

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN

PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR EM
FEIJÃO DO TIPO CARIOCA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

T

R141p
2004

Ragagnin, Vilmar Antonio, 1971-

Piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular em feijão do tipo carioca / Vilmar Antonio Ragagnin. – Viçosa : UFV, 2004.
xi, 79f. : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão - Resistência à doenças e pragas. 3. Feijão - Genética molecular. 4. Feijão - Marcadores moleculares. 5. Feijão - Resistência à *Uromyces appendiculatus*. 6. Feijão - Resistência à *Colletotrichum lindemuthianum*. 7. Feijão - Resistência à *Phaeoisariopsis griseola*. 8. Feijão - Seleção. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 635.6523

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN

PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR EM
FEIJÃO DO TIPO CARIOCA

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

APROVADA: 03 de agosto de 2004.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin
(Conselheira)

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Aos meus pais Aldemiro e Dinorá.

Aos meus irmãos pelo constante apoio

Aos meus colegas e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, e por ter concedido vitória em mais esta importante etapa da minha vida profissional.

Aos meus pais Aldemiro Agnelo Ragagnin e Dinorá Ceolin Ragagnin, pelo apoio, incentivo, dedicação e amor aos filhos.

Aos meus estimados irmãos Dirceu, Eneli, Sueli, Clarice, Darci, Deloci, Luís, Rosane e Osmar, pelo apoio e compreensão durante a minha ausência.

Ao povo brasileiro pela manutenção da escola pública e gratuita.

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

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela competente orientação, pela confiança e amizade, pelo apoio e incentivo desde o período de Iniciação Científica e por sua colaboração em todas as etapas dessa minha formação acadêmica e profissional.

Ao professor Conselheiro Maurílio Alves Moreira, pelas sugestões, pelo zelo incansável com as condições de pesquisa, pelo exemplo de dedicação à UFV e pela eficiência no planejamento e na sugestão da pesquisa científica.

À Dra. Ana Lilia Alzate-Marin, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela atenção dispensada e pelas valiosas sugestões.

Aos amigos do laboratório: Thiago, Demerson, Wagner, Klever, Márcia Costa, Márcia Flores, Maria Fernanda, Rita, Newton, Francisco, Pedro Ivo, Carlos, Lílian, Simone, Francisco, Taís, Lucinete, Cassiana, Fábio, Marcos, João Paulo, Reginaldo pelo

companheirismo, amizade e ajuda nas técnicas de Biologia Molecular, pelos conselhos durante a execução deste trabalho e pela colaboração na compreensão dos resultados.

Aos amigos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, Thiago, Demerson, Márcia, Vagner, Carlos, Klever que muito contribuíram, sem medir esforços, para realização deste trabalho e pela amizade.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do Programa de Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Sr. José Pinto Rosa, pelo apoio constante nas atividades na casa de vegetação.

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

BIOGRAFIA

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN, filho de Aldemiro Agnelo Ragagnin e Dinorá Ceolin Ragagnin, nasceu em Vicente Dutra, RS, em 09 de fevereiro de 1971.

Cursou da 1^a à 5^a séries na Escola Municipal Aluísio Braun, Ferminhão, 6^a e 7^a séries na Escola Estadual de Primeiro Grau Eng^o Álvaro Leitão, Laranjeiras, Município de Vicente Dutra, RS.

Cursou a 8^a série na Escola Estadual Polivalente Dante Mosconi, em Jataí, GO.

Cursou o segundo grau científico na Escola Paroquial Santa Helena, em Santa Helena de Goiás, GO.

Em 1994, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, colando grau em março de 1999 como Engenheiro-Agrônomo.

Em 1999, iniciou o curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento, na UFV, defendendo tese em janeiro de 2001.

Em 2001, iniciou o curso de Doutorado, no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de Genética Molecular, na UFV, defendendo tese em agosto de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Doenças do feijoeiro	4
2.2. Fontes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular	6
2.3. O melhoramento do feijoeiro no Brasil	9
2.4. Uso de marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro	11
2.5. Piramidação de genes de resistência no feijoeiro	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1	27
OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE FEJJOEIRO RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Material genético e cruzamentos	29
2.2. Patótipos utilizados na inoculação	33
2.3. Inoculação e avaliação da doença	33
2.4. Seleção por meio de marcadores moleculares	35
2.5. Análise de <i>Fingerprinting</i>	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

3.1. Obtenção de linhagens 'Rudá R'	38
3.2. Obtenção de linhagens na população Pérola x 'Rudá R'	42
4. RESUMO E CONCLUSÕES	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 2	48
AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LINHAGENS RESISENTES, EM CONDIÇÕES DE CAMPO	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Local de condução do experimento	50
2.2. Material genético	50
2.3. Delineamento e condução do experimento	50
2.4. Características avaliação e análise dos dados	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1. Avaliação das populações	53
4. RESUMO E CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO 3	61
REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO A DIFERENTES PATÓTIPOS DE <i>Uromyces appendiculatus</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Phaeoisariopsis</i> <i>griseola</i>	61
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1. Material genético e delineamento experimental	63
2.2. Patótipos utilizados, preparo do inóculo, inoculação e avaliação	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Análise da reação a <i>U. appendiculatus</i> , <i>C. lindemuthianum</i> e <i>P. griseola</i>	67
4. RESUMO E CONCLUSÕES	73
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CONCLUSÕES GERAIS	79

RESUMO

RAGAGNIN, Vilmar Antonio, D. S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2004.

Piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular em feijão do tipo carioca. Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Ana Lilia Alzate-Marin.

Visando piramidar genes de resistência à ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*) em cultivar de feijão do tipo carioca, foram intercruzadas quatro isolinhas de feijoeiro-comum. As isolinhas foram obtidas por meio de retrocruzamento nos quais foi utilizado o cv. Rudá como genitor recorrente. As isolinhas continham os seguintes genes de resistência: linha ON-48-99 – genes *Co-10* e *Ur-ON* provenientes do cultivar Ouro Negro, linha AB-74-1-18 – gene *Co-6* proveniente do cultivar AB-136, linha TO-41-5-6-24 – gene *Co-4* proveniente do cultivar TO e linha AND-7-2-9-7-10 – gene *Phg-1* proveniente do cultivar AND 277. Após seleção para homozigose e avaliação das características altura de plantas, número de dias para floração, número de dias para maturação, produtividade de grãos, peso de 100 sementes, número de sementes por vagens, número de vagens por plantas, e da reação de resistência aos patótipos de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, as isolinhas foram intercruzadas duas a duas. Em seguida, as plantas F₁ foram intercruzadas para obter os híbridos duplos. Os marcadores moleculares SCAR-F10_{1150a}, SCAR-BA8_{560a}, OPX11_{550a}, OPY20_{830a}, OPB03_{1800r}, OPAZ20_{940a} e OPH13_{490a} associados aos respectivos genes de resistência *Ur-ON*, *Co-10*, *Co-6*, *Co-4* e *Phg-1* proveniente foram utilizados para identificar as plantas contendo todos os genes de interesse as quais foram autofecundadas para obtenção de sementes F₂. As sementes F₂ foram semeada em casa de vegetação, e as plantas F₂ foram genotipadas utilizando-se de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência. A resistência das plantas foi também confirmada por inoculação dos patógenos. Na geração F₃ foi feita nova avaliação com os marcadores moleculares, selecionando-se apenas as plantas que apresentavam todas as marcas. Este procedimento foi também utilizado na geração F₄. No final deste processo foi obtida uma população constituída de 40 famílias F₄

denominadas genericamente por 'Rudá R'. Paralelamente, foi feito o cruzamento de 'Rudá R' com o cv. Pérola, obtendo-se 30 famílias F₄. Sementes das famílias F_{4:5} foram multiplicadas para realização de experimento a campo. As famílias F_{4:6} foram testadas quanto ao seu desempenho agrônômico em ensaio em condição de campo e foram selecionadas 4 e 3 linhagens F_{4:7} de cada população, respectivamente. Estas famílias foram avaliadas quanto à resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. As inoculações feitas em famílias F_{4:7} mostraram que as famílias R-127-10-14, R-97-13-5, R-97-13-6, R-127-4-13, P-33-5-1, P-49-8-2 e P-49-2-2 se comportaram como resistentes a todos os patótipos de *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*, e a cinco dos sete patótipos de *P. griseola* inoculados. As melhores famílias serão avaliadas em uma rede de ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU) para uma possível recomendação de um novo cultivar de feijão tipo carioca. A seleção de linhagens de feijão com grãos do tipo carioca, resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular confirmam o grande potencial e a importância do uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de piramidação de genes de resistência.

ABSTRACT

RAGAGNIN, Vilmar Antonio, D. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2004.
Pyramiding of resistance genes to rust, anthracnose and angular leaf spot in a “carioca-type” common bean. Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Advisory Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Ana Lilia Alzate-Marin.

The objective of this work was to pyramid resistance genes to rust (*Uromyces appendiculatus*), anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) and angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in the “carioca-type” common bean cultivar Rudá. Four isolines were obtained in four backcross programs and intercrossed. The isolines contained the following resistance genes: isoline ON-48-99 - genes *Co-10* and *Ur-ON* from cultivar Ouro Negro (ON), isoline AB-74-1-18 - gene *Co-6* from cultivar AB 136, isoline TO-41-5-6-24 - gene *Co-4* from cultivar TO and isoline AND-7-2-9-7-10 - gene *Phg-1* from cultivar AND 277. After selection for homozygosis and evaluation of different quantitative, morphologic, and molecular characteristics, and for resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot, the isolines were intercrossed. The F₁ plants were intercrossed to obtain the double hybrid. The molecular markers SCAR-F10_{1150a}, SCAR-BA8_{560a}, OPY20_{830a}, OPAZ20_{940a}, OPH13_{490a}, OPX11_{550a} and OPB03_{1800r} associated to the resistance genes were used to identify the plants containing all the genes of interest which were selfed to obtain the F₂ seeds. The F₂ seeds were sown, and the corresponding plants were selected with molecular markers linked to the resistance genes and resistance was confirmed by inoculation of the pathogens. The selection based on molecular markers was repeated in the F₃ and F₄ generations, only plants containing all the markers were selected. At the end of this process a population of 40 families was obtained and designated ‘Rudá R’. In a parallel procedure, ‘Rudá R’ were crossed with cv. Pérola. Thirty F₄ families (‘Rudá R’ x Pérola) were obtained. Seeds of the F_{4.5} families were multiplied and used for agronomic evaluation in preliminary field tests. Four and three lines were selected from populations ‘Rudá R’ and ‘Rudá R’ x Pérola, respectively. These lines were tested against different pathotypes of *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* and *P. griseola*. The inoculations done in F_{4.7} lines showed that the lines R-127-10-14, R-97-13-5, R-97-13-6, R-127-4-13, P-33-5-1, P-49-8-2 and P-49-2-2 were resistant to all pathotypes of *U. appendiculatus* and *C. lindemuthianum*, and to five of the seven pathotypes of *P. griseola* tested. The lines are

still being analyzed for quantitative characteristics in field trials. The best lines will be tested in an official trial to be released as new varieties of “carioca-type” bean. The selection of bean lines with "carioca-type” grains, resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot confirm the power and importance of the use of marker assisted selection in breeding programs aiming to pyramid disease resistance genes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento fundamental para a população brasileira, constituindo fonte básica de proteína na dieta de milhões de pessoas de diferentes classes sociais. O hábito de consumo de feijão pelas famílias brasileiras, associadas à ampla adaptação climática dessa cultura, faz com que o feijão esteja distribuído por todo o território nacional. O Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor mundial de feijão. Na safra de 2003, a produção brasileira foi de aproximadamente três milhões de toneladas (IBGE, 2004). A produtividade média da cultura no país está estacionada ao redor de 700 kg/ha, mesmo considerando que, no Brasil, a cultura do feijão tem potencial para produzir acima de 4.000 kg/ha (IBGE, 2004).

Um dos importantes fatores que limitam a produtividade do feijoeiro e o desempenho da cultura como um todo, são as enfermidades. VIEIRA (1983) citou mais de 30 doenças que podem atingir o feijoeiro, das quais cerca de oito são de maior importância. As demais, em geral de menor importância, podem no entanto, ocasionar danos severos em condições específicas. Entre as doenças consideradas de maior importância, no território nacional, merecem destaque: a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*; a antracnose, por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib.; e a mancha-angular, por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), sendo todas de origem fúngica. Essas enfermidades são especialmente problemáticas, porque os fungos, agentes causais, apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas ou patótipos”.

A existência de patótipos dificulta o trabalho de desenvolvimento de cultivares resistentes. A concentração de genes de resistência num único cultivar comercial (piramidação de genes) é uma alternativa para solucionar esse problema.

O controle químico das doenças, principalmente em culturas não-irrigadas, é pouco utilizado pelos agricultores, porque aumenta o custo de produção e demanda conhecimento tecnológico adequado. Além disso, os produtos químicos contaminam o ambiente e prejudicam a saúde do homem. Assim, o uso de cultivares resistentes no

controle de doenças tem recebido atenção de pesquisas por ser uma estratégia eficiente, segura, barata e acessível a produtores de qualquer nível econômico.

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem concentrado esforços na piramidação de genes de resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular, com o auxílio de marcadores moleculares. Ao longo desse processo, várias linhagens de feijoeiro têm sido desenvolvidas, principalmente no *background* genético Rudá. Nesse processo, torna-se importante a caracterização da resistência das linhagens produzidas, para facilitar e monitorar a piramidação dos genes de resistência. Além disso, ensaios preliminares de linhagens são conduzidos para selecionar linhagens a serem incluídas em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), em rede nacional, para complementação dos dados de produtividade, resistência e demais características agronômicas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi piramidar genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular no cultivar de feijão carioca Rudá.

Os objetivos específicos foram:

- Após os inter cruzamentos, identificar em cada geração por meio de inoculação marcadores moleculares, as plantas portadoras dos genes de resistência aos patógenos de ferrugem, antracnose e mancha-angular.
- Avaliar, em condição de campo, o comportamento das linhagens obtendo os genes de resistência já piramidados.
- Caracterizar as linhagens obtidas quanto à resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças do feijoeiro

A produção de feijão no Brasil é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Dentro dos fatores bióticos se destacam as enfermidades como causa expressiva da redução da produtividade (VIEIRA, 1983). Bactérias, fungos, nematóides e vírus são causadores de doenças no feijoeiro. Segundo VIEIRA (1983) as enfermidades mais importantes que ocorrem no Brasil são: mancha-angular, ferrugem, antracnose, mofo-branco, mosaico-dourado e crestamento-bacteriano-comum. Mesmo podendo ser controladas por defensivos agrícolas, as doenças de parte aérea, como mancha-angular, ferrugem e antracnose, são muito problemáticas durante o ciclo da cultura devido às graves perdas que podem provocar, reduzindo a produtividade.

A ferrugem do feijoeiro é causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*. A infecção, nas folhas, forma inicialmente, manchas esbranquiçadas, as quais, sob condições favoráveis, aparecem, na face inferior das folhas, oito dias após a infecção. As pústulas vão aumentando de tamanho gradualmente, rompendo a epiderme quando as frutificações do fungo amadurecem (10 a 12 dias após a inoculação), expondo os uredósporos, fazendo com que as pústulas adquiram uma coloração marrom-avermelhada (cor de ferrugem) em ambas as superfícies foliares (VIEIRA, 1983).

Os uredosporos desprendem-se facilmente das pústulas e são disseminados, a curta distância, por implementos agrícolas, insetos e outros animais, sendo o vento o principal agente de disseminação. No Brasil, onde o feijão é plantado durante todo o ano, os uredosporos transportados pelo vento constituem a principal fonte de inóculo inicial, propiciando a sobrevivência contínua do patógeno em hospedeiros suscetíveis (KIMATI, 1980; VARGAS, 1980). Esse fungo pode apresentar diversas gerações durante o ciclo do hospedeiro, caracterizando a ferrugem, sob o enfoque epidemiológico, como uma doença policíclica ou de ciclo secundário (BERGAMIM FILHO, 1978).

A infecção pelos uredosporos é favorecida por temperaturas moderadas, entre 17 e 27°C, associadas a períodos de alta umidade relativa (AUGUSTIN et al., 1972). Esse

fungo é um parasita obrigatório, podendo ser disseminado por chuvas, ventos, resíduos culturais, animais, insetos e o próprio homem. *U. appendiculatus* é reconhecido como um dos patógenos de maior variabilidade patogênica o que dificulta o trabalho de melhoramento visando resistência (STAVELY, 1984a; MORA-NUÑES *et al.*, 1992; FALEIRO, 1997).

A antracnose é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn). Alta umidade relativa do ar e temperaturas entre 13 e 26°C favorecem a ocorrência dessa enfermidade. Entre os fatores que contribuem para disseminação do patógeno, encontram-se as chuvas moderadas acompanhadas de ventos e, na disseminação a curta distância, o salpico de chuva sobre os resíduos de colheita (PASTOR-CORRALES, 1985). A disseminação a longas distâncias realiza-se, principalmente, por meio de sementes, aparecendo os primeiros sintomas como lesões necróticas nas folhas cotiledonares ou nos cotilédones (SINGH, 1991; PASTOR-CORRALES, 1985). Outras formas de disseminação são os insetos e o próprio homem, neste caso, normalmente a infecção pode ocorrer na haste da folha, e, em casos severos, a folha se dobra no sítio da lesão (PASTOR-CORRALES, 1985). As lesões foliares ocorrem, inicialmente, na parte inferior das folhas e nas extensões das nervuras principais, na forma de manchas angulares pequenas de cor vermelho-alaranjada a purpúrea, tornando-se, posteriormente, de cor escura. Nas vagens, as lesões apresentam-se como cancos deprimidos, de formas arredondadas, com margens ligeiramente proeminentes, delimitadas por um anel preto com borda laranja-avermelhada (PASTOR-CORRALES e TU, 1989). As perdas causadas por *C. lindemuthianum* podem ser de até 100% quando são empregadas sementes contaminadas em regiões onde prevaleçam condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (DEL PELOSO, 1992).

