

DEMERSON ARRUDA SANGLARD

**Melhoramento do Feijoeiro para Resistência à Mancha-Angular:
Validação de Marcadores Moleculares SCAR, Piramidação de Genes,
Testes de Alelismo e Caracterização de Linhagens Elite**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

T

S225m
2010

Sanglard, Demerson Arruda, 1981-

Melhoramento do feijoeiro para resistência à mancha-angular : validação de marcadores moleculares SCAR, piramidação de genes, testes de alelismo e caracterização de linhagens elite / Demerson Arruda Sanglard. – Viçosa, MG, 2010.

ix, 109f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Mancha-angular. 3. Marcadores genéticos. 4. Biologia molecular. 5. Feijão - Resistência à *Pseudocercospora griseola*. 6. Antracnose. 7. Ferrugem. 8. Feijão - Resistência à *Colletotrichum lindemuthianum*. 9. Feijão - Resistência à *Uromyces appendiculatus*. 10. Feijão - Resistência a doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6522

DEMERSON ARRUDA SANGLARD

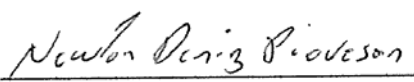
**Melhoramento do Feijoeiro para Resistência à Mancha-Angular:
Validação de Marcadores Moleculares SCAR, Piramidação de Genes,
Testes de Alelismo e Caracterização de Linhagens Elite**

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

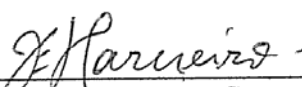
APROVADA: 31 de março de 2010.



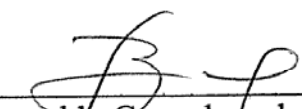
Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior



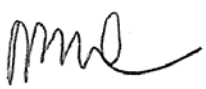
Pesq. Newton Deniz Piovesan



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



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)



Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

À querida Cida.

Aos meus pais Demétrio e Sônia.

À minha irmã Natália.

DEDICO

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

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Cida, pelo companheirismo, afeto, amor e compreensão, e também pelo incentivo e ajuda talentosa durante a minha Graduação, Mestrado e Doutorado.

Aos meus pais, Demétrio e Sônia, pela formação, disciplina, garra e participação efetiva em todos os momentos da minha vida.

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro, indispensável à condução deste trabalho.

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

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

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

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

Ao Dr. Newton Deniz Piovesan e ao Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, pelas importantes sugestões na melhoria do corpo da tese.

Aos colegas de execução dos projetos de pesquisa Edgard, Jeziel, Bruno, Alberto, Carlos Alexandre, Juan, Natália, Leonardo e Luiz, pela ajuda precisa e atenciosa, o que viabilizou o volume dos resultados alcançados.

Aos colegas de Pós-Graduação na área de Melhoramento Genético do Feijoeiro Dr. Thiago Lívio, Dr. Klever Márcio, Dra. Márcia Costa e Dr. Carlos Lásaro, pelo convívio, valiosas sugestões e parcerias na pesquisa.

Ao Cássio, ao José Carlos e à Gláucia, pela organização ao dispor os materiais necessários à pesquisa e que sempre estiveram disponíveis a me ajudar.

Em especial, ao Sr. José Pinto Rosa (*in memorian*), pelo auxílio na rotina de atividades realizadas em casa de vegetação.

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

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

BIOGRAFIA

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

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

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

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, na área de Genética Molecular de Plantas e de Microrganismos, defendendo sua dissertação em outubro de 2006. Neste mesmo período, iniciou o curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado, também pelo Programa de Genética e Melhoramento da UFV, defendendo sua tese em março de 2010.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1	6
Validação de marcadores moleculares SCAR para genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro comum	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Material genético e cruzamentos	9
2.2. Avaliações fenotípicas	10
2.2.1. Raças e preparo do inóculo	10
2.2.2. Inoculação e avaliação dos sintomas	10
2.3. Análises moleculares	11
2.3.1. Extração de DNA	11
2.3.2. Determinação das condições de amplificação dos marcadores SCAR	12
2.4. Determinação das distâncias genéticas	13
2.5. Nomenclatura dos <i>primers</i> SCAR	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	29
Seleção e caracterização de linhagens e populações de feijão “carioca” com resistência a doenças e outras características favoráveis	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Locais de condução dos experimentos	33
2.2. Material genético	33
2.3. Estratégia de melhoramento	34
2.4. Análises moleculares	36
2.4.1. Extração de DNA	36
2.4.2. Análise com RAPD	36
2.4.3. Análise com SCAR	36
2.4.4. Eletroforese e fotodocumentação	37
2.5. Ensaio a campo	40
2.5.1. Delineamento	40
2.5.2. Características avaliadas e análise de dados	40
2.6. Avaliação da reação aos patógenos	43
2.6.1. Avaliação da reação a <i>Pseudocercospora griseola</i>	43
2.6.2. Avaliação da reação a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	45
2.6.3. Avaliação da reação a <i>Uromyces appendiculatus</i>	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO 3.....	68
Caracterização do gene de resistência à mancha-angular presente no cultivar de feijoeiro comum ‘Ouro Negro’	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1. Material genético e cruzamentos	72
2.1.1. Testes de alelismo	72
2.1.1. Estudos de herança	73
2.2. Avaliações fenotípicas.....	74
2.2.1. Raças e preparo do inóculo.....	74
2.2.2. Inoculação e avaliação da doença.....	75
2.3. Análises moleculares	76
2.3.1. Extração de DNA.....	76
2.3.2. Análise com RAPD.....	77
2.3.3. Análise com SCAR.....	77
2.3.4. Eletroforese e fotodocumentação.....	77
2.4. Análise estatística	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	87
 CAPÍTULO 4.....	 92
Reação de cultivares e linhagens elite de feijão comum a isolados de <i>Pseudocercospora griseola</i> coletados no Estado de Minas Gerais	92
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1. Material genético	95
2.2. Raças.....	96
2.3. Avaliação da reação a <i>Pseudocercospora griseola</i>	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	105

RESUMO

SANGLARD, Demerson Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março, de 2010. **Melhoramento do feijoeiro para resistência à mancha-angular: validação de marcadores moleculares SCAR, piramidação de genes, testes de alelismo e caracterização de linhagens elite.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Sousa Carneiro.

Neste trabalho são apresentados resultados de pesquisas desenvolvidas no âmbito do Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV), o qual tem visado o melhoramento genético para resistência à mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e ferrugem (*Uromyces appendiculatus*). Inicialmente, foram validados os marcadores moleculares SCAR SE04_{640a}, SAA07_{950a} e SA012_{950a} como sendo ligados a genes de resistência à mancha-angular. Paralelamente, foram selecionadas e caracterizadas linhagens e populações de feijão “carioca” com resistência a doenças e outras características agronômicas favoráveis. Neste caso, foram realizadas seleções assistidas por marcadores moleculares ligados a genes de resistência às três doenças, ensaios a campo, e caracterizações fenotípicas com diversas raças dos três patógenos. Também foram realizados testes de alelismo para o loco de resistência à mancha-angular, presente no cultivar ‘Ouro Negro’, frente a outros genótipos já utilizados pelo referido Programa. Finalmente, foram caracterizados importantes cultivares e linhagens elite quanto à reação a diversas raças de *Pseudocercospora griseola* oriundos do estado de Minas Gerais.

ABSTRACT

SANGLARD, Demerson Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010. **Common bean breeding to angular leaf spot resistance: validation of SCAR molecular markers, genes pyramiding, allelisms tests and characterization of elite lines.** Advisor: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisors: Everaldo Gonçalves de Barros and José Eustáquio de Sousa Carneiro.

This work present research data developed in the common bean breeding program of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), whose main target is genetically breeding common bean aiming at pyramiding resistance to angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*), anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) and rust (*Uromyces appendiculatus*) diseases. Initially, the SCAR molecular markers SE04_{640a}, SAA07_{950a} and SAO12_{950a} were validated as linked to resistance genes to angular leaf spot. At the same time, lines and populations of the “carioca” common bean were selected and characterized with respect to resistance to diseases and other favorable agronomic traits. In this case, assisted selections were carried out by molecular markers linked to the three diseases resistance genes, as well as field essays and phenotypic characterizations with several races of the three pathogens. Allelism tests were also carried out for the locus of resistance to the angular leaf spot, present in the cultivar ‘Ouro Negro’, genotypes already used by the mentioned breeding Program. Finally, important cultivars and elite lines were characterized for their reaction to several races of *Pseudocercospora griseola* collected in several regions of Minas Gerais state.

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um importante alimento para a população brasileira, sendo uma fonte básica de proteínas na dieta de milhões de pessoas de diferentes classes sociais. O hábito de consumo de feijão pelas famílias brasileiras, associado à ampla adaptação climática dessa cultura, faz com que o feijão esteja distribuído por todo o território nacional (Vieira, 1998).

