

MÁRCIA REGINA COSTA

**INTROGRESSÃO DE GENES DE
RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E
MANCHA-ANGULAR NO CULTIVAR DE FEIJÃO
DIAMANTE NEGRO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

MÁRCIA REGINA COSTA

**INTROGRESSÃO DE GENES DE
RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E
MANCHA-ANGULAR NO CULTIVAR DE FEIJÃO
DIAMANTE NEGRO**

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

APROVADA: 13 de fevereiro de 2004.

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Conselheiro)

Prof. Pedro Crescêncio de Souza Carneiro

Prof. João Marcos de Araújo

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

**Aos meus maravilhosos pais Vitor e Lia
Aos meus irmãos Marccone e Mariana
Ao querido Idelmar**

AGRADECIMENTO

A Deus pela vida e pela constante proteção.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram, depositando toda confiança na minha pessoa e que são a razão do meu viver.

Aos meus irmãos Marccone e Mariana pela companhia , apoio e convivência.

Ao meu namorado Idelmar, pelo companheirismo, pelo incentivo, conselhos, carinhos e, principalmente, por está sempre presente em todos os momentos.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação desde 1998, pela confiança e amizade e por sua colaboração em todas as etapas da minha formação.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pelo apoio recebido, pelas sugestões e pela amizade.

Ao Professor José Eustáquio de Souza Carneiro pelas valiosas sugestões e participações no desenvolvimento deste trabalho.

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

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

Aos amigos do laboratório: Simone, Maguida, Chico, Tais, Lucinete, Maria Fernanda, Cassiana, Klever, Thiago, Demerson, Pedro, Vagner, Fábio, Marcos, Naldo, João Paulo, Rita, Newton, Lucas, Marcinho, Francismar, Ricardo, James, Tadeu, Marcinho, Andréa, Cíntia, Cândida, Taís, Mariana, Luciane, Carlos, Lílian, pelo agradável convivência.

Ao Vilmar que muito contribuiu, sem medir esforços, pela realização deste trabalho e pela sua amizade.

A amiga Ana Lília Alzate-Marin pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A “filha adotada” Letícia que muito me apoiou, ajudou e sempre esteve ao meu lado.

A galera da Biologia Cíntia, Lílian, Pedro, Bruno, Marco Antônio, Diego, Marina, Maria Eliesi, Grasi que me adotaram como uma bióloga de coração.

Aos amigos Marcelinho, Gisele, Carlinha, Toninho, Dartagnan, Luciano, Toninho, Porquinho, Betinho, Barbosa, Beto, Di, Augusto, Adhemar, Fernando, Tatiana, Marinaldo, que me apoiaram e fazem a minha vida em Viçosa mais agradável.

Aos funcionários Aloísio, Gláucia, Fausto, pelo apoio na condução do trabalho. Em especial ao Sr. Pintinho que muito me ajudou na condução dos trabalhos em casa-de-vegetação.

Aos amigos do curso pela com grande amizade e companheirismo.

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

BIOGRAFIA

MÁRCIA REGINA COSTA, filha de Vítor Edis da Costa e Maria José da Costa, nasceu em Diamantina, Minas Gerais, em 09 de setembro de 1978.

De 1994 a 1996, cursou o segundo grau científico no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais.

Em março de 1997, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), colando grau em maio de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Genética Molecular e Melhoramento Vegetal, defendendo tese em fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	Viii
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Aspectos gerais da cultura.....	4
3.2. Doenças do feijoeiro.....	5
3.3. Marcadores moleculares e piramidação de genes de resistência a patógenos	8
3.4. Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares.....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 1	20
REAÇÃO DO CULTIVAR DIAMANTE NEGRO AOS FUNGOS DA ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR E SUA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	20
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Caracterização fenotípica do Diamante Negro.....	23
2.1.1. Reação a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	23
2.1.2. Reação a <i>Uromyces appendiculatus</i>	25
2.1.3. Reação a <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	26
2.2. Caracterização molecular do Diamante Negro.....	28
2.2.1. Extração de DNA.....	28
2.2.2. Análise de RAPD	28
2.2.3. Avaliação de distâncias genéticas e análise de agrupamento	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Reação do Diamante Negro ao patógeno da antracnose, ferrugem e mancha-angular.....	31
3.2. Caracterização molecular do Diamante Negro	36
4. RESUMO E CONCLUSÕES	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO 2	50
INTROGRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR NO CULTIVAR DIAMANTE NEGRO.....	50
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Material genético, cruzamentos e seleção	52
2.2. Extração de DNA	56
2.3. Análise de SCAR	56
2.4. Análise de RAPD	57
2.5. Avaliação de distância genética a cada retrocruzamento.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do primeiro retrocruzamento.....	59
3.2. Seleção e análise molecular de plantas provenientes do segundo retrocruzamento.....	65
4. RESUMO E CONCLUSÕES	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONCLUSÕES GERAIS	77

RESUMO

COSTA, Márcia Regina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão Diamante Negro.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurilio Alves Moreira e José Eustáquio de Souza Carneiro.

O cultivar de feijão preto Diamante Negro além da boa aceitação comercial, apresenta resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico comum. No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, foi produzida uma isolinha de grãos tipo carioca (Rudá "R") contendo simultaneamente genes de resistência à *Colletotrichum lindemuthianum* (genes *Co-6* e *Co-4*), à *Uromyces appendiculatus* (genes *Ur-?*) e à *Phaeoisariopsis griseola* (gene *Phg -1*), com o auxílio de marcadores moleculares ligados a cada um desses genes. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar o cultivar Diamante Negro quanto à reação às principais raças de *C. lindemuthianum* (antracnose), *U. appendiculatus* (ferrugem) e *P. griseola* (mancha-angular) e também quanto ao seu *fingerprint* molecular por meio de marcadores do DNA, e transferir genes de resistência já piramidados na isolinha Rudá "R", para esse cultivar. O Diamante Negro foi inoculado com 10 patótipos de *C. lindemuthianum*, 10 de *U. appendiculatus* e seis de *P. griseola*. No resultado da avaliação, o Diamante Negro mostrou-se suscetível a três patótipos de *C. lindemuthianum* (65, 81 e 89) e resistente, mas segregante, a quatro (55, 87, 95 e 342). Com relação a *U. appendiculatus*, comportou-se como suscetível a todos os patótipos. Com relação a *P. griseola*, foi suscetível a quatro patótipos (31.17, 63.19, 63.23 e 63.55). Para sua caracterização molecular frente a outros cultivares do tipo preto

e ao cultivar Rudá, pela técnica de RAPD, foram utilizados 78 *primers*, gerando 146 bandas polimórficas que permitiram o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. A maior distância observada em relação ao Diamante Negro foi com o cultivar andino Preto 60 dias (26,79%), a menor com o Ouro Negro (6,42%) e o Rudá mostrou-se a uma distância de 28,11%. Três grupos foram formados: um contendo o Preto 60 dias (andino), um contendo o Rudá (mesoamericano-carioca) e um contendo os demais cultivares (mesoamericanos-pretos). Para a introgressão dos genes de resistência, cruzamentos entre Diamante Negro e o Rudá “R” foram realizados e as plantas F₁ foram retrocruzadas com o Diamante Negro gerando 394 plantas. Com inoculações seriadas com os três patógenos, foi possível selecionar 32 plantas resistentes às três doenças. O DNA destas 32 plantas foi amplificado com os marcadores SCAR Y20_{830a} (*Co-4*), SCAR H13_{490a} (*Phg-1*), SCAR AZ20_{940a} (*Co-6*) e SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a} (*Ur-?*). Com o resultado desta amplificação foi possível selecionar 21 plantas que possuíam pelo menos quatro marcas, sendo que quatro destas plantas (75, 93, 141 e 270) apresentaram as cinco marcas. As distâncias genéticas relativas entre estas plantas RC₁F₁ e o Diamante Negro variaram de 37 a 65%. Todas as 21 plantas RC₁F₁ foram conduzidas para o segundo retrocruzamento, gerando 231 plantas RC₂F₁. A amplificação do DNA destas plantas RC₂F₁ com os marcadores SCAR, permitiu selecionar 18 plantas com pelo menos quatro marcas. Seis destas (75.8, 93.8, 141.2, 141.4, 141.6 e 141.7) apresentaram as cinco marcas. As distâncias genéticas relativas entre as plantas selecionadas e o Diamante Negro foram de 32 a 48%. As 18 plantas selecionadas foram usadas para o terceiro retrocruzamento. O objetivo final deste trabalho é o de selecionar linhagens de grãos pretos com resistência à antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-bacteriano-comum e mosaico comum, com bom potencial produtivo.

ABSTRACT

COSTA, Márcia Regina, M. S., Universidade Federal de Viçosa, february 2004.. **Introgression of anthracnose, rust, and angular leaf spot resistance in the black bean cultivar Diamante Negro.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee Members: Maurilio Alves Moreira e José Eustáquio de Souza Carneiro.

Diamante Negro, a black-seeded common bean cultivar, is not only outstanding because of its excellent commercial acceptability, but also because it is resistant to common bean leaf blight and to common bean mosaic virus. Using molecular marker assisted selection, the common bean breeding program of the Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO) developed an isoline with carioca type grains (Rudá "R") containing genes for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* (genes *Co-6* and *Co-4*), to *Uromyces appendiculatus* (genes *Ur-?*), and to *Phaeoisariopsis griseola* (gene *Phg -1*). The objectives of this study were: a) to characterize the cultivar Diamante Negro in relation to its reaction to the main *C. lindemuthianum* (anthracnose), *U. appendiculatus* (rust), and *P. griseola* (angular leaf spot) races; b) to determine its molecular fingerprint using DNA markers; and c) to transfer the resistance genes present in Rudá "R" to this cultivar. Diamante Negro was inoculated with 10 pathotypes of *C. lindemuthianum*, 10 of *U. appendiculatus*, and six of *P. griseola*. Diamante Negro was susceptible to three pathotypes of *C. lindemuthianum* (65, 81, and 89) and resistant, though segregant, to four other (55, 87, 95, and 342). The cultivar was susceptible to all pathotypes of *U. appendiculatus* and to four pathotypes of *P. griseola* (31.17, 63.19, 63.23, and 63.55). The genetic distances between Diamante Negro and

other black-seeded cultivars and cultivar Rudá were determined. Seventy-eight RAPD primers produced 146 polymorphic bands. Andean cultivar Preto 60 dias presented the greatest distance in relation to Diamante Negro (26.79%), Ouro Negro, the shortest distance (6.42%), and Rudá a distance of 28.11%. Based on the genetic distances, three groups were formed: one containing Preto 60 dias (andean), the other containing Rudá (“carioca-type”, mesoamerican) and the last one including all the other cultivars (black-seeded, mesoamerican). For the introgression of the resistance genes, the F₁ plants of the cross Diamante Negro x Rudá “R” were backcrossed with Diamante Negro, producing 394 plants. By serial inoculations with the three pathogens, 32 plants resistant to the three diseases were selected. The DNA of these 32 plants was amplified with the markers SCAR Y20_{830a} (Co-4), SCAR AZ20_{940a} (Co-6), SCAR H13_{490a} (Phg-1), and SCAR F10_{1050a} and SCAR BA08_{560a} (Ur-?). Twenty-one plants were selected harboring at least four markers of the markers. Four of these plants presented all five markers. The relative genetic distances between these RC₁F₁ plants and Diamante Negro varied from 37 to 65%. All 21 RC₁F₁ plants were included in the second backcrossing, giving rise to 231 RC₂F₁ plants. The DNA amplification of these plants with the SCAR markers led to the selection of 18 plants with at least four markers. Six among them presented the five markers. Relative genetic distances between the selected plants and Diamante Negro ranged between 32 and 48%. The 18 selected plants were used for a third backcross. The ultimate goal of this work is to select black-seeded lines with resistance to anthracnose, rust, angular leaf spot, common leaf blight and common mosaic with a promising yield potential.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos alimentos básicos da população mundial sendo uma das principais fontes de proteínas na dieta alimentar da população economicamente menos favorecida (SCHWARTZ *et al.*, 1996). No Brasil, o feijão consumido pela população contribui com 18,5% do consumo de proteínas, chegando a representar, na região nordeste do país, 34% do ferro consumido (LAJOLO *et al.*, 1996). Além da grande importância do feijão na dieta do brasileiro, ele é um produto agrícola de relevância econômica e social, por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que utilizam alta tecnologia em todas as etapas do processo de produção.

A produção mundial de feijão no ano de 2003 ficou em torno de 23 milhões de toneladas, em uma área de, aproximadamente 26 milhões de hectares. Somente a produção da América Latina e África corresponderam a 7 milhões de toneladas. Cinco países se destacam na produção mundial: Índia, Brasil, China, Estados Unidos e México (FAO, 2003). Considerando somente feijões do gênero *Phaseolus* o Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor mundial. Na safra de 2003, a produção brasileira foi de 3,055 milhões de toneladas, ocupando uma área de 5,09 milhões de hectares. Com certa tendência de crescimento, o consumo *per capita* de feijão no Brasil foi de 17,2 kg/habitante/ano, em média, sendo as regiões de maior consumo a região nordeste, com 20,8 e a região sul, com 18,2 kg/habitante/ano (FAO, 2003).

Apesar dos números relativos à produtividade já representarem um aumento comparado com anos anteriores, a produtividade média nacional ainda é pouco expressiva, sendo de apenas 600 kg/ha, que é inferior à

média mundial que está em torno de 670 kg/ha (MOURA *et al.*, 1994; SANTOS e BRAGA, 1998; IBGE, 2003).

Uma das principais razões deste baixo rendimento é, sem dúvida, a alta incidência de doenças. O feijoeiro-comum é suscetível a inúmeras doenças fúngicas, bacterianas e viróticas. As doenças fúngicas de maior importância são a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*). Dentre as bacterioses, a de maior importância é o crestamento-bacteriano-comum causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e dentre as viroses, o mosaico-comum do feijoeiro (BCMV).

No programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV foi observado que o cultivar Ouro Negro (Honduras 35) apresentou resistência a 14 patótipos de *U. appendiculatus* e a vários patótipos de *C. lindemuthianum* (FALEIRO, 1997; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003). Além do Ouro Negro, outras fontes de resistência à antracnose foram caracterizadas, dentre elas os cultivares TO (gene *Co-4*) e AB136 (gene *Co-6*). Para a mancha-angular, foram caracterizadas as linhagens AND 277, MAR 2, México 54, BAT 332 e Cornell 49-242.

