12,5 cM respectively. The identified RAPD marker OPN02₈₉₀ was converted into a SCAR marker.

Key words: *Phaeoisariopsis griseola*, molecular markers and resistance.

INTRODUÇÃO

A mancha-angular do feijoeiro, cujo agente causador é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., é considerada uma das principais doenças desta cultura. Dados recentes têm indicado que este patógeno se encontra distribuído em todas as regiões produtoras de feijão (Correa-Victoria et al., 1994). As perdas no rendimento devido à doença podem alcançar 70%, principalmente se o cultivo for realizado durante os períodos de temperaturas mais amenas (24°C), entre os meses de fevereiro e abril (Mora-Brenes et al., 1983; Sartorato & Rava, 1992). Dentre as estratégias de controle da doença, a utilização de cultivares com elevado grau de resistência proporciona proteção adicional, principalmente se associada às práticas de manejo integrado.

A herança da resistência da mancha-angular a esse patógeno tem sido atribuída a um ou mais genes, em alguns casos dominantes e, em outros, recessivos (Barros et al., 1957; Cardona-Alvarez, 1962; Santos Filho et al., 1976; Singh & Saini, 1980; Sartorato et al., 1993; Carvalho et al., 1997; Ferreira, 1998; Sartorato et al., 1999).

Atualmente, vários marcadores moleculares do tipo RAPD – *Random Amplified Polimorphic DNA* (Williams et al., 1990) ligados a genes que condicionam resistência a doenças têm sido identificados em diversas espécies (Carvalho, 1995; Martin et al., 1991; Michelmore et al., 1991; Alzate-Marin, 1999; Young & Kelly, 1996; Silva et al., 1998), ressaltando-se que a utilização desses marcadores vem possibilitando efetuar seleção indireta dos genótipos resistentes.

Atualmente, é possível aumentar a utilidade e a reprodutibilidade de um marcador RAPD de interesse, convertendo-o em um marcador mais específico e reprodutível, denominado SCAR – *Sequence Characterized Amplified Regions* (Paran & Michelmore, 1993).

O presente trabalho teve como objetivos estudar a herança da resistência do feijoeiro-comum ao patótipo 31.17 de *P. griseola* e identificar marcadores moleculares RAPD e SCAR ligados a genes de resistência do cultivar Cornell 49-242.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado de *Phaeoisariopsis griseola*

Foi utilizado um isolado monospórico (lg 97.2) de *P. griseola* coletado no município de Coimbra, região da Zona da Mata mineira. O isolado foi caracterizado como raça 31-17 (Nietsche, 1997), por meio de sua inoculação na série diferenciadora descrita por Pastor-Corrales & Jara (1995).

Material genético e cruzamentos

O cultivar Cornell 49-242, de origem mesoamericana, de grãos pequenos de cor preta e resistente à raça 31-17 de *P. griseola*, foi cruzado com o cultivar suscetível Rudá, de origem mesoamericana e de grãos pequenos, do tipo "carioca". Parte das plantas F_1 obtidas desse cruzamento foi retrocruzada com Cornell 49-242 (RC_R) e Rudá (RC_S). As plantas F_1 remanescentes foram autofecundadas para obtenção da população F_2 . As sementes dos genitores, F_1 , F_2 , RC_R e RC_S foram semeadas em vasos contendo 3 kg de solo. Todos os cruzamentos e plantios foram realizados em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Inoculação e avaliação das populações segregantes

Para o preparo do inóculo, um disco de meio contendo micélio do fungo foi macerado em tubo contendo água estéril. A suspensão resultante foi distribuída uniformemente em placas de Petri contendo meio V-8 (Campbell Soup Company, EUA) (Campos & Fucikovsky, 1980). As placas foram incubadas durante 14 dias, no escuro, a 22°C. O inóculo foi preparado a partir dessas placas, adicionando-se 5 ml de água destilada por placa e raspando a superfície delas com uma espátula. A concentração do inóculo foi ajustada para 2×10^4 conídios/ml. Aos 18 dias após o plantio, os genitores e os indivíduos das populações F_1 , F_2 , RC_S e RC_R foram inoculados em ambas as superfícies da primeira folha trifoliolada (estádio V3), com o auxílio de um pincel. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro por

quatro dias, com UR > 95% e temperatura entre 20 e 22°C e, em seguida, transferidas para casa de vegetação.

As avaliações foram efetuadas aos 18, 21 e 24 dias após a inoculação, usando-se uma escala de severidade de nove graus, adaptada do CIAT (1987), resumidamente descrita a seguir: 1 – plantas sem sintomas da doença; 2 – presença de até 3% de lesões; 3 – presença de até 5% de lesões não-esporuladas; 4 – presença de lesões esporuladas, que cobrem aproximadamente 10% da área foliar; 5 – presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, que cobrem aproximadamente 10-15% da área foliar; 6 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 15-20% da área foliar; 7 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 20- 25% da área foliar; 8 – presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem 25-30% da área foliar; geralmente associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; 9 – sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte. Plantas apresentando graus de severidade superiores a 4 foram consideradas suscetíveis. Para o estudo da herança, as freqüências das classes obtidas foram testadas para significância, utilizando-se o teste de χ^2 .