Um dos entraves à obtenção de altas produtividades na cultura do feijoeiro é a ocorrência de doenças. Entre elas, merecem destaque as de origem fúngica: a mancha-angular, incitada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun; a antracnose, incitada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Lams.- Scrib.; e a ferrugem, incitada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.), todos com alta variabilidade patogênica (Souza et al., 2005; Damasceno-Silva et al., 2008; Ishikawa et al., 2008)

Em trabalhos anteriores conduzidos no Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram priorizadas a indentificação e caracterização de genes de resistência a estes três patógenos, sendo que diversas isolinhas foram obtidas. Visando transferir genes de resistência à mancha-angular (*Phg-ON*), antracnose (*Co-10*) e ferrugem (*Ur-ON*), do cultivar ‘Ouro Negro’ para o cultivar ‘Pérola’, foram conduzidos três ciclos de retrocruzamentos. Durante a execução foram utilizadas inoculações com raças incitadoras das doenças, análises de *fingerprinting* molecular, marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e testes de progênie. Foram obtidas seis famílias RC₃F₅ (Pérola x Ouro Negro), as quais deram origem ao grupo de linhagens denominadas de ‘Pérola R1’. Estas possuem simultaneamente as bandas de tamanhos específicos ligadas aos locos de resistência em homozigose: SF10_{1050a} e SBA08_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*); SBA16_{669a} e SAA19_{650a} (*Phg-ON*) (Sanglard et al., 2005).

Posteriormente, foram realizados cruzamentos entre uma isolinha derivada do cultivar ‘Rudá’, a qual já possuía cinco genes de resistência

piramidados, sendo um para a ferrugem (*Ur-ON*), um para a mancha-angular (*Phg-1*) e outros três para antracnose (*Co-4*, *Co-10*, e *Co-6*); com três outras isolinhas também derivadas de ‘Rudá’ que possuíam isoladamente genes de resistência à mancha-angular: MEX-37-3-6-3 (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*), MAR-138A-1-11-4 (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) e BAT-67-15-8 (*Phg-6*²). Os cruzamentos foram realizados de forma direcionada em dois esquemas conduzidos separadamente: isolinhas MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8 e MEX-37-3-6-3 x Rudá R (Sanglard et al., 2007).

Considerando o primeiro esquema de cruzamento, foi utilizado o raça 63.19 de *P. griseola* na verificação da natureza híbrida das plantas F₁. As plantas resistentes tiveram seu DNA extraído e amplificado com os marcadores moleculares OPE04_{500a} (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) e OPAO12_{950a} (*Phg-6*²). Essas plantas F₁ resistentes e que apresentaram marcas moleculares foram intercruzadas com a isolinha ‘Rudá R’. Deste modo, foram obtidas plantas F₁ (híbrido triplo), as quais foram inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e monitoradas com os marcadores moleculares: SF10_{1050a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SBA8_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SAZ20_{845a} (*Co-4*), SY20_{830a} (*Co-6*), SH13_{520a} (*Phg-1*), OPE04_{640a} (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) e OPAO12_{950a} (*Phg-6*²). Na população F₂ segregante foram identificadas plantas contendo todas as marcas. Estes materiais originaram outro grupo de linhagens, denominadas de ‘Rudá R3’, obtidas neste trabalho.

No segundo esquema de cruzamento, plantas F₁ MEX-37-3-6-3 x Rudá R foram avançadas até a geração F₃. Neste caso, também foram monitorados os genes de resistência por meio de inoculação com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e uso dos marcadores moleculares: SF10_{1050a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SBA8_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*), SAZ20_{845a} (*Co-4*), SY20_{830a} (*Co-6*), SH13_{520a} (*Phg-1*) e OPE04_{650a} (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*).

Para que a resistência a patógenos com extensiva variabilidade fisiológica seja estável, existe a necessidade de contínua avaliação do germoplasma e eventual introgressão de diferentes genes em genótipos comerciais (Young & Kelly, 1996). Para facilitar essa introgressão, além de

identificar as fontes de resistência e estudar a herança dos genes presentes, é importante que sejam efetuados testes de alelismo, cujo objetivo é verificar se diferentes genótipos compartilham, ou possuem distintos locos de interesse (Ehdaie & Baker, 1999). No caso de genes distintos, justifica-se o inter cruzamento dos diferentes genótipos visando à piramidação. Neste contexto, torna-se de extrema relevância a caracterização do gene de resistência à mancha-angular presente em ‘Ouro Negro’, frente a outros genótipos já utilizados (Sartorato, 2006).

Além destes trabalhos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV também tem investido esforços na conversão de outros marcadores moleculares do tipo RAPD em SCAR, o que confere vantagens, pois geram bandas específicas e não apresentam os problemas de reprodutibilidade da técnica de RAPD.

REFERÊNCIAS

- Damasceno-Silva, K. J. D.; Souza, E. A.; Sartorato, A.; Freire, C. N. S. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. *Phytopathology*, 156:602-606, 2008.
- Ehdaie, B. & Baker, C. A. Inheritance and allelism for resistance to Russian wheat aphid in an Iranian spring wheat. *Euphytica*, 107:71-78, 1999.
- Ishikawa, F. H.; Souza, E. A.; Silva, K. J. D.; Freire, C. N. S. Pathogenic variability of causal agent of common bean anthracnose. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 51:184-185, 2008.
- Sanglard, D. A.; Souza, T. L. P. O.; Sousa, C. S.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Molecular marker assisted backcrossing for developing lines with cv. Pérola genetic background, resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 48:84-85, 2005.
- Sanglard, D. A.; Damasceno, J. D.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Introgression of angular leaf spot resistance genes in common bean isolines. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 50:101-102, 2007.
- Sartorato, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. *Fitopatologia Brasileira*, 31:92-194, 2006.
- Souza, T. L. P. O.; Alzate-Marin, A. L.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. *Fitopatologia Brasileira*, 30:143-149, 2005.
- Vieira, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV. 1983, 231p.
- Young, R. A. & Kelly, J. D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Disease*, 80(6):650-654, 1996.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Obter linhagens e populações de feijão “carioca” contendo genes de resistência a doenças e características agronômicas favoráveis.

Objetivos específicos

- Validar marcadores moleculares SCAR associados á genes de resistência à mancha-angular, por meio de co-segregação entre marcas e avaliações fenotípicas (Capítulo 1).
- Selecionar linhagens derivadas da população F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] possuindo os genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1* (Rudá R); *Phg-4* e/ou *Phg-5*² (MAR-2); e *Phg-6*² (BAT 332); e *background* genético ‘Rudá’ (Capítulo 2).
- Selecionar linhagens derivadas da população RC₃F_{2:5} (Pérola x Ouro Negro) possuindo os genes *Ur-ON*, *Co-10* e *Phg-ON* (Ouro Negro) e *background* genético ‘Pérola’ (Capítulo 2).
- Avaliar o comportamento, em ensaios de campo, das linhagens que apresentarem todos os genes de resistência fixados (Capítulo 2).
- Avaliar linhagens com destaque nos ensaios a campo quanto à reação a raças de *P. griseola*, *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus* (Capítulo 2).
- Realizar testes de alelismo entre o loco de resistência à mancha-angular, presente em ‘Ouro Negro’, e os demais oriundos dos genótipos ‘AND 277’, ‘BAT 332’, ‘Cornell 49-242’, ‘MAR-2’ e ‘México 54’ (Capítulo 3).
- Caracterizar diversos cultivares e linhagens elite quanto à reação a raças de *P. griseola* obtidas no estado de Minas Gerais (Capítulo 4).

CAPÍTULO 1

Validação de marcadores moleculares SCAR para genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro comum

Resumo: O objetivo deste trabalho foi validar os marcadores SCAR SE04_{640a}, SAA07_{950a} e SAO12_{950a} como sendo capazes de monitorar genes de resistência à mancha-angular. Para isso, foram realizadas análises de co-segregação entre presença/ausência das marcas moleculares e reações fenotípicas de resistência/suscetibilidade a raças de *Pseudocercospora griseola*. Para o marcador SE04_{640a}, foi utilizada a raça 63.39 nas inoculações da população F₂ (MAR-2 x Rudá). No caso de SAA07_{950a} e SAO12_{950a}, utilizou-se a raça 63.47 para a população F₂ (BAT 332 x Rudá). Após os testes de gradiente de temperatura, foram determinadas as temperaturas de anelamento de 60 °C (SAA07_{950a}), 62 °C (SAO12_{950a}) e 65 °C (SE04_{640a}). As decomposições dos testes de qui-quadrado (χ^2) totais indicaram que os marcadores co-segregam com os locos de resistência às raças 63.39 e 63.47. Na obtenção das estimativas de frequência de recombinação e conversão para distância em centiMorgans, adotou-se o LOD mínimo igual a 3,0; frequência máxima de recombinação igual a 30%; e a função de mapeamento de Kosambi. Foi constatado que SE04_{640a} está ligado a 6,03 cM de distância do loco de resistência ao raça 63.39, presente em ‘MAR-2’. O loco de resistência à raça 63.47 oriundo de ‘BAT 332’, está ligado aos marcadores SAA07_{950a} e SAO12_{950a}, a 4,92 cM e 7,02 cM, respectivamente.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* – *Pseudocercospora griseola* – seleção assistida – SCAR – RAPD.