De um modo geral, essas fontes de resistência não apresentam características agronômicas desejáveis para o produtor e consumidor, por esse motivo esses genes de resistência foram transferidos para cultivares de maior aceitação comercial.

Inicialmente, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV realizou a caracterização de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular e a indentificação de marcadores moleculares ligados a esses genes. Em seguida, com auxílio desses marcadores, foi possível associar (piramidar) os genes em um mesmo cultivar comercial. O primeiro cultivar comercial no qual foi realizada a piramidação dos genes de resistência foi o Rudá (tipo carioca). Numa segunda etapa do programa, esses genes de resistência também serão piramidados em cultivares de grãos pretos e vermelhos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal a introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão preto, Diamante Negro.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar fenotipicamente o cultivar Diamante Negro quanto à reação à *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*.
- Caracterizar molecularmente (*fingerprint*) o cultivar Diamante Negro, comparando-o a outros cultivares de feijão de grãos pretos.
- Selecionar isolinhas de grãos pretos resistentes à antracnose, ferrugem e mancha-angular provenientes de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares entre o cultivar Diamante Negro (genitor recorrente) e uma isolinha do cultivar Rudá (Ruda "R", genitor doador).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais da cultura

O feijão é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro, por ser reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e de ser rico em ferros.

O gênero *Phaseolus* originou-se nas Américas e possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK, 1993). Entre elas, o feijão-comum *Phaseolus vulgaris* L, é o mais importante, por ser a espécie cultivar mais antiga e também a mais utilizada.

O feijão-comum é uma espécie diplóide com $2n=2x=22$, sendo seus cromossomos extremamente curtos quando comparados com os de outras espécies. É uma planta autógama, por causa da estrutura de sua flor, na qual os órgãos masculinos e femininos são bem protegidos pelas pétalas.

O feijão teve dois centros de principais de domesticação. O primeiro que se localiza na região central das Américas, principalmente no México, e o segundo no sul dos Andes, principalmente no norte da Argentina e no sul do Peru.

O Brasil é classificado como o segundo maior produtor mundial de feijão, com uma produção média de 3 milhões de toneladas (FAO, 2003), porém, seu rendimento ainda é muito baixo, cerca de 600 kg/ha (IBGE, 2003). Este baixo rendimento se deve ao fato da alta incidência de doenças, sendo o feijoeiro-comum muito suscetível a inúmeras doenças fúngicas, bacterianas e viróticas.

3.2. Doenças do feijoeiro

A produtividade do feijoeiro é altamente comprometida pela ocorrência de diversas doenças e pragas. VIEIRA (1983) cita mais de 45 doenças que podem atingir o feijoeiro, sendo a antracnose, a mancha-angular, o crestamento-bacერიano-comum, o mosaico-dourado e a ferrugem as de maior importância, considerando a parte aérea da planta.

Dentre as doenças de origem fúngica, no território nacional, as de maior relevância são a antracnose, a mancha-angular e a ferrugem. Os agentes causais destas doenças apresentam grande número de formas patogênicas especializadas denominadas raças fisiológicas.

Por exemplo, não é possível dizer ao certo quantos patótipos de *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro, ocorrem no país e nem a sua distribuição geográfica. Esse fungo é um parasita obrigatório que se caracteriza por apresentar alta variabilidade, o que dificulta o trabalho de melhoramento visando à resistência. MORA (1986) identificou 53 patótipos de *U. appendiculatus* a partir de 80 isolados monopustulares coletados em oito estados brasileiros (SC, PR, SP, RJ, MG, ES, GO e PE) e apenas quatro desses patótipos foram encontrados em mais de um estado. FALEIRO *et al.* (1999) identificaram 13 patótipos a partir de 15 isolados coletados em diferentes municípios de Minas Gerais e demonstraram a existência de patótipos diferentes em uma mesma folha, confirmando a alta variabilidade genética do patógeno. Portanto, pode-se dizer que, em cada região produtora de feijão, ocorre grande número de patótipos, e além disso, nem sempre são os mesmos de ano para ano (VIEIRA, 1972).

A existência de patótipos dificulta o trabalho de desenvolvimento de cultivares resistentes. Dependendo dos patótipos que prevaleçam numa certa região, um cultivar de feijão pode comportar-se como resistente ou suscetível. Muitas vezes, um cultivar resistente torna-se suscetível, porque foi infectado por uma raça nova do patógeno. Isso aconteceu com os cultivares de feijão preto 'Milionário 1732' e 'Rico 1735', lançados em 1983, porque, além de muito produtivos, eram resistentes à ferrugem

(VIEIRA, 1983). Contudo, poucos anos depois de distribuídas as sementes, passaram a ser infectados.

Estudos genéticos de resistência à ferrugem têm evidenciado que esse caráter é controlado por um gene dominante único (ou bloco gênico) e que existem muitos genes de efeito menor atuando também na determinação da resistência (STAVELY, 1984; GRAFTON *et al.*, 1985; STAVELY e GRAFTON, 1985; WEBSTER e AINSWORTH, 1988; FALEIRO, 1997).

Estudos feitos por GRAFTON *et al.*(1985), demonstraram que o cultivar Olathe possui um gene que tem comportamento complementar a outro presente na linhagem T-39, conferindo resistência ao patótipo 44 de *U. appendiculatus*. Estudando a herança da resistência do cultivar Ouro Negro a quatro patótipos de *U. appendiculatus*, FALEIRO (1997) mostrou que um gene de “efeito maior”, possivelmente associado a genes “menores”, seria responsável pela resistência à ferrugem.

O agente causal da antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, também apresenta raças fisiológicas (patótipos), mas em número inferior ao apresentado pela ferrugem. O levantamento feito por RAVA *et al.* (1994) mostrou a ocorrência de 25 diferentes patótipos de *C. lindemuthianum* no território brasileiro.

A alta umidade relativa do ar e temperatura entre 13 e 26 °C favorecem o surgimento dessa doença. Entre os fatores que contribuem para disseminação do patógeno, encontram-se as chuvas moderadas freqüentes 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 (SINGH, 1991; PASTOR-CORRALES, 1985), de insetos e do próprio homem (PASTOR-CORRALES, 1985).

As perdas causadas pela antracnose podem chegar a 100% quando são empregadas sementes contaminadas em regiões onde prevaleçam condições ideais para o desenvolvimento da doença (PELOSO, 1992).

KELLY E YOUNG (1996) propuseram uma nomenclatura para designar os genes de resistência à antracnose, usando o símbolo *Co* (de *Colletotrichum*). Vários genes que conferem resistência á antracnose já foram identificados em diversos cultivares.

O gene *Co-2* (gene *Are*, pela antiga nomenclatura), presente no cultivar Cornell 49-242, foi intensivamente utilizado como fonte de resistência à antracnose. Outras fontes de resistência, como os cultivares Kaboon, Rio Tibagi, TO, TU, AB 136 e G 2333 (MENEZES & DIANESE, 1988a; TU, 1988; BALARDIN *et al.*, 1990), têm sido também utilizadas em diversos programas de melhoramento. O gene *Are*, entretanto, não fornece proteção contra diversos patótipos encontrados no Brasil (MENEZES & DIANESE, 1988b), inclusive o patótipo 89, encontrado em Minas Gerais (RAVA *et al.*, 1994). 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*), AB 136 (gene *Co-6*), G2333 (genes *Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) e Cornell 49-242 (*Co-2*). O cultivar Ouro Negro (Honduras 35), que é utilizado como fonte de resistência à ferrugem nesse programa, também tem se mostrado uma boa fonte de resistência à antracnose. Possuidor do gene *Co-10*, confere resistência a 14 dos 15 principais patótipos de *C. lindemuthianum* encontrados no Brasil (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a).

A mancha-angular, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, era considerada de pequena importância no passado, pois aparecia no final de ciclo da cultura, não causando grandes perdas. Entretanto, hoje é considerada de grande importância, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou safrinha nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (SARTORATO, 2001), podendo causar redução de até 70% na produção.

Temperaturas entre 16 e 28 °C, com ótimo em 24 °C, e alta umidade são condições favoráveis à infecção *P. griseola*. Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece-lhes a disseminação (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956).

Pensava-se, inicialmente, que o número de patótipos de *P. griseola* fosse baixo (ALVAREZ-AYALA & SCHWARTZ, 1979). Entretanto, estudos

recentes indicam que essa conclusão estava incorreta. Foram identificados 26 patótipos de *P. griseola* a partir de 72 isolados coletados no Brasil (NIETSCHE, 2000). 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). BARROS *et al.* (1957) observaram que em vários cruzamentos a resistência era recessiva e controlada por dois ou três genes independentes. Em outros casos, foi verificado que a resistência era monogênica e dominante (CARDONA-ALVAREZ, 1958). NIETSCHE *et al.* (1997) avaliaram diversas fontes potenciais de resistência no Estado de Minas Gerais, sendo México 54, AND 277 (possuidor do gene *Phg -1*), MAR 2 e Cornell 49-242 identificadas como as mais promissoras fontes de resistência aos principais patótipos do Estado. 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*.

3.3. Marcadores moleculares e piramidação de genes de resistência a patógenos.

Com o avanço na utilização de 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 precisa do grau de parentesco entre linhas ou populações pode auxiliar os melhoristas na obtenção de combinações genéticas mais favoráveis. Os marcadores moleculares tem sido utilizados no estabelecimento de filogenia, determinação de similaridade genética, estudos evolucionários, mapeamento de genes, piramidação de genes, dentre outros usos (FU *et al.*, 1993). Os marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA) tem sido utilizados em diversos programas de melhoramento do feijoeiro para a marcação de genes específicos e para estudos de caracterização de cultivares (variabilidade genética) (YOUNG *et al.*, 1998; ALZATE-

MARIN et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2003b). As informações geradas com o uso dos marcadores RAPD, juntamente com informações de caracteres agronômicos, podem ser usadas no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento.

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. 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, por causa da necessidade de realização de inoculações múltiplas e também devido a interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência, especialmente quando o cultivar já possui um gene que confere resistência a várias raças do patógeno (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, 1978). Apesar da piramidação de genes não ser uma idéia nova, não há muitos exemplos na literatura de suas aplicações no melhoramento de plantas. Uma possível explicação para este fato é a dificuldade encontrada no processo de combinação de diferentes genes de resistência via métodos tradicionais de melhoramento. Entretanto, 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 moléstias é aquela que permanece efetiva durante seu prolongado e amplo uso, em ambiente favorável ao desenvolvimento da moléstia. Segundo SCHAFFER 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 seqüencialmente 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 ser vencido pelo patógeno, ou seja, quanto maior o número de genes piramidados mais difícil será vencer a resistência.

Como auxílio aos programas de melhoramento, os marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) estão sendo usados no mapeamento de genes de resistência a importantes patógenos que causam doenças no feijoeiro. 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).

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 provenientes do cultivar Ouro Negro (FALEIRO *et al.*, 1997), os genes de resistência à antracnose *Co-6* e *Co-4*, dos cultivares AB 136 e TO, respectivamente (ALZATE-MARIN *et al.*, 1999), e o gene de resistência à mancha-angular da linhagem AND 277 (gene *Phg -1*) (CARVALHO *et al.*, 1998) para piramidação destes genes em um só cultivar. Vários marcadores RAPD foram identificados. RAGAGNIN *et al.* (1998) identificaram, no cultivar Ouro Negro, o marcador OPX11_{630a} ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 5,8 cM. CORRÊA (1999) identificou, também em Ouro Negro, dois marcadores SCAR mapeados a 4,3 cM (_{scar}F10_{1071a}) e 6,0 cM (_{scar}BA08_{530a}) do gene que confere resistência à ferrugem. ARRUDA (1998), trabalhando com

populações F₂ do cruzamento de Rudá x TO, verificou que o marcador OPY20_{830a} encontrava-se ligado ao gene *Co-4*, não apresentando recombinantes. MENARIM *et al.* (1998), trabalhando com uma população oriunda do cruzamento de AB 136 x Rudá, identificaram o marcador OPAZ20_{940a} ligado ao gene *Co-6* a uma distância de 7,4 cM. CARVALHO *et al.* (1998) verificaram que o marcador OPH13₄₉₀ está ligado em acoplamento ao gene *Phg-1* de resistência à mancha-angular presente na linhagem AND 277, a uma distância de 5,5 cM.

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

Outros exemplos de piramidação assistida por marcadores moleculares podem ser também observados em outras espécies cultivadas. HUANG *et al.* (1997) piramidaram quatro genes de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* no 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, os autores demonstraram que a combinação dos genes promoveram altos níveis de resistência aos isolados testados. Testes feitos no campo, em 31 ambientes, confirmaram as observações feitas em casa-de-vegetação.

3.4. Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares

O método dos retrocruzamentos é usado para a transferência de um ou mais genes de interesse de um genitor doador, para um genitor recorrente, sendo este normalmente um cultivar elite. O método consiste em recuperar os alelos do pai recorrente, além daqueles que estão sendo transferidos do parental doador.

No melhoramento visando resistência a doenças, este método, associado ao uso de marcadores moleculares, tem ajudado na seleção de indivíduos que possuem o gene desejado, dispensando a necessidade de

inoculações com patógenos, possibilitando assim seleção precoce. Além disso, com o uso dos marcadores moleculares, é possível selecionar, entre os indivíduos que carregam o gene desejado, aqueles que possuem a maior porção do genoma do parental recorrente, acelerando, assim, a recuperação do genoma do mesmo.