Extração e amplificação do DNA

Para identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência, folhas das plantas da população F₂ foram coletadas e seu DNA foi extraído, com base na metodologia proposta por Doyle & Doyle (1987). As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer 9600 (Williams et al., 1990), programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturação do DNA), 30 segundos a 35°C (pareamento do *primer* ao DNA-molde) e um minuto a 72°C (extensão dos *primers*). Cada reação de 25 μ L continha 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de MgCl₂, 100 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato, 0,4 μ M de um único *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), uma unidade de Taq-polimerase e 30 ng de DNA. Os fragmentos de DNA foram separados, por eletroforese, em géis de

agarose 1,2% em tampão TBE (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), corados com brometo de etídio (0,2 ng/mL de gel) e, posteriormente, fotografados sob luz ultravioleta, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

Construção dos bulks e análise de ligação

Para identificação de marcadores RAPD, na população F₂, do cruzamento entre Cornell 49-242 e Rudá, foi utilizada a metodologia proposta por Michelmore et al. (1991). Construíram-se dois bulks, um constituído do DNA de plantas resistentes (grau 1) e outro do DNA de plantas suscetíveis (grau 9), cada qual contendo o DNA de oito plantas. Os bulks foram testados com 220 primers. Para confirmar a ligação entre o marcador e o gene de resistência, foi utilizado o DNA de 222 plantas da população F₂. A distância foi estimada, usando-se o programa MAPMAKER III, com um lod score mínimo de 3,0, e adotando a função de mapeamento de Kosambi (Lander et al., 1987).

Amplificação e análise do DNA pela técnica de SCAR

A banda polimórfica identificada pela técnica de RAPD foi clonada no vetor pGEM – T Easy (Promega, Madison, WI, USA). Células competentes de *E. coli* JM 109 foram transformadas (Ausubel, 1998), e o DNA das colônias brancas foi seqüenciado com primers universais, M13, que flanqueiam o inserto (Sanger et al., 1977). Baseado na seqüência, dois primers SCAR específicos foram desenhados e sintetizados. A síntese dos primers foi efetuada pela GIBCO -BRL (USA). Cada primer foi constituído de 10 nucleotídios originais do primer RAPD acrescidos de 10 nucleotídios a partir da extremidade 3' do primer. O DNA genômico, obtido como anteriormente, foi amplificado com os primers SCAR via PCR (*Polymerase Chain Reaction*); essa amplificação foi de 35 ciclos, sendo cada um destes composto de 30 segundos a 94°C, um minuto a 65°C e um minuto e meio a 72°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e corados com brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM e pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema Eagle Eye II (Stratagene) de

fotodocumentação. O DNA de 222 indivíduos da população F₂ segregante e dos genitores correspondentes foi também amplificado.

Caracterização da série diferenciadora via marcadores RAPD

Foram coletadas folhas dos 12 cultivares da série diferenciadora (Quadro 1) e de cinco fontes de resistência utilizadas no programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO-UFV) (MAR 1, MAR 2, MAR 3, AND 277 e Rudá). A extração do DNA foi efetuada com base na metodologia de Doyle & Doyle (1987).

Quadro 1 – Genótipos de feijão utilizados como diferenciadores para caracterizar as raças de *Phaeoisariopsis griseola*

Genótipo Diferenciador	Tamanho da Semente ¹	Acervo Genético	Valor Binário ² Quando Suscetível
A. Don Timóteo	G	Andino	1
B. G 11796	G	Andino	2
C. Bolón Bayo	G	Andino	4
D. Montcalm	G	Andino	8
E. Amendoim	G	Andino	16
F. G 5686	G	Andino	32
G. PAN 72	P	Mesoamericano	1
H. G 2858	M	Mesoamericano	2
I. Flor de Mayo	P	Mesoamericano	4
J. México 54	M	Mesoamericano	8
K. BAT 332	P	Mesoamericano	16
L. Cornell 49-242	P	Mesoamericano	32

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

Reações de amplificação

Amostras de DNA de todas as variedades da série diferenciadora, bem como as cinco fontes de resistência, foram amplificadas com os marcadores moleculares determinados em estudos de herança da resistência à mancha-angular, dentre eles: o marcador OPH 13 (Carvalho et al., 1997), o marcador OPE 04 (Ferreira, 1998) e o marcador OPN 02 (Sartorato et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Herança da resistência

Conforme pode ser observado no Quadro 2, os valores χ^2 obtidos indicam uma segregação de três plantas resistentes para uma planta suscetível, o que evidencia que a resistência do cultivar Cornell 49-242 ao patótipo 31-17 de *P. griseola* é do tipo monogênico e dominante.