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais alimentos para a população da América Latina. Os grãos desta leguminosa apresentam componentes que os tornam vantajosos nutricionalmente, tais como altos teores protéicos e de lisina, fibras alimentares, carboidratos e vitaminas do complexo B (Maldonado et al., 2002). Muitos problemas têm causado prejuízos aos produtores de feijão, dentre eles determinadas doenças, especialmente a mancha-angular incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. A mancha-angular ocorre praticamente em todas as regiões onde o feijão é cultivado, principalmente em condições de temperaturas amenas e cultivos irrigados. Esta condição aliada ao uso de cultivares suscetíveis ao patógeno favorece a ocorrência da doença ocasionando perdas expressivas (Paula Júnior & Zambolim, 2006).

O retrocruzamento e a seleção recorrente têm sido estratégias muito utilizadas pelos programas de melhoramento genético que visam resistência a doenças. O objetivo final é a piramidação de alelos de resistência em um mesmo genoma. Cultivares que contêm simultaneamente diferentes genes de resistência podem ter uma existência mais duradoura frente a raças dos diversos patógenos. Para a piramidação destes genes via seleção assistida, os marcadores moleculares são ferramentas extremamente úteis (Costa, 2008).

O RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) é uma técnica que utiliza a reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (Williams et al., 1990) e possui a vantagem de não exigir o conhecimento prévio da sequência a ser amplificada, o que permite a obtenção de um elevado número de polimorfismos (Welsh & McClelland, 1990). Esta técnica utiliza apenas um *primer* curto (10 nucleotídeos) que permite seu pareamento em diversos pontos do genoma. Quando duas cópias deste *primer* se ligam às fitas opostas do DNA durante a PCR, a uma distância entre 200 e 2.000 pares de bases, a região flanqueada pelos mesmos pode ser amplificada (Tingey & Del Tufo, 1993).

Apesar de sua ampla utilização na década de 1990 e início dos anos 2000, a técnica RAPD tem sido substituída, pois apresenta desvantagens que limitam seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para o anelamento do *primer* ao molde torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Mudanças no termociclador, na DNA polimerase e outros reagentes da mistura da reação podem afetar significativamente o padrão de amplificação. Para contornar tais problemas, marcadores RAPD podem ser convertidos em marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”). A banda de DNA de interesse, proveniente do marcador RAPD, é excisada, purificada e clonada. A partir do seqüenciamento dos fragmentos clonados, um par de novos *primers* é sintetizado e utilizado para amplificar a mesma região do genoma. Esta estratégia tem sido empregada com sucesso em trabalhos com a cultura do feijão (Queiroz et al., 2004a; 2004b; 2004c; Rodrigues-Suárez et al., 2008; Beraldo et al., 2009; Miklas et al., 2009; Ragagnin et al., 2009).

Esta metodologia foi proposta por Paran & Michelmore (1993) e pressupõe que os novos *primers* sejam maiores. Dessa forma, a temperatura de anelamento será mais elevada, garantindo que o processo de amplificação seja mais estável e reprodutível.

O marcador OPE04_{640a} está ligado ao loco de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, presente em ‘MAR-2’ (Ferreira et al., 2000). Da mesma forma, Caixeta et al. (2003) concluíram que os marcadores OPAO12_{950a} e OPAA07_{950a} estão ligados ao loco de resistência à raça 61.41 de *P. griseola*, presente em ‘BAT 332’. Este trabalho teve por objetivo a validação de marcadores SCAR desenvolvidos previamente em nossos laboratórios (Damasceno, 2007) a partir dos marcadores RAPD OPE04_{640a}, OPAO12_{950a} e OPAA07_{950a} ligados a genes de resistência a mancha-angular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e cruzamentos

As sementes foram fornecidas pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV). Os cultivares ‘MAR-2’ e ‘BAT 332’ foram cruzados com ‘Rudá’, o qual foi o genitor feminino. Para assegurar que as plantas F_1 de cada cruzamento foram produtos de hibridação, analisou-se a cor, formato, tamanho e brilho das sementes F_2 (Figura 1). As populações segregantes F_2 foram usadas para a validação dos marcadores SCAR (Tabela 1).

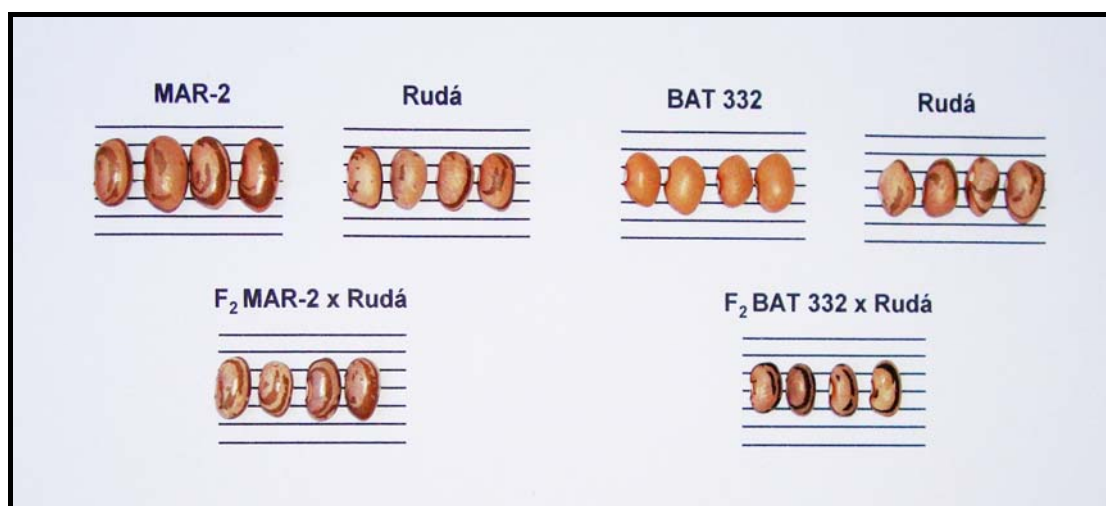


Figura 1. Aspectos da forma, tamanho, cor e brilho das sementes dos genitores e suas respectivas populações F_2 derivadas.

Tabela 1. Genitores, raças e marcadores SCAR utilizados nas validações

Genitores	Raça	Tamanho da população F_2	Marcador SCAR*
MAR-2 x Rudá	63.39	376	SE04 _{640a}
BAT 332 x Rudá	63.47	376	SAO12 _{950a}
	63.47	376	SAA07 _{950a}

*a: acoplamento.

2.2. Avaliações fenotípicas

2.2.1. Raças e preparo do inóculo

As avaliações da reação à mancha-angular foram realizadas com as raças 63.39 para F₂ (MAR-2 x Rudá) e 63.47 para F₂ (BAT 332 x Rudá), as quais foram caracterizadas por Nietzsche et al. (2002) e Balbi et al. (2009), respectivamente. O inóculo de cada raça consistiu de uma suspensão de conídios preparada raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade crescendo a 24°C sobre placas contendo uma mistura água destilada, molho de tomate, ágar e carbonato de cálcio (CaCO₃). Essa suspensão foi filtrada em gase e posteriormente ajustada para a concentração final de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL (Sanglard et al., 2009).

2.2.2. Inoculação e avaliação dos sintomas

As inoculações foram realizadas em ambas as superfícies da primeira folha trifoliolada 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 uma câmara de nevoeiro (20 ± 1°C e umidade relativa > 95%), onde permaneceram por 48 h, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram até serem avaliadas.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por Pastor-Corrales & Jara (1995): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da

doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.3. Análises moleculares

2.3.1. Extração de DNA

Cerca de 300 mg de folha foram triturados em um politron (Nova Técnica) na presença de 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 40 min e, posteriormente, centrifugados por 5 min a 14.000 rpm em microcentrífuga *Eppendorf* 5415C (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA). O sobrenadante foi transferido para microtubos novos. Ao sobrenadante, foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram, suavemente, invertidos e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi transferida para microtubos novos e o DNA precipitado com a adição de 800 µL de isopropanol gelado. O isopropanol foi descartado, sendo adicionados 600 µL de etanol gelado (95%) ao precipitado. Após o descarte do etanol, o precipitado foi seco ao ar, ressuspensão em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubado a 37 °C, por 30 minutos, com RNase A à concentração final de 60 µg/mL. O DNA foi novamente precipitado com a adição de 30 µL de NaCl 5M e 200 µL de isopropanol gelado aos microtubos, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com 600 µL de etanol gelado 95%, seco ao ar e ressuspensão em um volume de 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro, por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 ng/mL de DNA fita dupla (Sambrook et al., 1989).