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por meio de retrocruzamento é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores (LANZA *et al.*, 2000). O uso de marcadores moleculares ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo introduzir dois ou mais genes de resistência, quando o fenótipo é de determinação complexa, ou quando o processo de avaliação requer destruição da planta (LANZA *et al.*, 2000). À medida que um grande número de marcadores associados a genes de resistência estiver disponível, o uso de marcadores moleculares na seleção assistida de genes de resistência será cada vez mais viável (MILACH & CRUZ, 1997).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-AYALA, G. & SCHWARTZ, H.F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.22, 1979.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB 136, TO and G2333. **Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Use of RAPD molecular markers for genetic variability studies in common bean. **Bean Improvement Cooperative**, 43:196-197, 2000.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G. de, 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. de, MOREIRA, M.A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agrícola**, v. 60, n.2, p.283-290, 2003b.
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão**

- do gene Co-4 no cultivar Rudá.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 101p. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- 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.
- BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia brasileira**, 15:243-245. 1990.
- BARROS, O., CARDONA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p.3, 1957.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J. C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v.46, n.11, p. 610-615, 1956.
- CARDONA-ALVAREZ, C. Herancia de la resistencia a la mancha angular em frijol. **Agron. Trop.**, v.18, n.11, p. 330-331, 1958.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G. de, 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. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- DEBOUCK, D. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van & VOYSESR, O.(eds.). **Common beans – Research for crop improvement.** Cali, CAB International, CIAT, p.55-118, 1993.
- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da**

- resistência no feijoeiro.** Viçosa, UFV, Imprensa Universitária. 1997. 65p. (Tese M.S.).
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., LOOS, R.A., CORRÊA, A.G.G., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Uso de marcadores RAPD na obtenção de linhas isogênicas de feijoeiro contrastantes para resistência à ferrugem. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p. 258, 1997 (Suplement).
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v.24, p. 166-169, 1999.
- FAO. Agriculture data. Disponível em: <<http://www.fao.org>.2003>. Acessado em janeiro de 2004.
- FU, Y.K., DEYNZE, V.A., PAULS, R.P. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**, [S.I.] CRC.1993. p.450.
- GRAFTON, K.F., WEISER, G.C., LITTLEFIELD, L.J. et al. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, v. 25, p. 537-539, 1985.
- HUANG, N., ANGELES, E. R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G. S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, n.3, p. 313-320, 1997.
- 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 **Ann. Rev. Phytopatology**, 22:309-330, 1984.
- KELLY, J.D., AFANADOR. L. & HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica** 82:207-212, 1995.

- LAJOLO, F.M., GEMOVESE, M.I., MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Eds.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: PATAFÓS, p. 23-56,1996.
- LANZA, M. A., GUIMARÃES, C. T. & SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário** (Belo Horizonte) 21:97-108, 2000.
- MENARIM, H.; ALZATE-MARIN, A. L.; BARROS, E. G. DE. & MOREIRA, M. A. Identificação de marcador molecular RAPD ligado ao gene de resistência Co-6 para antracnose do feijoeiro. **Rev. Bras. Genet.** v.21, n. 3, supplement, p. 184, 1998.
- MENEZES, J.R. & DIANESE, J.C. Resistance to races of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean cultivars grown in Brazil. **Fitopatologia brasileira.**, 13: 382-384. 1988a.
- MENEZES, J.R. & DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 78:650-655. 1988b.
- 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.**, v. 88, p. 9828-32, 1991.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, 27:685-689. 1997.
- MORA, N.O.A. **Variabilidade patogênica de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. no Brasil e o problema da identificação de raças fisiológicas.** Viçosa, UFV, Imprensa Universitária. 1986. 68p. (Tese M.S.).

- MOURA, P.A.M., PAIVA, B.M., RESENDE, L.M.A. Aspectos econômicos da cultura do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.67-72, 1994.
- NIETSCHE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. (Dissertação Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- 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.
- OLIVEIRA, E.J. de **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: M. López, F. Fernández & A. Schoonhoven (Eds.), *Frijol: Investigación y Producción*, PNUD-CIAT, Cali. 1985. p. 172-180.
- PEDERSEN, W.L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Ann. Rev. Phytopatology**, 26:369-378, 1988.
- PELOSO, M.J. Del. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PATOR-CORRALES, M. (Ed). **La antracnosis Del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, 1992. p. 86-108. (Doc de trabajo, 113)
- RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., FALEIRO, F.G., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G.de. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência do feijoeiro à ferrugem. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.3, p.389, 1998. (Suplement)
- 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. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1, 2001, Resumos. Goiânia: GO, 2001.CD-Room, Resumo 26.
- SANTOS, M.L., BRAGA, M.J. Aspectos econômicos. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**: Viçosa, Editora UFV, 1998. p. 10-53.
- 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., BRINK, M.A., NULAND, D.S., FRANC, G.D. (Ed.). **Dry Bean Production and Pest Management**. Fort Collins: Cooperative Extension Resources Center, 1996.106p.
- SINGH, S., Bean genetics. In: VAN SCHOONHEVEN, A., VOYSEST, O. (Eds). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB Internacional, 1991. p. 199-286.
- SINGH, S., SIDHU, J. S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H. S., KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p. 1011-1015, 2001.
- STAVELY, J.R. Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. **Phytopathology**, v.74, p. 339-344, 1984.
- STAVELY, J.R., GRAFTON, K.F. Genetics of resistance eight races of to *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris* cultivar México 235. **Phytopathology**, v.75, p. 1310, 1985 (Resumo).

- TU, J.C. Control of bean anthracnose caused by the delta and labda races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. **Plant Disease**, 72:5-8. 1988.
- VIEIRA, C. Resistência horizontal às doenças e diversidade genética no melhoramento do feijoeiro no Brasil. **Rev. Ceres**, 19:261-279. 1972.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, UFV. 1983, 231p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento de espécie cultivadas, Viçosa, MG: Editora UFV, p.273-349, 1999.
- YOUNG, R., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar G2333. **Theor. Appl. Genet**, v. 96, p.87-94, 1998.
- WEBSTER, D.M., AINSWORTH, P.M. Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap bean to *Uromyces appendiculatus*. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v.113, p. 938-940, 1988.

CAPÍTULO 1

REAÇÃO DO CULTIVAR DIAMANTE NEGRO AOS FUNGOS DA ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR E SUA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui o alimento protéico básico da população brasileira, a qual consome, em média, 17,2 kg/habitante/ano, o que torna o Brasil o maior consumidor de feijão do mundo (FAO,2003).

O brasileiro, nas diversas regiões do país, é exigente quanto à cor e tipo de grão, sendo o feijão de grão tipo carioca o mais consumido, com 79% das preferências, vindo em segundo lugar, o feijão de grão preto com 17%. O feijão preto é consumido principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo.

O Brasil é classificado também como o segundo maior produtor mundial de feijão, com uma produção média de 3 milhões de toneladas (FAO, 2003), porém, seu rendimento ainda é muito baixo, cerca de 600 kg/ha (IBGE, 2003). Esta produção tem sido suficiente para abastecer o mercado interno nos últimos quatro anos, com exceção do feijão preto que apresentou uma importação média de 100 mil toneladas/ano e os feijões branco e de cores com 50 mil toneladas/ano. Devido à baixa produção de feijão preto, o país perde mercado, tendo que abrir as portas

para o feijão argentino, que muitas das vezes faz com que haja a queda dos preços do feijão em geral.

Uma das principais razões destes rendimentos baixos é, sem dúvida, a alta incidência de doenças. O feijoeiro-comum é suscetível a inúmeras doenças fúngicas, bacterianas e viróticas. As doenças fúngicas de maior importância são a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*). Dentre as bacterioses, a de maior importância é o crestamento-bacteriano-comum (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) e dentre as viroses, o mosaico-comum do feijoeiro (BCMV).

Embora seja possível controlar quimicamente doenças como antracnose, ferrugem e mancha-angular, o uso de cultivar resistentes constitui-se numa alternativa simples e mais econômica para o controle das referidas doenças. No programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV foi observado que o cultivar Ouro Negro (Honduras 35) apresentou resistência a 14 patótipos de *U. appendiculatus* e a vários patótipos de *C. lindemuthianum* (FALEIRO, 1997; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003). Além do Ouro Negro, outras fontes de resistência à antracnose foram caracterizadas, dentre elas os cultivares TO (gene *Co-4*) e AB 136 (gene *Co-6*). Para a mancha-angular, foram caracterizadas como fontes de resistência, as linhagens AND 277, MAR 2, México 54, BAT 332 e Cornell 49-242.

De um modo geral, essas fontes de resistência não apresentam características agronômicas totalmente favoráveis, portanto esses genes de resistência só terão utilidade se transferidas para cultivares de maior aceitação comercial.

O Diamante Negro é um cultivar de grãos pretos, originário de cruzamento realizado no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, e selecionado pela EMBRAPA Arroz e Feijão. Possui alto potencial de produtividade, resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico comum e excelentes qualidades comerciais e culinárias (EMBRAPA, 1991). Contudo, não se tem conhecimento do seu comportamento quanto à antracnose, ferrugem e mancha-angular. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar

fenotipicamente o cultivar Diamante Negro quanto à reação às principais raças de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* disponíveis na micoteca do BIOABGRO/UFV, e, molecularmente (*fingerprint*), por meio de marcadores do DNA, comparando-o a outros cultivares de feijão de grãos pretos do banco de germoplasma do BIOAGRO/UFV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização fenotípica do Diamante Negro

O cultivar Diamante Negro foi caracterizado quanto à reação aos patógenos da antracnose, ferrugem e mancha-angular.

Quinze sementes de Diamante Negro juntamente com 15 sementes de uma testemunha resistente e uma testemunha suscetível, para cada doença e cada patótipo utilizado na inoculação, foram semeadas em vasos contendo 3 kg da mistura de solo e esterco (4:1) e adubada com NPK, de acordo com as necessidades da cultura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o momento das inoculações.

2.1.1. Reação a *Colletotrichum lindemuthianum*

Para avaliação da reação à *C. lindemuthianum*, foram utilizados os patótipos descritos na Tabela 1, caracterizados por RAVA *et al.* (1994).

Tabela 1 – Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizados na inoculação e suas origens.

Patótipo (nomenclatura binária)	Grupo/Patótipo (nomenclatura clássica)	Origem (Estado)	Testemunha resistente utilizada na caracterização	Testemunha suscetível utilizada na caracterização
55	DELTA/Lambda	PR	G 2333	Rosinha
64	MEXICANO I/Mexicano I	ES	G 2323	Rosinha
65	ALFA/Epsilon	BA	G 2333	Rudá
81	ALFA/Eta	PE	Ouro Negro	Rudá
87	DELTA/Mu	ES	Ouro Negro	Rudá
89	ALFA/Alfa BR	MG	Ouro Negro	Rudá
95	DELTA/Capa	RS	Ouro Negro	Rudá
102	GAMA/Gama	RS	Ouro Negro	Rudá
343	DELTA/Mu	MS	Ouro Negro	Rudá
453	BRASILEIRO I/Zeta	RS	Ouro Negro	Rudá

Fonte: RAVA *et al.* (1994).

O preparo do inóculo e a inoculação seguiram a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). Para a produção de conídios, o inóculo de cada patótipo foi multiplicado em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas, parcialmente imersas em meio ágar-água, e incubados por 10 dias à temperatura de 23 °C. A inoculação foi realizada 10 dias após o plantio, utilizando-se uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por oito dias em câmara de nevoeiro 20 ± 1 °C e umidade relativa > 95%), sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram avaliadas com base na escala de severidade de doença com graus de 1 a 9 conforme descrito 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 freqüência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas, 4- até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das

folhas, 5- maior freqüência 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. Além de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo, 9- maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.1.2. Reação a *Uromyces appendiculatus*

Para avaliação da reação à *U. appendiculatus*, foram utilizados os patótipos descritos na Tabela 2, identificados e classificados por FALEIRO *et al.* (1999).

Tabela 2 – Isolados de *Uromyces appendiculatus* utilizados na inoculação.

Patótipos	Testemunha resistente	Testemunha suscetível
32 ¹	Ouro Negro	US Pinto 111
45	Ouro Negro	US Pinto 111
46	Ouro Negro	US Pinto 111
47	Ouro Negro	US Pinto 111
49	Ouro Negro	US Pinto 111
50	Ouro Negro	US Pinto 111
52	Ouro Negro	US Pinto 111
54	Ouro Negro	US Pinto 111
58	Ouro Negro	US Pinto 111
59	Ouro Negro	US Pinto 111

¹ - Designação das raças fisiológicas classificadas pelo sistema simplificado (FALEIRO *et al.*, 1999).

As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação, para recuperar a viabilidade dos uredósporos. A

inoculação foi realizada quando as folhas primárias estavam com aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. Os uredósporos, na concentração de $2,0 \times 10^4$ esporos/mL, foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e aspergidos em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro (20 ± 1 °C e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram levadas novamente para a casa de vegetação (20 ± 5 °C), onde permaneceram até serem avaliadas.

Foi avaliada a frequência de infecção (FI) aos dezoito dias após a inoculação, determinando-se o número de pústulas/cm², e estimado o tamanho médio de pústulas (TMP), quando 50% das mesmas encontravam-se esporulando. Na avaliação dos sintomas foram considerados seis graus de severidade segundo escala proposta no “The Bean Rust Workshop”: 1- ausência de pústulas, 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro < 300 µm, 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300 a 499 µm, 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500 a 800 µm e 6- pústulas esporulando com diâmetro > 800 µm (STAVELY *et al.*, 1983). As plantas que apresentaram graus de 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis. O grau de severidade da doença foi determinado mediante observação visual das pústulas na face superior das folhas primárias, com auxílio, do diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985).

2.1.3. Reação a *Phaeoisariopsis griseola*

Para avaliação da reação à *P. griseola*, foram utilizados os patótipos descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Patótipos de *Phaeoisariopsis griseola* utilizados na utilizados.

Patótipo	Isolado	Origem	Testemunha resistente	Testemunha suscetível	Referência
31.17	97.2	Coimbra (MG)	AND 277	Rosinha	NIETSCHÉ, 1997
31.39	122.5	Lavras (MG)	AND 277	Rosinha	NIETSCHÉ, 2000
63.19	48.1	Coimbra (MG)	AND 277	Rosinha	NIETSCHÉ, 2000
63.21	592.3	Coimbra (MG)	AND 277	Rosinha	SILVA, 2003
63.23	158.1	Goiânia (GO)	AND 277	Rosinha	NIETSCHÉ, 2000
63.55	29.2	Lambari (MG)	AND 277	Rosinha	NIETSCHÉ, 2000

O inóculo de cada patótipo foi reproduzido em placas de Petri contendo meio V8. A inoculação foi realizada após o aparecimento da primeira folha trifoliolada em ambas as superfícies da folha com uma suspensão do patógeno, previamente preparada e ajustada para a concentração de 2×10^4 conídios/mL. Os procedimentos de inoculação e transferência para a câmara de nevoeiro e para a casa de vegetação foram idênticos aos realizados no ensaio de ferrugem. A severidade da doença foi avaliada visualmente entre os 18 e 25 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 sem esporulação do patógeno; 3- presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4- presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5- presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9- sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e

morte da planta. As plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.2. Caracterização molecular do Diamante Negro

Para a caracterização molecular (*fingerprint*) do cultivar Diamante Negro e análise de agrupamento, foram utilizados como referências os seguintes cultivares de grãos pretos encontrados no Banco de Germoplasma do BIOAGRO/UFV: Ica Pijão, Costa Rica, Milionário 1732, Preto 60 dias, Rio Tibagi, Venezuela 350, Porrillo Sintético, Caraota 260, Puebla 152, Ouro Negro, Cornell 49-242, Rico 1735, Meia Noite, CNF 9287, B 98311 e Preto Jamapa. Todos são de origem mesoamericana, com exceção do Preto 60 dias que é de origem andina. O cultivar Rudá, apesar de apresentar grão tipo carioca, também foi inserido na caracterização por ser um importante genitor do programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

2.2.1. Extração de DNA

As folhas de cada cultivar foram coletadas e armazenadas a -80°C até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995).