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), era considerada de pequena importância até meados da década passada, uma vez que aparecia no final do ciclo da cultura. Entretanto, hoje é considerada de grande importância, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou “safrinha” nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (SARTORATO, 2001), podendo causar redução de até 70% na produção (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). Esta doença causa sérios prejuízos, especialmente de abril a julho, quando são observadas baixas temperaturas e ocorrências de orvalho (PAULA

JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). A mancha-angular afeta o caule, as folhas e as vagens. Os sintomas incluem manchas cinzas na superfície abaxial das folhas trifolioladas que se tornam de coloração marrom claro nas bordas. As lesões, na superfície abaxial das folhas, apresentam pontos pretos muito pequenos que são as estruturas reprodutivas do fungo. Delimitado pelas nervuras, as lesões assumem forma angular, motivando o nome da doença. As lesões podem se fundir causando necrose parcial, amarelecimento das folhas e desfolha prematura. Nas vagens, as manchas têm formas e tamanhos variáveis, mas normalmente são circulares com coloração marrom ou avermelhado e marrom escuro nas bordas. Quando em grande número, as manchas fundem-se cobrindo parte da vagem, que terminam por produzir sementes menores (VIEIRA, 1997; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). Quase todos os cultivares plantados no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular. Entretanto, fontes de resistência têm sido encontradas (VIEIRA *et al.*, 1999). SARTORATO *et al.* (1991) avaliaram alguns cultivares comerciais de feijoeiro frente a vários patótipos de *P. griseola* e encontraram uma ampla resposta de resistência para esses patótipos.

2.2. Fontes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular

As principais fontes para genes de resistência a *U. appendiculatus*, relatadas por BASSETT (2004), estão presentes nos cultivares B1627 (*Ur-1*), B2090 (*Ur-2*), Aurora (*Ur-3*), Nep-2 (*Ur-4*) e Early Gallatin (*Ur-4*) (BALLANTYNE, 1978), Mexico 309 (*Ur-5*) (STAVELY, 1984b), Olathe e Golden Gate Wax (*Ur-6*) (GRAFTON *et al.*, 1985), GN 1140 (*Ur-7*) (AUGUSTIN *et al.*, 1972), U.S. #3 (*Ur-8*) (CHRIST e GROTH, 1982), Pompadour Checa (*Ur-9*) (FINKE *et al.*, 1986), PI 181996 (*Ur-11*) (JOHNSON *et al.*, 1995). Alguns alelos para estes genes foram identificados. BALLANTYNE (1978) encontrou o alelo *Ur-2*² na fonte Mesoamericana B2055, e o alelo *Ur-3*² foi encontrado por STAVELY (1990) na fonte Mesoamericana PI 181996.

O cultivar Ouro Negro (derivado de Honduras 35), tem sido o mais amplamente utilizado em Minas Gerais como fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro, apresentando resistência a 14 patótipos identificados neste Estado (FALEIRO, 1997). ALZATE-MARIN *et al.* (2004) relataram que o cultivar Ouro Negro foi testado com 24 dos 94 isolados de *U. appendiculatus* mantidos pelo USDA (*Beltsville United States*

Department of Agriculture), mostrando reação de resistência a 22 patótipos, moderada reação para 78 patótipos e suscetível somente ao patótipo 108.

FALEIRO *et al.* (2001b) relataram a resistência das linhagens norte-americanas BelMiDak-RMR-12 (*Ur-4*, *Ur-11*) e BelMiDak-RR-3 (*Ur-11*) aos patótipos 2, 6, 9 e 10 de Minas Gerais, mostrando a importância do gene *Ur-11* como fonte de resistência neste Estado brasileiro. *Ur-11* confere resistência a 89 de 90 patótipos de *U. appendiculatus* testados no USDA (STAVELY, 2000).

Dentre as principais fontes de resistência à ferrugem utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV encontram-se os cultivares México 309 (gene *Ur-5*), Belmidak RR-11 (gene *Ur-11*) e Ouro Negro (gene *Ur-ON*).

As principais fontes para genes de resistência à *C. lindemuthianum* foram listadas por (BASSETT, 2004), e estão presentes nos cultivares Dark Red Kidney (*Co-1*) (MCROSTIE, 1919), Cornell 49-242 (*Co-2*) (MASTENBROEK, 1960), Mexico 222 (*Co-3*) (BANNEROT, 1965), TO (*Co-4*) (FOUILLOUX, 1976), G2333 (*Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) (FOUILLOUX, 1976; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994), AB 136 (*Co-6* e *co-8*) (SCHWARTZ *et al.*, 1982; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001b), BAT 93 (*Co-9*) (GEFFROY, *et al.*, 1999), Ouro Negro (*Co-10*) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a). Vários outros alelos foram identificados e que estão presentes nos cultivares Kaboon (*Co-1*²) (MELOTTO e KELLY, 2000), Perry Marrow (*Co-1*³) (MELOTTO e KELLY, 2000), AND 277 (*Co-1*⁴) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003c), Widusa (*Co-1*⁵) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2002a), Mexico 227 (*Co-3*²) (FOUILLOUX, 1976), SEL 1308 (*Co-4*²) (YOUNG *et al.*, 1998) e PI 207.262 (*Co-4*³) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2002b).

Em testes realizados em diversos centros de pesquisa, os cultivares G2333, AB 136, TU, TO e PI 207.262 têm sido considerados os mais resistentes (PASTOR-CORRALES, 1992; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994), sendo G 2333, considerado o de maior espectro de resistência. Por outro lado, o cultivar AB136, tem sido resistente em avaliações de campo, mas suscetível em casa de vegetação, para alguns isolados da Costa Rica, México e Nicarágua (SINGH, 1991; BALARDIN e PASTOR-CORRALES, 1990, RAVA *et al.*, 1993).

No Brasil, até o ano de 2002, foi relatada a resistência dos cultivares AB 136 e G 2333 a 50 patótipos de *C. lindemuthianum* identificados em diferentes regiões produtoras de feijão (RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; BALARDIN *et al.*, 1997; THOMAZELLA *et al.*, 2000, TALAMINI *et al.*, 2002). Os cultivares TU (gene *Co-5*),

PI 207.262 e TO (alelos do gene *Co-4*) apresentaram resistência a 49, 45 e 44 dos 50 patótipos, respectivamente. PI 207.262 faz parte da genealogia de vários cultivares elite do CNPAF-EMBRAPA e de cultivares melhorados, como o EMGOPA 201 (Ouro) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b). Segundo SINGH *et al.* (1992), o cultivar Cornell 49-242 confere resistência a 29 dos 50 patótipos identificados, incluindo os patótipos 65, 81 e 87 de ampla distribuição no país. Ouro Negro também apresenta resistência a 19 patótipos de *C. lindemuthianum* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a).

Dentre as principais fontes de resistência à antracnose utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV encontram-se os cultivares TO (gene *Co-4*), AB136 (gene *Co-6*), G2333 (genes *Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) e Ouro Negro (gene *Co-10*).

As principais fontes para genes de resistência a *P. griseola* já descritos estão presentes nos cultivares AND-277 (*Phg-1*) (CARVALHO *et al.* (1998), México 54 (*Phg-2*) (SARTORATO *et al.*, 1999), México 54 (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*), BAT 332 (*Phg-6*²), MAR 2 (*Phg-4*) e Cornell (*Phg-3*) (CAIXETA, 2003). Em estudo realizado por (NIETSCHKE *et al.*, 2001) verificou-se que os genes *Phg-1* e *Phg-2* conferiram resistência a 17 e 16 patótipos, respectivamente, de 25 patótipos avaliados. Os cultivares México 54, BAT 332 e Cornell 49-242, quando em associação, conferem resistência a maioria dos patótipos de *P. griseola* encontrados no Brasil, mas não conferem resistência ao patótipo 63-63 de *P. griseola* (NIETSCHKE *et al.*, 2001). CORREA *et al.* (2001) também estudou a herança da resistência para os patótipos 63.23 e 63.39 e encontrou um gene dominante no cultivar Ouro Negro controlando esta característica. Além disso foi encontrado resistência no cultivar US Pinto 111 para o patótipo 31.21 controlada por um gene recessivo. Segundo OLIVEIRA (2002), os cultivares Antioquia 8, CAL 143, Equador 299 e México 235 também são potencialmente úteis aos programas de melhoramento, apresentando resistência às raças 63.19, 31.17, 63.55 e 63.23 de *P. griseola*. Dentre as principais fontes de resistência à mancha-angular utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV encontram-se os cultivares AND 277 (gene *Phg-1*), México 54 (gene *Phg-2*), BAT 332 (*Phg-6*²) e Ouro Negro.

Quando o objetivo do programa de melhoramento é ampliar a variabilidade genética da população a ser melhorada, a associação de fontes de origem Andina e Mesoamericana seria uma importante estratégia. No entanto, devido as dificuldades na

obtenção de cultivares comerciais, provenientes de cruzamentos com genótipos de origem Andina, a piramidação de genes de origem Mesoamericano de amplo espectro de resistência como *Co-5* ou *Co-6* e *Co-4²* (antracnose); AND 277 (gene *Phg-1*), México 54 (gene *Phg-2*), Cornell 49-242 (*Phg-3*) e BAT 332 (*Phg-6³*), e Mexico 309 (*Ur-5*), BelmidakRR-3 (*Ur-11*) e Ouro Negro (*Ur-11*), também se apresenta como uma excelente estratégia na procura de resistência durável no Brasil.

Embora o conhecimento do espectro de resistência das diferentes fontes de interesse de um programa de melhoramento seja importante, a utilização destas fontes como genitores exige um conhecimento prévio do seu modo de herança e de sua localização (ligação), sobretudo tratando-se de programa de piramidação de genes de resistência.

2.3. O melhoramento do feijoeiro no Brasil

De acordo com VIEIRA *et al.* (1999), os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil têm visado, sobretudo, ao aumento da capacidade produtiva e à resistência a doenças. Num programa de melhoramento cujo objetivo é aumentar a capacidade produtiva do feijoeiro, diversas características morfológicas, fisiológicas e de rendimento são consideradas. Nesse sentido, o progresso genético dos programas de melhoramento têm sido, em muitos casos limitados, devido ao emprego de materiais do mesmo conjunto gênico no processo de hibridação (VIEIRA *et al.*, 1999). Além disso, devem ser consideradas as grandes diferenças de capacidade produtiva entre os cultivares dos distintos conjuntos gênicos (SINGH, 1991).

A resistência a doenças em um cultivar é de grande importância para aumentar a produção e reduzir o uso de defensivos agrícolas, o que representa economia para o produtor e segurança ao ambiente. A identificação de fontes de resistência aos patógenos é uma etapa básica e fundamental em qualquer programa de melhoramento que visa ao desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b). Segundo PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM (1998), inúmeros patógenos ocorrem na cultura do feijoeiro, causando danos econômicos expressivos.

Outras características como tipo e qualidade do grão, arquitetura da planta, resistência a pragas, adaptação ao cultivo consorciado, adaptação à colheita mecanizada, resistência à seca, adaptação a solos pobres e ácidos e aumento da eficiência da fixação

simbiótica de nitrogênio têm recebido atenção dos melhoristas, mas, em geral, estas últimas características ficam num segundo plano de importância (VIEIRA *et al.*, 1999).

Com relação ao hábito de crescimento, os cultivares de porte mais ereto têm sido preferidos, uma vez que, os tratos culturais são facilitados, reduzem as perdas na colheita e permite a obtenção de grãos de melhor qualidade e menor incidência de patógenos.

A preferência por determinado tipo de grão varia com a região. O feijão tipo carioca é o mais cultivado no Brasil, contudo os grãos de cor preta e bege também ocupam uma parcela considerável do mercado.

A maioria dos programas de melhoramento de feijoeiro utiliza a hibridação de dois ou mais materiais, visando reunir características favoráveis em um único genótipo. Na utilização desse método, um aspecto importante a ser considerado é a escolha dos genitores. Para solucionar problemas específicos da cultura, os genitores são selecionados com base em características como produtividade de grãos, resistência a doenças, boa arquitetura e tipo de grãos (RAMALHO *et al.*, 1988). No entanto, quando o objetivo é a obtenção de genótipos superiores para características de baixa herdabilidade, os genitores escolhidos devem possuir boa capacidade de combinação em cruzamento (RAMALHO *et al.*, 1988). Outro aspecto a ser considerado após a realização da hibridação é o modo de condução da população segregante para se proceder à seleção de progênie. Entre os métodos mais utilizados no feijoeiro estão o método da população (*bulk*), o genealógico (*pedigree*), SSD (*single seed descendent*) e retrocruzamento (ALLARD, 1971; RAMALHO e SANTOS, 1982; RAMALHO *et al.*, 1993).

Após a obtenção das linhagens, outra importante etapa no processo de lançamento de um cultivar são as avaliações das linhagens, em vários ambientes e diferentes épocas de plantio. Do resultado deste processo, todos os anos novos cultivares têm sido lançados pelas instituições envolvidas com o melhoramento do feijoeiro em todo o Brasil. Dentre estes cultivares podem ser destacados: Ouro Negro (ARAÚJO *et al.*, 1991), Rudá (CNPAP, 1995), Pérola (CNPAP, 1996), IAPAR 80 (MODA-CIRINO *et al.*, 2001a), IAPAR 81 (MODA-CIRINO *et al.*, 2001b), IPR88 Uirapuru (MODA-CIRINO *et al.*, 2001c), Talismã (RAMALHO *et al.*, 2002), IPR Graúna (CIRINO *et al.*, 2003a), IPR Juriti (CIRINO *et al.*, 2003b), BRS Radiante (FARIA *et al.*, 2003), BRS Valente (DEL PELOSO *et al.*, 2003).

2.4. Uso de marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro

Atualmente, com o grande avanço na utilização de técnicas envolvendo marcadores moleculares, as informações a respeito da diversidade genética do germoplasma das grandes culturas vêm ganhando importantes aplicações nos programas de melhoramento, uma vez que a determinação apurada acerca do grau de parentesco de linhas ou de populações pode auxiliar os melhoristas na obtenção de combinações genéticas mais favoráveis. Desse modo, os marcadores moleculares são utilizados no estabelecimento de filogenia, localização de genes, determinação de similaridade genética, mapeamento genético e estudos evolucionários, dentre outros (FU *et al.*, 1993).

Muitos trabalhos visando compreender a relação planta-patógeno são relatados na literatura. Exemplo de estudos de co-evolução entre patógeno e hospedeiro têm sido mostrado em trabalhos com mancha-angular (GUZMAN *et al.*, 1995), antracnose (BALARDIN e KELLY, 1998; ALZATE-MARIN *et al.*, 1999a) e ferrugem do feijoeiro (MACLEAN *et al.*, 1995).

O uso do conceito de genótipos gráficos (YOUNG e TANKSLEY, 1989) de marcadores moleculares tem boa aplicabilidade em programas de melhoramento que utilizam o método de retrocruzamentos, permitindo a seleção de indivíduos que, além de possuírem o gene em introgressão, apresentam maior proporção do genoma recorrente, reduzindo, assim, o número de gerações de retrocruzamento necessárias para o desenvolvimento de cultivares melhorados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Outra importante aplicação dos marcadores moleculares é a possibilidade da sua utilização na seleção indireta de genes de resistência a doenças sem a necessidade de inoculações com vários patógenos. A identificação de marcadores moleculares fortemente ligados aos genes de resistência tem facilitado o processo de piramidação desses genes (MIKLAS *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 1994). A seleção assistida por marcadores pode, também ser utilizada durante o procedimento de autofecundação de linhagens e identificação de híbridos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; ALZATE-MARIN *et al.*, 1996).

Nesse aspecto, alguns marcadores RAPD ligados a genes que conferem resistência à antracnose (*Co-1*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*) foram identificados, e

marcadores SCAR para dois desses genes (*Co-2* e *Co-4*) foram desenvolvidos (ADAM-BLONDON *et al.*, 1994; YOUNG e KELLY, 1996; YOUNG e KELLY, 1997). Marcadores RAPD ligados a genes de resistência à ferrugem foram identificados por vários grupos de pesquisadores (HALEY *et al.*, 1993; HALEY *et al.*, 1994; JOHNSON *et al.*, 1997; JUNG *et al.*, 1996; KELLY e MIKLAS, 1998).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foram identificados vários marcadores RAPD ligados aos genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular (Tabela 1).

Tabela 1. Marcadores RAPD ligados a genes de resistência do feijoeiro à *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

Marcador*	Distância (cM)	Gene de resistência	Fonte de resistência	Referência
OPY20 _{830a}	0,0	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000)
OPC08 _{900a}	9,7	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000)
OPB03 _{1800r}	3,8	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000)
OPAZ20 _{940a}	7,8	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (2000)
OPAZ04 _{560a}	8,5	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (1999b)
OPAZ09 _{950r}	20,4	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (1999b)
OPF10 _{1050a}	6,9	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2000).
OPBA08 _{560a}	6,0	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2000).
OPX11 _{550a}	5,8	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO <i>et al.</i> (2000)
OPE04 _{500a}	5,8	<i>Phg-?</i>	MAR 2	FERREIRA <i>et al.</i> (1999)
OPH13 _{490a}	5,5	<i>Phg-1</i>	AND277	CARVALHO <i>et al.</i> (1998)
OPN02 _{890a}	5,9	<i>Phg-2</i>	Mexico 54	SARTORATO <i>et al.</i> (1999)
OPAC14 _{2400a}	6,6	<i>Phg-2</i>	Mexico 54	SARTORATO <i>et al.</i> (1999)
OPBA16 _{669a}	10,4	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO <i>et al.</i> (2003)
OPAA19 _{400a}	10,0	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2001)
OPM02 _{425a}	5,6	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2001)

* a: acoplamento; r: repulsão.