2.3.2. Determinação das condições de amplificação dos marcadores SCAR

Amostras de DNA dos cultivares contrastantes foram amplificadas com os *primers* SCAR (Tabela 2) em diferentes valores de temperatura de anelamento, no intervalo de 50 a 70°C.

Tabela 2. *Primers* SCAR desenvolvidos a partir dos marcadores moleculares RAPD

<i>Primer</i>	Seqüência do <i>primer</i> (5'→3')*	T _F (pb)
SAO12	F: GGTCTCAAGCTACAGCGAAA R: CGGTCTCGATGGTTCTGACT	950
SAA07	F: CGCTCACTTATCGAAGATCG R: CGCTCACTGATTATAGACAAAATTACC	950
SE04	F: TGACATGCCCCACTTAGTTAGA R: CATGCCATGATTACCTTCC	640

*Seqüências obtidas por Damasceno (2007); T_F (pb): tamanho do produto de amplificação em pares de bases.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 15 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 pmoles de cada *primer* específico, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador modelo Robocycler (*Eppendorf* AG 22331, Hamburg, Alemanha), programado para uma etapa a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, cada valor do gradiente (50,0 °C; 50,3 °C; 51,5 °C; 53,4 °C; 55,7 °C; 58,3 °C; 61,0 °C; 63,7 °C; 66,1 °C; 68,0 °C; 69,4 °C e 70,0 °C) por 1 minuto, e 72 °C por 90 segundos. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em SB 1X (hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico) (Brody & Kern, 2004), contendo brometo de etídio 0,2 mg/mL, por cerca de 2 h a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.4. Determinação das distâncias genéticas

As frequências genotípicas esperadas na população F_2 utilizando marcadores dominantes ligados em fase de aproximação podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Frequências genotípicas esperadas na população F_2 utilizando marcadores dominantes ligados em fase de aproximação, derivada cruzamento entre indivíduos com genótipos MMGG x mmgg

Genótipo	Código	Nº Obs	Frequência esperada	$P_i(\text{RIG})$
M-G-	4-4	a1	$p_1 = \frac{1}{2} + \frac{1}{4}(1-r)^2 = \frac{1}{4}(2+s^2)$	$\frac{2r}{(3r-2r+r^2)}$
M-gg	4-2	a2	$p_2 = \frac{1}{4} - \frac{1}{4}(1-r)^2 = \frac{1}{4}(1-s^2)$	$\frac{1}{(2-r)}$
mmG-	2-4	a3	$p_3 = \frac{1}{4} - \frac{1}{4}(1-r)^2 = \frac{1}{4}(1-s^2)$	$\frac{1}{(2-r)}$
mmgg	2-2	a4	$p_4 = \frac{1}{4}(1-r)^2 = \frac{1}{4}s^2$	0,0

M/m: loco relacionado à marca molecular; G/g: loco do gene de interesse; Nº Obs: número observado; $P_i(\text{RIG})$: probabilidade de que um gameta seja recombinante, dado o genótipo dos locos; $s = (1-r)$.

O teste de qui-quadrado (χ^2_{Total}) foi efetuado com o auxílio do programa GQMOL (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm) visando avaliar se houve ajuste para as proporções de 9:3:3:1, considerando 3 graus de liberdade. Também foi decomposto o qui-quadrado obtido na análise das quatro classes fenotípicas, em qui-quadrado associado à hipótese de segregação do gene de resistência “G/g”, da marca molecular “M/m”, e de forma conjunta; estando todos associados a 1 grau de liberdade.

As seguintes expressões foram calculadas a 5% de probabilidade a partir da decomposição do qui-quadrado (χ^2_{Total}):

$$\chi^2_{(M/m)} = \frac{(a1 + a2 - 3a3 - 3a4)^2}{3N}$$

$$\chi^2_{(G/g)} = \frac{(a1 - 3a2 + a3 - 3a4)^2}{3N}$$

$$\chi^2_{\text{conjunta}} = \frac{(a1 - 3a2 - 3a3 - 9a4)^2}{9N}$$

sendo $N = a1 + a2 + a3 + a4$

Os dados das reações de amplificação com marcadores SCAR foram codificados como presença (4) e ausência (2) nos indivíduos das populações F_2 (MAR-2 x Rudá) e F_2 (BAT 332 x Rudá). Codificação semelhante foi utilizada para os indivíduos resistentes (4) e suscetíveis (2) destas populações, com base nas inoculações. A determinação da distância genética entre as marcas moleculares e os genes de resistência também foi feita com o auxílio do programa GQMOL (Schuster & Cruz, 2008). Marcadores e genes de resistência foram agrupados, utilizando-se valor de LOD mínimo igual a 3,0 e máxima recombinação igual a 30%. Para a estimação da porcentagem de recombinação, foi utilizada a função de máxima verossimilhança disponível na interface do programa. Para a distribuição multinomial, tem-se a seguinte função densidade de probabilidade:

$$f(x) = \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_n!} p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_n^{n_n}$$

A partir de uma população de tamanho N com n possíveis classes, obtém-se a seguinte função de máxima verossimilhança considerando uma população F_2 com marcadores ligados em fase de aproximação:

$$L(r; n_i) = \lambda p_1^{n_1} p_2^{n_2} p_3^{n_3} p_4^{n_4}, \text{ sendo:}$$

$$\lambda = \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_n!} \quad \text{e} \quad N = \sum_{i=1}^n n_i$$

n_i = número de ocorrência do evento x_i com probabilidade p_i .

ou, de forma equivalente e consultando as frequências esperadas da Tabela 3:

$$L(r; n_i) = \lambda \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{4}(1-r)^2 \right]^{n_1} \left[\frac{1}{4} - \frac{1}{2}(1-r)^2 \right]^{n_2+n_3} \left[\frac{1}{4}(1-r)^2 \right]^{n_4}$$

considerando $s = (1-r)$, tem-se:

$$L(s; n_i) = \lambda \left(\frac{2+s^2}{4} \right)^{n_1} \left(\frac{1-s^2}{4} \right)^{n_2+n_3} \left(\frac{1}{4} s^2 \right)^{n_4}$$

portanto, a função suporte é dada por:

$$\ell(s; n_i) = \ln(\lambda) + n_1 \ln(2+s^2) + (n_2+n_3) \ln(1-s^2) + n_4 \ln(s^2) - N \ln(4)$$

obtem-se por derivação da função suporte em relação a s, a função escore:

$$\frac{\partial \ell(s; n_i)}{\partial s} = \frac{n_1}{2+s^2} (2s) + \frac{n_2+n_3}{1-s^2} (-2s) + \frac{n_4}{s^2} (2s), \text{ de forma que:}$$

$$\frac{\partial \ell(s; n_i)}{\partial s} = \frac{2n_1(s^3 - s^5) - 2(n_2+n_3)(2s^3 + s^5) + 2n_4(2s - s^3 - s^5) + 2n_4(2s - s^3 - s^5)}{(2+s^2)(1-s^2)s^2}$$

igualando a zero a função escore, obtém-se o polinômio de verossimilhança dado por:

$$-2n_4 - s^2(n_1 - 2n_2 - 2n_3 - n_4) + Ns^4 = 0$$

A função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944) foi utilizada na conversão da frequência de recombinação para distância em centiMorgans, onde se leva em conta a existência de interferência (I). Dessa forma, considera-se que a coincidência (C) pode ser expressa por 2r (r = % de recombinação), de forma a assumir os seguintes valores:

Se r = 0; então C = 2r = 0 e I = 1

Se r = 0,5; então C = 2r e I = 0

adota-se, portanto, a expressão:

$$m_k = \int_0^r \frac{1}{1-2cr} \partial r, \text{ sendo:}$$

m_k : distância entre locos expressa por Kosambi (1944), onde:

$$m_k = \int_0^r \frac{1}{1-4r^2} \partial r = \int_0^r \frac{1}{(1-2r)(1+2r)} \partial r$$

fazendo $u = \frac{1-2r}{1+2r}$, chega-se a:

$$\frac{\partial u}{\partial r} = (1-2r)' \frac{1}{1+2r} + (1-2r) \left(\frac{1}{1+2r} \right)' = \frac{-2}{1+2r} - \frac{(1-2r)(2)}{(1+2r)^2} = \frac{-4}{(1+2r)^2}; \text{ ou}$$

$$\partial u = \frac{-4}{(1+2r)^2} \partial r \quad (\text{se } r = 0, \text{ então } u = 1); \text{ tem-se, portanto:}$$

$$m_k = \int_0^r \frac{1}{(1-2r)(1+2r)} \partial r = \int_0^r \frac{(1+2r)}{(1-2r)} \frac{1}{(1+2r)^2} \partial r = -\frac{1}{4} \int_0^{\frac{1-2r}{1+2r}} \frac{1}{u} \partial u; \text{ logo:}$$

$$m_k = -\frac{1}{4} [\ln(u)] \Big|_0^{\frac{1-2r}{1+2r}} = -\frac{1}{4} \left[\ln\left(\frac{1-2r}{1+2r}\right) - \ln(1) \right]; \text{ e finalmente:}$$

$$m_k = -\frac{1}{4} \ln\left(\frac{1-2r}{1+2r}\right) \quad \text{e} \quad r = \frac{1}{2} \left[\frac{e^{4m_k} - 1}{e^{4m_k} + 1} \right]$$