2.2.2. Análise de RAPD

Amostras de DNA dos cultivares foram amplificadas pela técnica de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), de acordo com ALZATE-MARIN *et al.* (2001). Foram utilizados *primers* da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA) tomados ao acaso.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 μl , contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, 100 μM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μM de um *primer*, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e,

aproximadamente, 30 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 realizada 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 durante um período de cerca de 3 h, a 110 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.2.3. Avaliação de distâncias genéticas e análise de agrupamento

O registro de dados foi feito a partir das bandas polimórficas detectadas entre os cultivares. Foi gerada uma matriz de valores binários, onde a codificação (0) significou ausência e (1) presença da banda.

As estimativas de dissimilaridade genética (D_{ij}) foram feitas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973) :

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} = 1 - \frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{b + c}{a + b + c + d}$$

em que:

S_{ij} = coeficiente de similaridade;

a = número de encontros 1,1;

b = número de encontros 1,0;

c = número de encontros 0,1;

d = número de encontros 0,0.

Os valores de dissimilaridade genética foram organizados em matrizes, que foram empregadas na análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo. As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Reação do Diamante Negro aos patógenos da antracnose, ferrugem e mancha-angular

Os resultados da avaliação da reação do cultivar Diamante Negro à *C. lindemuthianum* são apresentados na Tabela 4. Dos dez patótipos testados, o Diamante Negro se comportou como resistente a sete deles (patótipos 55, 64, 87, 95, 102, 343 e 453), sendo suscetível somente aos patótipos 65, 81 e 89.

Em relação à resistência aos patótipos 55, 87, 95 e 343, o Diamante Negro apresentou plantas resistentes e suscetíveis, indicando que esse cultivar não é um material genético puro no loco gênico que confere resistência a esses patótipos, ou seja, é um cultivar segregante em locos de resistência à antracnose, comportando-se como uma multilinha. Isto indica que este material não deve ser recomendado como fonte de resistência para estes patótipos. RAGAGNIN *et al.* (2003), encontraram resultados semelhantes em relação à resistência a alguns patótipos nos cultivares Rudá e Ouro Negro.

Apesar do Diamante Negro ter demonstrado um bom espectro de resistência à *C. lindemuthianum*, os patótipos 65, 81 e 89, para os quais ele foi suscetível, são os observados com maior frequência no estado de Minas Gerais (RAVA *et al.*, 1994). Portanto, dependendo da região onde for plantado, pode ser severamente atacado por este patógeno.

Tabela 4- Reação do cultivar Diamante Negro à *C. lindemuthianum*.

Patótipo	Nº de indivíduos resistentes	Nº de indivíduos suscetíveis	Reação
55	9	3	R
64	12	0	R
65	0	13	S
81	0	10	S
87	11	3	R
89	3	8	S
95	10	2	R
102	15	0	R
343	10	3	R
453	12	0	R

R= resistente e S= suscetível.

Diante destes resultados, observa-se que o cultivar Diamante Negro deve ser melhorado quanto à resistência à antracnose. Uma das estratégias para esta melhoria seria a introgressão de genes de resistência conhecidos, presentes em outros cultivares, visando aumentar o seu espectro de resistência. Alguns cultivares podem ser utilizados como excelente fonte de resistência, como é o caso do cultivar TO (gene *Co-4*) e AB 136 (gene *Co-6*), que mostraram-se resistentes a 17 e 18 patótipos de *C. lindemuthianum*, respectivamente, dentre os 18 patótipos testados por RAGAGNIN *et al.* (2003) no Brasil. O cultivar TO foi suscetível apenas ao patótipo 343. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que o cultivar Ouro Negro (gene *Co-10*) também se apresenta como boa fonte de resistência à antracnose, sendo resistente a 10 patótipos de *C. lindemuthianum* dentre os 18 testados, porém, apresentou suscetibilidade ao patótipo 65, ao qual Diamante Negro também é suscetível. O cultivar G2333 também é uma ótima opção de fonte doadora de genes de resistência, pois possui os genes *Co-4*², *Co-5* e *Co-7* (YOUNG *et al.*, 1998), conferindo resistência a todos os patótipos de *C. lindemuthianum* encontrados no Brasil (ALZATE-MARIN *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados da avaliação da reação do Diamante Negro à *U. appendiculatus*, apresentados na Tabela 5, observa-se que o cultivar comportou como suscetível a todos os dez patótipos. FALEIRO *et*

al. (2001a), verificando a reação de diversos cultivares de feijão à *U. appendiculatus*, observaram que o Diamante Negro foi suscetível as cinco patótipos utilizados (45, 46, 47, 52 e 58), confirmando o presente resultado.

Tabela 5- Reação do cultivar Diamante Negro à *U. appendiculatus*.

Patótipos	FI*	TMP **	Reação
32	11	4,8	S
45	17	6,0	S
46	8	6,0	S
47	16	4,8	S
49	15	6,0	S
50	19	6,0	S
52	11	3,8	S
54	25	4,6	S
58	20	6,0	S
59	21	5,0	S

*FI = Frequência de infecção; ** TMP = tamanho médio das pústulas, S = suscetível.

A ferrugem é uma doença distribuída em todo território brasileiro e, quando presente, pode causar grandes prejuízos aos produtores. Desta forma, os cultivares plantados nas diversas regiões do país, devem apresentar pelo menos um certo nível de resistência a esta doença. O Diamante Negro é um cultivar de grande aceitação comercial, sendo plantado em diversas regiões do país. Pelos dados aqui obtidos, o plantio do Diamante Negro não é recomendado naquelas regiões onde a incidência de ferrugem é alta.

Uma estratégia para solucionar este problema é incluir o cultivar Diamante Negro em programas de melhoramento, visando a transferência de genes de resistência à ferrugem para o mesmo. O cultivar Ouro Negro apresentou resistência a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados por FALEIRO *et al.* (1999) e RAGAGNIN *et al.* (2003), destacando-se como importante fonte doadora de genes de resistência à ferrugem. Além disso, CORRÊA (1999) mostrou que a resistência à ferrugem, presente em Ouro Negro, é conferida por um bloco gênico e, por meio da técnica de inoculações seqüenciais, com os patótipos 73 e 89 de *C.*

lindemuthianum e os patótipos 46, 49, 50, e 59 de *U. appendiculatus*, demonstrou que os genes de resistência a estes patógenos estão ligados a uma distância de 12,3 cM. Deste modo, o cultivar Ouro Negro se mostra como uma excelente fonte doadora de genes de resistência à ferrugem e antracnose, possíveis de serem utilizados nos programas de melhoramento.

Outras fontes de resistência à ferrugem também podem ser utilizadas como doadoras de genes de resistência para o Diamante Negro, como é o caso dos cultivares Belmidak RR-3 e o cultivar México 309. O cultivar Belmidak RR-3 (gene *Ur-11*) demonstrou resistência aos quatro patótipos de *U. appendiculatus* (45, 46, 49 e 52) testados por FALEIRO *et al.* (2001b). A cultivar México 309 (gene *Ur-5*) a *U. appendiculatus*, comportando-se como resistentes a 73 deles (PASTOR-CORRALES, 2001).

Verificando a reação do cultivar Diamante Negro à *P. griseola*, pode-se observar que este cultivar apresenta baixa resistência a esta doença. Dos seis patótipos testados, o Diamante Negro mostrou-se suscetível a quatro (31.17, 63.19, 63.23 e 63.55), resistente a um (63.21) e segregou quanto à reação ao patótipo 31.39 (Tabela 6).

Tabela 6 - Reação do cultivar Diamante Negro à *P. griseola*.

Patótipo	Isolado	Nº de indivíduos resistentes	Nº de indivíduos suscetíveis	Reação
31.17	97.2	0	12	S
31.39	122.5	12	1	R
63.19	48.1	0	13	S
63.21	592.3	15	0	R
63.23	158.1	0	12	S
63.55	29.2	0	14	S

R= resistente e S= suscetível

Esta é uma doença que, quando aparece no início do ciclo da cultura, pode causar uma redução de até 70% na produtividade (SARTORATO, 2001). Assim, devemos preocupar com a resistência desta doença nos diversos cultivares recomendados para plantio. Da

mesma forma que a antracnose e ferrugem, genes de resistência à mancha-angular também devem ser introduzidos no cultivar Diamante Negro, visto que é um cultivar amplamente difundido nas áreas de produção de feijão.

Dentre as fontes de resistência à mancha-angular, pode-se citar a linhagem AND 277 (fonte do gene *Phg-1*), que comportou-se como resistente a quatro patótipos de *P. griseola* testados por RAGAGNIN *et al.* (2003), sendo considerada uma boa fonte de resistência de origem andina a ser utilizada em programas de melhoramento (NIETSCHE, 1997; CARVALHO *et al.*, 1998). CAIXETA (2002), por meio de testes de alelismo entre várias fontes de resistência à mancha-angular (Cornell 49-242, México 54, MAR 2, BAT 332 e AND 277), demonstrou que AND 277 possui três genes de resistência que, ao contrário do esperado, não segregaram com relação a genes de resistência presentes em cultivares mesoamericanos, sugerindo a possibilidade da presença de genes mesoamericanos nesta linhagem. Esta condição híbrida é uma vantagem, pois facilita o cruzamento desta linhagem andina com cultivares mesoamericanos sem a incompatibilidade típica de cruzamentos entre indivíduos destes dois grupos. No mesmo trabalho, a autora demonstrou que o cultivar Cornell 49-242 possui apenas um gene dominante, denominado de *Phg-3*; México 54 possui três genes denominados de *Phg-2*, *Phg-5*, *Phg-6*; MAR 2 apresenta dois genes designados *Phg-4* e *Phg-5*² e o BAT 332 possui a forma alélica *Phg-6*². Além do AND 277, estes cultivares são excelentes fontes de resistência à mancha-angular, constituindo-se em potenciais genitores em programas de melhoramento visando resistência a mancha-angular.

Diante dos resultados encontrados e discutidos acima, constatou-se uma clara necessidade de introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar Diamante Negro.

3.2. Caracterização molecular do cultivar Diamante Negro

Na caracterização molecular do Diamante Negro, foram utilizados 78 *primers* decâmeros que geraram pelo menos uma banda polimórfica

entre os dezoito cultivares analisados (17 pretos e o cultivar Rudá). Estes *primers* geraram 265 produtos de amplificação (bandas de DNA), com uma média de 3,4 bandas por *primer*. Destas, 146 bandas foram polimórficas (1,9 bandas por *primer*), ou seja, apresentaram polimorfismo para pelos menos dois cultivares analisados, e 119 bandas foram monomórficas (1,5 bandas por *primer*).

A Figura 2 mostra o padrão de amplificação obtido com os *primers* OPAC19 (A) e OPBE03 (B), ilustrando a variabilidade (bandas polimórficas e bandas monomórficas) entre os cultivares analisados.

Com base nos resultados obtidos nas análises de RAPD, relativos à presença e ausência das 265 bandas de DNA nos 18 cultivares, foram determinadas as distâncias genéticas entre eles (Tabela 7); essas distâncias genéticas situaram-se entre 6,42 a 35,47%.

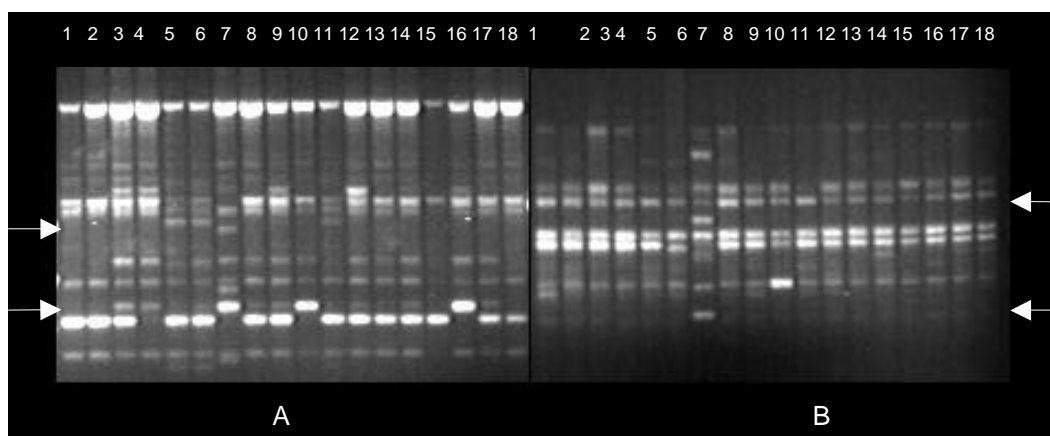


Figura 2- Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA de cultivares de feijão-comum, com os *primers* OPAC19 (A) e OPBE03 (B). Os cultivares analisados foram: Rudá (1), Cornell 49-242 (2), Diamante Negro (3), Ouro Negro (4), Rio Tibagi (5), Caraota 260 (6), Preto 60 dias (7), Milionário 1732 (8), Venezuela 350 (9), Puebla 152 (10), Porrillo Sintético (11), Ica Pijão (12), Rico 1735 (13), Meia Noite (14), Jamapa (15), CNF 9287 (16), B 98311 (17) e Costa Rica (18). As setas indicam bandas polimórficas.

De posse destas distâncias, foi possível fazer uma análise de agrupamento pelo Método do Vizinho mais próximo e a construção de um

dendrograma (Figura 3), com as distâncias relativas. Três grupos puderam ser distinguidos: um contendo o cultivar Preto 60 dias, outro o cultivar Rudá e o terceiro, com todos os outros cultivares de grãos pretos analisados.