Quadro 2 – Herança e ligação genética dos marcadores moleculares e o gene de resistência (R) na população F₂, derivada do cruzamento entre os cultivares Cornell 49-242 e Rudá

Locus	Geração Analisada	Proporção Esperada na F ₂	Proporção Observada	Qui-Quadrado	Probabilidade	Distância Genética ^a
R	F ₂	3:1 ^b	169:53	0,15	70-80	-
OPN02	F ₂	3:1	155:50	0,12	90	-
OPE04	F ₂	3:1	149:58	0,48	75-90	-
R/OPN02	F ₂	9:3:3:1 ^c	153:7:3:39	125,5	< 0,0001	3,2
R/OPE04	F ₂	9:3:3:1	133:21:13:35	66,17	< 0,0001	12,5

^aDistância genética em centimorgans, ^bproporção esperada para uma herança monogênica e dominante na progênie F₂ (3 resistentes, R_ : 1 suscetível, rr) e ^cproporção esperada para a segregação de dois genes independentes na progênie F₂ (R_ / + : R_ / - : rr / + : rr / -).

Estudos conduzidos anteriormente têm demonstrado que a resistência do feijoeiro a este patógeno é atribuída a um, dois ou três genes, em alguns casos dominantes e, em outros, recessivos (Cardona-Alvarez, 1962; Santos Filho et al., 1976). Barros et al. (1957) observaram que, na maioria dos cruzamentos estudados, a resistência foi recessiva e controlada por dois ou três genes independentes; todavia, em alguns cruzamentos, foi observado que a resistência era dominante. Em outros estudos, Singh & Saini (1980) constataram que a resistência do cultivar PLB de *P. coccineus* é determinada por um par de genes recessivos. Sartorato et al. (1993), em estudos anteriores com o cultivar Cornell 49-242, observaram que, nos cruzamentos entre o cultivar resistente Cornell 49-242 e os cultivares suscetíveis Rosinha G-2 e Caraota 260, a resistência é monogênica e dominante. Carvalho et al. (1997),

Ferreira (1998) e Sartorato et al. (1999) demonstraram que a resistência à mancha-angular nas linhagens AND 277, MAR 2 e Mexico 54 (patótipos 63-23, 63-39 e 63-19, respectivamente) é controlada por um gene dominante, respectivamente.

Marcador molecular

Foi testado um total de 220 *primers* RAPD. Destes, o *primer* OPN 02 (ACCAGGGGCA) e o OPE 04 (GTGACATGCC) geraram marcadores polimórficos. O *primer* OPN 02 gerou uma banda polimórfica de aproximadamente 890 pares de bases, ligados em fase de acoplamento ao gene de resistência do cultivar Cornell 49-242 (Figura 1). Na análise de co-segregação em 222 plantas F₂, este marcador foi mapeado a 3,2 cM do gene de resistência, com um *lod score* calculado de 35,92. O marcador gerado pelo *primer* OPE 04 de 650 pb, também ligado em fase de acoplamento, foi mapeado a 12,5 cM do gene de resistência, com um *lod score* de 47,77. A partir do marcador OPN 02 foi identificado um marcador do tipo SCAR (Sartorato et al., 1999). O par de *primers* foi determinado e sintetizado com base nas seqüências flanqueando o marcador RAPD. As seqüências dos *primers* SCAR flanqueando o marcador OPN02₈₉₀ são **ACCAGGGGCATTATGAACAG** e **ACCAGGGGCAACATACTATG**, sendo o marcador correspondente amplificado designado de SCAR N02 (Figura 2). Com o uso do marcador SCAR N02 na população segregante, obteve-se uma eficiência de seleção de 98%.

Carvalho et al. (1997), verificando que a herança de resistência ao patótipo de *P. griseola* 63-23 no cruzamento Rudá/AND 277 foi monogênica e dominante, sugeriram a designação de *Phg-1* para o gene presente em AND 277. Esses autores determinaram o marcador OPH 13 ligado em fase de acoplamento a 5,5 cM do gene. Sartorato et al. (1999) determinaram que a herança de resistência a *P. griseola* ao patótipo 63-19 no cruzamento Rudá/Mexico 54 foi monogênica e dominante. Eles identificaram três marcadores RAPD ligados em fase de acoplamento a esse gene, OPN02₈₉₀, AC14₂₄₀₀ e OPE04₆₅₀, a uma distância de 5,9; 6,6; e 11,8 cM, respectivamente.