2.5. Nomenclatura dos *primers* SCAR

A nomenclatura dos marcadores SCAR foi derivada da numeração do RAPD que o originou, precedida pela letra S. As designações F para *forward* e R para *reverse* foram utilizadas para diferenciar cada *primer* SCAR. Portanto, a representação SE04F se refere ao *primer* SCAR *forward* originado da sequência do fragmento OPE04_{640a}.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho três *primers* SCAR foram validados quanto ao monitoramento de genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro. Inicialmente, a população F₂ (MAR-2 x Rudá) foi inoculada com a raça 69.39 de *P. griseola*, sendo esta, a mesma utilizada no trabalho de identificação do marcador OPE04_{640a}, conduzido por Ferreira et al. (2000). A raça 61.41, a qual originalmente foi utilizada na identificação dos marcadores OPAA07_{950a} e OPAO12_{950a} tendo 'BAT 332' como fonte de resistência (Caixeta et al., 2003), não estava mais disponível. Dessa forma, foi necessário testar outras raças para as análises de co-segregação. A partir do trabalho realizado por Balbi et al. (2007), foi verificado que 'BAT 332' é resistente às raças 15.7, 63.7, 47.39 e 63.47. Estas foram inoculadas em grupos individuais de 50 plantas da população F₂ (BAT 332 x Rudá). Como resultado, foi utilizada a raça 63.47 por proporcionar melhor discriminação das reações ao patógeno e pelo padrão de segregação 3:1 (resistência condicionada por um gene com relação alélica de dominância completa). Após os testes de gradiente, foram consideradas apropriadas as temperaturas de 60 °C, 62 °C e 65 °C referentes aos marcadores SAA07_{950a}, SAO12_{950a} e SE04_{640a}, respectivamente. As seqüências, a natureza dos marcadores, e as condições de amplificação na PCR estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Seqüências e condições de amplificação para marcadores moleculares SCAR ligados a genes de resistência à mancha-angular

Marcador	Seqüência do <i>primer</i> (5' → 3')*	Características da PCR				T _F (pb)	Natureza do marcador
		Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
AO12	F: GGTCTCAAGCTACAGCGAAA R: CGGTCTCGATGGTTCTGACT	35	94 °C/30 s	62 °C/1 min	72 °C/90 s	950	Dominante
SAA07	F: CGCTCACTTATCGAAGATCG R: CGCTCACTGATTATAGACAAAATTACC	35	94 °C/30s	60 °C/1 min	72 °C/90 s	950	Dominante
SE04	F: TGACATGCCCCACTTAGTTAGA R: CATGCCATGATTACCTTCC	35	94 °C/30s	65 °C/1 min	72 °C/90 s	640	Dominante

*Seqüências obtidas por Damasceno (2007); T_F (pb): tamanho do produto de amplificação em pares de bases.

Ao se lançar a hipótese de independência de segregação entre dois locos quaisquer, a razão de segregação esperada é igual a 9:3:3:1. Essa proporção pode ser testada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), considerando todas as quatro classes fenotípicas e três graus de liberdade (Schuster & Cruz, 2008). No entanto, a rejeição desta hipótese não implica que os locos estejam ligados, pois é possível que, no caso de uma validação de marcador molecular, um gene de resistência “G/g” ou o loco para o marcador “M/m”, não estejam segregando na proporção esperada de 3:1. Para verificar essa possibilidade, foram decompostos os qui-quadrados obtidos das quatro classes, em qui-quadrados associados à hipótese de segregação do gene “G/g”, do loco marcador “M/m”, e de forma conjunta (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Análise da segregação do gene que confere resistência à raça 63.39 de *P. griseola* e do marcador SE04_{640a} na população F₂ (Rudá x MAR-2)

Loco	Proporção esperada	Proporção observada	χ^2	P(%)	cM
M/m	3:1	277:99	0,3546	55,1515	
G/g	3:1	285:91	0,1276	72,0871	
M/m G/g	9:3:3:1	270:7:15:84	272,3404	0	6,03

M/m: loco relacionado ao marcador SE04_{640a}; G/g: loco do gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*; P(%): probabilidade associada ao teste de qui-quadrado (χ^2); cM: distância genética (centiMorgans) obtida por meio da função de mapeamento de Kosambi (1944).

Tabela 6. Análise da segregação do gene que confere resistência à raça 63.47 de *P. griseola* e dos marcadores SAA07_{950a} e SAO12_{950a} na população F₂ (Rudá x BAT332)

Loco	Proporção esperada	Proporção observada	χ^2	P(%)	cM
M1/m1	3:1	285:91	0,1276	72,0871	
M2/m2	3:1	280:96	0,0567	81,1728	
G/g	3:1	285:91	0,1276	72,0871	
M1/m1 G/g	9:3:3:1	276:9:9:86	293,1489	0	4,92
M2/m2 G/g	9:3:3:1	272:8:10:86	290,7905	0	7,02
M2/m2 M1/m1	9:3:3:1	277:3:5:91	94,6678	0	2,10

M1/m1: loco relacionado ao marcador SAA07_{950a}; M2/m2: loco relacionado ao marcador SAO12_{950a}; G/g: loco do gene de resistência à raça 63.47 de *P. griseola*; P(%): probabilidade associada ao teste de qui-quadrado (χ^2); cM: distância genética (centiMorgans) obtida por meio da função de mapeamento de Kosambi (1944).

Em todos os casos, foi observado que os locos relacionados aos genes de resistência e aos respectivos marcadores moleculares, segregaram, individualmente, como esperado, na proporção 3:1. O padrão de herança monogênica dominante também já havia sido descrito para os genótipos ‘MAR-2’ e ‘BAT 332’ na identificação dos respectivos marcadores RAPD (Ferreira et al., 2000; Caixeta et al., 2003). Neste trabalho, as segregações conjuntas foram rejeitadas sob a hipótese de independência, confirmando a ligação entre os marcadores e os genes de resistência.

A mensuração da frequência de gametas recombinantes entre dois locos constitui procedimento importante para o cálculo das distâncias genéticas (Staub et al., 1996). Diversos tratamentos estatísticos podem ser usados para estimar a frequência de recombinantes, entre eles, o método analítico obtendo a função de máxima verossimilhança (Liu, 1997). O intervalo de confiança para a frequência de recombinação pode ser estabelecido por meio do LOD score. Este por sua vez representa a razão de verossimilhança, em que no numerador é disposta a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r ; e, no denominador, a função de verossimilhança considerando $r = 0,5$ (ausência de ligação). Para facilitar a interpretação, essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo este termo definido como LOD score (Beazortti, 2000). Por exemplo, um valor de LOD score igual a 3,0 implica que há uma probabilidade 1.000 vezes maior da presença de ligação do que da ausência de ligação entre os locos em estudo.

Assim, o intervalo suporte (ou intervalo de confiança) pode ser obtido a partir da curva dos valores de LOD score, em função dos valores da porcentagem de recombinação entre os locos. Este intervalo é delimitado pelos pontos correspondentes da porcentagem de recombinação obtidos a partir da redução em uma unidade do LOD representativo do ponto de máximo da curva (Schuster & Cruz, 2008). Nas Figuras 2, 3 e 4 são apresentados os gráficos contendo os intervalos de confiança dos valores de recombinação referentes aos marcadores SAA07_{950a}, SA012_{950a} e SE04_{640a}, respectivamente.