As maiores distâncias genéticas obtidas foram entre pares de cultivares dos *pools* gênicos andino e mesoamericano, sendo a maior delas de 35,47%, que foi observada entre os cultivares Preto 60 dias (andino) e Porrilho Sintético (mesoamericano). As menores distâncias foram observadas entre cultivares pertencentes ao mesmo *pool* gênico e com a mesma cor de grão, variando de 21,51 a 6,42%, entre os cultivares CNF 9587 e Caraota 260 e Diamante Negro e Ouro Negro, respectivamente.

O feijão-comum foi domesticado independentemente em dois centros principais, América Central e México e no sul dos Andes (GEPTS & DEBOUCK, 1991). Múltiplos eventos de domesticação nos dois centros levou à formação de dois conjuntos gênicos (*pools* gênicos) principais, um Mesoamericano e um Andino, dentro das quais, forças evolutivas têm resultado em significantes mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas (GEPTS & DEBOUCK, 1991; SINGH, 1992). Por esse motivo, as distâncias genéticas entre os cultivares andinos e mesoamericanos tendem a ser maiores. VASCONCELOS *et al.* (1996), em seus estudos de variabilidade genética entre 28 cultivares de feijão-comum pelo uso de marcadores moleculares RAPD, observaram uma clara separação dos cultivares em dois grandes grupos, um contendo os cultivares andinos e o outro contendo os cultivares mesoamericanos. Resultados semelhantes também foram observados por FRANCO *et al.* (2001) que, por meio de marcadores moleculares RAPD, verificaram a diversidade entre 19 cultivares de feijão-comum, encontrando também a formação de dois grandes grupos, um de cultivares andinos e outro de mesoamericanos.

Tabela 7- Matriz de distâncias genéticas (%) entre os cultivares de feijão, analisados dois a dois, obtidas pelo método de complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples

	Rudá	Diamante Negro	Cornell 49-242	Ouro Negro	Rio Tibagi	Caraota 260	Preto 60dias	Milionário 1735
Rudá	0,00							
Diamante Negro	28,11	0,00						
Cornell 49-242	15,85	8,30	0,00					
Ouro Negro	20,75	6,42	10,94	0,00				
Rio Tibagi	13,96	16,98	13,21	18,11	0,00			
Caraota 260	15,09	18,11	17,36	19,25	9,43	0,00		
Preto 60dias	31,32	26,79	28,30	30,19	33,21	34,34	0,00	
Milionário 1735	17,74	14,72	13,96	14,34	12,83	13,96	31,70	0,00
Venezuela 350	15,47	14,72	14,72	17,36	12,08	15,47	31,70	9,06
Puebla 152	16,23	10,19	13,96	12,83	17,36	18,49	29,43	12,83
Porrillo Sintético	17,74	16,23	12,45	16,60	9,06	12,45	35,47	12,83
Ica Pijão	16,23	11,70	13,21	14,34	12,08	16,23	29,43	9,81
Rico 1735	14,72	10,19	13,21	14,34	14,34	15,47	31,70	11,32
Meia Noite	19,25	11,70	13,21	11,32	14,34	18,49	30,19	12,83
Jamapa	16,60	11,32	10,57	15,47	15,47	14,34	30,57	16,98
CNF 9287	20,00	10,19	13,96	11,32	17,36	21,51	30,94	13,58
B 98311	18,87	12,83	10,57	12,45	13,21	18,87	32,08	8,68
Costa Rica	14,72	10,94	12,45	13,58	15,09	16,23	27,92	12,08

Tabela 7- continua...

	Venezuela 350	Puebla 152	Porrillo Sintético	Ica Pijão	Rico 1735	Meia Noite	Jamapa	CNF 9287	B 98311	Costa Rica
Venezuela 350	0,00									
Puebla 152	11,32	0,00								
Porrillo Sintético	12,83	15,09	0,00							
Ica Pijão	8,30	12,08	12,08	0,00						
Rico 1735	12,08	10,57	13,58	9,81	0,00					
Meia Nnoite	14,34	12,83	14,34	13,58	11,32	0,00				
Jamapa	14,72	14,72	16,23	13,21	12,45	15,47	0,00			
CNF 9287	12,83	10,57	17,36	12,08	12,83	14,34	14,72	0,00		
B 98311	11,70	11,70	12,45	10,19	10,19	8,68	15,85	11,70	0,00	
Costa Rica	13,58	10,57	15,85	12,08	9,81	11,32	13,96	12,08	10,19	0,00

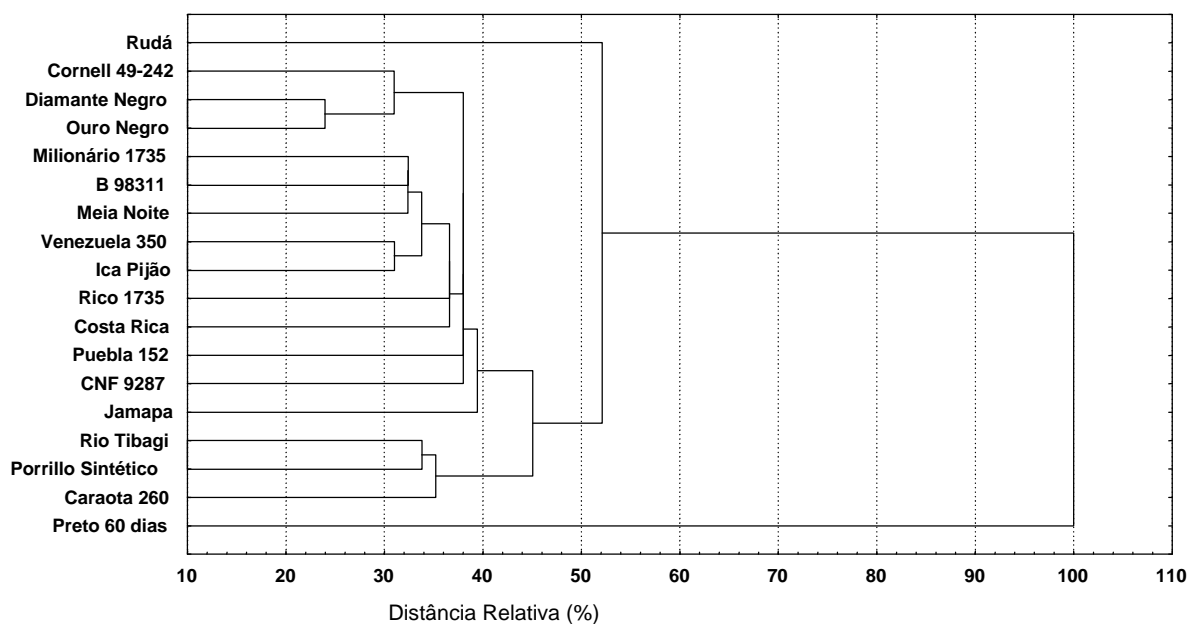


Figura 3 - Análise de agrupamento (dendrograma) de cultivares de feijão dos grupos preto e carioca (Rudá), obtida por meio do método do vizinho mais próximo.

Comparando somente as distâncias entre os cultivares Diamante Negro e Rudá e os demais cultivares de grãos pretos, que foi um dos objetivos do trabalho, pode-se observar que as distâncias variaram entre 6,42 e 26,79% (Tabela 7). A maior distância verificada (26,79%) foi entre Diamante Negro e Preto 60 dias. Este fato já era esperado uma vez que Preto 60 dias é um cultivar de origem andina e o Diamante Negro é mesoamericano. A menor distância encontrada (6,42%) foi entre os cultivares Diamante Negro e Ouro Negro. A proximidade entre esses dois cultivares é uma vantagem em programas de melhoramento por retrocruzamentos em que se deseja recuperar as características do parental recorrente tão rápido quanto possível. Desta forma, como foi discutido no item anterior, além do cultivar Ouro Negro ser uma excelente fonte de genes de resistência à antracnose e ferrugem, é também mais próximo do Diamante Negro, sendo, portanto, uma opção viável e rápida para transferência de seus genes de resistência para o Diamante Negro por meio de retrocruzamentos.

O cultivar Rudá apresentou-se a uma distância de 28,11% do Diamante Negro. Esta é uma distância relativamente grande e, um dos

motivos para isto, se deve ao fato do Rudá pertencer ao grupo de grão tipo carioca, enquanto o Diamante Negro possui grãos pretos. Aliás, este poderá ser também o motivo foi pelo qual o Rudá apresenta altas distâncias em relação aos demais cultivares, que também são de grão preto. Cruzamentos entre o Diamante Negro e o Rudá devem proporcionar alta variabilidade, fato que é geralmente desejado pelos melhoristas. Porém, a existência de diversidade genética detectada por marcadores de DNA não é garantia de alta correlação com o desempenho do híbrido e de variabilidade para características de interesse agrônomo nas populações segregantes (BERNARDO, 1992).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar fenotipicamente o cultivar Diamante Negro quanto à reação às principais raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola* disponíveis na micoteca do BIOAGRO/UFV e molecularmente, por meio de marcadores do DNA (*fingerprint*), comparando-o a outros cultivares de feijão de grãos pretos do banco de germoplasma do BIOAGRO/UFV. Para a caracterização fenotípica, conduziram-se inoculações artificiais de 10 patótipos de *C. lindemuthianum*, 10 patótipos de *U. appendiculatus* e 6 patótipos de *P. griseola*. Para a caracterização molecular, amostras de DNA dos 18 cultivares (Diamante Negro, Rudá e 16 outros cultivares pretos) foram extraídas, quantificadas e amplificadas pela técnica de RAPD. Os iniciadores (*primers*) foram tomados ao acaso. Os produtos de amplificação polimórficas entre pelo menos dois cultivares foram utilizados para construir uma matriz de presença e ausência de bandas de DNA, que foi usada para o cálculo das distâncias genéticas entre os cultivares, por meio do complemento aritmético do coeficiente de coincidência simples. A análise de agrupamento dos cultivares foi feita a partir da matriz de distâncias genéticas, pelo método do vizinho mais próximo.

Na avaliação de resistência/suscetibilidade, o cultivar Diamante Negro se mostrou suscetível a três (65, 81 e 89) patótipos de *C. lindemuthianum*, resistente homocigoto a três (64, 102 e 453) e resistente, mas segregante, a quatro (55,87, 95 e 342). Para os 10 patótipos avaliados de *U. appendiculatus*, o Diamante Negro comportou-se como suscetível a todos eles. Já para os patótipos de *P. griseola*,

Diamante Negro foi suscetível a quatro (31.17, 63.19, 63.23 e 63.55) e resistente somente a dois (31.39 e 63.21).

Diante destes resultados, pode-se concluir que o cultivar Diamante Negro é fracamente resistente à antracnose, ferrugem e mancha-angular, necessitando da transferência de genes de resistência oriundos de outros cultivares.

Na caracterização molecular, 78 *primers* foram testados, e destes, todos apresentaram bandas polimórficas entre pelo menos dois cultivares. Os *primers* geraram 265 bandas, sendo 146 polimórficas e 119 monomórficas. A partir destes dados foi construída uma matriz de distância genética entre os cultivares. A distância variou de 35,47 a 6,42%, sendo a maior entre os cultivares Preto 60 dias (único material andino testado) e Porrilho Sintético, e a menor, entre Diamante Negro e Ouro Negro. As maiores distâncias foram observadas entre cultivares mesoamericanos e andino, e as menores entre os cultivares mesoamericanos com a mesma cor de grão. Comparando somente as distâncias do Diamante Negro com os demais cultivares pretos, a maior foi verificada em relação ao Preto 60 dias (26,79%) e a menor com o Ouro Negro (6,42%). O Rudá mostrou-se a uma distância de 28,11% do Diamante Negro. Na análise de agrupamento, três grupos foram formados: um contendo o Preto 60 dias (andino), um contendo o Rudá (mesoamericano-carioca) e um contendo os demais cultivares (mesoamericanos-pretos).

O fato do cultivar Ouro Negro estar muito próximo do Diamante Negro e ser uma excelente fonte doadora de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, o habilita como um excelente progenitor doador em programas de melhoramento que tem como objetivo a transferência de genes por retrocruzamentos para o cultivar Diamante Negro. Em cruzamentos com o Rudá, poderá se observar uma maior variabilidade, visto que a diversidade genética é maior, o que poderá ser de interesse ao programa de melhoramento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18:265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:125-133, 2001.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., ARRUDA, K.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003.
- BERNARDO, R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 628-634, 1992.
- 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., NIETSCHE, S., BARROS, E.G. de, 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 standas para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol. Cali, Colombia: CIAT, 1985. 22p.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CRUZ, C.D. **GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- EMBRAPA Arroz e Feijão <[www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão/Dnegro](http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão/Dnegro.htm)>htm
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., LOOS, R.A., CORRÊA, A.G.G., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Uso de marcadores RAPD na obtenção de linhas isogênicas de feijoeiro contrastantes para resistência à ferrugem. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p. 258, 1997.(Suplement).
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v.24, p. 166-169, 1999.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHE, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha-angular em condições de casa de vegetação **Fitopatologia brasileira**, v.26, p. 86-89, 2001a.

- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., STAVELY, J.R., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 77-80, 2001b.
- FAO. Agriculture data. Disponível em:<<http://www.fao.org>.2003>. Acessado em janeiro de 2004.
- FRANCO, M.C., CASSINI, S.T.A., OLIVEIRA, V.R., TSAI, S.M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.36, n.2, p. 381-385, 2001.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford : CAB/CIAT, 1991. p. 7-53.
- 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.
- NIETSCHE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária. 1997. 47p. (Tese M.S.).
- NIETSCHE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. (Dissertação Doutorado). 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* com el frijol comum em América Latina** 19:15-22. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M.A. The reaction of 19 bean rust differential cultivares to 94 races de *Uromyces appendiculatus* and the implication for the development of rust resistance cultivars. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 44, p. 103-104, 2001.
- 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**, v.19, p. 95-118, 1975.
- RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G.de Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.6, p.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.
- SARTORATO, A. **Resistência do feijoeiro comum à mancha-angular**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1, 2001, Resumos.Goiânia: GO, 2001.CD-Room, Resumo 25.
- SILVA, M.G.de M.; SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identificação de raça de um isolado de *phaeoisariopsis griseola* por meio de inoculação em série diferenciadora. **XIII Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Viçosa**, p.160, 2003.
- SINGH, S. P. Common bean improvement in the Tropics. JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. New York : J. Wiley, p. 199-269, 1992.

- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.26, p. 4-6, 1983.
- VASCONCELOS, M., J. V.; BARROS E., G.; MOREIRA, M., A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19,p. 447-451, 1996.
- 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**, v. 96, p.87-94, 1998.

CAPÍTULO 2

INTROGRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR NO CULTIVAR DIAMANTE NEGRO

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui elemento básico na alimentação da maioria da população brasileira, sendo o seu consumo médio anual *per capita* de cerca de 17,2 kg (FAO, 2003). Com isso, é de interesse que as instituições de pesquisa voltem sua atenção para a cultura, para assegurar bons níveis de produção, que possam atender a demanda nacional.

A maioria dos cultivares comerciais de feijão apresenta características agronômicas desejáveis e boa aceitação pelos consumidores. No entanto, algumas doenças causam severas perdas à cultura do feijoeiro. Estratégias de melhoramento estão sendo utilizadas para incorporar resistência a uma série de patógenos que atacam esta cultura, bem como tornar a resistência mais duradoura. A resistência genética é um importante componente no manejo integrado de pragas e doenças por ser uma tecnologia de baixo custo e, conseqüentemente, fácil de ser adotada pelos agricultores. Além disso, reduz a poluição do meio ambiente causada pelo uso indiscriminado de defensivos agrícolas contribuindo, assim, para a manutenção da qualidade de vida no planeta.

A possibilidade de introduzir um conjunto de genes de resistência para um ou mais patógenos (piramidação de genes) no mesmo cultivar, com o objetivo de aumentar a durabilidade e o espectro de resistência a

doenças, tem despertado grande interesse dos programas de melhoramento. A piramidação de genes de resistência é geralmente muito difícil, ou mesmo impraticável, utilizando apenas as técnicas do melhoramento convencional devido às dificuldades advindas do uso de inoculações múltiplas com vários patótipos e das interações epistáticas entre os vários genes de resistência. Porém, esta dificuldade pode ser superada com o uso de marcadores do DNA ligados aos genes de resistência, o que possibilita a identificação precisa dos genótipos contendo os genes desejados. Desse modo, seleção assistida por marcadores moleculares de DNA constitui-se numa ferramenta importante visando piramidação de genes (MILACH e CRUZ, 1997).

Em trabalhos preliminares do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, foi realizada a caracterização de genes de resistência à antracnose, genes *Co-6* e *Co-4* dos cultivares AB 136 e TO (ALZATE-MARIN *et al.*, 1999); à ferrugem, genes provenientes do cultivar Ouro Negro (FALEIRO *et al.*, 1997); e à mancha-angular, gene *Phg -1* da linhagem AND 277 (CARVALHO *et al.*, 1998). Simultaneamente, foram identificados marcadores moleculares ligados a esses genes. Em seguida, num processo assistido por marcadores moleculares, foram produzidas linhagens contendo, individualmente, pelo menos um dos referidos genes. Essas linhagens foram intercruzadas e isolinhas contendo simultaneamente genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, foram criadas. O genoma recuperado nas isolinhas foi o do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, que é bem aceito comercialmente.

Uma segunda etapa do programa do BIOAGRO/UFV consiste na transferência dessa pirâmide de genes, conferindo resistência a vários patógenos, para cultivares comerciais. Assim, o objetivo deste trabalho relatado neste capítulo foi introgridir genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, já piramidados em uma isolinha do cultivar Rudá (Rudá "R"), para o cultivar Diamante Negro, que apresenta grãos pretos, excelentes características agronômicas, resistência à cretamento-bacteriano-comum e boa aceitação comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético, cruzamentos e seleção

A isolinha, denominada de Rudá “R”, utilizada como genitor doador dos genes de resistência no processo de retrocruzamento, foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Esta isolinha é proveniente do intercruzamento de quatro outras isolinhas de Rudá desenvolvidas pelo programa (Tabela 1). Possui grão do tipo carioca e contém os genes de resistência à ferrugem (*Ur-?*, proveniente de Ouro Negro), à antracnose (*Co-6*, proveniente de AB 136 e *Co-4*, proveniente de TO) e à mancha-angular (*Phg -1*, proveniente de AND 277).

Tabela 1 - Isolinhas com *background* Rudá utilizadas para gerar a isolinha Rudá “R”, com resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Isolinha	Genealogia	Patógeno (Doença)	Gene de Resistência	Fonte de Resistência
ON-25-99	Rudá/Ouro Negro	Ferrugem	<i>Ur-?</i>	Ouro Negro
T0-41-5-2-5	Rudá/TO	Antracnose	<i>Co-6</i>	TO
AB-74-1-18	Rudá/AB 136	Antracnose	<i>Co-4</i>	AB 136
AN-7-2-9-7-10	Rudá/AND 277	Mancha-angular	<i>Phg-1</i>	AND 277

O genitor recorrente usado no processo foi o Diamante Negro, um cultivar pertencente ao grupo comercial preto, originário de cruzamento

realizado no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, e selecionado pela EMBRAPA Arroz e Feijão. Possui alto potencial de produtividade, resistência ao crestamento-bacteriano-comum, mosaico comum e excelentes qualidades comerciais e culinárias (EMBRAPA, 1991).

Inicialmente os cruzamentos foram realizados entre Ruda “R” e Diamante Negro. A verificação dos cruzamentos foi feita por meio de inoculação. As sementes F_1 (Diamante Negro x Ruda “R”) foram semeadas em condições controladas e as plantas inoculadas com o patótipo 63.23 (isolado 158.1) de *P. griseola*, ao qual Diamante Negro é suscetível e Ruda “R” resistente. As plantas F_1 selecionadas como resistentes, ou seja, provenientes do cruzamento, foram retrocruzadas com Diamante Negro.

As sementes F_1RC_1 foram inoculadas com os patógenos causadores da antracnose (patótipo 65), ferrugem (mistura dos patótipos 32, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 54, 58 e 59) e mancha-angular (patótipo 63.23), utilizando uma metodologia seqüencial de inoculação (CORRÊA, 1999). Amostras de DNA das plantas selecionadas como resistentes às três doenças foram extraídas e amplificadas com marcadores moleculares ligados aos genes de resistência previamente identificados e testados (Tabela 2). As plantas selecionadas para o retrocruzamento seguinte foram aquelas que apresentaram resistência às três doenças e que possuíam pelo menos quatro marcas ligadas aos genes de resistência (Tabela 2).

A seleção no segundo retrocruzamento foi feita somente com base nos marcadores moleculares. Amostras de DNA das plantas F_1RC_2 foram extraídas e amplificadas com marcadores moleculares ligados a genes de resistência utilizados no primeiro retrocruzamento. As plantas selecionadas para o terceiro retrocruzamento foram aquelas que apresentaram pelo menos quatro marcas ligadas aos genes de resistência.

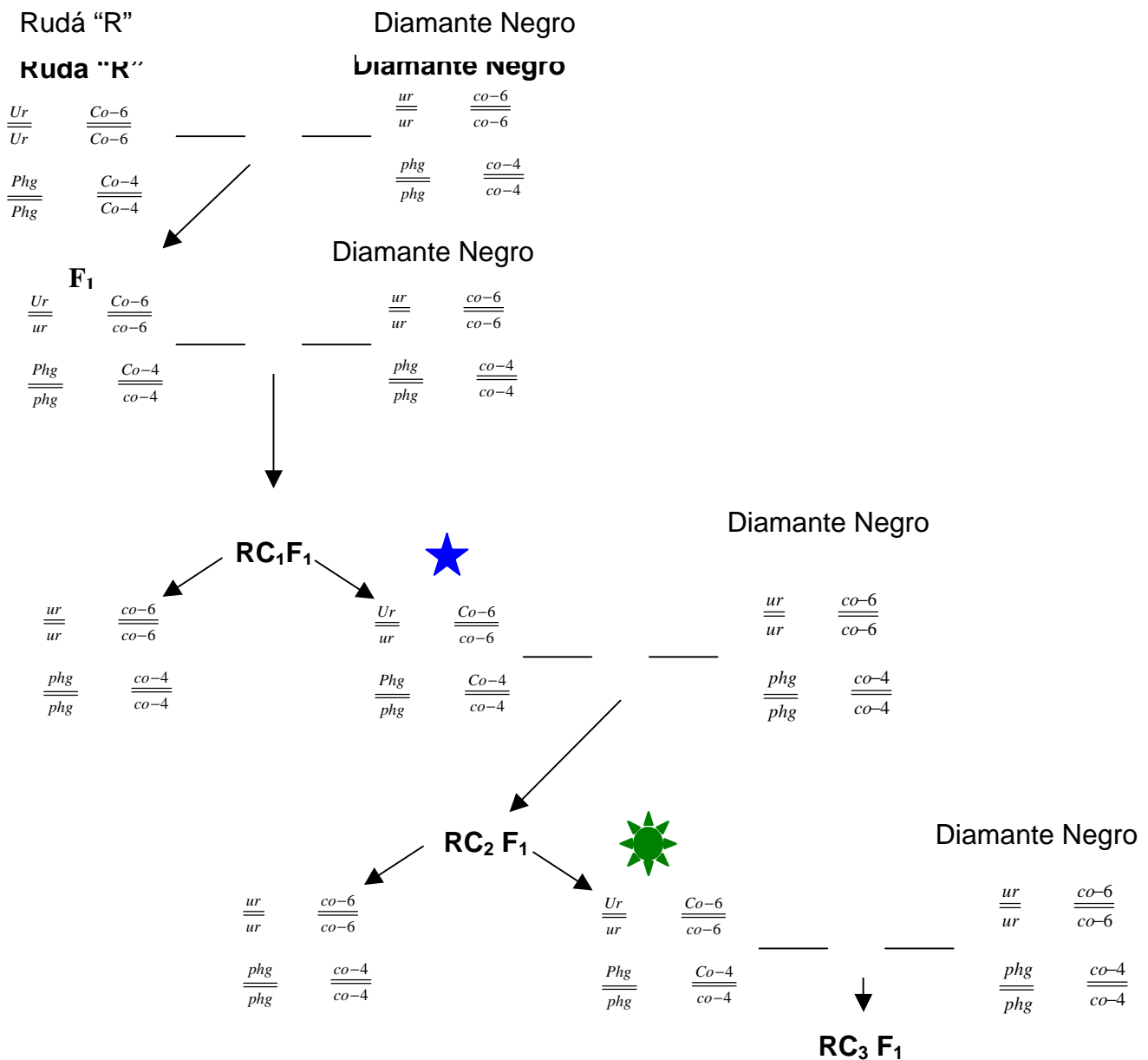
Os marcadores moleculares que foram utilizados no processo de seleção estão ligados aos genes de resistência à antracnose, ferrugem ou mancha-angular. Na Tabela 2 estão descritos os marcadores já

identificados, a fase de ligação e a distância em relação aos genes de resistência. Todos os marcadores utilizados foram do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*). Três deles ($_{SCAR} Y20$, $_{SCAR} H13$, $_{SCAR} AZ20$) foram recentemente desenvolvidos pelo grupo do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV e gentilmente cedidos mesmo antes da sua publicação.

Tabela 2 - Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador	Distância (cM) e Fase de ligação	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Referência
OPY20 _{830a}	0,0 – acoplamento	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (1999)
OPH13 _{490a}	5,5 – acoplamento	<i>Phg-1</i>	Mancha-angular	AND 277	CARVALHO <i>et al.</i> (1998)
$_{SCAR} F10_{1050a}$	6,9 – acoplamento	<i>Ur?</i>	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
$_{SCAR} BA08_{560a}$	6,0 – acoplamento	<i>Ur?</i>	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPAZ20 _{940a}	7,1 – acoplamento	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (1999)

O esquema de cruzamentos, seleção e condução da população segregante está detalhado na Figura 1.



★ Seleção por inoculações e marcadores moleculares

★ Seleção somente por marcadores moleculares

Figura 1 - Esquema de cruzamentos, seleção e condução da população segregantes

2.2. Extração de DNA

Em cada geração, folhas das plantas selecionadas e dos genitores foram coletadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizadas para extração de DNA. A extração foi de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995).

2.3. Análise de SCAR

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR em mistura de reação de $25\text{ }\mu\text{L}$ contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM , MgCl_2 2 mM , $100\text{ }\mu\text{M}$ de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 picomoles de cada *primer* específico, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por 3 min ; 35 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s , temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 1 min e 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min e 30 s ; e um passo final de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min e, finalmente, a temperatura foi reduzida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura de anelamento para os *primers* $_{\text{scar}}\text{Y20}$, $_{\text{scar}}\text{F10}$, $_{\text{scar}}\text{BA08}$ foi de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e para os *primers* $_{\text{scar}}\text{H13}$, $_{\text{scar}}\text{AZ20}$ foi de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, $3\text{ }\mu\text{L}$ 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 ($0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM , EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada durante um período de três horas aproximadamente, a 110 volts . Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.4. Análise de RAPD

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção por meio da análise da presença de marcadores moleculares ligados a resistência, foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com ALZATE-MARIN *et al.* (2001). Os *primers* adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA), foram tomados ao acaso e eram diferentes a cada ciclo de retrocruzamento. Eles foram primeiramente testados entre os dois progenitores, e somente aqueles que mostraram polimórficos foram amplificados nas plantas selecionadas para verificação da recuperação do genoma do progenitor recorrente em cada ciclo de retrocruzamento.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios SCAR, exceto para o *primer*, que foi substituído por 0,4 µM de um *primer*. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 1 min a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4 °C.

2.5. Avaliação de distâncias genéticas a cada retrocruzamento

Amostras de DNA de folhas do progenitor recorrente (Diamante Negro), do progenitor doador (Rudá “R”) e das plantas RC_nF₁ resistentes foram extraídas de acordo com a metodologia de DOYLE & DOYLE (1990) e amplificadas como descrito no item 2.4. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método do complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples, com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2001). O registro de dados foi feito a partir das bandas polimórficas detectadas entre os progenitores. Foi gerada uma matriz de valores binários, onde a codificação (0) significou ausência e (1) presença da banda.

As estimativas de dissimilaridade genética (D_{ij}) foram feitas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973) :

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} = 1 - \frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{b + c}{a + b + c + d}$$

em que

S_{ij} = coeficiente de similaridade;

a = número de encontros 1,1;

b = número de encontros 1,0;

c = número de encontros 0,1;

d = número de encontros 0,0.