FALEIRO *et al.* (2000) identificaram o marcador OPX11_{550a} ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 5,8 cM presente no cultivar Ouro Negro. Também, no cultivar Ouro Negro, foram identificados os marcadores OPF10_{1050a} e OPBA08_{560a} ligado 6,9 e 6,0 cM de distância do gene de resistência à ferrugem, respectivamente (CORREA *et al.*, 2000).

ARRUDA *et al.* (2000) identificaram no cultivar TO os marcadores OPY20_{830a} e OPB03_{1800r} ligados a distâncias de 0,0 e 3,8 cM do gene *Co-4*. ALZATE-MARIN *et*

al. (2000) identificaram o marcador OPAZ20_{940a} ligado ao gene de resistência para antracnose *Co-6* presente no cultivar AB 136 a uma distância de 7,4 cM. CARVALHO *et al.* (1998) identificaram o marcador OPH13_{490a} ligado a uma distância de 5,5 cM do gene de resistência à mancha-angular presente na linhagem AND 277.

CORREA *et al.* (2001) identificaram os marcadores OPAA19_{400a} e OPM02_{425a} ligados a 10,0 e 5,6 cM de distância do gene de resistência à mancha angular presente no cultivar Ouro Negro. O grupo do BIOAGRO/UFV identificou os primeiros marcadores ligados a genes de resistência à mancha-angular nos cultivares BAT 332, México 54, MAR 2 e Cornell 49-242 (CARVALHO *et al.*, 1998; SARTORATO *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 1999; NIETSCHKE, 2000). Muitos marcadores SCAR foram desenvolvidos a partir dos marcadores RAPD (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores SCAR ligados a genes de resistência do feijoeiro à *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

Marcador	Seqüência do <i>primer</i> (5' - 3')	Referência
SCARY20 ₈₃₀	AGCCGTGGAAGGTTGTCAT CCGTGGAAACAACACACAAT	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCARC08 ₉₁₀	AGAATGCCTTTAGCTGTTGG CAGAGAGGCTAGGCTTATCG	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCARAZ20 ₈₄₅	ACCCCTCATGCAGGTTTTTA CATAATCCATTCATGCTCACC	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCARAZ04 ₅₆₇	GGCTGTGCTGATTAATTCTGG TGCTCATTTTATAATGGAGAAAAA	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCARAE19 ₈₉₀	CAGTCCCTGACAACATAACACC CAGTCCCTAAAGTAGTTTGTCCCTA	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004c)
SCARF10 ₁₀₅₀	GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA GGAAGCTTGGCTATGATGGT	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004)
SCARBA08 ₅₆₀	CCACAGCCGACGGAGGAG GCCATGTTTTTTGTCCCC	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SCARBA16 ₅₆₀	TTCCACGTCTATTTTGCATCA CACGCATCACGCAGAACT	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)
SCARH13 ₅₂₀	GACGCCACACCCATTATGTT GCCACACAGATGGAGCTTTA	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)
SCARN02 ₈₉₀	ACCAGGGGCATTATGAACAG ACCAGGGGCAACATACTATG	NIETSCHKE <i>et al.</i> (2000)
SCARAA19 ₆₅₀	TGAGGCGTGTCAATGGATATAA GAGGCGTGTTGATAATTCTGG	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)
SCARM02 ₄₆₀	CAACGCCTCATTAATTGGA CGCCTCTAAACGGGAGAAAC	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)

2.5. Piramidação de genes de resistência no feijoeiro

A possibilidade de introduzir no mesmo cultivar um conjunto de genes de resistência para um ou mais patógenos (piramidação de genes) tem despertado grande interesse dos programas de melhoramento no Brasil e em todo o mundo. A piramidação de genes de resistência para diferentes raças de um mesmo patógeno, por exemplo, é geralmente muito difícil ou mesmo impraticável utilizando somente técnicas do melhoramento convencional (RAMAN *et al.*, 1999). Devido a necessidade de realização de inoculações múltiplas e também devido a interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência, especialmente quando a variedade já possui um gene que confere resistência a várias raças do patógeno, torna-se difícil o reconhecimento preciso dos diferentes genes em um mesmo genótipo (SINGH *et al.*, 2001). Trabalhos recentes demonstraram que o acúmulo de genes confere maior resistência ao cultivar do que a soma da resistência observada nas linhagens paternas (YOSHIMURA *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001).

A piramidação de genes de resistência tem sido sugerida como uma estratégia para proporcionar resistência durável a diferentes patótipos de um mesmo patógeno (NELSON, 1979). Marcadores de DNA ligados a genes de resistência possibilitam a identificação precisa dos genótipos contendo os genes de resistência desejados permitindo que eles sejam facilmente acumulados em um único genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares (MILACH e CRUZ, 1997).

De acordo com JOHNSON (1984), a resistência durável a doenças é aquela que permanece efetiva durante seu prolongado e amplo uso, em ambiente favorável ao desenvolvimento da epidemia. Segundo SCHAFER e ROELFS (1985) a probabilidade de um patógeno superar a resistência de uma pirâmide com quatro ou seis genes é muito baixa. Para que isso ocorra, mutantes que surgem independentemente devem ser combinados, ou eles devem surgir simultaneamente ou sequencialmente no mesmo isolado. NELSON (1979) argumenta que a resistência decorrente dos efeitos parciais de numerosos genes, na planta, exerce uma menor pressão de seleção sobre o patógeno e, assim, deve ser mais durável. Apesar deste conceito não ser universalmente aceito, há evidência experimental que dá suporte à existência desses efeitos parciais de resistência em alguns sistemas hospedeiro/parasita (BRONDY *et al.*, 1986; PEDERSEN e LEATH, 1988). De acordo com esta teoria a durabilidade de um cultivar piramidado dependerá

do número de genes de resistência a serem vencidos pelo patógeno, ou seja, quanto maior o número de genes piramidados mais difícil para o patógeno vencer a resistência; dependerá também da pressão de seleção sobre o patógeno, isto é, quanto maior a pressão de seleção maior a chance de fixação de nova mutação virulenta no patógeno.

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência viabiliza a piramidação de genes de resistência num único cultivar sem a necessidade de inoculações múltiplas (MICHELMORE *et al.*, 1991). Outros exemplos de piramidação assistida por marcadores moleculares podem ser também observados em outras espécies. HUANG *et al.* (1997) piramidaram quatro genes de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* na cultura do arroz. Linhagens com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas para resistência a este patógeno. SINGH *et al.* (2001) piramidaram os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21* de resistência à *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) no cultivar de arroz PR106. Em inoculações em casa-de-vegetação, estes autores demonstraram que as combinações dos genes promoveram altos níveis de resistência aos isolados testados. Testes feitos no campo, em 31 ambientes, confirmaram as observações feitas em casa-de-vegetação.

Marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) estão sendo identificados e utilizados no mapeamento de genes de resistência para importantes patógenos que causam doenças no feijoeiro em diversos programas de melhoramento (STAVELY, 2000; MIKLAS *et al.*, 2000; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001a).

KELLY *et al.* (1995), usando a piramidação de genes de resistência assistida por marcadores moleculares em feijão, piramidaram quatro genes (*I*, *bc-u*, *bc-1²*, *bc-2²*, *bc-3*) que conferem resistência ao vírus do mosaico-comum do feijoeiro (BCMV).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foram desenvolvidas linhas quase isogênicas (NILs, *near isogenic lines*), com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular (RAGAGNIN *et al.*, 2003). As isolinhas possuem, separadamente, o gene de resistência a ferrugem *Ur-11*, proveniente do cultivar Ouro Negro (FALEIRO *et al.*, 2001a), os genes de resistência à antracnose *Co-6* e *Co-4*, dos cultivares AB 136 e TO, respectivamente (ALZATE-MARIN *et al.*, 1999c), ou o gene de resistência à mancha-angular *Phg-1*, do cultivar AND 277 (RAGAGNIN *et al.*, 2003).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F., SÉVIGNAE, M., BANNEROT, H., DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 88: 865-870, 1994.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1971. 381 p.
- ALZATE-MARIN, A.L., BAÍA, G.S., MARTINS FILHO, S., PAULA JR., T.J., SEDIYAMA, C.S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. **Brazilian Journal of Genetics**, 19: 621-623, 1996.
- ALZATE-MARIN, A.L., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Co-evolution of *Colletotrichum lindemuthianum* (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. **Genetics and Molecular Biology**, 22: 115-118, 1999a.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 89: 281-285, 1999b.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 633-637, 2000.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:125-133, 2001a.
- ALZATE-MARIN A. L., ALMEIDA, K.S., RAGAGNIN, V.A., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a recessive gene conferring resistance to anthracnose in common bean lines derived from differential cultivar AB 136. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44: 117-118, 2001b.
- ALZATE-MARIN A. L., ARRUDA, K.M., BARROS E.G. & MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar Widusa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45: 110-111, 2002a.

- ALZATE-MARIN, A.L., MORAIS, M.G., MAURÍLIO, A.M., BARROS, E.G. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar PI 207.262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45: 112-113, 2002b.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., PELOSO, M.J. Del, BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agrícola**, 60: 283-290, 2003b.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46: 173-174, 2003c.
- ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, 152:60 - 64, 2004.
- ARAÚJO, G.A.A., VIEIRA, C., SOUZA FILHO, B.F. **‘Ouro Negro’: Nova Variedade de Feijão-Preto para os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1991. (Boletim Técnico No. 1).
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance genes to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 90: 758-761, 2000.
- AUGUSTIN, E., COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli typica* Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 97:526-529. 1972.
- BALLANTYNE, B.J. **The genetic bases of resistance to rust , caused by *Uromyces appendiculatus* in bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Sydney, Australia: New South Wales, 1978. 262p. (Tese Doutorado). University of Sydney, 1978.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 50-53, 1997.
- BALARDIN, R.S., JAROSZ, A., KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.

- BALARDIN, R.S., KELLY, J.D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, 123: 1038-1047, 1998.
- BALARDIN, R., PASTOR-CORRALES, M. Reação de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* a nove raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira**, 15: 269-263, 1990.
- BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Ann. Amélior. Plant.** 15:201–222, 1965.
- BASSETT, M.J. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 1-24, 2004.
- BERGAMIN FILHO, A. **Análise matemática de epidemias**. In: GALLI, F., (Coord.) Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos vol I. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres Ltda.. 1978. p.242-256.
- BRONDY, U., NELSON, R.R., GREGORY, L.V. The residual and interactive expression of “defeated” wheat stem rust resistance genes. **Phytopatology**, 76:546-549, 1986.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 90p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, 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**, 23: 482-485, 1998.
- CIRINO, V.M., OLIARI, L., FONSECA JÚNIOR, N.S., LOLLATO, M.A. IPR Graúna – common bean cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 3: 301-302, 2003a.
- CIRINO, V.M., OLIARI, L., FONSECA JÚNIOR, N.S., LOLLATO, M.A. IPR Juriti – common bean cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 3: 303-305, 2003b.
- CNPAF - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Rudá. Nova cultivar de feijão**. EMBRAPA. 1995. (Folder)
- CNPAF - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Pérola. Tipo carioca, alta produtividade e ampla adaptação**. EMBRAPA. 1996. (Folder)
- CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOODGOD, P.I., RAGAGNIN, V.A., FALEIRO, F.G., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCH, S., MOREIRA, M.A., BARROS E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27-32, 2001.
- CHRIST, B.J., GROTH, J.V. Inheritance of resistance in three cultivars of beans to the bean rust pathogen and the interaction of virulence and resistance genes. **Phytopathology**, 72:771-773, 1982.
- DEL PELOSO, M.J. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali: CIAT, 1992. p. 86-108. (Doc de trabajo, 113).
- DEL PELOSO, M.J., COSTA, J.G.C., RAVA, C.A., CARNEIRO, G.E.S., SOARES, D.M., FARIA, L.C., DÍAZ, J.L.C., ANTUNES, I.F., SILVEIRA, E.P., MESQUITA, A.N., SARTORATO, A., FARIA, J.C. BRS Valente – black common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 3: 311-314. 2003.
- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 399-402, 2000.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular marker-assisted backcrossing. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44: 109-110, 2001a.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., STAVELY, J.R., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, 26:77-80. 2001b.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 059-066. 2003.
- FARIA, L.C., DEL PELOSO, M.J., COSTA, J.G.C., RAVA, C.A., CARNEIRO, G.E.S., SOARES, D.M., DÍAZ, J.L.C., SARTORATO, A., FARIA, L.C. BRS Radiante – sugar common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 3: 307-310, 2003.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCH, S., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD

- ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, 58: 247-252, 1999.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- FINKE, M.L., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, 35:969-982, 1986.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19: 36-37, 1976.
- FU, Y.K., DEYNZE, V.A., PAULS, R.P. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**, [S.l.] CRC. 1993. p. 450.
- GRAFTON, K.F., WEISER, G.C., LITTLEFIELD, L.J., STAVELY, J.R. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, 25:537-539, 1985.
- GEFFROY, V., DELPHINE, S., OLIVIRA, J.C.F., SEVIGNA, M., COHEN, S., GEPTS, P., NEEMA, C., LANGIN, T., DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 12:774-784, 1999.
- GUZMAN, P., GILBERTSON, R.L., NODARI, R., JOHNON, W.C., TEMPLE, R.S., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization o variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopatology**, 85: 60-607, 1995.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86: 505-512, 1993.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L., KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, 34: 1061-1066, 1994.
- HUANG, N., ANGELES, E.R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 313-320, 1997.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.2003>>. Acessado em janeiro de 2004.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopatology**, 22:309-330, 1984.

- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 659–664, 1995.
- JOHNSON, W.C., GUZMAN, P., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., TEMPLE, R.S., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science**, 37: 248-254, 1997.
- JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARIYARATHNE, H., STEADMAN, J.R., BEAVER, J., KAEPLER, S. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 106: 601-604, 1996.
- KELLY, J.D., HALEY, S.D., AFANADOR, L., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 37: 15-16, 1994.
- KELLY, J.D., AFANADOR, L. & HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, 4: 1-11, 1998.
- KIMATI, H. **Doenças do feijoeiro**. In: GALLI, F. (Coord.), Manual de Fitopatologia, vol. II. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda. 1980. p.297-318.
- MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., IRVINE, J.A.G., MANNERS, J.M., GROTH, J.V. MEINERS, J.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, 85: 757-765, 1995.
- MASTENBROCK, C. A breeding program for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, 9:177-184, 1960.
- MCROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.
- MEINERS, J.P. Genetics of disease resistance in edible legumes. **Annual Review of Phytopathology**, 19: 189-209, 1981.
- MELOTTO, M., KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, 116:143-149, 2000.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., 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 segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 9828-32, 1991.

- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 745-749, 1993.
- MIKLAS, P.N., SMITH, J.R., RILEY, R., GRAFTON, K.F., SINGH, S.P., JUNG, G., CONE, D.P. marker-assisted breeding for pyramiding resistance to common bacterial blight in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43: 39-40, 2000.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, 27:685-689, 1997.
- MODA-CIRINO, V., OLIARI, L., LOLLATO, M.A., FONSECA JÚNIOR, N.S. IAPAR 80 – common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:201-202. 2001a.
- MODA-CIRINO, V., OLIARI, L., LOLLATO, M.A., FONSECA JÚNIOR, N.S. IAPAR 81 – common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:203-204. 2001b.
- MODA-CIRINO, V., OLIARI, L., LOLLATO, M. A.; FONSECA JÚNIOR, N. S. IPR88 Uirapuru – common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:205-206, 2001c.
- MORA-NUÑES, O.A., VIEIRA, C., ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, 39: 391-404, 1992.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant Disease, An Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1979. p. 23-46.
- NIETSCHKE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, 148:117–121, 2000.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., FERREIRA, C.F., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, 117:77–84, 2001.
- OLIVEIRA, E.J. **Seleção de linhagens de feijoeiro resistente à mancha-angular assistida por marcadores moleculares e identificação de novas fontes de resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 93p. (Tese MS). Universidade Federal de Viçosa, 2002.

- PASTOR-CORRALES, M.A. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ, M., FERNANDEZ, F., SCHOONHOVEN, A. (Eds.). **Frijol: investigación y producción**. Cali: PUND-CIAT, 1985. p.172-180.
- PASTOR-CORRALES, M.A., TU, J.C. Anthracnose. In: SCHWART, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p.77-93.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O.A., ESTRADA, E.I., SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, 78: 959-962, 1994.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG, Editora UFV, 1998. p. 375-433.
- PEDERSEN, W.L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, 26:369-378, 1988.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLAD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 237-238, 2004a.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLAD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 249-250, 2004b.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLAD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 271-272, 2004c.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596, 2003.
- RAMALHO, M.A., SANTOS, J.B. Melhoramento do feijão. **Informe Agropecuário**, 8: 16-19, 1982.

- RAMALHO, M.A., SANTOS, J.B., PEREIRA FILHO, I.A. Choise of parents for dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding. **Revista Brasileira de Genética**, 11: 391-400, 1988.
- RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.P., ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora UFG, 1993, 271p.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S.; GONÇALVES, F.M.A.; SANTOS, J.B.; DEL PELOSO, M.J.; FARIA, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; PEREIRA FILHO, I.A. **O “Talismã” de sua lavoura de feijoeiro**. Goiânia, GO. EMBRAPA - Arroz e Feijão, 2002. (Comunicado Técnico 36).
- RAMAN, H. READ, B.J. BROWN, A.H.D.; ABBOTT, D.C. Molecular Markers and Pyramiding of Multiple Genes for Resistance to Scald in Barley. Australia, **Proceedings of the 9th Australian Barley Technical Symposium**, 1999 (Abstracts)
- RAVA, C., MOLINA, J., KAUFFMANN, M. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, 18: 388-391, 1993.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19: 167-172, 1994.
- SARTORATO, A., RAVA, C.A., MENTEN, J.O. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. **Fitopatologia Brasileira**, 16:43-46, 1991.
- SARTORATO, A., NIETSCH, 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**, 42: 21-22, 1999.
- SARTORATO, A. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1, 2001, Resumos. Goiânia: GO, 2001.CD-Room, Resumo 26.
- SCHAFER, J.F., ROELFS, A.P. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence, **Phytopathology**, 75:749-750, 1985.
- SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A., SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 31:741-754, 1982.
- SINGH, S. Bean genetics. In: VAN SCHOONHEVEN, A., VOYSEST, O. (Eds). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1991. p.199 - 286.