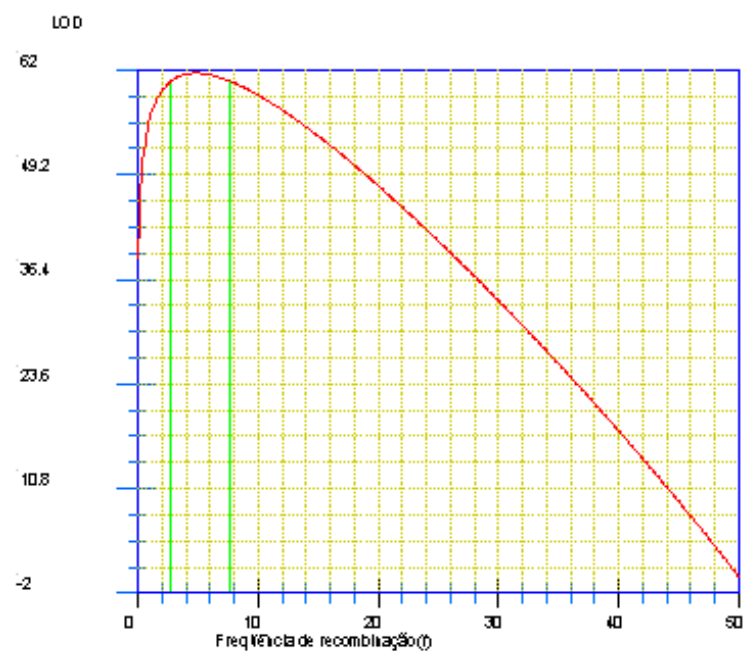


Figura 2. Valores de LOD score em função das frequências de recombinação, relativos à análise entre o marcador SAA07_{950a} e o gene de resistência à raça 63.47 de *P. griseola*. As colunas verdes delimitam o intervalo de confiança da estimativa de recombinação. LOD máximo = 61,6314; limite inferior = 2,90; limite superior = 7,70.

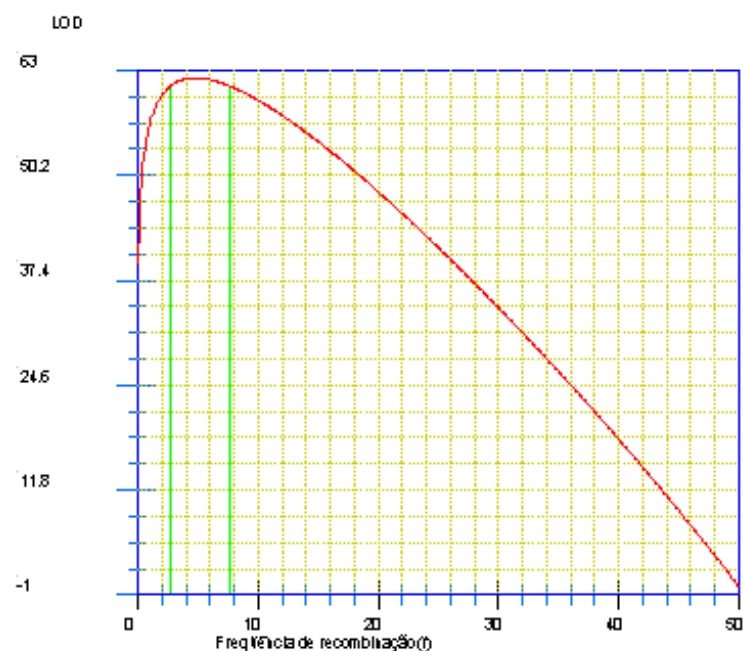


Figura 3. Valores de LOD score em função das frequências de recombinação relativos à análise entre o marcador SAO12_{950a} e o gene de resistência à raça 63.47 de *P. griseola*. As colunas verdes delimitam o intervalo de confiança da estimativa de recombinação. LOD máximo = 62,0790; limite inferior = 2,90; limite superior = 7,70.

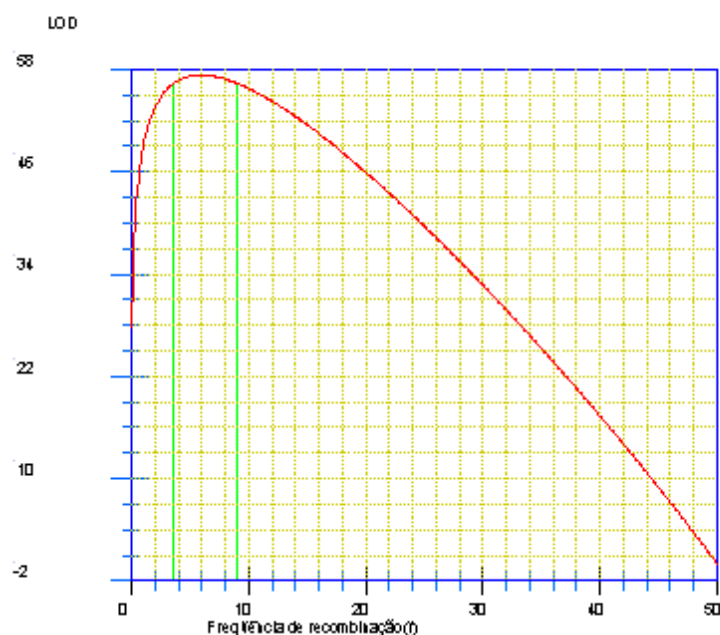


Figura 4. Valores de LOD score em função das frequências de recombinação relativos à análise entre o marcador SE04_{640a} e o gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*. As colunas verdes delimitam o intervalo de confiança da estimativa de recombinação. LOD máximo = 57,3513; limite inferior = 3,70; limite superior = 9,10.

Alguns aspectos importantes para a obtenção dos intervalos de confiança e maior precisão das estimativas das frequências de recombinação entre dois locos, se referem ao tipo e tamanho das populações utilizadas, além da natureza do marcador molecular. Nos trabalhos de simulação realizados por Schuster & Cruz (2008) foram obtidos os tamanhos mínimos de determinadas populações necessários para se obterem as frequências de recombinação entre dois locos em função da precisão desejada. Considerando uma população F_2 , trabalhada com um marcador dominante em fase de acoplamento, e no nível de significância α de 5%; seriam necessários pelo menos 310 indivíduos. Neste trabalho, foram utilizadas populações com 376 indivíduos, atendendo ao critério para esta precisão das estimativas.

Embora a frequência de recombinantes indique a medida de distância entre dois locos ao longo de determinado cromossomo, o ideal é que as distâncias usadas na construção de mapas genéticos sejam totalmente aditivas, de modo que, ao atribuir novos locos (marcadores) ao mapa, não seja

necessário ajustar as distâncias já estabelecidas. Entretanto, as frequências de recombinação não são aditivas; sendo, portanto, inadequadas como medidas diretas de distâncias entre dois locos a serem mapeados, ou no caso de ligação entre genes de interesse e marcadores moleculares com o intuito de seleção assistida (Staub et al., 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Para estabelecer a relação entre as distâncias genéticas entre dois locos em um mapa e a frequência de gametas recombinantes, são utilizadas as chamadas funções de mapeamento. Neste estudo, foi utilizada a função de Kosambi (Kosambi, 1944), a qual admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência). Assim, esta função assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo decrescente para locos mais distantes, e iguais à zero para locos independentes (Zeng, 1994; Liu, 1997). Na Figura 5 são apresentadas as posições relativas e distâncias genéticas entre os marcadores moleculares e os genes de resistência à mancha-angular, para os quais foram validados.

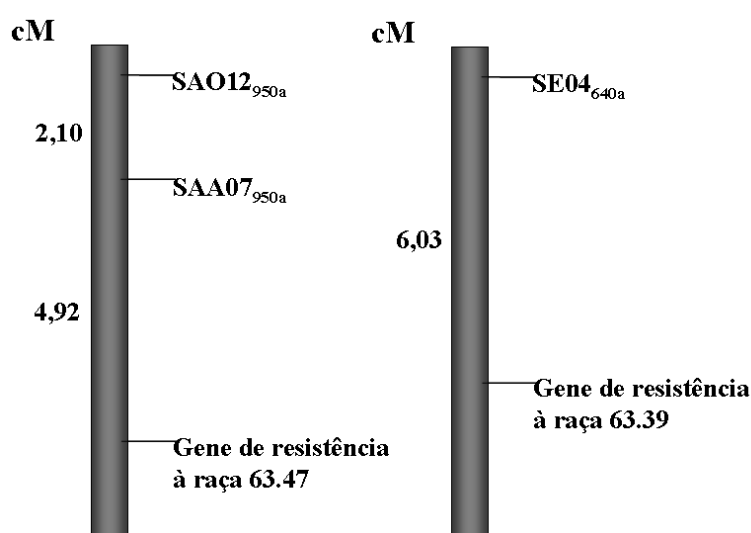


Figura 5. Posições relativas e distâncias genéticas entre os marcadores moleculares e os genes de resistência à mancha-angular, para os quais foram validados.

No estudo realizado por Ferreira et al. (2000), constatou-se que o marcador RAPD OPE04_{640a} estava ligado ao loco de resistência à raça 63.39, presente em 'MAR-2', a uma distância de 5,80 cM. No caso dos marcadores

OPAO12_{950a} e OPAA07_{950a}, as distâncias foram de 5,83 cM e 5,10 cM, em relação ao loco de resistência à raça 61.41, oriundo de ‘BAT 332’ (Caixeta et al., 2003). Neste trabalho, foram estimadas as distâncias de 6,03 cM, 7,02 cM e 4,92 cM, referentes aos marcadores SCAR SE04_{640a}, SAO12_{950a} e SAA07_{950a}, respectivamente. Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças nos tamanhos das populações usadas na obtenção das estimativas das distâncias, e pela substituição da raça 61.41 por 63.47, considerando os marcadores SAO12_{950a} e SAA07_{950a}.