Para cálculo das distâncias genéticas relativas (D_{rij}), a maior D_{ij} foi considerada 100% e as demais D_{ij} , corrigidas proporcionalmente.

Este procedimento foi realizado nos dois ciclos de retrocruzamento para verificar o grau de recuperação do genoma do progenitor recorrente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Plantas F_1 originadas do cruzamento entre Diamante Negro (genitor recorrente) e Rudá “R” (genitor doador) foram retrocruzadas com o genitor recorrente para gerar as sementes F_1 do retrocruzamento 1 (RC_1F_1). Neste primeiro retrocruzamento, foram geradas 394 plantas. Todas estas plantas foram inoculadas com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*, sendo que, 224 delas foram resistentes e 170 suscetíveis (uma eliminação de 43% das plantas). Como as plantas jovens que apresentam suscetibilidade a *C. lindemuthianum* geralmente morrem com a inoculação, somente as 224 resistentes (sobreviventes) foram inoculadas com uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus*. Destas, 65 foram classificadas como resistentes, 147 suscetíveis e 12 morreram antes de serem avaliadas. As mesmas 212 plantas remanescentes, inoculadas com *U. appendiculatus*, foram após a avaliação, inoculadas com o patótipo 63.23 (isolado 158.1) de *P. griseola*. Destas, 176 comportaram-se como resistentes e 36 suscetíveis. Analisando a resistência de todas as plantas sobreviventes, foi possível selecionar 32 plantas (8,12% das plantas iniciais) que apresentaram resistência às três doenças.

Amostras de DNA das 32 plantas selecionadas foram extraídas e amplificadas com os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência para cada doença. Após a amplificação com os marcadores

SCAR Y20_{830a}, SCAR H13_{490a}, SCAR AZ20_{940a}, SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a}, ligados aos genes *Co-4*, *Phg-1*, *Co-6* e *Ur-?*, respectivamente, verificou-se que somente quatro das plantas selecionadas (plantas 75, 93, 141 e 270) possuíam as cinco marcas utilizadas para seleção (Tabela 3). Devido ao baixo número de plantas selecionadas, optou-se por selecionar também aquelas que possuíam pelo menos quatro marcas, sendo selecionadas mais 17 delas (plantas 2, 18, 21, 70, 72, 100, 101, 151, 195, 196, 203, 242, 256, 268, 269, 278 e 286). Portanto, dentre as 32 plantas selecionadas como resistentes por meio de inoculações, 21 possuíam pelo menos quatro marcas, ou carregavam três genes de resistência. Estas foram utilizadas no retrocruzamento seguinte (Tabela 3). A Figura 2 exemplifica a seleção de algumas plantas pela amplificação com o SCAR F10_{1050a}.

O objetivo inicial do trabalho foi selecionar as plantas somente por meio de marcadores moleculares, porém, neste primeiro ciclo de retrocruzamentos, devido ao grande número de plantas, foram conduzidas inoculações seriadas para eliminar as plantas que fossem suscetíveis às três doenças. HUANG *et al.* (1997) usaram a mesma estratégia em seus trabalhos de piramidação de quatro genes de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz. Devido ao número de plantas F₂ a serem analisadas com os nove marcadores moleculares disponíveis, os autores fizeram inoculação das plantas com o patógeno, eliminando aquelas plantas que não possuíam nenhum gene de resistência.

Tabela 3 – Análise de presença/ausência dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha-angular nas plantas RC₁F₁ (Diamante Negro x Rudá “R”)

# da planta ^a	SCAR Y20	SCAR AZ20	SCAR H13	SCAR F10	SCAR BA08	Genes incorporados
2 ^b	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
10	-	+	-	-	+	Co-6, Ur-?
18	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
21	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
70	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
72	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
73	+	-	-	-	+	Co-4, Ur-?
74	+	-	-	+	-	Co-4, Ur-?, Phg-1
75	+	+	+	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?, Phg-1
89	-	-	+	+	-	Ur-?, Phg-1
93	+	+	+	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?, Phg-1
100	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
101	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
123	-	+	-	-	+	Co-6, Ur-?
141	+	+	+	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?, Phg-1
151	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
185	+	-	-	+	-	Co-4, Ur-?
195	+	+	-	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?,
196	+	+	-	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?
198	+	-	-	-	-	Co-4
203	-	+	+	+	+	Co-6, Ur-?, Phg-1
224	+	-	-	+	-	Co-4, Ur-?
240	-	-	-	+	-	Ur-?
242	-	+	+	+	+	Co-6, Ur-?, Phg-1
256	-	+	+	+	+	Co-6, Ur-?, Phg-1
268	-	+	+	+	+	Co-6, Ur-?, Phg-1
269	-	+	+	+	+	Co-6, Ur-?, Phg-1
270	+	+	+	+	+	Co-4, Co-6, Ur-?, Phg-1
278	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
286	+	-	+	+	+	Co-4, Ur-?, Phg-1
316	-	+	-	-	-	Co-6
361	-	-	-	+	+	Ur-?

^a Plantas selecionadas com base nos resultados de inoculação

^b As plantas em destaque referem-se as plantas selecionadas para o próximo retrocruzamento

+ = presença da banda do marcador molecular;

- = ausência da banda do marcador molecular.

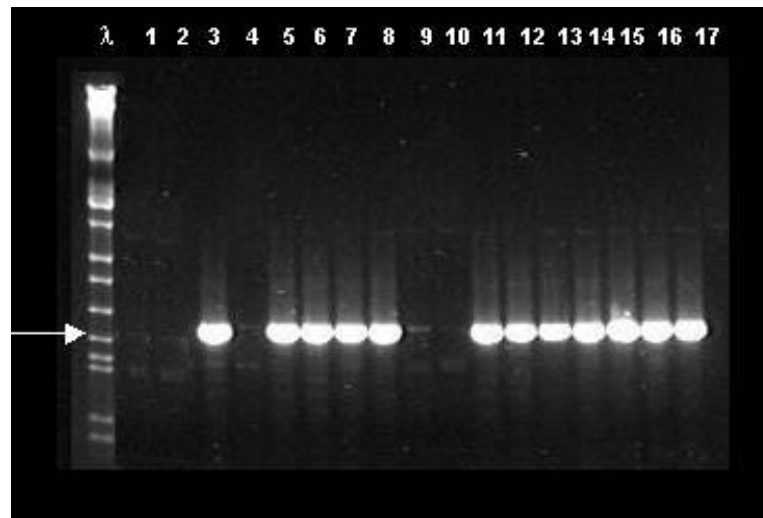


Figura 2- Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o SCAR F10₁₀₅₀. A primeira coluna corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*. As colunas seguintes referem-se aos produtos de amplificação do DNA de: Rudá (1), Diamante Negro (2), Ouro Negro (3 - controle), e das plantas RC₁F₁: 73 (4), 74 (5), 75 (6), 89 (7), 93 (8), 123 (9), 198 (10), 242 (11), 256 (12), 268 (13), 269 (14), 270 (15), 278 (16), 286 (17). A seta indica o produto de amplificação de 1050 pb.

Da mesma forma que observamos um número pequeno de plantas que eram resistentes e possuíam todas as marcas, SINGH *et al.* (2001) piramidando os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21* de resistência a *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* no cultivar de arroz PR106, por meio de retrocruzamentos, conseguiram somente três plantas que apresentaram as três marcas ligadas aos genes de resistência de interesse. E, devido a este baixo número, selecionaram também aquelas que possuíam pelo menos duas marcas.

Para a análise da divergência genética entre as 21 plantas selecionadas e o genitor recorrente, foram utilizados 30 *primers* que apresentaram polimorfismo entre os genitores Diamante Negro e Rudá. Estes geraram 35 bandas polimórficas, com uma média de 1,16 bandas por *primer* e 85 monomórficas. Na Figura 3 pode-se observar o padrão de amplificação do *primer* OPAM04 entre os genitores e as plantas RC₁F₁ selecionadas.

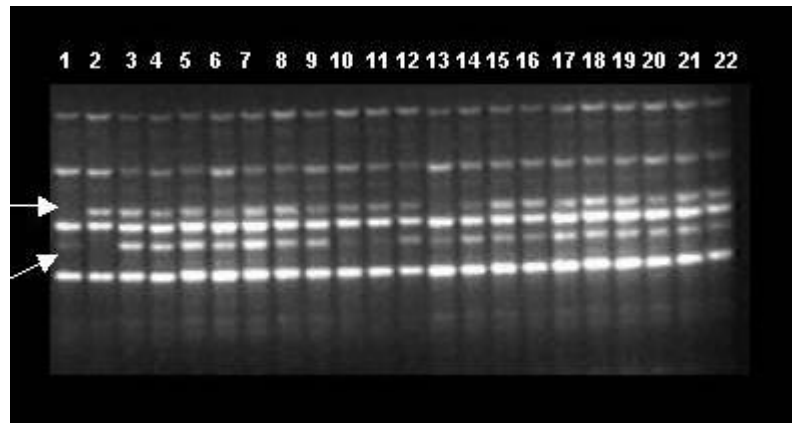


Figura 3- Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o *primer* OPAM04 com os genitores Rudá (1), Diamante Negro (2) e as plantas RC₁F₁: 2 (3), 18 (4), 21 (5), 70 (6), 72 (7), 75 (8), 93 (9), 100 (10), 101 (11), 141 (12), 151 (13), 195 (14), 196 (15), 203 (16), 242 (17), 256 (18), 268 (19), 269 (20), 270 (21) e 278 (22). As setas indicam bandas polimórficas.

As distâncias genéticas relativas, com base nos marcadores RAPD, entre as plantas RC₁F₁ e o genitor recorrente (Diamante Negro) variaram de 37 a 65% (Tabela 4).

As plantas de maior interesse, que são aquelas que possuíam as cinco marcas de seleção (75, 93, 141 e 270), apresentaram as distâncias de 54, 45, 54 e 45%, respectivamente, com relação ao Diamante Negro (Tabela 4). Considerando as 21 plantas usadas no segundo retrocruzamento, a que se mostrou mais próxima do genitor recorrente foi a planta 151 com 37% de distância, e a mais distante foi a 286 com 65%, ambas apresentando quatro marcas e carregando os genes *Co-4*, *Ur-?* e *Phg-1*.

Tabela 4 – Distâncias genéticas relativas entre o genitor recorrente (Diamante Negro), genitor doador (Rudá) e a plantas RC₁F₁

Genitor doador e plantas RC ₁ F ₁	Distância Genética Relativa em relação ao Diamante Negro (%)
Rudá	100
2	51
18	57
21	60
70	51
72	54
75^a	54
93	45
100	51
101	60
141	54
151	37
195	45
196	57
203	48
242	40
256	57
268	48
269	62
270	45
278	54
286	65

^a Os números em destaque referem-se à identificação das plantas que amplificaram as cinco marcas.

As plantas RC₁F₁ selecionadas apresentaram uma variação muito pequena com relação a % de recuperação do genoma recorrente como pode ser observado na Tabela 4. Por esse motivo e pelo fato do número de plantas selecionadas ter sido pequeno, principalmente as que possuíam as cinco marcas (somente quatro plantas), as distâncias genéticas entre elas e o genitor recorrente não foram usadas como parâmetro para seleção, ou seja, não foi possível selecionar plantas que apresentavam menor distância em relação ao recorrente. Com isso, todas as 21 plantas foram utilizadas como doadoras de pólen no retrocruzamento seguinte.

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

As plantas 21, 100, 203, 242 e 286 selecionadas no primeiro retrocruzamento não deixaram descendentes no segundo retrocruzamento, provavelmente devido às altas temperaturas na casa de vegetação quando da realização dos cruzamentos. As demais originaram um total de 213 plantas RC₂F₁. Como o número de plantas foi menor do que no primeiro retrocruzamento a seleção foi baseada somente em marcadores moleculares ligados aos genes de resistência usados na primeira seleção. Das 213 plantas, somente seis (75.8, 93.8, 141.2, 141.4, 141.6, 141.7) apresentaram as cinco marcas de interesse (Tabela 7). Da mesma forma que na seleção do primeiro retrocruzamento, foram selecionadas também aquelas plantas que possuíam pelo menos quatro marcas. Assim, mais 12 plantas foram selecionadas, totalizando 18 plantas para o próximo retrocruzamento (Tabela 7).

Para a análise da determinação das distâncias genéticas destas plantas com relação aos genitores (visando a rápida recuperação do genoma do recorrente), foram testados 45 *primers* diferentes dos usados na análise do primeiro retrocruzamento. Destes, somente 27 apresentaram bandas polimórficas entre Diamante Negro e Rudá, gerando 196 bandas, 56 polimórficas e 136 monomórficas, com uma média de 2,07 bandas polimórficas por *primer*. A Figura 4 mostra o padrão de amplificação com um *primer* que evidenciou polimorfismo entre as plantas selecionadas.

Tabela 7 – Análise de presença/ausência dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha-angular nas plantas RC₂F₁ (Diamante Negro x Rudá “R”)

# da planta	SCAR Y20	SCAR AZ20	SCAR H13	SCAR F10	SCAR BA08	Genes incorporados
72.9	+	-	+	-	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
75.1	-	+	+	+	+	<i>Co-6, Ur-?, Phg-1</i>
75.6	-	+	+	+	+	<i>Co-6, Ur-?, Phg-1</i>
75.8	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
75.13	+	-	+	+	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
75.15	+	+	-	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?</i>
93.8	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
93.13	+	-	+	+	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
93.15	-	+	+	+	+	<i>Co-6, Ur-?, Phg-1</i>
93.18	+	+	-	-	+	<i>Co-4, Co-6, Ur-?,</i>
101.4	+	-	+	+	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
141.2	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
141.4	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
141.6	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
141.7	+	+	+	+	+	<i>Co-6, Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
151.1	+	-	+	+	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
151.2	+	-	+	-	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>
270.2	+	-	+	+	+	<i>Co-4, Ur-?, Phg-1</i>

^a As plantas em destaque referem-se as plantas selecionadas com as cinco marcas

+ = presença da banda do marcador molecular;

- = ausência da banda do marcador molecular.