- SINGH, S.P., PASTOR-CORRALES, M.A., MOLINA, A., OTOYA, M. **Breeding common bean for resistance to anthracnose**. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed.). La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en America Latina. Cali: CIAT. (Doc. de trabajo, 113), p.198-211, 1992.
- SINGH, S., SIDHU, J. S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H. S., KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 1011-1015, 2001.
- STAVELY, J.R. Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. **Plant Disease**, 68: 95-99, 1984a.
- STAVELY, J.R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology**, 74: 834, 1984b. (Abstract)
- STAVELY, J.R. Genetic of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80: 1056, 1990. (Abstract)
- STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43: 1-4, 2000.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; FERNANDEZ, F.R.; ISHIKAWA, F.H. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão-comum em Minas Gerais. In: **VII congresso nacional de pesquisa de feijão**. Viçosa, MG. p. 187-189, 2002. (Resumo)
- THOMAZELLA, C.; VIDIGAL, C.G.; VIDA, J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.
- VARGAS, E. **Rust**. In: SCHWARTZM H.F. & GÁLVEZ, G.E. (eds.). Bean production problems: Disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1980. p.17-36.
- VIEIRA, C. **O feijoeiro comum: cultura, doenças e melhoramento**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1967. 220 p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 817 p.
- YOSHIMURA, S., YOSHIMURA, A., IWATA, N., McCOUCH, S.R., ABENES, M.L., BARAOIDAN, M.R., MEW, T.W. NELSON R.J. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. **Molecular Breeding**, 1: 375-387, 1995.

- YOUNG, R., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, 77: 95-101, 1989.
- YOUNG, R.A, KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80: 650-654, 1996.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, 37: 940-946, 1997.
- YOUNG, R., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar "G2333". **Theoretical and Applied Genetics**, 96: 87-94, 1998.

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A importância social do feijão como fonte alimentar e o seu amplo consumo por parte da população brasileira justificam o esforço da pesquisa na busca de obter melhores níveis de produtividade e a garantia do abastecimento interno do produto (VIEIRA *et al.*, 1998).

As doenças que acometem a cultura do feijoeiro são uma das principais causas da baixa produtividade no Brasil. Dentre as doenças mais importantes podemos destacar a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus*; a antracnose, por *Colletotrichum lindemuthianum*; e a mancha-angular, por *Phaeoisariopsis griseola*, que podem levar a sérios prejuízos, principalmente durante os meses de abril a julho, quando são observadas, nas principais regiões produtoras, temperaturas amenas e ocorrência de orvalho (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998).

É fundamental que o controle dessas doenças seja feito de forma integrada, adotando-se conjuntamente diferentes medidas e tendo em vista as características desses patógenos. Dentre os métodos de controle, a utilização de cultivares resistentes merece destaque especial, por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível aos produtores dos diversos níveis tecnológicos de produção.

Dentre os métodos de melhoramento utilizados para obtenção de cultivares resistentes, o método dos retrocruzamentos tem sido empregado para transferir genes de cultivares resistentes para cultivares com ótimas características agrônômicas, comercial, culinária e nutricional, mas suscetíveis. Por meio desse método, na maioria dos casos, os genes de resistência são transferidos individualmente. No entanto, existem situações em que se pode ter o interesse em transferir dois ou mais genes de resistência para um mesmo genitor recorrente. Nesse caso, três estratégias têm sido utilizadas: a sequencial,

a paralela e a simultânea. Na estratégia seqüencial, transfere-se um gene ou uma característica de cada vez. Na estratégia da transferência paralela, é feita a condução de tantos subprogramas quanto o número de genes a ser transferido para o genótipo desejado. Após a obtenção das isolinhas contendo os genes individuais faz-se a piramidação em um único genótipo. Na transferência simultânea, todos os genes são transferidos de uma única vez (BORÉM, 1997).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foi utilizada a estratégia de transferência paralela, ou seja, foram conduzidos diferentes subprogramas para a introdução de genes de resistência genes ao patógenos causadores da ferrugem (*U. appendiculatus*), antracnose (*C. lindemuthianum*) e mancha-angular (*P. griseola*), no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Para isso, foram desenvolvidas isolinhas de feijoeiro, possuindo o *background* do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) (RAGAGNIN *et al.*, 2003). No presente trabalho, foram intercruzadas isolinhas homozigotas para resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular, derivadas desse Programa, visando piramidar os genes de resistência em um único genótipo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e cruzamentos

O cultivar Rudá, utilizado como genitor recorrente nos quatro subprogramas de retrocruzamentos, foi desenvolvido a partir do cruzamento entre os cultivares Carioca e Rio Tibagi (CIAT, 1986), sendo introduzido no Brasil como linhagem A285 pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Goiânia, GO). Esse cultivar possui características agronômicas desejáveis, como tipo de grão, aspectos culinários e alta produtividade. Entretanto, é suscetível a diversas doenças. Visando corrigir este problema, foram utilizados cultivares e linhagens possuindo genes de resistência a estes patógenos, os quais foram transferidos por retrocruzamento para o cultivar Rudá.

Como fonte de resistência à ferrugem foi utilizado o cultivar Ouro Negro que apresenta tegumento preto, alta produtividade e boas qualidades culinárias. Esse cultivar, introduzido no Brasil como Honduras 35 e recomendado como cultivar Ouro Negro em 1991 (ARAÚJO *et al.*, 1991), Ouro Negro apresentou resistência à 13 patótipos de *U. appendiculatus* coletados no estado de Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 1999). Este cultivar com excelente características agronômicas, tem sido recomendado pelo SNPA (Sistema Nacional de Pesquisa Agrícola) para o cultivo em vários estados. Além do mais, ALZATE-MARIN *et al.* (2004) relata que o cultivar Ouro Negro foi testado com 24 dos 94 isolados of *U. appendiculatus* mantidos pelo USDA (*Beltsville United States Department of Agriculture*), mostrando reação de resistência a 22 patótipos, moderada reação para 78 patótipos e suscetível somente ao patótipo 108. O cultivar Ouro Negro também apresenta boa capacidade de combinação em cruzamentos com cultivares do tipo carioca (FALEIRO *et al.*, 2002).

O cultivar Ouro Negro possui um gene de resistência à antracnose designado *Co-10* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003). Por meio da técnica de inoculações sequenciais, com os patótipos de *C. lindemuthianum* e de *U. appendiculatus* demonstrou-se que os genes de resistência a estes patógenos estão ligados a uma distância de 12,3 cM (FALEIRO *et al.*, 2000a). Tais características justificam seu freqüente uso em programas de melhoramento.

Como fontes de resistência à antracnose foram utilizados os cultivares diferenciadores TO e AB 136 (PASTOR-CORRALES, 1992), os quais carregam os

genes *Co-4* e *Co-6*, respectivamente (YOUNG e KELLY, 1996) e o cultivar Ouro Negro que possui o gene *Co-10* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003). O cultivar TO teve origem no cruzamento de “Tanderette” (suscetível) com a linhagem mexicana “Acapulco” (resistente), possui o gene dominante *Co-4*, diferente e independente dos outros genes de resistência à antracnose (FOUILLOUX, 1976). O cultivar AB 136 foi desenvolvido a partir de um cruzamento realizado pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (VOYSEST, 1999). Esses cultivares foram utilizados como genitores por apresentarem resistência à maioria dos patótipos de *C. lindemuthianum* no Brasil.

O material genético utilizado como fonte de resistência à mancha-angular foi o cultivar AND 277, que possui o gene de resistência *Phg-1* (CARVALHO *et al.*, 1998). No estudo realizado por NIETSCHE (1997), esse cultivar mostrou-se resistente a 9 dos 13 patótipos de *P. griseola* testados, apresentando resistência aos patótipos mais freqüentemente encontrados no Estado de Minas Gerais.

As isolinhas selecionadas para fazer parte dos inter cruzamentos foram as que apresentaram maior similaridade genética com o cultivar Rudá e com maior espectro de resistência ao patógenos (RAGAGNIN *et al.*, 2003). Durante a obtenção das isolinhas ‘Rudá R’, foram utilizados marcadores moleculares para a identificação de indivíduos com maior proporção do genoma recorrente permitindo reduzir o número de retrocruzamentos requeridos para recuperar o genoma do recorrente (ALZATE-MARIN *et al.*, 1999; FALEIRO *et al.*, 2001). Na Figura 1 estão esquematizados os retrocruzamentos visando à obtenção das isolinhas de feijoeiro resistentes aos principais patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. A isolinha utilizada como resistente à ferrugem foi resultante de três retrocruzamentos, enquanto que as isolinhas desenvolvidas para resistência à antracnose e à mancha-angular foram resultantes de quatro retrocruzamentos. Além disso, foram identificados marcadores moleculares ligados aos genes de resistência permitindo assim selecionar indivíduos resistentes apenas com a utilização de marcadores moleculares (FALEIRO *et al.*, 2000b; ARRUDA *et al.*, 2000; ALZATE-MARIN *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 1998).

O inter cruzamento foi realizado cruzando as linhagens duas a duas, e em seguida cruzando as plantas F₁ para obtenção de plantas com todos os genes ‘Rudá R’ (Figura 2). Para seleção, foram empregados marcadores moleculares ligados aos genes

de resistência, e inoculações com os patótipos para reduzir o número de plantas a serem genotipadas.

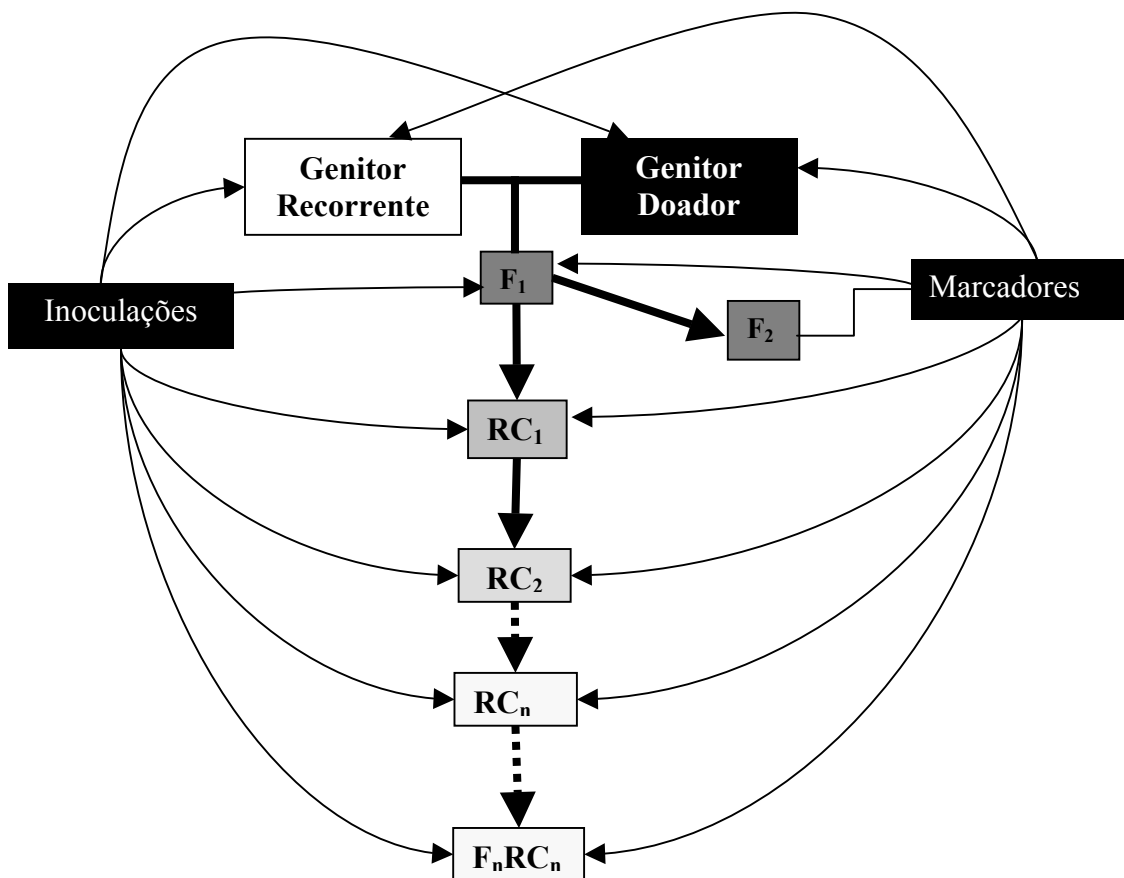


Figura 1. Esquema dos retrocruzamentos visando a obtenção de isolinhas homozigotas para resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular.

Após a obtenção de plantas com todos os genes piramidados, estas foram cruzadas com o cultivar Pérola (Figura 3). Este cultivar foi escolhido por ser o mais cultivado em todo o Brasil. Este é um cultivar de excelente desempenho em termos de produtividade e apresenta excelentes características comerciais e culinárias. Para a obtenção da população Pérola x 'Rudá R', seguiu-se a mesma metodologia de seleção com inoculação e marcadores moleculares, aplicada para obtenção de plantas piramidadas da população 'Rudá R'.

Utilizando marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e seleção de plantas resistentes com inoculação com os patógenos causadores de ferrugem, antracnose e mancha-angular, foram desenvolvidas duas populações de feijoeiro (F₄) a partir do cruzamento inicial entre estes cultivares.

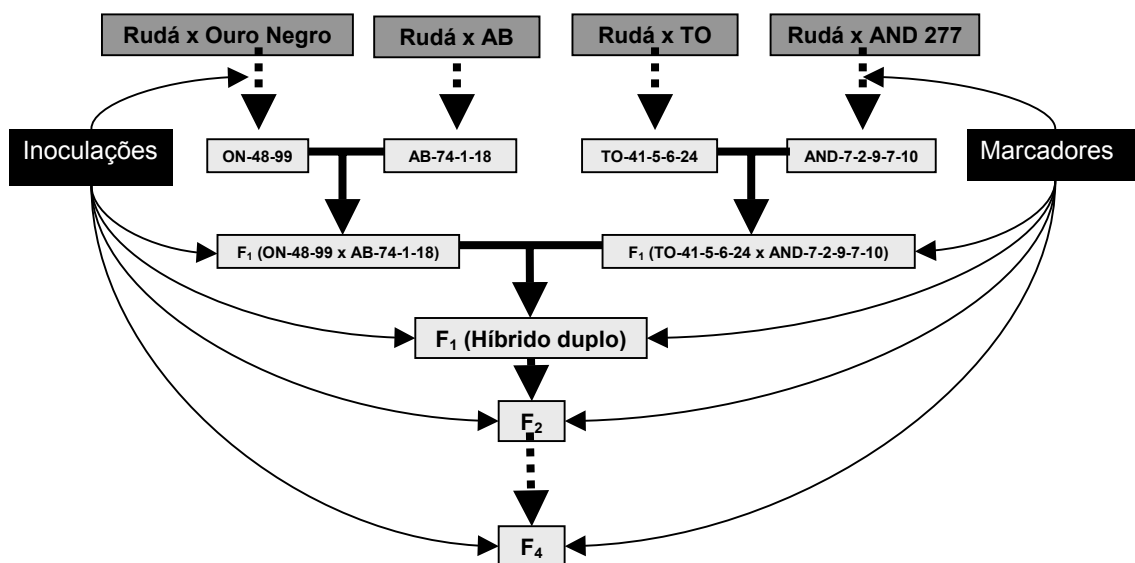


Figura 2. Esquema de seleção assistida utilizando isolinhas homozigotas para piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular.

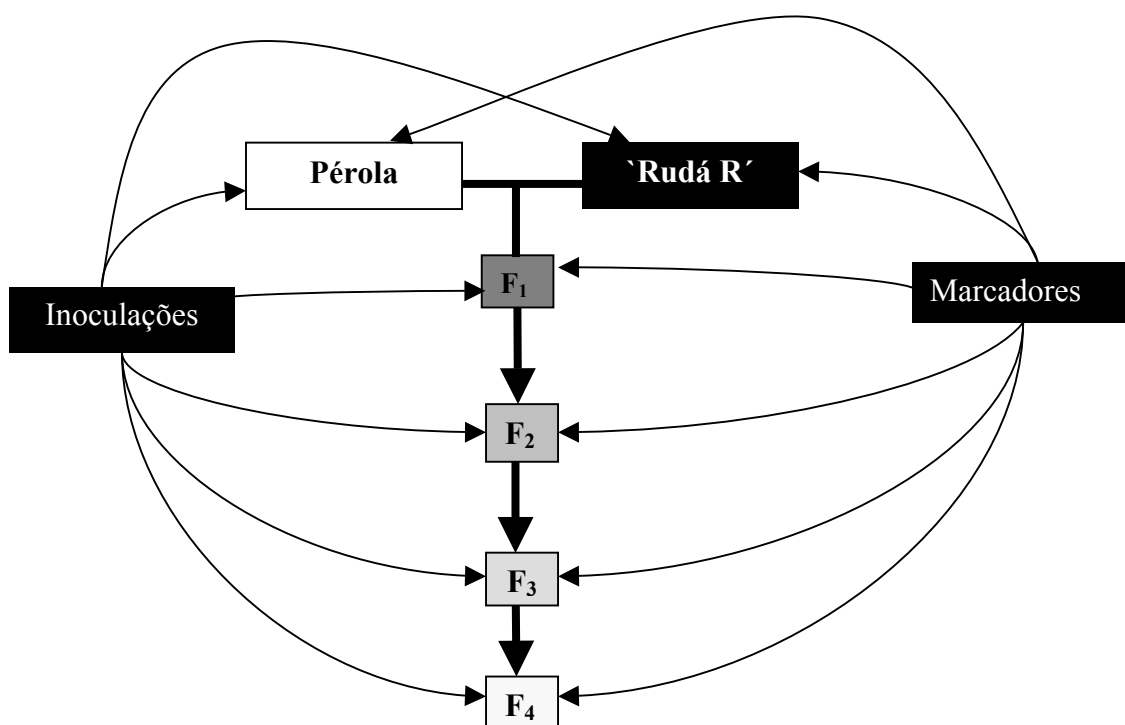


Figura 3. Esquema da seleção assistida para piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular.