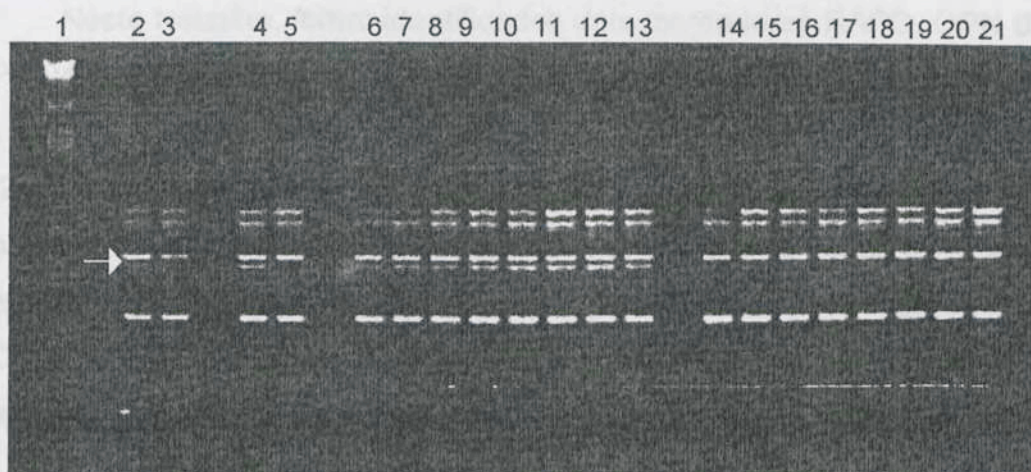


Figura 1 – Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o *primer* OPN 02 dos progenitores Cornell 49-242 (2) e Rudá (3), dos “bulks” resistente (4) e suscetível (5) e de plantas F_2 provenientes desse cruzamento, resistentes (colunas 6 a 13) e suscetíveis (colunas 14 a 21). A primeira coluna corresponde ao DNA do fago lãmbda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *Hind III* (marcadores do tamanho dos fragmentos de DNA).

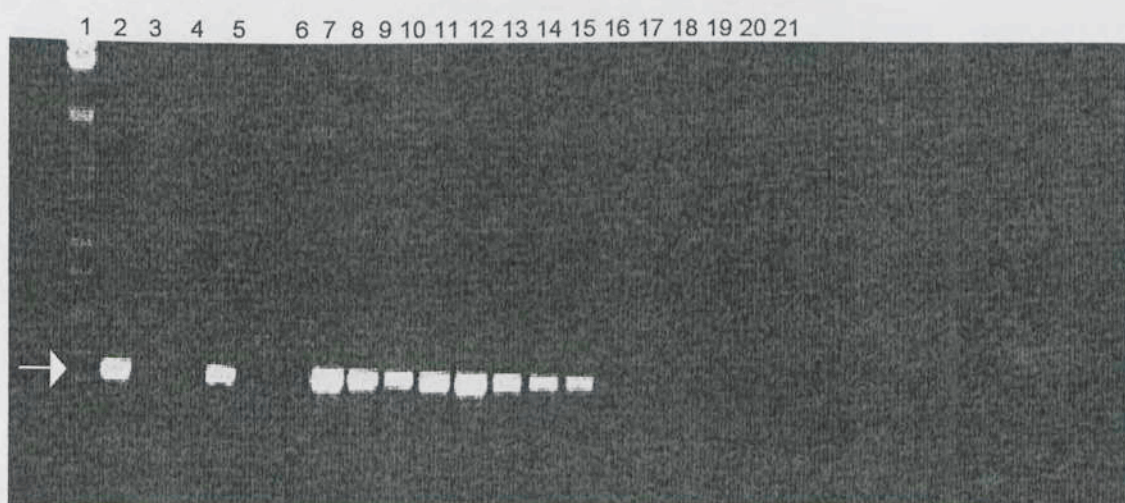


Figura 2 – Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o par de *primers* SCAR N02₈₉₀ dos genitores Cornell 49-242 (2) e Rudá (3), dos “bulks” resistente (4) e suscetível (5) e de plantas F_2 provenientes desse cruzamento, resistentes (colunas 6 a 13) e suscetíveis (colunas 14 a 21). A primeira coluna (1) corresponde ao DNA do fago lãmbda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *Hind III* (marcadores do tamanho dos fragmentos de DNA).

Neste trabalho, foram identificados dois marcadores RAPD, OPN 02₈₉₀ e OPE 04₆₅₀, ligados em fase de acoplamento a 3,2 e 12,5 cM, respectivamente, ao gene que confere resistência ao patótipo 31-17, presente em Cornell 49-242. Considerando que os cultivares Mexico 54 e Cornell 49-242 são resistentes aos patótipos 63-19 e 31-17 e uma vez que os genes de resistência presentes nesses cultivares são marcados pelos mesmos marcadores OPN 02 e OPE 04, relatou-se que Mexico 54 e Cornell 49-242 possuem o mesmo *locus* que determina resistência a *P. griseola*.