Nietsche et al. (2002) avaliando a reação de nove cultivares de feijoeiro a 60 isolados de *P. griseola*, classificados em 25 raças, relataram os genótipos ‘México 54’ e ‘MAR-2’ como sendo importantes fontes de resistência a mancha-angular. Considerando o estudo de alelismo conduzido por Caixeta et al., (2005), quando utilizada a raça 63.39 de *P. griseola*, não foi observada segregação da população F₂ oriunda do cruzamento entre ‘México 54’ e ‘MAR-2’, comprovando a presença de um loco em comum. Estes dois genótipos apresentam diferentes reações, quando testados contra um conjunto de raças do patógeno, sugerindo que, os fatores presentes naquele loco em comum não são o mesmo alelo e sim formas alélicas distintas. Deste modo, ‘México 54’ possuiria o alelo *Phg-5* e ‘MAR-2’ o alelo *Phg-5*², sendo possível que as isolinhas derivadas destes genótipos possuam apenas formas alélicas de um mesmo gene, o que seria inviável do ponto de vista da piramidação.

Os marcadores RAPD OPE04_{640a} e OPE04_{650a}, os quais monitoram os genes de resistência presentes em ‘MAR-2’ e ‘México 54’, respectivamente, geram produtos específicos. A banda amplificada a partir do DNA de ‘MAR-2’ não se manifesta em ‘México 54’, e vice-versa. Entretanto, as posições das bandas de tamanhos específicos ligadas a cada loco de resistência, aparecem muito próximas, o que impossibilita sobre a inferência de genótipos que possuam as duas marcas simultaneamente. Neste trabalho foi observado que o marcador SE04_{640a}, validado na população F₂ (MAR-2 x Rudá), também gerou banda em posição similar quando testado com o DNA de ‘México 54’, o que inviabiliza seu uso no caso do inter cruzamento de materiais derivados destes

genótipos. Além disso, foi observada uma segregação independente na tentativa de validação do marcador SE04_{640a} por meio da população F₂ (México-54 x Rudá) e a raça 63.19.

O genótipo ‘BAT 332’ tem uma especial importância por apresentar uma resistência complementar às outras fontes de resistência (Nietsche et al., 2002; Balbi et al., 2007). Os marcadores SAO12_{950a} e SAA07_{950a}, identificados no presente trabalho, podem auxiliar a incorporação da resistência desse genótipo, em outros *backgrounds* genéticos de interesse. Esses marcadores foram testados nas fontes de resistência ‘México 54’, ‘MAR-2’, ‘Cornell 49-242’ e ‘AND 277’, sendo que a banda só foi amplificada em ‘BAT 332’. Este resultado demonstra a especificidade dos marcadores ao gene *Phg-6²* de ‘BAT 332’, facilitando a identificação deste quando linhagens derivadas das fontes forem cruzadas e os diferentes genes combinados.

Os marcadores SCAR desenvolvidos já estão sendo utilizados nos trabalhos de piramidação de genes de resistência à mancha-angular conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV. Estes têm sido utilizados em associação com dados de avaliação fenotípica, visando o aumento da eficiência de seleção.

REFERÊNCIAS

- Balbi, B. P.; Sanglard, D. A.; Sanglard, N. A.; Damasceno, J. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Phenotypical evaluation of resistance sources to common bean angular leaf spot by using races occurring in the State of Minas Gerais, Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 51:196-197, 2008.
- Balbi, B. P.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:56-57, 2009.
- Bearzoti, E. Mapeamento de QTL. In: Pinheiro, J. B.; Carneiro, I. F (Eds.). Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, 2000, p. 63-223.
- Brody, R. J. & Kern, E. S. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. BioTechniques, 36:214-216, 2004.
- Beraldo, A. L. A.; Colombo, C. A.; Chiorato, A. F.; Ito, M. F.; Carbonell, S. A. M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. Bragantia, 68: 53-61, 2009.
- Caixeta, E. T.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. Euphytica, 134:297-303, 2003.
- Caixeta, E. T.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. Euphytica, 145:237-245, 2005.
- Costa, J. G. C. Melhoramento para resistência a doenças e pragas do feijoeiro comum. Documentos IAC, Campinas, 85, 1672-1674, 2008.
- Damasceno, J. D. Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares SCAR ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro. Viçosa, MG: UFV, 39p. (Monografia). Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- Ferreira, C. F.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Nietzsche, S.; Paula Jr, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. Crop Science, 40:1130-1133, 2000.

- Kosambi, D. D. The estimation of map distances from recombination values. *Annual Eugene*, 12:172-175, 1944.
- Lynch, M. & Walsh, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 978p.
- Liu, B. H. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1997.
- Maldonado, S. H. G.; Gallegos, J. A. A.; Alvarez-Munoz, M. A.; Garciadelgados, S.; Loarca-Pina, G. Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en Mexico*, 28(2):159-173, 2002.
- Miklas, P. N.; Fourie, D.; Wagner, J.; Larsen, R. C.; Mienie, C. M. S. Tagging and mapping *Pse-1* gene for resistance to halo blight in common bean host differential cultivar UI-3. *Crop Science*, 49:41-48, 2009.
- Morgan, T. H. The theory of genes. New Haven: Yale University Press, 1928.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Alzate-Marin, A. L.; Costa, M.; Rocha, R. C.; Caixeta, E. T.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. *Summa Phytopathologica*, 28(4):331-335, 2002.
- Paran, I. & Michelmore, R. W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985-993. 1993.
- Pastor-Corrales, M. A. & Jara, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común em América Latina. *Fitopatologia Colombiana*, 19:15-24, 1995.
- Paula Júnior, T. J. & Zambolim, L. Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds.) *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais*. 2ed. Viçosa, MG, Editora UFV, 2006. p.359-414.
- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Costa, M. R.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 47:237-238, 2004a.
- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Costa, M. R.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G. Moreira, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 47:249-250, 2004b.

- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:271-272, 2004c.
- Ragagnin, V. A.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Alzate-Marin, A. L.; Carneiro, J. E. S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. Plant Breeding, 28:156-163, 2009.
- Rodríguez-Suárez, C.; Ferreira J. J.; Campa, A.; Pañeda, A.; Giradles, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. Theoretical and Applied Genetics, 116:807-814, 2008.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 3:8B, 1989.
- Sanglard, D. A.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *Pseudocercospora griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:62-63, 2009.
- Schuster, I. & Cruz, C. D. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. 2ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008, 567 p.
- Staub, J. E; Serquen, F. C.; Gupta, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience, 31(5):729-740, 1996.
- Tingey, S. V.; Del Tufo, J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiology, 101:349-352, 1993.
- Zeng, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, 136(4):492-496, 1994.
- Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 24:7213-7218, 1990.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, A.; Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18:6531-6535, 1990.

CAPÍTULO 2

Seleção e caracterização de linhagens e populações de feijão “carioca” com resistência a doenças e outras características favoráveis

Resumo: No Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV) têm sido desenvolvidas diversas linhagens possuindo genes de resistência a doenças. Partindo da população F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] portadora dos genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Phg-1*, *Phg-6*², *Phg-4* e/ou *Phg-5*²; foram avançadas duas gerações em casa de vegetação, pelo método *bulk* dentro de famílias. Durante este processo, foram realizados testes quanto à presença dos genes de resistência por meio de marcadores moleculares. Após testes de progênie, as isolinhas possuidoras de todos os alelos fixados foram avaliadas a campo para produtividade, cor do grão e resistência à mancha-angular. As linhagens que se destacaram foram caracterizadas em de casa de vegetação quanto à reação a diversas raças de *Pseudocercospora griseola* (mancha-angular), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose) e *Uromyces appendiculatus* (ferrugem). Também foram avaliadas a campo e caracterizadas com raças das três doenças, algumas isolinhas derivadas de três ciclos de retrocruzamentos entre ‘Ouro Negro’ e ‘Pérola’, portadoras dos genes *Ur-ON*, *Co-10* e *Phg-ON*. Ao final do processo, foram selecionadas 15 linhagens com grãos padrão “carioca”; com produtividades similares aos cultivares ‘Rudá’ e ‘Pérola’; e resistentes à mancha-angular, antracnose e ferrugem. Visando a continuidade dos trabalhos de melhoramento, foram obtidas também novas populações de feijão “carioca” com diversas combinações de genes de resistência para as três doenças.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* – melhoramento do feijoeiro – resistência a doenças – marcadores moleculares – piramidação.

1. INTRODUÇÃO

As doenças que acometem o feijoeiro são uma das causas da baixa produtividade dessa cultura no Brasil. Dentre as doenças mais importantes destacm-se a mancha-angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun; a antracnose, por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Lams.-Scrib.; e a ferrugem, por *Uromyces appendiculatus* (Pers.), que podem levar a sérios prejuízos, principalmente durante os meses de abril a julho, quando são observadas, nas principais regiões produtoras, temperaturas amenas e ocorrência de orvalho (Paula Júnior & Zambolim, 2006). É fundamental que o controle dessas doenças seja feito de forma integrada, adotando-se conjuntamente diferentes medidas e tendo em vista as características desses patógenos.