2.2. Patótipos utilizados na inoculação

Para selecionar para a resistência a *U. appendiculatus*, foi utilizada uma mistura de patótipos identificados por FALEIRO *et al.* (1999) mantidos na micoteca do BIOAGRO/UFV. As culturas monospóricas, armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa, foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação. O inóculo foi preparado utilizando uma concentração de aproximadamente 2×10^4 uredósporos/mL (DAVISON e VAUGHAN, 1964), suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, para melhor dispersão dos uredósporos.

A seleção para resistência à antracnose foi realizada utilizando o patótipo 65 de *C. lindemuthianum* caracterizado por RAVA *et al.* (1994). O preparo do inóculo e a inoculação seguiram a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO & CHAVES (1975). Para a obtenção de inóculo o patótipo foi cultivado durante 10 dias a 23°C em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. A inoculação foi feita utilizando-se uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/mL.

A seleção para resistência à mancha-angular foi realizada utilizando o patótipo 63-23 classificado por NIETSCHE (1997). O inóculo foi reproduzido em placas de Petri contendo meio V8, e a suspensão do patógeno, previamente preparada e ajustada para concentração de 2×10^4 conídios/mL.

2.3. Inoculação e avaliação da doença

A inoculação de *U. appendiculatus* foi realizada quando as folhas primárias apresentavam, aproximadamente, 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. A suspensão contendo o inóculo foi aplicada em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram transferidas para casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), aí permanecendo até a sua avaliação.

A severidade foi determinada pela observação das pústulas na face superior das folhas primárias. A avaliação foi realizada visualmente, com o auxílio de um diagrama

de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985). Plantas com graus 1 a 3 foram designadas resistentes e aquelas com graus 4 a 6, suscetíveis.

As inoculações com *C. lindemuthianum* foram realizadas 10 dias após a semeadura. A suspensão contendo o inóculo foi aplicada em ambas as superfícies foliares. A atomização e a transferência para câmara de nevoeiro foram semelhantes à inoculação com ferrugem. As plantas foram incubadas por sete dias em câmara úmida, mantidas em temperatura entre 20 e 22°C e com 100% de umidade relativa. Após esse período, cada planta foi avaliada visualmente com base na escala de severidade de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES (1992). 1 - Ausência de sintomas; 2 - Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; 3 - Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 4 - Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; 5 - Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 6 - Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos e pecíolos; 7 - Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolos; 8 - Manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas; lesões abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo; 9 - Maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

A inoculação com *P. griseola* foi realizada sobre a primeira folha trifoliolada. O inóculo consistiu de uma suspensão de conídios preparada, raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade, crescendo a 24°C, sobre placas contendo meio V8 (“Campbell Soup Company”, EUA). A atomização, a temperatura, e a umidade relativa para câmara de nevoeiro e a transferência para casa de vegetação foi semelhante à inoculação com ferrugem. A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995). As plantas que apresentaram graus de severidade 1 a 3 foram consideradas resistentes (em que a nota 1 foi dada às plantas com folhas apresentando ausência total de lesões e a nota 3 àquelas com folhas apresentando poucas lesões, sem haver esporulação do patógeno). Plantas

apresentando graus de severidade 4 a 9 foram consideradas suscetíveis (em que a nota 4 foi dada às plantas com folhas contendo poucas lesões, porém havendo a esporulação do patógeno).

2.4. Seleção por meio de marcadores moleculares

Marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) ligados aos genes de resistência a essas doenças foram utilizados nas gerações F₁, F₂, F₃ e F₄ para auxiliar a seleção de plantas contendo todos os genes de resistência. Na Tabela 1 estão descritos os marcadores moleculares, a fase de ligação e a distância em relação aos genes de resistência.

Para tornar possível este processo foi necessário realizar extração de DNA de folhas das plantas em cada geração. A extração foi feita de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995). As amostras de DNA obtidas foram amplificadas pela técnica de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990) e de SCAR (CORRÊA *et al.*, 2000), para selecionar com base na presença de marcadores moleculares ligados à resistência. Os *primers* foram adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação com marcadores RAPD foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer*, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada durante um período de quatro horas, aproximadamente, a 100 volts. Ao término da

corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

As reações de amplificação com marcadores SCAR foram feitas em mistura de reação de 25 µL contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto para o primer, que foi substituído por cinco picomoles de cada primer específico. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 65°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos.

Tabela 1. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador*	Distância (cM)	Gene	Fonte de resistência	Referência
OPY20 _{830a}	0,0	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000)
OPB3 _{1800r}	3,7	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000)
OPAZ20 _{940a}	7,1	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (2000)
OPH13 _{490a}	5,5	<i>Phg-1</i>	AND 277	CARVALHO <i>et al.</i> (1998)
OPX11 _{550a}	5,8	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	FALEIRO <i>et al.</i> (2000b)
SCARBA8 _{560a}	6,0	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SCARF10 _{1050a}	6,9	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)

* a: acoplamento; r: repulsão.

2.5. Análise de *Fingerprinting*

As plantas F₂ selecionadas foram utilizadas para realização de *fingerprinting* de DNA com o objetivo de fazer uma comparação com o *background* do cultivar recorrente Rudá. As bandas polimórficas obtidas pela técnica de RAPD foram registradas como presença ou ausência entre as diferentes plantas, gerando uma matriz de valores binários de 0 e 1. As distâncias genéticas (Dij) foram calculadas com base no complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973):

$$Dij = \frac{b + c}{a + b + c + d}$$

em que

Dij = distância genética entre a linhagem ou genitor i e a linhagem ou genitor j;

a = número de encontros 1, 1;

b = número de encontros 1, 0;

c = número de encontros 0, 1; e

d = número de encontros 0, 0.

Para cálculo das distâncias genéticas relativas (DR_{ij}), a maior D_{ij} foi transformada para 100% e as demais D_{ij} , corrigidas proporcionalmente. As medidas de dissimilaridade genética foram realizadas com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 1997) e expressas em relação ao cultivar recorrente Rudá.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de linhagens 'Rudá R'

Para piramidar todos os genes de resistência em um único genótipo, foram realizadas combinações de cruzamentos entre as isolinhas AB-74-1-18 (*Co-6*) x ON-48-99 (*Ur-ON* + *Co-10*) e AND-7-2-9-7-10 (*Phg-1*) x TO-41-5-6-24 (*Co-4*). Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência foram usados para confirmar os cruzamentos em F₁. Para o cruzamento (AB-74-1-18) x (ON-48-99), foi utilizado o marcador ScarF10₁₀₅₀, e para o cruzamento (AND-7-2-9-7-10) x (TO-41-5-6-24), o marcador OPY20₈₃₀. As plantas F₁ foram cruzadas para combinar os cinco genes de resistência em um único genótipo. Foram obtidas, aproximadamente, 200 sementes F₁ (híbrido duplo) (AB-74-1-18/ON-48-99) x (AND-7-2-9-7-10/TO-41-5-6-24), as quais foram semeadas e as plantas inoculadas com a raça 63-23 de *P. griseola*. As plantas suscetíveis foram descartadas e aquelas resistentes foram analisadas com marcadores moleculares para confirmar a presença de todas as marcas. Foram identificadas 50 plantas F₁ (híbrido duplo) apresentando todos os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência (Tabela 1). As plantas F₁ (híbrido duplo) foram autofecundadas para obter sementes F₂. Foram obtidas 235 sementes F₂, as quais foram semeadas e as plantas inoculadas com uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus*. As plantas suscetíveis foram descartadas para reduzir o número de plantas a serem genotipadas. O DNA de 143 plantas F₂ resistentes a ferrugem foi amplificado com os marcadores moleculares e treze plantas que possuíam todas as marcas foram identificadas (Figura 4). Realizou-se então uma análise de *fingerprinting* com as treze plantas F₂ para verificar a similaridade genética das plantas contendo os referidos genes de resistência em relação ao genitor recorrente Rudá. Foram usados 65 *primers* aleatórios gerando 33 bandas polimórficas. As distâncias genéticas relativas entre estas plantas e o cultivar Rudá variaram entre 2,2 e 0,9% (Tabela 2). Usando-se retrocruzamentos como método de melhoramento assistido por marcadores moleculares foi possível obter, na geração F₂ 13 plantas com características fenotípicas e genotípicas muito similares ao cultivar recorrente Rudá, e possuindo os genes de resistência *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1*.

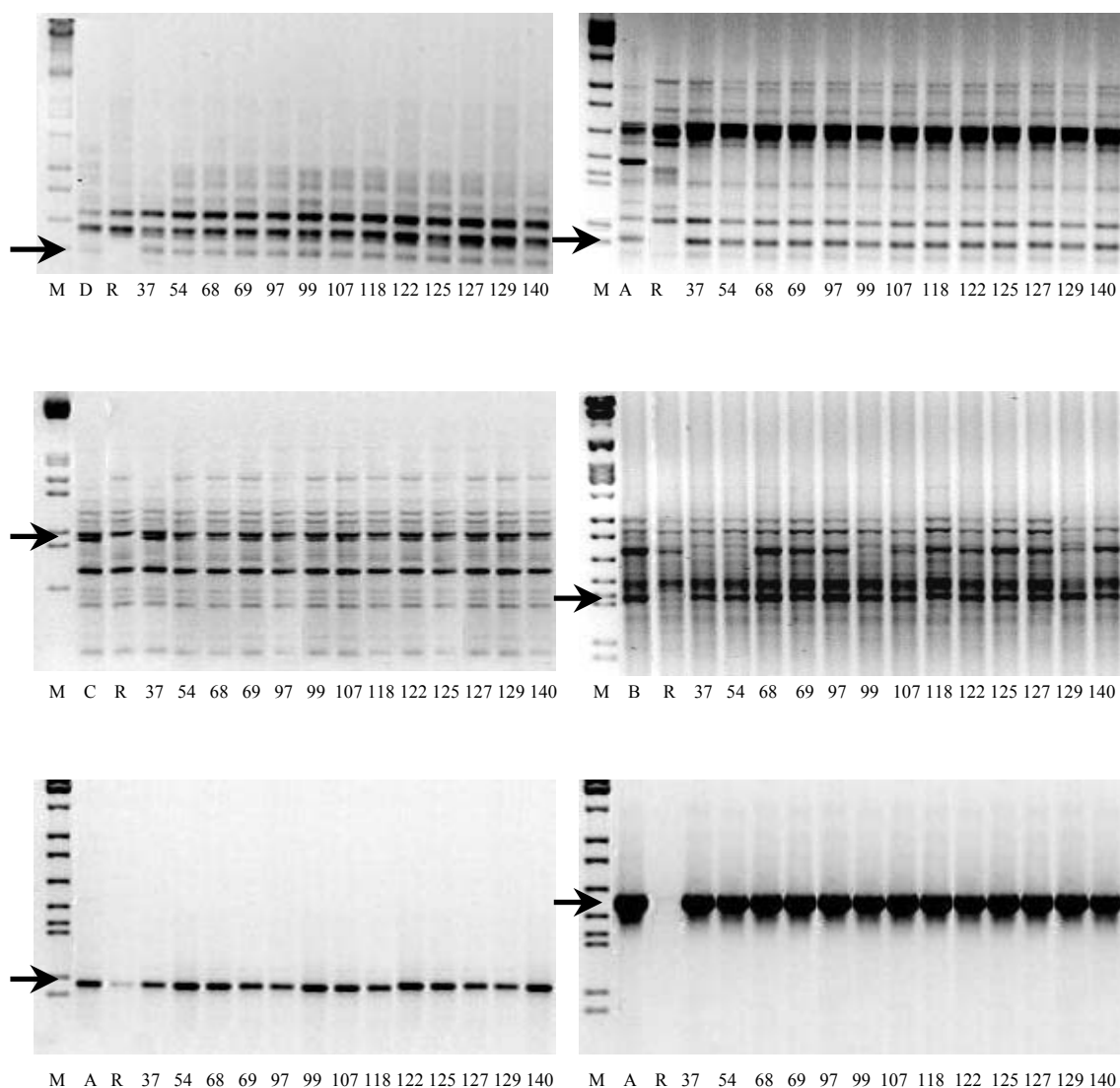


Figura 4. Produto da amplificação do DNA com os *primers* (A) OPH13_{490c}, (B) OPX11_{550c}, (C) OPAZ20_{940c}, (D) OPY20_{830c}, (E) SCARBA08_{560c}, e (F) SCARF10_{1150c}. A coluna (M) contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de tamanho). Os genitores Rudá, Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277 estão representados pelas colunas (R), (A), (B), (C) e (D) respectivamente, seguidos das plantas F₂ resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular. As setas indicam as bandas de tamanho específico, ligadas aos genes de resistência.

As 13 plantas F₂ foram autofecundadas para obter sementes F₃. As sementes F₃ foram semeadas e as plantas inoculadas com o patótipo 63-23 de *P. griseola*; as plantas suscetíveis foram descartadas para reduzir o tamanho de população para genotipagem.

O DNA das plantas resistentes à antracnose foi amplificado com os marcadores moleculares, sendo que cinco delas foram resistentes e não segregantes para as três doenças pelo teste de progênie (Tabela 1). Sementes F₄ foram semeadas e as plantas inoculadas com os três patógenos para confirmar e assegurar a presença dos genes de resistência (Figura 5). Com base nos resultados, pôde-se verificar que a estratégia de piramidação utilizada neste trabalho diminuiu consideravelmente o tempo exigido para recuperar o genoma do genitor recorrente e permitiu a rápida piramidação de genes para resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular em um cultivar de feijão tipo carioca comercial. Além disso, os marcadores identificados e as linhagens obtidas neste trabalho poderão ser utilizados em futuros programas de melhoramento.

Tabela 2. Distância genética relativa (%) entre plantas F₂ em relação ao genitor recorrente (Rudá).

Nº	Rudá	37	54	68	69	97	99	107	118	122	125	127	129
37	2,2												
54	1,6	0,4											
68	1,6	0,8	0,4										
69	1,9	1,5	1,1	0,8									
97	1,9	1,1	1,5	1,1	1,9								
99	1,3	1,1	0,8	0,4	0,4	1,5							
107	1,3	0,8	0,4	0,0	0,8	1,1	0,4						
118	1,6	0,8	0,4	0,0	0,8	1,1	0,4	0,4					
122	0,9	0,8	0,4	0,0	0,8	1,1	0,4	0,4	0,4				
125	1,9	1,1	0,8	0,4	1,1	1,5	0,8	0,4	0,4	0,4			
127	0,9	0,8	1,1	0,8	1,5	0,4	1,1	0,8	0,8	0,8	1,1		
129	1,6	0,4	0,0	0,4	1,1	1,5	0,8	0,4	0,4	0,4	0,8	1,1	
140	0,9	0,4	0,0	0,4	1,1	1,5	0,8	0,4	0,4	0,4	0,8	1,1	0,4

As plantas contendo os cinco genes de resistência foram, então, autofecundadas até a geração F₄. As famílias F_{4:5} obtidas foram multiplicadas no campo para obter o número suficiente de sementes para posterior avaliação do seu desempenho agrônômico. As famílias F_{4:6} foram avaliadas quanto à reação de resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, de forma semelhante à caracterização realizada por RAGAGNIN *et al.* (2003) com as isolinhas obtidas por retrocruzamento.