O marcador OPE 04₆₅₀, mapeado a 12,5 cM no cultivar Cornell 49-242 e a 11,8 cM na linhagem Mexico 54, também está mapeado a 5,8 cM no cultivar MAR 2 (Ferreira, 1998). É possível que o mesmo *locus* de resistência esteja presente nessas três importantes fontes de resistência à mancha-angular. Se esse for o caso, tais resultados devem ser cuidadosamente analisados e levados em consideração em programas de melhoramento visando à resistência à mancha-angular do feijoeiro. Somente através de testes de alélismo entre esses cultivares é que será possível designar a presença de um bloco de genes ou formas alélicas.

Análise dos marcadores RAPD

Os marcadores RAPD, OPH 13, OPE 04 e OPN 02 (Figuras 3 a 5), identificados em estudos de herança da resistência nos cruzamentos Rudá x AND 277, Rudá x MAR 2, Rudá x Mexico 54 e Rudá x Cornell 49-242 (Carvalho et al., 1997; Ferreira, 1998; Sartorato et al., 1999), foram testados no DNA do conjunto de 12 cultivares diferenciadores, bem como em cinco fontes de resistência utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijão do BIOAGRO – UFV.

Na Figura 3 está representado um padrão de amplificação com o marcador OPE 04₆₅₀. Este marcador foi identificado por Ferreira (1998) em estudo de herança da resistência entre os cultivares MAR 2 e Rudá. Utilizando o marcador OPE 04₆₅₀ no DNA dos 17 cultivares, verificou-se que a banda de 650 pb estava presente também nas variedades Mexico 54, Cornell 49-242, MAR 1, G 2858 e Flor de Mayo. Como apenas as variedades Mexico 54, Cornell 49-242 e MAR 2 apresentaram resistência ao patótipo utilizado no

estudo de herança, tais resultados indicaram a potencial existência de alelos entre esses cultivares. Esse *primer*, ao ser testado no cruzamento entre Rudá e Cornell 49-242, demonstrou estar ligado ao gene de resistência de Cornell 49-242 a uma distância de 12,5 cm. A mesma seqüência do marcador e a sua ligação ao gene de resistência podem indicar alelismo entre genes das variedades MAR 2 e Cornell 49-242.

Na Figura 4, observa-se o padrão de amplificação com o marcador OPN 02₈₉₀. Este indicador foi identificado como ligado a 5,9 e 3,2 cM dos genes de resistência dos cultivares Mexico 54 e Cornell 49-242. Ao ser testado o marcador OPN 02₈₉₀ nos 17 genótipos, observou-se que 11 apresentavam o marcador. No entanto, apenas os genótipos Mexico 54, Cornell 49-242, MAR 1, MAR 2, MAR 3, G 5686 e AND 277 exibiram resistência aos patótipos utilizados nos estudos de herança. Os marcadores OPE 04₆₅₀ e OPN 02₈₉₀ identificaram os genes de resistência nas três variedades (Mexico 54, MAR 2 e Cornell 49-242), e, de acordo com as distâncias genéticas, pode-se considerar esse resultado como potencial alelismo entre as três variedades. Tal hipótese só poderá ser comprovada através de estudos de alelismo entre as três linhagens.

Na Figura 5, amplificada com o *primer* OPH 13 (Carvalho et al., 1997), observa-se que somente a variedade AND 277 apresenta marcador, o que vem confirmar os dados obtidos na caracterização de fontes de resistência. A linhagem AND 277, além de se comportar como excelente fonte de resistência, apenas ela, dentre todos os outros genótipos andinos, apresenta o polimorfismo gerado pelo *primer* OPH 13. A variedade AND 277 não exibe sensibilidade ao fotoperíodo e se caracteriza como excelente fonte de resistência, apresentando-se como potencial cultivar diferenciado.