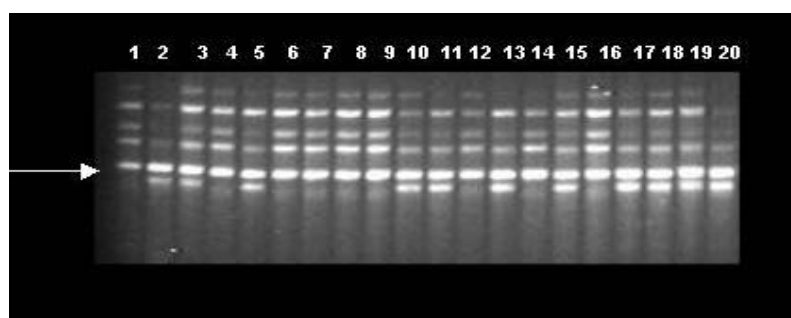


Figura 4- Análise eletroforética dos produtos de amplificação com os primers OPA14 com os genitores Rudá (1), Diamante Negro (2) e as plantas RC₂F₁: 72.9 (3), 75.1 (4), 75.6 (5), 75.8 (6), 75.13 (7), 75.15 (8), 93.8 (9), 93.13 (10), 93.15 (11), 93.18 (12), 101.4 (13), 141.2 (14), 141.4 (15), 141.6 (16), 141.7 (17), 150.10 (18), 151.20 (19), 570.2 (20). A seta indica a banda polimórfica.

As distâncias genéticas relativas entre as plantas RC₂F₁ e o genitor recorrente (Diamante Negro), com base na presença/ausência de bandas, variaram entre 30 e 48% (Tabela 8), sendo a menor distância observada com relação à planta 151.2 (30%) e a maior, com relação à 270.2 (48%). A planta 151 do RC₁, que deu origem à planta 151.2, apresentou também a menor distância em relação ao Diamante Negro (37%). As plantas selecionadas com as cinco marcas (75.8, 93.8, 141.2, 141.4, 141.6 e 141.7) apresentaram as distâncias relativas de 35, 41, 44, 44, 42 e 46%, respectivamente. Todas elas apresentaram uma recuperação relativamente baixa, visto que as plantas RC₁ que as originaram (75, 93 e 141) apresentaram distâncias de 54, 45, e 54%, respectivamente, em relação ao recorrente.

Tabela 8 – Distâncias genéticas relativas entre o genitor recorrente (Diamante Negro), genitor doador (Rudá) e a plantas RC₂F₁

Genitor doador e plantas RC₂F₁	Distância Genética Relativa em relação ao Diamante Negro (%)
Rudá	100
72.9	39
75.1	39
75.6	35
75.8^a	35
75.13	35
75.15	35
93.8	41
93.13	46
93.15	37
93.18	44
101.4	42
141.2	44
141.4	44
141.6	42
141.7	46
151.1	46
151.2	30
270.2	48

^a Os números em destaque referem-se à identificação das plantas que amplificaram as cinco marcas. Os números antes do ponto se referem à origem da planta doadora de pólen selecionada no primeiro retrocruzamento.

Pelos mesmos motivos apresentados no item 3.1 (baixa variação de % de recuperação entre as plantas RC₂F₁ analisadas e baixo número de plantas selecionadas), os valores de distâncias genéticas obtidos não foram usados como critério de seleção. Portanto, as 18 plantas selecionadas por meio de marcadores moleculares serão utilizadas como doadoras de pólen para o terceiro retrocruzamento.

Observando as distâncias genéticas relativas entre os indivíduos tanto do RC1 quanto do RC2 e os genitores, houve uma baixa recuperação do genoma recorrente, pois as distâncias variaram de 37 a 65% em RC1 e de 30 a 48% em RC2. Em média, na ausência de seleção e ligação fatorial, as distâncias entre as plantas oriundas do primeiro e segundo retrocruzamentos e o recorrente devem ser de 25 e 12,5%, respectivamente. Uma hipótese para explicar a baixa recuperação obtida seria o arraste provocado pela seleção dos genes de interesse. Quando os genitores estão geneticamente mais distantes entre si, como é o caso de Diamante Negro e Rudá, o arraste devido à ligação nos indivíduos da progênie, tem maior importância do que quando eles estão mais próximos entre si.

ARRUDA (1998), trabalhando com a transferência do gene *Co-4* de resistência à antracnose do cultivar TO para o Rudá, encontrou distâncias genéticas relativas entre as plantas RC₁F₁ e RC₂F₁, e o genitor recorrente, variando entre 29 a 72% e 27 a 60%, respectivamente. A justificativa apresentada pela autora para a baixa recuperação do genoma do recorrente foi o arraste de regiões ligadas ao gene *Co-4*.

Quando ocorre a transferência dos genes de interesse, ocorre também, a transferência de DNA adicional ligado aos mesmos (*linkage drag*) diminuindo a porcentagem de recuperação do genoma recorrente. No momento da seleção das plantas de interesse a serem retrocruzadas, foram usados cinco marcadores moleculares ligados a três genes de resistência (*Co-4*, *Co-6* e *Phg-1*) e a um bloco gênico (*Ur-?*). Na transferência de cada um destes genes ocorreu um arraste de outros genes indesejáveis (provenientes do genitor doador) que estavam estreitamente ligados a estes genes de resistência, portanto, o arraste dos genes do genitor doador foi maior do que na ausência de seleção.

Apesar dos indivíduos RC_1F_1 e RC_2F_1 terem apresentado uma baixa recuperação do genoma do Diamante Negro, as sementes RC_1F_3 já mostraram-se fenotipicamente bem parecidas com as sementes do Diamante Negro, mesmo ocorrendo segregação, como mostra a Figura 5. Mesmo assim, decidiu-se levar para o terceiro retrocruzamento as plantas RC_2F_1 selecionadas. Quando as sementes RC_3F_1 forem obtidas, estas serão selecionadas novamente para a resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular por meio dos marcadores moleculares. Além disso, será observado se as plantas selecionadas para a resistência às três doenças, mantiveram os genes de resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico comum presentes no Diamante Negro e será determinado o potencial produtivo das mesmas. Assim, o nosso objetivo futuro é selecionar linhagens de grão preto que possuam resistência à antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-bacteriano-comum, mosaico comum e com bom potencial produtivo.



F₆ Piramidação



Diamante Negro



RC₁F₃ - 75



RC₁F₃ - 141

Figura 5- Sementes dos genitores, Diamante Negro e F6 Piramidação (Ruda "R"), e dos indivíduos RC₁F₃ correspondentes.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O cultivar Diamante Negro é um feijão de grãos pretos bem aceito por produtores e consumidores, sendo plantado e consumido em larga escala e apresenta resistência ao crestamento bacteriano e ao mosaico comum. Porém, este cultivar é suscetível a três doenças fúngicas de grande importância: a antracnose, ferrugem e mancha-angular. Em trabalhos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, num processo assistido por marcadores moleculares, foram produzidas linhagens avançadas contendo, individualmente, genes de resistência à antracnose (genes *Co-6* e *Co-4*), à ferrugem (genes *Ur-?*) e à mancha-angular (gene *Phg -1*). Simultaneamente, foram identificados marcadores moleculares ligados a esses genes. Em seguida, essas linhagens foram intercruzadas e isolinhas contendo simultaneamente estes genes de resistência foram criadas. O genoma recuperado nas isolinhas foi o do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca. Este trabalho teve como objetivo introgridir genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, já piramidados em uma isolinha do cultivar Rudá (Rudá "R"), para o cultivar Diamante Negro.

Cruzamentos entre Diamante Negro e o Rudá "R" foram realizados e as plantas F_1 foram retrocruzadas com o Diamante Negro (genitor recorrente), gerando 394 plantas. Todas estas plantas foram inoculadas com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*, sendo selecionadas 224 como resistentes e 170 suscetíveis. As 224 resistentes foram novamente inoculadas com uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus* e com o patótipo 63.23 (isolado 158.1) de *P. griseola*. Destas, 32 apresentaram

resistência às três doenças. Amostras de DNA das 32 plantas foram extraídas e amplificadas com os marcadores SCAR Y20_{830a}, SCAR H13_{490a}, SCAR AZ20_{940a}, SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a}, ligados aos genes *Co-4*, *Phg-1*, *Co-6* e *Ur-?*, respectivamente. Verificou-se que somente quatro delas (plantas 75, 93, 141 e 270) possuíam as cinco marcas. Devido ao baixo número de plantas selecionadas, optou-se por selecionar também aquelas que possuíam pelo menos quatro marcas, sendo selecionadas mais 17 delas (plantas 2, 18, 21, 70, 72, 100, 101, 151, 195, 196, 203, 242, 256, 268, 269, 270, 278 e 286).

As distâncias genéticas entre estas plantas RC₁F₁ selecionadas pelos marcadores moleculares e os seus genitores, foram calculadas a partir dos dados de 35 bandas polimórficas amplificadas com 30 *primers*. As distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente variaram de 37 a 65%. Porém, estas distâncias não foram usadas como parâmetro para seleção. Portanto, as 21 plantas RC₁F₁ foram usadas como doadoras de pólen para o retrocruzamento seguinte.

No segundo retrocruzamento foram geradas 231 plantas RC₂F₁. Amostras de DNA destas plantas foram extraídas e amplificadas com os mesmos marcadores SCAR usados no primeiro ciclo de seleção. Somente seis delas apresentaram as cinco marcas (plantas 75.8, 93.8, 141.2, 141.4, 141.6 e 141.7). Porém, as que apresentaram pelo menos quatro marcas também foram selecionadas (72.9, 75.1, 75.6, 75.13, 75.15, 93.13, 93.15, 93.18, 101.4, 151.1, 151.2 e 270.2).

Amostras de DNA das 18 plantas selecionadas foram amplificadas, juntamente as dos genitores, com 27 *primers*, gerando 196 bandas polimórficas. A partir destas bandas, foram calculadas as distâncias genéticas relativas que variaram entre 32 e 48% em relação ao Diamante Negro. A menor distância foi obtida para a planta 151.2 e a maior para a 270.2. Novamente, as 18 plantas foram selecionadas para o próximo retrocruzamento, sem levar em consideração as distâncias genéticas.

Este trabalho terá continuidade, e quando obtivermos plantas RC₃F₁, estas serão selecionadas novamente pelos marcadores moleculares e será verificada a sua resistência em relação à bacteriose, mosaico comum e o seu potencial produtivo. Portanto, o nosso objetivo

maior é desenvolver linhagens de grão preto, com resistência à antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento bacteriano, mosaico comum e com bom potencial produtivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G. de, 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., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB 136, TO and G2333. **Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, 1:125-133, 2001.
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene Co-4 no cultivar Rudá**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 101p. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G. de, 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. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CRUZ, C.D. **GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p.2001.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- EMBRAPA Arroz e Feijão <[75](http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão/Dnegro>htm</p><p>FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., LOOS, R.A., CORRÊA, A.G.G., PAULA-JR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Uso de marcadores RAPD na obtenção de linhas isogênicas de feijoeiro contrastantes para resistência à ferrugem. Brazilian Journal of Genetics, v.20, p. 258, 1997.(Suplement).</p><p>FAO, Beans (<i>Phaseolus</i> spp.) - model food legumes, Plant and Soil ,252: 55-128, FAO 2003.</p><p>HUANG, N., ANGELES, E. R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G. S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. Theoretical and Applied Genetics, v.95, n.3, p. 313-320, 1997.</p><p>MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. Ciência Rural, 27:685-689. 1997.</p><p>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 (<i>xa5</i>, <i>xa13</i> and <i>Xa21</i>) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. Theoretical and Applied Genetics, v.102, p. 1011-1015, 2001.</p></div><div data-bbox=)

SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

CONCLUSÕES GERAIS

O cultivar Diamante Negro se mostrou suscetível aos patótipos 65, 81, 89 de *Colletotrichum lindemuthianum*, resistente homozigoto aos 64, 102, 453 e resistente, mas segregante, aos 55, 87, 95 e 342. Para os patótipos de *Uromyces appendiculatus*, o Diamante Negro comportou-se com suscetível a todos os dez testados. Já para os patótipos de *Phaeoisariopsis griseola*, o Diamante Negro foi suscetível aos 31.17, 63.19, 63.23, 63.55 e resistente a aos 31.39 e 63.21. Diante destes resultados, pode-se concluir que o cultivar Diamante Negro é fracamente resistente à antracnose, ferrugem e mancha-angular, necessitando da transferência de genes de resistência oriundos de outros cultivares.

A partir dos produtos de amplificação de 78 *primers* tomados ao acaso, foram calculadas as distâncias genéticas entre os cultivares e o agrupamentos dos mesmo. As distâncias genéticas relativas variaram de 35,47 a 6,42%, sendo a maior entre os cultivares Preto 60 dias (único material andino testado) e Porrilho Sintético, e a menor, entre Diamante Negro e Ouro Negro. As distâncias entre o Diamante Negro e os demais cultivares pretos, variaram de 26,79% a 6,42%, sendo a maior verificada em relação ao Preto 60 dias e a menor com o Ouro Negro. O Rudá mostrou-se a uma distância de 28,11% do Diamante Negro. Na análise de agrupamento, três grupos foram formados: um contendo o Preto 60 dias (andino), um contendo o Rudá (mesoamericano-carioca) e um contendo os demais cultivares (mesoamericanos-pretos).

Cruzamentos entre Diamante Negro e o Rudá "R" foram realizados e as plantas F₁ foram retrocruzadas com o Diamante Negro (genitor recorrente). Com o auxílio dos marcadores moleculares SCAR Y20_{830a}, SCAR

H13_{490a}, SCAR AZ20_{940a}, SCAR F10_{1050a} e SCAR BA08_{560a}, ligados aos genes *Co-4*, *Phg-1*, *Co-6* e *Ur-?*, respectivamente, foi possível selecionar as plantas de interesse. No primeiro retrocruzamento foram selecionadas 21 plantas que possuíam pelo menos quatro marcas, sendo que somente quatro delas (plantas 75, 93, 141 e 270) possuíam as cinco.

Já no segundo retrocruzamento foram selecionadas 18 plantas que possuíam pelo menos quatro marcas, obtendo somente seis (plantas 75.8, 93.8, 141.2, 141.4, 141.6 e 141.7) com as cinco.

Este trabalho terá continuidade obtendo plantas RC₃F₁. Estas serão selecionadas com base na resistência à antracnose, ferrugem, mancha-angular, bacteriose, mosaico comum e o seu potencial produtivo. Portanto, o nosso objetivo maior é do desenvolver linhagens de grão preto com todas as características.