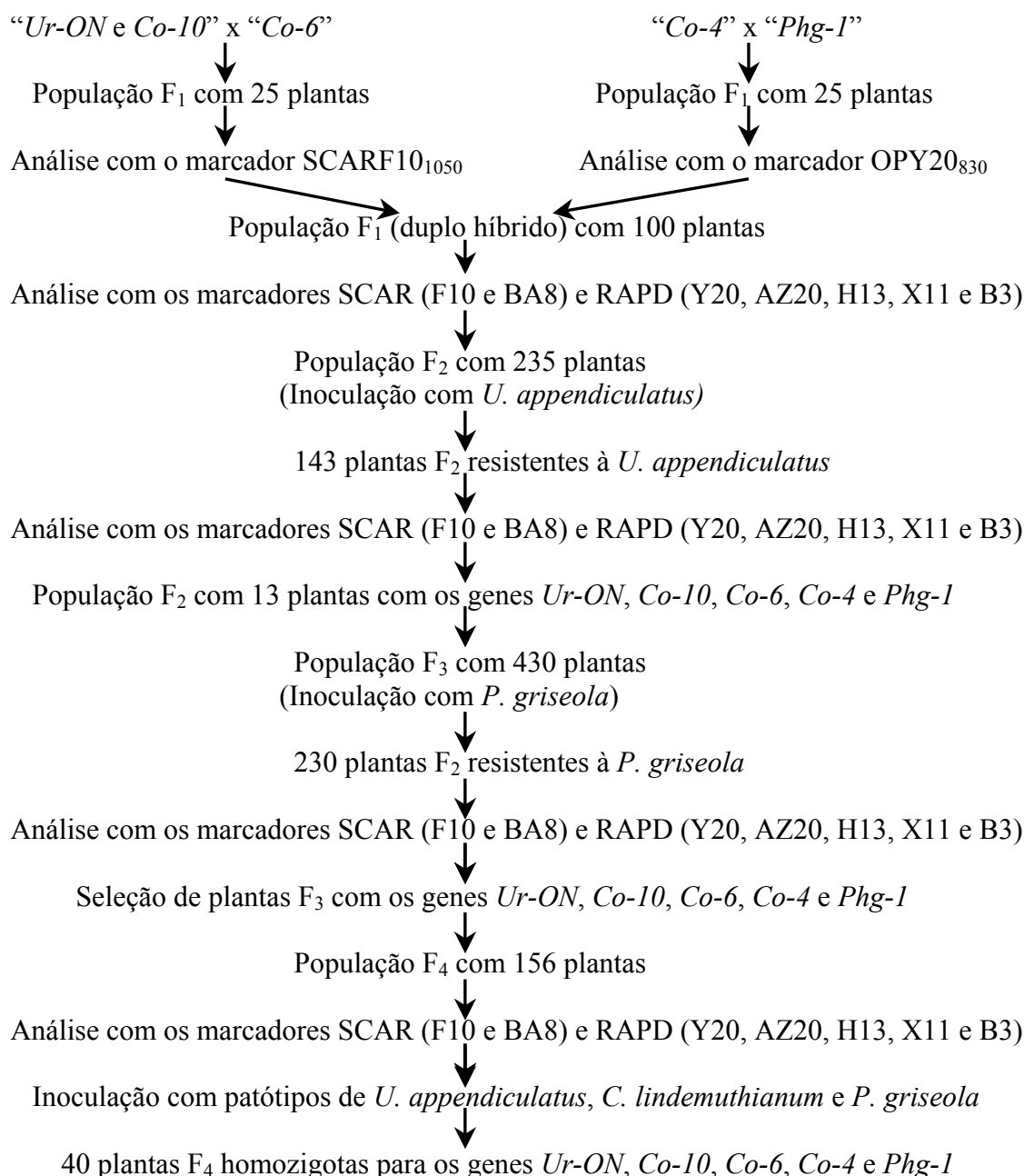


Figura 5. Procedimento para piramidação dos genes de resistência *Ur-ON*, *Co-10*, *Co-6*, *Co-4* e *Phg-1*

3.2. Obtenção de linhagens na população Pérola x 'Rudá R'

A estratégia de piramidação utilizada transferência dos genes de resistência das plantas 'Rudá R' para o cultivar Pérola foi de maneira semelhante aquela utilizada para a obtenção da população 'Rudá R' (Figura 5). O cultivar Pérola foi cruzado com plantas F₁ do híbrido duplo 'Rudá R'. As sementes obtidas deste cruzamento foram semeadas e as plantas inoculadas com raça 63-23 de *P. griseola*. As plantas suscetíveis foram descartadas e aquelas resistentes foram analisadas por marcadores moleculares para confirmar a presença de todas as marcas. Após a identificação das plantas F₁ portadoras de todas as marcas, estas foram autofecundadas para obter sementes F₂. As sementes F₂ foram semeadas e as plantas inoculadas com uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus*. As plantas suscetíveis foram descartadas para reduzir o tamanho de população e o volume de trabalho para análise com marcadores moleculares. O DNA das plantas F₂ resistentes a ferrugem foi amplificado com os marcadores moleculares e identificadas aquelas que possuíam todas as marcas. As sementes F₃ foram semeadas e as plantas inoculadas com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*; as plantas suscetíveis foram descartadas para reduzir o tamanho de população. O DNA das plantas resistentes à antracnose foi amplificado com os marcadores moleculares sendo que cinco delas foram resistentes e não segregantes para as três doenças pelo teste de progênie. Sementes F₄ foram semeadas e as plantas inoculadas com as três doenças para confirmar e assegurar a presença dos genes de resistência. Seguindo esta metodologia, foi possível obter na geração F₄ plantas com características fenotípicas muito similares às do cultivar Pérola, possuindo os genes de resistência *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1*. As sementes F_{4:5} foram multiplicadas em condição de campo para obter o número suficiente de sementes para posterior avaliação do seu desempenho agrônômico e de resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola* semelhantemente ao trabalho de caracterização realizada por RAGAGNIN *et al.* (2003) com as isolinhas obtidas por retrocruzamento.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O uso de cultivares resistentes é uma interessante estratégia de controle das doenças em plantas. O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV objetiva desenvolver cultivares de feijoeiro resistentes às principais doenças que acometem a cultura. Este programa tem utilizado o método de retrocruzamentos para a introdução de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no cultivar recorrente Rudá, sendo conduzidos subprogramas de retrocruzamentos paralelos para cada gene de resistência. Para isso, foram desenvolvidas isolinhas de feijoeiro, possuindo o *background* do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*).

Estas isolinhas foram inter cruzadas para piramidação desses genes de resistência em um único cultivar. Foram desenvolvidas linhagens de feijoeiro com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*), utilizando-se de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e seleção de plantas resistentes com inoculação com os patógenos causadores das referidas doenças.

As linhagens obtidas pertencem a duas populações, sendo quatro linhagens da população 'Rudá R' e três da população Pérola x 'Rudá R'. Estas linhagens estão ainda sendo avaliadas a campo para produtividade de grãos e outras características de interesse. As linhagens que se destacarem nessa avaliação serão promovidas ao ensaio de VCU (Valor de Cultivo e Uso) visando uma avaliação mais extensiva com vistas a recomendação de um novo cultivar. Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam a importância do uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de piramidação de genes de resistência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18: 265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., ARRUDA, M.C.C., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Backcross assisted by RAPD markers for the introgression of *Co-4* and *Co-6* anthracnose resistant genes in common bean cultivars. **Annual Report of the Bean improvement Cooperative**, 42:15-16, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a RAPD marker linked to the C0-6 anthracnose resistance gene in common bean AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 633-637, 2000.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003.
- ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, 152:60 - 64, 2004.
- ARAÚJO, G.A.A., VIEIRA, C., SOUZA FILHO, B.F. **‘Ouro Negro’: Nova Variedade de Feijão-Preto para os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1991. (Boletim Técnico No. 1).
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance genes to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 90: 758-761, 2000.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 1997. 453 p.
- 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**, 23: 482-485, 1998.

CASTAÑO, J. **Manual standard para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol**. Cali, Colômbia: CIAT, 1985. 22 p. (Mimeo.).

CIAT - CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Informe Annual 1986: programa de frijol**. Cali: CIAT, 1986. 339 p.

CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOODGOD, P.I., RAGAGNIN, V.A., FALEIRO, F.G., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.

DAVISON, A.D., VAUGHAN, E.K. Effect of uredospore concentration on determination of races of *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*. **Phytopathology**, 54: 336-338, 1964.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.

FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sistema simplificado para nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 24: 540-545, 1999.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., & BARROS, E.G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. **Revista Ceres**, 47:375-382, 2000a.

FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 399-402, 2000b.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CARVALHO, G.A., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular marker-assisted backcrossing. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44: 109-110, 2001.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CRUZ, C.D., BROMMONSCHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Selection of common bean lines based on yield, grain type, growth habit and disease resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2:507-514, 2002.

- FOUILLLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19: 36-37, 1976.
- 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.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19: 15-22, 1995.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p. 375-433.
- PIO-RIBEIRO, G., CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, 19: 95-118, 1975.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596. 2003.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19: 167-172, 1994.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.
- VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa. MG: UFV, 1998. 596p.
- VOYSEST, V.O. **Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**. CIAT, Cali, Colombia. 1999. 195 p.

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

YOUNG, R., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80: 650-654, 1996.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LINHAGENS RESISENTES, EM CONDIÇÕES DE CAMPO

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se no Brasil por sua importância econômica, cultural, culinária e, sobretudo, social. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* (IBGE, 2004). Por ser um alimento de amplo consumo por parte da população brasileira, justificam-se os esforços da pesquisa no sentido de se obter melhores níveis de produtividade. A utilização de cultivares com resistência a doenças, aliados ao uso correto das práticas de manejo da cultura, podem contribuir para a redução do uso de defensivos agrícolas, o que representaria economia para o produtor, redução de preço do produto e menor impacto ao meio ambiente. Inúmeros patógenos ocorrem na cultura do feijoeiro, causando danos econômicos expressivos (VIEIRA, 1983). No entanto, para se obter cultivares melhorados não somente a resistência deve ser considerada, mas também características como produtividade, tipo de grão, arquitetura, a fim de que estes cultivares atendam tanto à necessidade de produtores e consumidores (RAMALHO e ABREU, 1998). No Brasil, o feijão tipo carioca é o mais cultivado e consumido, no entanto, a preferência por determinado tipo de grão pode variar com a região, como é o caso do feijão do grupo preto no Sul do País, e até mesmo em microrregiões específicas, como o feijão do grupo vermelho na região da Zona da Mata Mineira. Com relação ao hábito de crescimento, as variedades de porte mais ereto têm sido preferidas, uma vez que, facilitam os tratos culturais, reduzem as perdas na colheita, possibilitando a colheita mecanizada, permitem a obtenção de grãos de melhor qualidade e menor intensidade de algumas doenças. A produtividade de um cultivar é de grande interesse, principalmente aos produtores, viabilizando economicamente o cultivo do feijoeiro.

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem trabalhado para a obtenção de cultivares de feijoeiro com grão tipo carioca resistentes às principais

doenças dessa cultura. O cultivar Rudá, desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colômbia) foi escolhido como genitor por apresentar boa produtividade. No entanto, este cultivar é suscetível a várias doenças, como a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular (FALEIRO *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 1999; LANZA *et al.*, 1997; NIETSCHE, *et al.*, 1998). Para isso, foram desenvolvidas isolinhas de feijoeiro, possuindo o *background* do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) (ALZATE-MARIN *et al.*, 1999; FALEIRO *et al.*, 2001; RAGAGNIN *et al.*, 2003a). Estas isolinhas foram intercruzadas para a piramidação desses genes de resistência em um único cultivar. Após o intercruzamento, as plantas piramidadas foram cruzadas com o cultivar Pérola (RAGAGNIN *et al.*, 2003b). Utilizando marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e seleção de plantas resistentes com inoculação com os patógenos causadores de ferrugem, antracnose e mancha-angular, foram desenvolvidas três populações de feijoeiro (F_{4:6}) a partir do cruzamento inicial entre estes cultivares.

Este trabalho teve como objetivo selecionar linhagens de feijoeiro com produção igual ou superior à dos cultivares Rudá e Pérola, com grãos do tipo carioca, boa arquitetura de planta, com tipo de grão aceitável comercialmente e resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução do experimento

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Coimbra-Coimbra/MG, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UV), localizada a 690 m de altitude, 20°45'S de latitude e 42°51'W de longitude.

2.2. Material genético

Foram avaliadas 70 linhagens obtidas de duas populações de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Inicialmente as linhagens foram multiplicadas com a finalidade de obter sementes suficientes para montar um experimento com tamanho de parcela e número de repetições adequados. Linhagens de duas populações foram utilizadas neste experimento: a primeira população foi obtida do inter cruzamento de quatro isolinhas obtidas a partir do cultivar Rudá. A segunda população foi obtida do cruzamento do cultivar Pérola com plantas F₁ da população 'Rudá R'. As descrições detalhadas da obtenção destas populações estão no CAPÍTULO 1. Foram utilizados também seis cultivares testemunhas: Rudá, Pérola, Ouro Negro, Talismã, Valente e Carioca.

2.3. Delineamento e condução do experimento

O experimento foi instalado no inverno/primavera, do ano de 2003. Os tratamentos constituíam de 70 linhagens e seis testemunhas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos casualizados com testemunhas adicionais, com parcelas de duas linhas de dois metros de comprimento, espaçadas de 0,5m, numa densidade de, aproximadamente, 15 sementes por metro.

O experimento foi conduzido utilizando-se o plantio direto sobre palhada de milho e o suprimento de água, nos períodos de deficiência hídrica, foi mantido por irrigações suplementares. No plantio foram empregados 400 kg/ha do fertilizante

formulado 8-28-16 e, aos 25 dias após a emergência das plantas, 150 kg/ha de sulfato de amônio, em cobertura. Por meio do uso de herbicidas, em pré-plantio e em pós-emergência, as plantas de feijão foram mantidas livres da competição de plantas daninhas. O controle de doenças não foi realizado em nenhum dos experimentos e o de pragas somente quando as populações das mesmas atingiram níveis de dano econômico.

2.4. Características avaliação e análise dos dados

Foram avaliadas visualmente a arquitetura de planta e a resistência a principais doenças. O tipo de grão foi avaliado considerando uma escala de notas de 1 a 5, sendo 1 o grão desejável e o 5 totalmente fora do padrão carioca. A produtividade foi mensurada para todas as parcelas e expressas em kg/ha.

Os dados de produtividade de grãos foram, inicialmente, submetidos à análise de variância considerando os efeitos de tratamentos e a média como fixos, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij},$$

em que:

Y_{ij} = Produção média por planta do i-ésimo tratamento no j-ésimo bloco;

μ = média geral;

T_i = efeito do i-ésimo tratamento. ($i = 1, 2, \dots, g+t$), sendo g o número de linhagens (70) e t o número de testemunhas (6);

B_j = efeito do j-ésimo bloco ($j = 1, 2, 3$);

ε_{ij} = erro experimental associado à observação Y_{ijk} , assumindo que os erros são independentes e normalmente distribuídos, com média zero e variância σ^2 .

Na análise de variância foi realizada a decomposição da fonte de variação tratamentos em testemunhas e famílias, e esta última, por sua vez, foi decomposta em populações. O esquema da análise de variância com as fontes de variação, graus de liberdade, quadrados médios, esperanças dos quadrados médios e teste F estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema da análise de variância e esperanças de quadrados médios para o modelo em blocos completos casualizados com testemunhas adicionais.

FV	GL	QM	F
Tratamentos	(g+t)-1	QMtr	QMtr/QMe
Linhagens	g-1	QMg	QMg/QMe
Testemunhas	t-1	QMte	QMte/QMe
Linhagens x Testemunhas	1	QMgt	QMgt/QMe
Erro	(r-1)(g+t-1)	QMe	

A partir da análise de variância da característica produção de grãos (kg/ha), foram obtidas as estimativas da variância ambiental média ($\hat{\sigma}^2$), e do coeficiente de determinação genotípico (h^2), sendo que

$$h^2(\%) = \frac{\phi_g}{QMg} r.100$$

A análise de variância, as estimativas dos parâmetros genéticos e o teste de comparação de médias foram realizados utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação das populações

O resumo da análise de variância da característica produtividade de grãos (kg/ha) das linhagens de feijoeiro na safra de inverno/primavera está apresentado na Tabela 2. Pode-se observar que o coeficiente de variação apresentou um baixo valor (12,1%) indica que o experimento apresentou boa precisão experimental. Valores semelhantes para coeficiente de variação são relatados na literatura para a cultura do feijoeiro (MARQUES JÚNIOR, 1997). Coeficientes de variação baixos, ou de alta precisão, são almejados pelos melhoristas, visto que proporcionam a obtenção de estimativas de parâmetros genéticos mais precisas, ou acuradas, as quais são fundamentais nas tomadas de decisão no decurso do programa de melhoramento.

Por meio do Teste F (Tabela 2) observou-se efeito significativo, para a fonte de variação tratamentos ($P \leq 0,01$), e podemos ainda observar que a decomposição da fonte de tratamentos em linhagens e testemunhas foi significativo ($P \leq 0,01$), indicando comportamento diferenciado das linhagens, das testemunhas e também dos tratamentos. Como o efeito de linhagens foi significativo, isso implica que há variabilidade entre as linhagens, ou ainda, indiretamente, que as linhagens estudadas apresentam diversidade genética para o caráter produtividade de grãos. A variabilidade genética verificada entre as linhagens indica que é possível empregar seleção entre elas.

Visto que as linhagens avaliadas foram obtidas a partir de cruzamentos envolvendo diferentes genitores (Rudá, Pérola, Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277) os efeitos de linhagens foram decompostos em suas partes componentes: população 'Rudá R', população Pérola x 'Rudá R' e o contraste "entre populações". A população Pérola x 'Rudá R' não apresentou efeitos significativos, indicando baixa variabilidade das linhagens pertencentes a esta população. A população 'Rudá R' apresentou efeito significativo ($P < 0,01$), indicando que existe diferença entre as médias das linhagens, em pelo menos uma, em relação às demais linhagens desta população.

O contraste "entre populações" apresentou efeito significativo ($P < 0,01$), indicando que existe diferença entre a média das populações, ou seja, existe diferença

entre o desempenho médio, de pelo menos uma população em relação às outras duas populações.

Tabela 2. Resumo das análises de variância da característica produtividade de grãos (Kg/ha) do experimento de avaliação linhagens na safra de inverno/primavera de 2003. Coimbra, MG

Fonte de Variação	GL	QM
Repetição	2	35502,96
Tratamentos	75	412773,10**
Testemunhas	5	638015,55**
Linhagens x Testemunhas	1	32713,45 ^{ns}
Linhagens	69	401959,29**
População 'Rudá R'	39	579167,15**
População "Pérola x 'Rudá R'"	29	428740,42 ^{ns}
Entre Populações	1	1022393,98**
Resíduo	150	251407,51
Média		4225,19
CV(%)		11,86
h^2 (%)		37,45

** significativo pelo teste F ($P < 0,01$); ns: não significativo pelo teste F ($P > 0,05$).

A estimativa do coeficiente de determinação genotípica (h^2) no sentido amplo foi de 37,45%. Essa estimativa, apesar de ser baixa, pode ser considerada satisfatória, uma vez que o material genético utilizado apresenta nível de homozigose elevado, em virtude dos vários ciclos de retrocruzamentos, que tornaram as linhagens muito próximas entre si e do genitor recorrente Rudá.

As estimativas de parâmetros genéticos encontrados neste trabalho foram semelhantes às obtidas por FALEIRO et al. (2002). Algumas variações foram observadas, as quais podem ser uma consequência dos diferentes métodos utilizados na estimação dos distintos materiais genéticos analisados, das diferentes condições ambientais, da época de plantio e do modo que o experimento foi conduzido, dentre outros fatores (FALCONER, 1987; VENCOVSKY E BARRIGA, 1992).