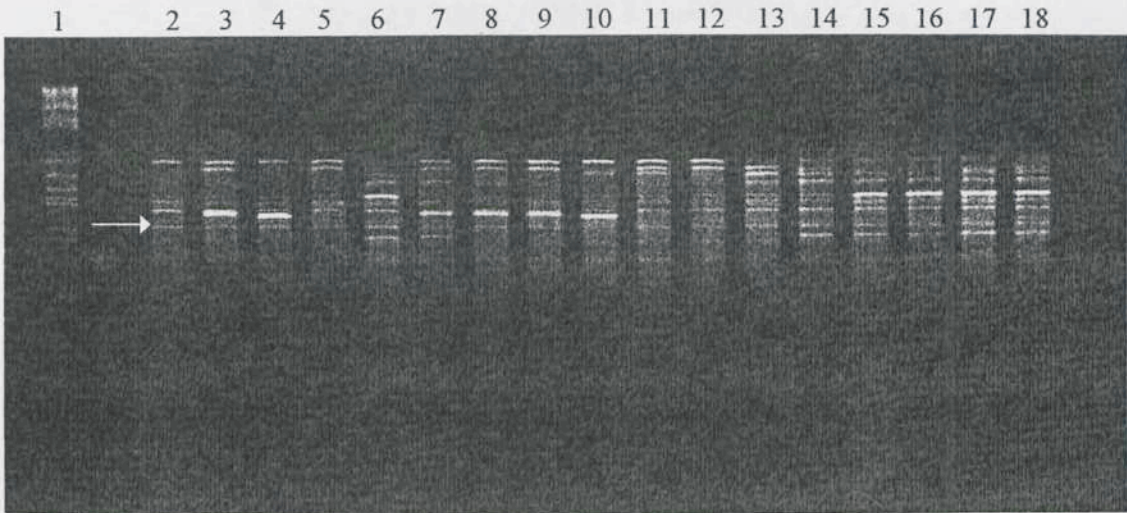


Figura 3 – Reação de amplificação com o *primer* OPE 04 nas variedades diferenciadoras e nas fontes de resistência (1 – marcador de peso molecular; 2 – Rudá; 3 – MAR 1; 4 – MAR 2; 5 – MAR 3; 6 – AND 277; 7 – Mexico 54; 8 – Cornell 49-242; 9 – G 2858; 10 – Flor de Mayo; 11 – Bat 332; 12 – Pan 72; 13 – G 11796; 14 – Bolon Bayo; 15 – Amendoim; 16 – Montcalm; 17 – Don Timóteo; e 18 – G 5686). A seta indica o polimorfismo.

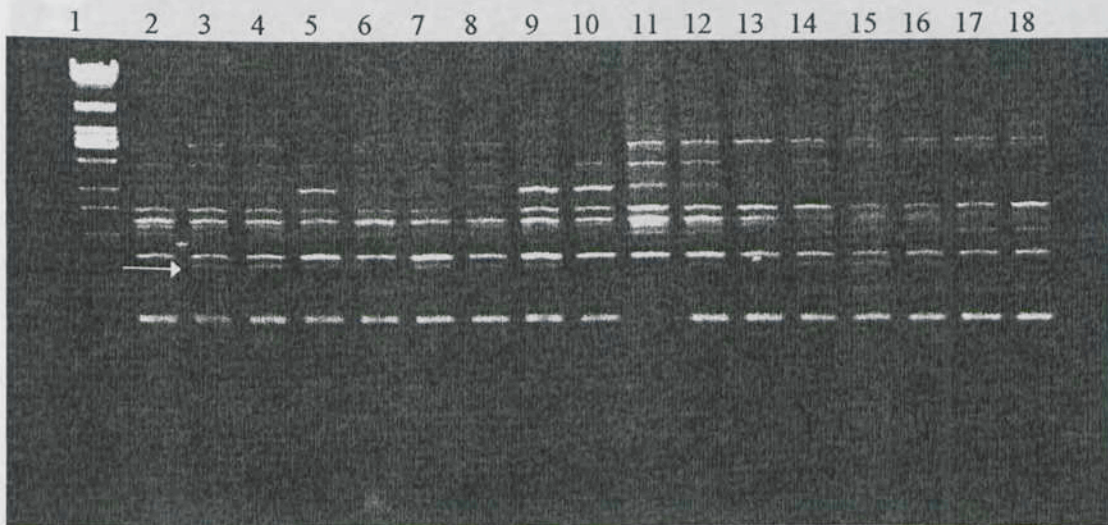


Figura 2 – Reação de amplificação com o *primer* OPN 02 nas variedades diferenciadoras e nas fontes de resistência (1 – marcador de peso molecular; 2 – Rudá; 3 – MAR 1; 4 – MAR 2; 5 – MAR 3; 6 – AND 277; 7 – Mexico 54; 8 – Cornell 49-242; 9 – G 2858; 10 – Flor de Mayo; 11 – Bat 332; 12 – Pan 72; 13 – G 11796; 14 – Bolon Bayo; 15 – Amendoim; 16 – Montcalm; 17 – Don Timóteo; e 18 – G 5686). A seta indica o polimorfismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., MENAQUIA, M., CARVALHO, G. A., PADLA JUNIOR, 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 beans. *Phytopathology*, v. 89, n. 1, p. 281-285, 1999.
- AUSUBEL, F. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1998. 161p.
- BARROS, O., CARDENOSA, R., ENLER, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. *Phytopathology*, v. 47, n. 2, p. 3, 1957.
- CAMPOS, J.A., FUCINOMBIKY, L.Z. Estudio de algunas características de *Ascochyta blight* Sacc., agente causal de la mancha angular del frijol. *Agronomía*, v.30, n. 1, p. 41-48, 1980.
- CARDONA-ALVAREZ, C. Herencia de la resistencia a la mancha angular en frijol. *Agronomía Tropical*, v.38, n.3, p. 330-331, 1982.
- CARVALHO, G. A. Marcadores RAPD ligados a genes de resistência ao