Analisando os valores das médias, verifica-se que houve uma grande semelhança de comportamento entre as linhagens e as testemunhas quanto à produtividade de grãos (Kg/ha) (Tabela 3). Pelo teste de médias, verifica-se que houve uma grande semelhança de comportamento entre as linhagens e as testemunhas quanto à

produtividade de grãos (kg/ha) (Tabela 4). Esta semelhança é explicada pela utilização dos cultivares testemunhas Rudá, Pérola e Ouro Negro, na formação das populações avaliadas, todos com produção média alta, acima de 4.000 Kg/ha.

Tabela 3. Comparação da produtividade de grãos (kg/ha) das populações das linhagens e das testemunhas avaliadas no inverno/primavera de 2003. Coimbra, MG

Tratamentos	Limite inferior	Limite superior	Média
População 'Rudá R'	3456,66	4980,00	4286,95
População Pérola x 'Rudá R'	3396,67	4883,33	4112,44
Testemunhas	3606,66	4871,66	4266,11

Quanto às distribuições das médias, pode-se afirmar que a maior freqüências de linhagens se encontrou em torno dos valores das médias das testemunhas (Figura 1), sendo que algumas linhagens foram superiores em produtividade em relação a testemunhas utilizados neste experimento (Tabela 4).

A seleção das linhagens para dar continuidade as avaliações de campo e avaliação de resistência a doenças se baseou na produtividade e no tipo de grão do cultivar Pérola. Foram selecionadas as linhagens que tiveram produtividade estatisticamente igual ou superior ao cultivar Pérola. No entanto, adotou-se como critério selecionar aquelas linhagens com produtividade superior a 4.000 Kg/ha. Embora algumas linhagens apresentaram produtividade maior do que as selecionadas, foram descartadas por não apresentarem padrão de grão tipo carioca comercialmente aceito.

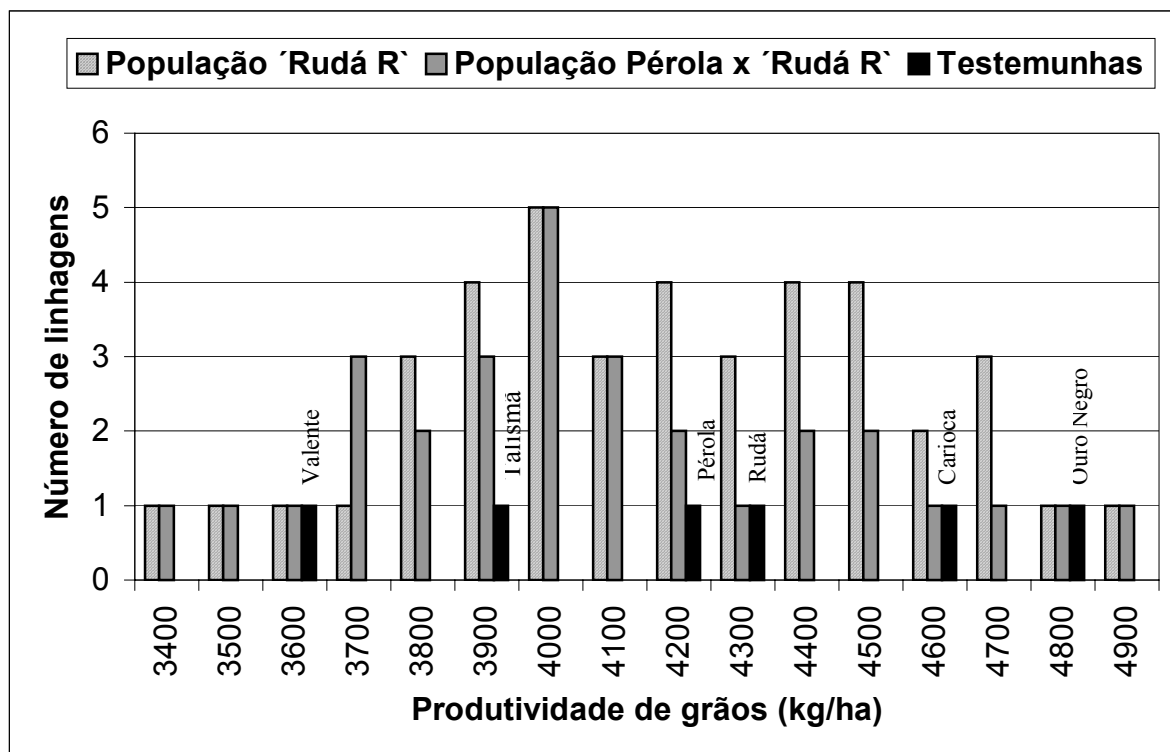
Do resultado da seleção, foram obtidas sete linhagens, sendo quatro da população 'Rudá R', e três da população Pérola x 'Rudá R'. As linhagens selecionadas apresentam características vantajosas, ou seja, possuem importantes genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular e grão tipo carioca. As sete linhagens selecionadas serão incluídas em ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU), onde serão complementados os dados de produtividade e resistência a doenças em uma rede de ensaio nacional.

Tabela 4. Produtividade médias de grãos (kg/ha) de linhagens e testemunhas avaliadas na safra das “águas” de 2003. Coimbra, MG

Genótipo	Médias		Genótipo	Médias	
R 140-11-10	4980,00	a ¹	P 31-3-4	4195,00	b
R 140-11-8	4898,33	a	R 127-4-7	4186,67	b
P 31-3-1	4883,33	a	R 127-10-5	4143,33	b
*Ouro Negro	4871,67	a	P 33-5-1	4133,33	b
R 140-5-7	4788,33	a	P 47-9-3	4123,33	b
R 127-10-8	4775,00	a	R 97-13-6	4103,33	b
P 44-4-1	4768,33	a	P 44-8-2	4098,33	b
R 127-4-1	4760,00	a	R 127-10-6	4073,33	b
R 127-10-14	4710,00	a	P 31-4-3	4068,33	b
R 97-13-5	4625,00	a	P 31-3-3	4063,33	b
*Carioca	4618,33	a	R 140-11-3	4055,00	b
R 140-11-12	4615,00	a	P 47-3-1	4048,33	b
P 31-3-2	4603,33	a	R 140-11-9	4046,67	b
R 97-13-7	4581,67	a	R 97-13-4	4033,33	b
P 49-6-1	4578,33	a	P 44-8-1	4023,33	b
P 33-1-1	4535,00	a	R 127-4-3	4001,67	b
P 47-9-1	4530,00	a	R 140-11-7	3988,33	b
R 127-4-9	4520,00	a	R 127-4-8	3976,67	b
R 127-4-13	4520,00	a	R 127-4-4	3968,33	b
P 33-3-2	4511,67	a	R 127-4-14	3965,00	b
R 140-11-1	4511,67	a	P 49-2-1	3958,33	b
R 127-4-10	4488,33	a	R 127-10-2	3955,00	b
R 127-4-6	4480,00	a	P 49-8-3	3923,33	b
P 31-2-1	4476,67	a	R 127-10-3	3908,33	b
R 97-13-8	4445,00	a	P 44-3-1	3905,00	b
P 31-4-1	4441,67	a	*Talismã	3903,33	b
R 127-4-5	4400,00	a	R 127-4-2	3893,33	b
P 49-2-2	4380,00	a	P 44-3-2	3875,00	b
R 140-11-2	4370,00	a	P 49-8-2	3865,00	b
*Rudá	4343,33	a	P 44-3-3	3798,33	b
R 140-11-2	4341,67	a	P 31-4-2	3780,00	b
R 140-11-13	4303,33	a	P 47-9-2	3776,67	b
R 127-10-1	4295,00	a	*Valente	3606,67	b
R 127-10-7	4270,00	a	P 49-8-1	3578,33	b
R 97-13-9	4256,67	a	R 127-10-9	3540,00	b
P 33-8-1	4253,33	a	P 44-5-1	3468,33	b
*Pérola	4253,33	a	R 140-11-4	3456,67	b
R 140-11-11	4248,33	a	P 44-5-2	3396,67	b

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Scott e Knott, $P \leq 1\%$); valores em negrito identificam as linhagens selecionadas; * testemunhas; Genótipos precedidos das letras R e P são pertencentes as populações 'Rudá R', e Pérola x 'Rudá R', respectivamente.

Figura 1. Distribuição das frequências das médias das linhagens e testemunhas para a característica produtividade de grãos (kg/ha) na safra de inverno/primavera de 2003. Coimbra, MG



4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo avaliar, a campo, o desempenho de linhagens de feijão provenientes de populações oriundas de Rudá piramidado para genes de à antracnose, ferrugem e mancha-angular 'Rudá R', obtidas por meio de retrocruzamentos e também do cruzamento entre Pérola x 'Rudá R'.

Foram obtidas linhagens com produção igual ou superior às dos cultivares Rudá e Pérola, com grãos do tipo carioca, aceitáveis comercialmente. As avaliações visuais de doenças de hábito de crescimento foram consideradas satisfatórias. Todas as linhagens apresentaram bom nível de resistência, hábitos de crescimento indistinguíveis dos padrões comerciais usados como testemunhas.

Linhagens originadas das três populações foram selecionadas, sendo quatro linhagens da população 'Rudá R', e três da população Pérola x 'Rudá R'.

As linhagens selecionadas apresentaram características vantajosas, ou seja, possuem genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular e com grão tipo carioca. Algumas destas linhagens selecionadas serão incluídas em ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU), onde serão complementados os dados de produtividade e resistência a doenças em uma rede de ensaio nacional.

As linhagens selecionadas neste trabalho fazem parte do programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV, que visa desenvolver cultivares com resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular e com grão do tipo carioca. Estas linhagens, se confirmarem sua superioridade genética, poderão ser lançadas como novos cultivares ou ainda serem utilizadas como genitores em programas de melhoramento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., ARRUDA, M.C.C., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Backcross assisted by RAPD markers for the introgression of *Co-4* and *Co-6* anthracnose resistant genes in common bean cultivars. **Annual Report of the Bean improvement Cooperative**, 42:15-16, 1999.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18. 1999.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CARVALHO, G.A., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular marker-assisted backcrossing. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44: 109-110, 2001.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CRUZ, C.D., BROMMONSCHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Selection of common bean lines based on yield, grain type, growth habit and disease resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2:507-514, 2002.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.2003>>. Acessado em janeiro de 2004.
- LANZA, M.A., PAULA JÚNIOR, T.J., VINHADELLI, W.S., MORANDI, M.A.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 560-562, 1997.
- MARQUES JÚNIOR, O.G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão**. Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas).

- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., Fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, 45: 567-571, 1998.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596. 2003a.
- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003b.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. **Cultivares**. In: VIEIRA, C, PAULA JR., T.J.; BORÉM, A. (eds.). Feijão - Aspectos gerais e cultura no estado de Minas. Viçosa, UFV, 1998. p. 435-449.
- VENCOVSKY, R., BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.

CAPÍTULO 3

REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO A DIFERENTES PATÓTIPOS DE *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se no Brasil por sua importância econômica, cultural, culinária e, sobretudo, social. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* (IBGE, 2004). Por ser um de amplo consumo por parte da população brasileira, justificam-se o seu valor e o trabalho de pesquisa no sentido de se obter melhores níveis de produtividade. Um dos fatores que interfere na produtividade da cultura do feijoeiro são as doenças que ocorrem durante a condução da cultura. Inúmeros patógenos ocorrem na cultura do feijoeiro, causando danos econômicos expressivos (VIEIRA, 1983). O uso de resistência genética é o meio mais viável econômico e ecologicamente para o controle das doenças. A utilização de cultivares com resistência a doenças aliado ao uso correto das práticas de manejo da cultura podem contribuir para a redução do uso de defensivos agrícolas, o que representa economia para o produtor e menor prejuízo ao meio ambiente e, além do mais, possibilita alcançar maiores produtividades. Doenças foliares como ferrugem, antracnose e mancha-angular, causadas, respectivamente, por *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, encontram-se entre as principais responsáveis por prejuízos na produção de grãos na cultura do feijoeiro. LANZA *et al.* (1997), FALEIRO *et al.* (1996), FALEIRO *et al.* (1999a) e NITSCHKE *et al.* (1998) estudaram o comportamento de cultivares comerciais de feijão quanto à reação a esses três patógenos e concluíram que a maioria dos cultivares comerciais testados foram suscetíveis.

A introgressão de genes de resistência em um cultivar-elite (piramidação) é uma estratégia que vem sendo sugerida e empregada em programas de melhoramento do feijoeiro visando ampliar o espectro de resistência e torná-la mais duradoura (KELLY *et al.*, 1994; KELLY *et al.*, 1995; KELLY e MIKLAS, 1998). Durante o processo de

piramidação dos genes de resistência, uma das etapas importantes é a caracterização fenotípica das isolinhas obtidas nos vários subprogramas (RAGAGNIN *et al.*, 2003a). Em cada subprograma os genes de resistência são transferidos individualmente, por retrocruzamentos, para isolinhas com *background* do cultivar recorrente (BORÉM, 1997). A caracterização é feita por inoculação de patótipos dos diferentes patógenos de interesse (RAGAGNIN *et al.*, 2003a).

As informações assim obtidas servem como base para a seleção das isolinhas com maior espectro de resistência. As melhores isolinhas são incluídas em um esquema de intercruzamento, ou seja, a hibridação para obtenção de linhagens com todos os genes de interesse. Outra etapa importante no processo de piramidação dos genes de resistência é a caracterização fenotípica das linhagens obtidas com todos os genes piramidados. As etapas de piramidação são feitas por inoculação de patótipos dos diferentes patógenos de interesse. As informações assim obtidas servem como base para a seleção das isolinhas ou linhagens com maior espectro de resistência para dar continuidade ao programa de melhoramento.

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem se concentrado na obtenção de linhagens resistentes à antracnose, ferrugem e mancha-angular. Assim, como continuação deste programa, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 13 linhagens de feijoeiro obtidas nesse programa, quanto à resistência/suscetibilidade a *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*, visando selecionar aquelas com maior espectro de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e delineamento experimental

Para a caracterização da reação de resistência, a diferentes patótipos de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, foram inoculadas em linhagens de feijoeiro obtidas de duas diferentes populações de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A primeira população foi obtida do intercruzamento de quatro isolinhas obtidas por retrocruzamentos a partir do cultivar Rudá (RAGAGNIN *et al.*, 2003a). A segunda população foi obtida do cruzamento do cultivar Pérola com plantas F₁ da população 'Rudá R' (RAGAGNIN *et al.*, 2003b). As descrições detalhadas da obtenção destas populações estão no CAPÍTULO 1.

A escolha das linhagens para fazer parte da caracterização foi com base na produção e tipo de grão, obtidos a partir de experimento de campo. Descrições detalhadas desta seleção se encontram no CAPÍTULO 2. Foram incluídas, também as isolinhas resistentes (ON-48-99, TO-41-5-6-24, AB-74-1-18, AND-7-2-9-7-10), que deram origem às linhagens reacionadas acima, e todos os genitores envolvidos neste programa de melhoramento (Rudá, Pérola, Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277).

A caracterização da resistência com *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola* foi realizada semeando-se 12 sementes de cada genótipo utilizado. Para *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*, as avaliações foram feitas em bandejas plásticas contendo 6 genótipos por bandeja. Para *P. griseola* foram utilizados vasos plásticos de 2,5 L com 3 plantas por vaso. Uma mistura de solo e esterco curtido foi utilizada como substrato, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg do adubo 4-14-8 por m³ de substrato. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o momento da inoculação.

2.2. Patótipos utilizados, preparo do inóculo, inoculação e avaliação

Os patótipos escolhidos para serem utilizados neste trabalho foram os mais virulentos e/ou prevalentes no estado de Minas Gerais (Tabela 1).

O inóculo de *U. appendiculatus* foi obtido multiplicando-se as culturas monospóricas armazenadas a 5 °C e 50% de umidade relativa, no hospedeiro suscetível

US Pinto 111 alguns dias antes da inoculação. Os uredósporos foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e a sua concentração ajustada para $2,0 \times 10^4$ esporos/mL. A inoculação foi realizada por aspersão, em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. A inoculação foi feita quando as folhas primárias apresentavam, aproximadamente, 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse tempo, foram novamente transferidas para a casa-de-vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas.

Tabela 1. Patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola* utilizados na avaliação da resistência de linhagens obtidas no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Patógeno	Patótipo	Identificação
<i>U. appendiculatus</i>	32, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 54, 58 e 59	FALEIRO <i>et al.</i> (1999b)
<i>C. lindemuthianum</i>	7 ^r , 23 ^r , 55 ^r , 64 ^r , 65 ^r , 67 ^r , 73 ^r , 75 ^r , 79 ^r , 81 ^r , 83 ^r , 87 ^r , 89 ^r , 97 ^r , 117 ^r , 119 ^r , 343 ^r , 449 ^r , 453 ^r , 1033 ^b e 2047 ^b	RAVA <i>et al.</i> (1994); BALARDIN <i>et al.</i> , (1997)
<i>P. griseola</i>	31-17, 31-39, 63-19, 63-23, 63-31, 63-35 e 63-55	NIETSCHE (1997 e 2000)

^r Patótipos caracterizados por RAVA *et al.* (1994); ^b Patótipos caracterizados por BALARDIN *et al.* (1997).

O preparo do inóculo e a inoculação para avaliação da resistência a *C. lindemuthianum* seguiu-se a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). O inóculo de cada patótipo foi produzido em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Os tubos com o inóculo foram incubados por 10 dias sob temperatura de 23°C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 10 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas superfícies das

folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por seis dias em câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), sob fotoperíodo de 12 horas até serem avaliadas.

O inóculo para avaliação da resistência a *P. griseola* foi obtido pela multiplicação do fungo em placas de Petri contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA) a partir de uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio obtidos da cultura original do patógeno. As placas foram incubadas por 12 dias, a 24°C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 15 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo $2,0 \times 10^4$ conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies da primeira folha trifoliolada, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas.

Na avaliação dos sintomas da ferrugem foram considerados seis graus de reação segundo a escala proposta no “The 1983 Bean Rust Workshop” (STAVELY *et al.*, 1983): 1 - ausência de pústulas; 2 - manchas necróticas sem esporulação; 3- pústulas esporulando com diâmetro $< 300 \mu\text{m}$; 4 - pústulas esporulando com diâmetro de 300 a $499 \mu\text{m}$; 5 - pústulas esporulando com diâmetro de 500 a $800 \mu\text{m}$; e 6 - pústulas esporulando com diâmetro $> 800 \mu\text{m}$. Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

A caracterização da resistência à antracnose foi realizada mediante a avaliação dos sintomas com base na escala. Após esse período, cada planta foi avaliada visualmente com base na escala de severidade de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES (1992). 1 - Ausência de sintomas; 2 - Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; 3 - Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 4 - Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; 5 - Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 6 - Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos

e pecíolos; 7 - Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolos; 8 - Manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas; lesões abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo; 9 - Maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

A caracterização da resistência à mancha-angular foi realizada mediante a avaliação visual dos sintomas 18 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentaram notas 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com notas 4 ou maior, suscetíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da reação a *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

A inoculação dos genitores usados como fontes de resistência, das isolinhas usadas para a piramidação e das linhagens obtidas do processo de piramidação foi conduzida para avaliar a reação à ferrugem, antracnose e mancha-angular. Com relação à ferrugem, os cultivares TO, AB 136 e AND 277 foram suscetíveis a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados, enquanto que o cultivar Ouro Negro apresentou resistência a todos eles (Tabela 2). FALEIRO *et al.* (1999a) já haviam destacado a importância do cultivar Ouro Negro como fonte doadora de genes de resistência à ferrugem em trabalhos de melhoramento. Semelhantemente aos resultados obtidos por outros autores os cultivares TO, AND 277, AB 136 e Ouro Negro mostraram-se resistentes a 20, 20, 19 e 18 patótipos de *C. lindemuthianum* testados, respectivamente (RAVA *et al.*, 1994; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b; RAGAGNIN *et al.*, 2003a) (Tabela 3). O cultivar TO foi suscetível apenas ao patótipo 2047. O cultivar AB 136 foi suscetível aos patótipos 1033 e 2047. Estes resultados confirmam os relatado que de que os cultivares AB 136 e TO conferem resistência a 50 patótipos de *C. lindemuthianum* identificados em diferentes regiões produtoras de feijão (RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; BALARDIN *et al.*, 1997; THOMAZELLA *et al.*, 2000). O cultivar AND 277 foi suscetível apenas ao patótipo 7 de *C. lindemuthianum*. Este resultado confirma o cultivar AND 277 como uma importante fonte de resistência para antracnose com foi relatado por outros autores (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b). Neste sentido, torna-se necessário maiores estudos para confirmação dos resultados obtidos neste trabalho, com relação ao cultivar AND 277. O cultivar Ouro Negro apresentou-se como suscetível aos patótipos 7, 65 e 2047, e comportou-se como uma multilinha frente aos patótipos 64 e 345 de *C. lindemuthianum*. Neste caso, algumas plantas mostraram resistência e outras, suscetibilidade a um mesmo patótipo testado. Tal fato foi também observado por FARIA *et al.* (2000) quando avaliaram o cultivar Ouro Negro para resistência ao vírus do mosaico comum necrótico. No trabalho de caracterização do cultivar Ouro Negro realizado por RAGAGNIN *et al.* (2003a), foi observado uma maior segregação deste cultivar frente às reações de resistência aos diferentes patótipos, indicando que durante

o trabalho de melhoramento o material disponível deste cultivar foi alcançando homozigose.

Com relação à mancha-angular, os genitores AND 277 e Ouro Negro apresentaram-se resistentes a seis e quatro patótipos de *P. griseola* testados, respectivamente (Tabela 4). O cultivar AND 277 foi suscetível apenas ao patótipo 63-55; o cultivar Ouro Negro apresentou plantas resistentes e suscetíveis aos patótipos 31-17, 63-19 e 63-55. O cultivar TO apresentou-se resistente aos patótipos 63-19, 63-23 e 63-31, enquanto que o cultivar AB 136 mostrou-se resistente apenas ao patótipo 63-31 de *P. griseola* testado. Trabalhos anteriores demonstraram que os cultivares AND 277 e Ouro Negro são excelentes fontes de resistência à mancha-angular (CARVALHO *et al.*, 1998; CORREA *et al.*, 2001).

Tabela 2. Avaliação da resistência à ferrugem em cultivares de feijoeiro-comum

Cultivar	Patótipos de <i>Uromyces appendiculatus</i> *									
	54	49	58	52	59	45	46	50	47	32
Rudá	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Pérola	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Ouro Negro	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
TO	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AB 136	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AND 277	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
ON 48-99	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
TO 41-5-6-24	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AB 74-1-18	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AN 7-2-9-7-10	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
R-127-10-14	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
R-97-13-5	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
R-97-13-6	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
R-127-4-13	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
P-33-5-1	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
P-49-8-2	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
P-49-2-2	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR

* Designação dos patótipos atribuída por FALEIRO *et al.* (1999b); RR: homozigoto resistente; rr – homozigoto suscetível.

Tabela 3. Avaliação da resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum

Cultivar	Patótipos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>																				
	7 ^r	23 ^r	55 ^r	64 ^r	65 ^r	67 ^r	73 ^r	75 ^r	79 ^r	81 ^r	83 ^r	87 ^r	89 ^r	97 ^r	117 ^r	119 ^r	343 ^r	449 ^r	453 ^r	1033 ^b	2047 ^b
Rudá	rr	RR	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	R/r	R/r	rr	rr	rr	rr	rr
Pérola	rr	RR	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	R/r	R/r	rr	rr	rr	rr	rr
Ouro Negro	rr	RR	RR	R/r	rr	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r	RR	rr
TO	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr
AB 136	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr	rr
AND 277	rr	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
ON-48-99	rr	RR	RR	rr	rr	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr
TO-41-5-6-24	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr
AB-74-1-18	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr	rr
AN-7-2-9-7-10	rr	R/r	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	R/r	R/r	rr	rr	rr	rr	rr
R-127-10-14	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
R-97-13-5	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
R-97-13-6	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
R-127-4-13	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
P-33-5-1	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
P-49-8-2	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r
P-49-2-2	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r

^r Patótipos caracterizados por RAVA *et al.* (1994); ^b Patótipos caracterizados por BALARDIN *et al.* (1997); RR: homozigoto resistente; R/r: em segregação; rr: homozigoto suscetível.

Em relação à antracnose os genitores Rudá e Perola comportaram-se como resistentes aos patótipos 23, 64 e 119 e foram suscetíveis a 18 dos 21 patótipos de *C. lindemuthianum* testados. Quanto à ferrugem e à mancha-angular, estes cultivares foram suscetíveis a todos os patótipos de *U. appendiculatus* e *P. griseola* testados. Estes resultados confirmam os dados de outros autores (LANZA *et al.*, 1997; RAGAGNIN *et al.*, 2003a; FALEIRO *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 1999b; FALEIRO *et al.*, 2001).

A isolinha ON-48-99 comportou-se como homozigota resistente a todos os patótipos, apresentando um padrão de resistência igual ao do genitor Ouro Negro (Tabela 2). As isolinhas derivadas dos retrocruzamentos Rudá x TO, Rudá x AB 136 e Rudá x AND 277 foram suscetíveis a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados (Tabela 2).

Tabela 4. Avaliação da resistência à mancha-angular em cultivares de feijoeiro-comum

Cultivar	Patótipos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> *						
	31-17	31-39	63-19	63-23	63-31	63-35	63-55
Rudá	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Pérola	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Ouro Negro	R/r	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r
TO	rr	rr	RR	RR	RR	rr	rr
AB 136	rr	rr	rr	rr	RR	rr	rr
AND 277	RR	RR	RR	RR	RR	RR	rr
ON-48-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
TO-41-5-6-24	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AB-74-1-18	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AN-7-2-9-7-10	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
R-127-10-14	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
R-97-13-5	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
R-97-13-6	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
R-127-4-13	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
P-33-5-1	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
P-49-8-2	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr
P-49-2-2	RR	rr	RR	RR	RR	RR	rr

* Isolados classificados por NIETSCHKE (1997 e 2000); RR: homozigoto resistente; R/r: em segregação; rr: homozigoto suscetível.

A isolinha TO-41-5-6-24 comportou-se como homozigota resistente a 20 patótipos e como suscetível ao patótipo 2047. A isolinha AB-74-1-18 comportou-se como homozigota resistente a 19 dos 21 patótipos testados e como suscetível frente aos

patótipos 1033 e 2047. A isolinha ON-48-99 apresentou-se homozigota resistente a 18 patótipos e suscetível aos patótipos 7, 65 e 2047 de *C. lindemuthianum* (Tabela 3).

A isolinha AND-7-2-9-4-6, proveniente do cruzamento entre Rudá x AND 277 comportou-se como homozigota resistente a cinco dos sete patótipos de *P. griseola* testados (Tabela 4). As isolinhas derivadas dos retrocruzamentos Rudá x TO, Rudá x AB 136 e Rudá x Ouro Negro foram suscetíveis a todos os patótipos de *P. griseola* testados.

Comparando-se os espectros de resistência dos genitores doadores e das isolinhas deles derivadas, verifica-se que as isolinhas TO-41-5-6-24, AB-74-1-18, ON-48-99 e AND-7-2-9-4-6 apresentam essencialmente os mesmos genes de resistência presentes em seus genitores (Tabelas 2, 3 e 4). Estes resultados corroboram os resultados obtidos por RAGAGNIN *et al.* (2003a).

Estas isolinhas foram inter cruzadas obtendo-se linhagens com genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular piramidados no *background* carioca 'Rudá R'. Verificou-se que todas as linhagens piramidadas comportaram-se como homozigotas resistentes a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados, com um padrão de resistência igual ao do genitor Ouro Negro (Tabela 2).

Verificou-se que todas as linhagens piramidadas comportaram-se como homozigotas resistentes a 20 dos 21 patótipos de *C. lindemuthianum* testados e como segregantes frente ao patótipo 2047 (Tabela 3). Este resultado indica que o acúmulo de genes conferiu maior resistência às linhagens piramidadas do que a soma da resistência observada nas isolinhas parentais individualmente.

Outros autores também verificaram que o acúmulo de genes pode conferir maior resistência ao cultivar derivado do que a soma das resistências observada nas linhagens parentais (YOSHIMURA *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001).

Observou-se que as linhagens piramidadas comportaram-se como homozigotas resistentes a cinco dos sete patótipos de *P. griseola* testados e como suscetíveis frente aos patótipos 31-39 e 63-55 (Tabela 4).

As linhagens obtidas do cruzamento entre Pérola x 'Rudá R' foram também avaliadas para a resistência/suscetibilidade à antracnose, ferrugem e mancha-angular. Verificou-se que estas linhagens comportaram-se como homozigotas resistentes a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados, apresentando um padrão de resistência igual aos genitores doadores (Tabela 2). Verificou-se também, que todas as linhagens

provenientes do cruzamento entre Pérola x 'Rudá R' comportaram-se como homozigotas resistentes a 20 dos 21 patótipos de *C. lindemuthianum* testados e como segregantes frente ao patótipo 2047 (Tabela 3). Observou-se também, que todas as linhagens provenientes do cruzamento entre Pérola x 'Rudá R' comportaram-se como homozigotas resistentes a cinco dos sete patótipos testados e como suscetíveis frente aos patótipos 31-39 e 63-55 de *P. griseola* (Tabela 4).

Comparando-se os espectros de resistência das isolinhas resistentes e das linhagens piramidadas delas derivadas pode-se verificar que as linhagens apresentam essencialmente os mesmos genes de resistência presentes em seus genitores (Tabelas 2, 3 e 4). As linhagens, obtidas neste trabalho de piramidação, constituem um precioso germoplasma do qual genes de resistência a doenças podem ser mobilizados para uso em outros programas de melhoramento do feijoeiro. Neste sentido, as linhagens obtidas estão sendo utilizadas como fontes de genes de resistência para serem incorporados em outros cultivares comerciais de feijão (COSTA, 2004). Além do mais, as linhagens piramidadas poderiam também, serem lançadas como novos cultivares de feijão para plantio.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Isolinhas de feijoeiro derivadas do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à antracnose (*Co-4* do cv. TO ou *Co-6* do cv. AB 136 ou *Co-10* do cv. Ouro Negro), ferrugem (gene do cv. Ouro Negro) e mancha-angular (*phg-1* da linhagem AND 277) desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, foram inter cruzadas e como resultado final foram obtidas linhagens de Rudá piramidado para os referidos genes de resistência.

Este trabalho teve como objetivo determinar o espectro de resistência dessas linhagens a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*, visando selecionar as linhagens mais similares aos genitores doadores quanto à resistência aos patógenos. Para isto, foram conduzidas inoculações artificiais com 21 patótipos de *C. lindemuthianum*, 10 patótipos de *U. appendiculatus* e sete patótipos de *P. griseola*. Para resistência à antracnose, foram selecionadas linhagens homozigotas resistentes a 20 patótipos e segregante para a resistência a um patótipo de *C. lindemuthianum*. Para resistência à ferrugem todas as linhagens testadas apresentaram-se como homozigotas resistentes aos 10 patótipos de *U. appendiculatus* testados. Para avaliação da resistência à mancha-angular, verificou-se que duas linhagens apresentaram-se como homozigotas resistentes a cinco dos sete patótipos de *P. griseola* inoculados.

Desta forma pôde-se concluir que as linhagens piramidadas constituem um excelente material genético, podendo ser utilizadas como genitores em programas de melhoramento e também lançadas como novos cultivares. Além do mais, as linhagens obtidas estão sendo utilizadas como fontes de genes de resistência para serem incorporados em outros cultivares comerciais de feijão. As melhores linhagens serão avaliadas em uma rede de ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU), e se confirmarem sua superioridade genética, poderão ser lançadas como novos cultivares de feijão do tipo carioca, ou ainda, serem utilizadas como genitores em programas de melhoramento.

A seleção de linhagens de feijão com grãos do tipo carioca, resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular confirmam a importância do uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de piramidação de genes de resistência. Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização de

marcadores moleculares facilitou o processo de transferência destes genes de resistência para os genótipos piramidados com grão do tipo carioca.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual report of the Bean Improvement Cooperative**, 46: 173-174, 2003b.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 50-53, 1997.
- BALARDIN, R.S., JAROSZ, A., KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV. 1997, 453p.
- 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**, 23: 482-485, 1998.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCH, S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27-32, 2001.
- COSTA, M.R. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão Diamante Negro**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 89p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18. 1999a.

- FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sistema simplificado para nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 24: 540-545, 1999b.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., STAVELY, J.R., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro à quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 26: 77-80, 2001.
- FARIA, J.C., DEL PELOSO, M.J., CARNEIRO, G.E.S. Resistência de cultivares de feijoeiro ao vírus do mosaico comum necrótico. **Fitopatologia Brasileira**, 25:197-199, 2000.
- HUANG, N., ANGELES, E.R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 313-320, 1997.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.2003>>. Acessado em janeiro de 2004.
- KELLY, J.D., HALEY, S.D., AFANADOR, L., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, 37: 15-16, 1994.
- KELLY, J.D., AFANADOR, L., HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, 4: 1-11, 1998.
- LANZA, M.A., PAULA JÚNIOR, T.J., VINHADELLI, W.S., MORANDI, M.A.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 560-562, 1997.
- 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.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, 45: 567-571, 1998.

- NIETSCHKE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina.** Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19: 15-22, 1995.
- PIO-RIBEIRO, G., CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, 19: 95-118, 1975.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596. 2003a.
- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003b.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19: 167-172, 1994.
- SINGH, S., SIDHU, J.S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H.S., KHUSH, G.S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 1011-1015, 2001.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26: 4-6, 1983.
- THOMAZELLA, C.; VIDIGAL, C.G.; VIDA, J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.

YOSHIMURA, S., YOSHIMURA, A., IWATA, N., McCOUCH, S.R., ABENES, M.L., BARAOIDAN, M.R., MEW, T.W. NELSON, R.J. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. **Molecular Breeding**, 1:375-387, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

Isolinhas resistentes à ferrugem (ON-48-99), antracnose (AB-741-18 e TO-41-5-6-24) e mancha-angular (AND-7-2-9-7-10), foram cruzadas duas a duas para piramidação dos genes de resistência *Ur-ON*, *Co-10*, *Co-6*, *Co-4* e *Phg-1*.

As plantas F₁ foram inter cruzadas para obter os híbridos duplos e a verificação da presença dos genes foi realizada com os marcadores moleculares SCAR-F10_{1150a}, SCAR-BA8_{560a}, OPY20_{830a}, OPAZ20_{940a}, OPH13_{490a}, OPX11_{550a} e OPB03_{1800r} e a resistência confirmada com inoculação dos patógenos.

Este procedimento foi repetido nas gerações F₂, F₃ e F₄ obtendo-se uma população constituída de aproximadamente 40 famílias que foi denominado de “Rudá R”.

Paralelamente foram feito o cruzamento entre “Rudá R” x Pérola, seguindo a mesma metodologia de avaliação e seleção, obtendo-se 30 famílias F₄ desta população.

Após multiplicação das sementes, linhagens foram avaliadas quanto ao seu desempenho agrônômico em ensaio preliminar de linhagens e foram selecionadas 4 e 3 linhagens de cada população, respectivamente.

A avaliação da reação de resistência das linhagens frente a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, mostraram que as linhagens R-127-10-14, R-97-13-5, R-97-13-6, R-127-4-13, P-33-5-1, P-49-8-2 e P-49-2-2 comportaram-se como resistentes a todos os patótipos de *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*, e a cinco dos sete patótipos de *P. griseola* inoculados.

As melhores linhagens serão avaliadas em uma rede de ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU) para uma possível recomendação de novo cultivar de feijão tipo carioca. As linhagens obtidas neste trabalho, se confirmarem sua superioridade genética, poderão ser utilizadas como genitores em programas de melhoramento, visando a resistência a doenças.

A seleção de linhagens de feijão com grãos do tipo “carioca”, resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular confirmam a importância do uso da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de piramidação de genes de resistência.