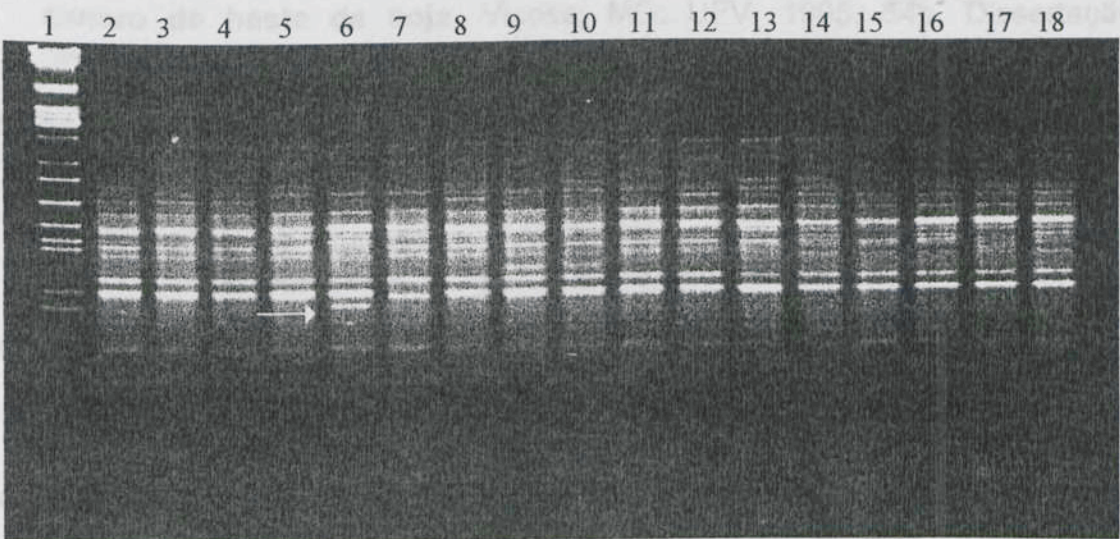


Figura 4 – Reação de amplificação com o *primer* OPH 13 nas variedades diferenciadoras e nas fontes de resistência (linha 1 marcadora de peso molecular; 2 – Rudá; 3 – MAR 1; 4 – MAR 2; 5 – MAR 3; 6 – AND 277; 7 – Mexico 54; 8 – Cornell 49-242; 9 – G 2858; 10 – Flor de Mayo; 11 – Bat 332; 12 – Pan 72; 13 – G11796; 14 – Bolon Bayo; 15 – Amendoim; 16 – Montcalm; 17 – Don Timóteo; e 18 – G 5686). A seta indica o polimorfismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G. A., PAULA JÚNIOR., 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 beans. **Phytopathology**, v. 89, n. 1, p. 281- 285, 1999.
- AUSUBEL, F. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1998.161p.
- BARROS, O., CARDEÑOSA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v. 47, n. 2, p. 3, 1957.
- CAMPOS, J.A., FUCIKOVSKY, L.Z. Estudio de algunas características de *Isariopsis griseola* Sacc., agente causal de la mancha angular del frijol. **Agrociencia**, v.39, n. 1, p. 41-48, 1980.
- CARDONA-ALVAREZ, C. Herencia de la resistencia a la mancha angular en frijol. **Agronomía Tropical**, v.18, n.3, p. 330-331, 1962.
- CARVALHO, G. A. **Marcadores RAPD ligados a genes de resistência ao cancro da haste da soja**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR., T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCH, 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. 2, p. 482-485,1997.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- CORREA-VICTORIA, F.J., PASTOR-CORRALES, M.A., SAETTLER, A.W. Mancha angular de la hoja. In: PASTOR-CORRALES, M.A. SCHWARTZ, H.F. (Eds.). **Problemas de producción del frijol en los trópicos**. 2. ed. Cali, Colômbia: CIAT, 1994. p.67-86.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 5, p. 13-15, 1987.

- FERREIRA, C.F. **Herança da resistência do feijoeiro à mancha-angular e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 38p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- LANDER, E. S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BAARLOW, A., DALY, M. J., LINCOLN, S. E., NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, n. 2, p. 174-181, 1987.
- MARTIN, G. B., WILLIAMS, J. G. K., TANKSLEY, S. D. Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines populations. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 8, n. 10, p. 2336-2340, 1991.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, J., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 88, n. 6, p. 9828-9832, 1991.
- MORA-BRENES, B., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 599, 1983.
- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris*.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PARAN, I., MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR – based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, n. 1, p. 151-156, 1993.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.A. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. **Fitopatología Colombiana**, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 4, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS FILHO, H.P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v. 23, n. 127, p. 226-230, 1976.

- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, n. 6, p. 21-22, 1999.
- SARTORATO, A., RAVA, C.A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 8, p. 247-251, 1992.
- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 5, p. 30, 1993.
- SILVA, M. A., SHUSTER, I., GUIMARÃES, C. T. , BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Avaliação de marcador do tipo SCAR obtido de DNA genômico de soja. **Genetics and Molecular Biology** , v. 21, n. 10, p. 230, 1998.
- SINGH, A.K., SAINI, S.S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 29, n. 1, p. 175-176, 1980.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELICK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 4, p. 6531-6535, 1990.
- YOUNG, R., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v. 80, n. 2, p. 650-654, 1996.

Gerais e no Brasil. A linhagem Muroto 54 apresentou reação de resistência a 26 patótipos, demonstrando ser a melhor fonte de resistência testada. Os genótipos AND 2/7, MAR 2, Cornell 49242, G 5085 e Bat 332 exibiram reação de incompatibilidade a 17, 16, 12, 13 e 10 patótipos, respectivamente. Já o cultivar Rudá foi suscetível a quase todos os patótipos testados.

Os resultados obtidos no estudo de herança entre o cruzamento Cornell 49-242 x Rudá indicaram a presença de um gene dominante controlando a resistência no cultivar Cornell 49-242. Foram identificados dois marcadores RAPD (OPN02₉₀ e OPE04₉₀) ligados ao gene de resistência, em fase de acoplamento, no gene de resistência a uma distância de 12,5 cM, respectivamente. O marcador OPN02₉₀ foi transformado em um marcador do tipo SCAR.

RESUMO E CONCLUSÕES

As avaliações efetuadas acerca da série diferenciadora indicaram que as variedades G 11799 e Bojon Bayo não são eficientes no diferenciamento de patótipos.

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética em *Phaeoisariopsis griseola*, agente causador da mancha-angular do feijoeiro no Estado de Minas Gerais e no Brasil, estudou-se a variabilidade de 72 isolados do patógeno proveniente de diversas regiões mineiras e de diferentes estados brasileiros, utilizando uma série de cultivares diferenciadores e marcadores RAPD. Para determinar a herança da resistência e identificar marcadores RAPD e SCAR ligados ao gene de resistência à mancha-angular, foi utilizado o cruzamento entre Rudá e Cornell 49-242.

No presente trabalho foram identificados 26 patótipos, demonstrando a grande variabilidade do fungo nas regiões amostradas. A raça 63.63 infectou todos os cultivares da série diferenciadora, e as raças 63.31, 63.23, 63.39, 63.47 e 63.55 agruparam o maior número de isolados. Os resultados obtidos com o primer OPAA 11 evidenciaram a presença do grupo Mesoamericano no Estado de Minas Gerais e no Brasil, e o uso dos marcadores RAPD não se mostrou um método eficaz na caracterização de patótipos de *P. griseola*. Os resultados obtidos com o marcador OPAA 11 e o fenótipo de virulência demonstrado pelos patótipos comprovaram a predominância do grupo de evolução Mesoamericano no Estado de Minas Gerais e no Brasil.

Utilizaram-se os 25 patótipos identificados nos estudos de variabilidade, com o objetivo de identificar fontes de resistência à mancha-angular em Minas

Gerais e no Brasil. A linhagem Mexico 54 apresentou reação de resistência a 20 patótipos, demonstrando ser a melhor fonte de resistência testada. Os genótipos AND 277, MAR 2, Cornell 49242, G 5686 e Bat 332 exibiram reação de incompatibilidade a 17, 16, 12, 13 e 10 patótipos, respectivamente. Já o cultivar Rudá foi suscetível a quase todos os patótipos testados.

Os resultados obtidos no estudo de herança entre o cruzamento Cornell 49-242 x Rudá indicaram a presença de um gene dominante controlando a resistência no cultivar Cornell 49-242. Foram identificados dois marcadores RAPD (OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀) ligados, em fase de acoplamento, ao gene de resistência a uma distância de 3,2 cM e 12,5 cM, respectivamente. O marcador OPN02₈₉₀ foi transformado em um marcador do tipo SCAR.

As avaliações efetuadas acerca da série diferenciadora indicaram que as variedades G 11796 e Bolon Bayo não são eficientes na diferenciação de patótipos de *P. griseola* e que a linhagem AND 277 poderia ser uma alternativa na substituição de uma dessas variedades. Os marcadores RAPD testados nos 17 genótipos evidenciaram a possibilidade de haver uma série alélica entre os genótipos MAR 2, Mexico 54 e Cornell 49-242, mas somente testes de alelismo poderão comprovar essa hipótese.