Dentre os métodos de controle, a utilização de cultivares resistentes merece destaque especial, por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível aos produtores dos diversos níveis tecnológicos de produção. No entanto, a existência de raças fisiológicas e a constante evolução dos patógenos demandam uma permanente busca por novas fontes de resistência. A piramidação ou a associação de genes de resistência em um mesmo cultivar tem sido proposta como forma de obter resistência duradoura e de amplo espectro (Johnson, 1984; Sanjay et al., 2001; Kelly et al., 2003; Servin et al., 2004).

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

moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência; (iv) obtenção de genótipos contendo os genes de resistência e as marcas moleculares correspondentes, mais comumente, por meio de retrocruzamentos; e (v) validação dos marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos genes de resistência, evitando problemas posteriores com os falsos positivos (Alzate-Marin et al., 2005).

Nos últimos anos, vários marcadores moleculares ligados a genes de resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem foram utilizados durante a obtenção de isolinhas em subprogramas de retrocruzamentos. Corrêa et al. (2000) identificaram o marcador OPBA08_{560a} ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 6,0 cM presente no cultivar ‘Ouro Negro’. Também, neste cultivar, foram identificados os marcadores OPF10_{1050a} e OPX11_{550a} ligados a 7,7 e 5,8 cM de distância do gene de resistência à ferrugem, respectivamente (Faleiro et al., 2000). Arruda et al. (2000) identificaram no cultivar ‘TO’ os marcadores OPY20_{830a} e OPB03_{1800a} ligados a distâncias de 0,0 e 3,8 cM do gene *Co-4* que confere resistência à antracnose. Seu alelo *Co-4*² presente em ‘G 2333’ pode ser monitorado pelo marcador OPAS13_{950a} a 0,0 cM (Young et al., 1998). O cultivar ‘G 2333’ possui também o gene *Co-5*, o qual está ligado ao marcador OPAB03_{450a} a 5,9 cM (Young & Kelly 1997). Alzate-Marin et al. (1999) identificaram o marcador OPAZ20_{940a} ligado ao gene *Co-6*, presente no cultivar ‘AB 136’ a uma distância de 7,4 cM.

No caso da mancha-angular, Carvalho et al. (1998) trabalhando com o cultivar ‘AND 277’, relataram que o marcador OPH13₄₉₀ está ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência à raça 63.23 de *P. griseola*, a uma distância de 5,5 cM. Os marcadores RAPD OPN02_{890a}, OPAC14_{2400a}, e OPE04_{650a} estão ligados em acoplamento, respectivamente, a 5,9; 6,6 e 11,8 cM de distância do gene de resistência à raça 63.19, presente em ‘México 54’ (Sartorato et al., 1999). Os marcadores SCAR N02_{890a} e OPE04_{650a}, também estão ligados ao gene de resistência à raça 31.17, presente em ‘Cornell 49-242’, às distâncias de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente (Nietsche et al., 2000b).

O marcador OPE04_{640a}, também em fase de acoplamento, está ligado ao gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, presente em ‘MAR-2’, a uma distância de 5,8 cM (Ferreira et al., 2000). (Caixeta et al., 2003) relataram que os marcadores OPAO12_{950a} e OPAA07_{950a} estão ligados a 5,83 e 5,10 cM, respectivamente, do gene de resistência à raça 61.41 de *P. griseola*, oriundo de ‘BAT 332’. Posteriormente, vários marcadores SCAR foram desenvolvidos para a maioria destes marcadores (Young et al., 1998; Correa et al., 2000; Nietsche et al., 2000; Vallejo et al., 2001; Queiroz et al., 2004a; Queiroz et al., 2004b).

Com o auxílio destes marcadores moleculares, foram desenvolvidas no Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV isolinhas com grãos tipo “carioca” contendo os genes *Ur-ON* e *Co-10*, que conferem resistência à ferrugem e à antracnose, respectivamente, provenientes de ‘Ouro Negro’; *Co-4* e *Co-6*, que conferem resistência à antracnose, provenientes de ‘TO’ e ‘AB 136’; *Phg-1*, que confere resistência à mancha-angular, proveniente de ‘AND 277’. Ragagnin et al. (2005); (2009) inter cruzaram estes materiais concentrando os genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1* em uma linhagem que foi denominada ‘Rudá R’. Em seguida, visando o aperfeiçoamento da pirâmide gênica estabelecida, Sanglard et al. (2007) introgridiram novos genes de resistência à mancha-angular advindos das fontes ‘MAR-2’ e ‘BAT 332’, originando genótipos que propiciaram o desenvolvimento das linhagens denominadas ‘Rudá R3’. Também foram desenvolvidas diversas linhagens derivadas do cruzamento entre os cultivares ‘Ouro Negro’ e ‘Pérola’, contendo os genes *Ur-ON*, *Co-10* e *Phg-ON*, as quais pertencem ao grupo ‘Pérola R1’ (Sanglard et al., 2005).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho selecionar e caracterizar as linhagens ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’ em casa de vegetação e campo; quanto à produtividade, aspecto de grãos, e reação a diversas raças de *P. griseola*, *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*. Visando à continuidade dos trabalhos de melhoramento, objetivou-se também a obtenção de populações de feijão

“carioca” portando novas combinações de genes de resistência para estas três doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais de condução dos experimentos

Os cruzamentos e a condução das populações foram realizados em condições de casa de vegetação, no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária/UFV. As inoculações com os patógenos incitadores de mancha-angular, antracnose, e ferrugem foram realizadas nas câmaras de nevoeiro pertencentes ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas. Os testes de campo foram realizados na Estação Experimental de Coimbra, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, em Coimbra-MG.

2.2. Material genético

Neste trabalho, os cultivares ‘Rudá’, ‘Pérola’ e ‘BRSMG Talismã’ foram os *background* genéticos adotados, sendo todos de grãos tipo “carioca”. Também foram intercruzadas diversas isolinhas, as quais possuem genes de resistência a doenças de forma individual e/ou em processo de piramidação. (Tabela 1).

Tabela 1. Isolinhas intercruzadas e/ou avaliadas visando melhoramento genético para resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem do feijoeiro.

Isolinhas	Genealogias	Genes de resistência	Referência
MAR-138A-1-11-4	Rudá/MAR-2	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	Oliveira et al. (2005)
BAT-67-15-8	Rudá/BAT 332	<i>Phg-6</i> ²	Oliveira et al. (2005)
MEX-37-3-6-3	Rudá/México 54	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	Oliveira et al. (2005)
COR-25-12-9	Rudá/Cornell 49-242	<i>Phg-3</i>	Damasceno et al. (2007)
Pérola R	Pérola/AB136/TO/ Ouro Negro/AND 277	<i>Phg-1</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Ragagnin et al. (2005); (2009)
Pérola R1 (6 linhagens)	Pérola/Ouro Negro	<i>Phg-ON</i> , <i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>	Obtidas neste trabalho
Rudá R	Rudá/AB136/TO/ Ouro Negro/AND 277	<i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> , <i>Ur-ON</i> , e <i>Phg-1</i>	Ragagnin et al. (2005); (2009)
Rudá R1	Rudá/AND 277/ AB136/ TO/Ouro Negro/G 2333	<i>Co-4</i> ² , <i>Co-5</i> , <i>Co-6</i> , <i>Ur-ON</i> , <i>Co-10</i> e <i>Phg-1</i>	Arruda (2005)
Rudá R3 (9 linhagens)	Rudá/AB136/TO/ Ouro Negro/AND277/ MAR-2/BAT332	<i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> , <i>Co-10</i> , <i>Ur-ON</i> , <i>Phg-1</i> , <i>Phg-6</i> ² , <i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	Obtidas neste trabalho

2.3. Estratégia de melhoramento

Partindo da população F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] obtida por Sanglard et al. (2007) foram avançadas duas gerações em condições de casa de vegetação, pelo método genealógico. Durante este processo, foram realizados testes quanto à presença dos genes de resistência por meio de marcadores moleculares. Após testes de progênie, as isolinhas possuidoras de todos os alelos fixados foram avaliadas a campo para produtividade, cor do grão e resistência à mancha-angular. Os materiais que se destacaram foram caracterizados em casa de vegetação quanto à reação à diversas raças de *P. griseola*, *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, disponíveis na micoteca do BIOAGRO/UFV. Também foram avaliadas a campo e caracterizadas com raças das três doenças algumas isolinhas derivadas do cruzamento entre Pérola e Ouro Negro (Sanglard et al., 2005).

Em trabalhos anteriores conduzidos no Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV foram desenvolvidas as linhagens denominadas ‘Rudá R’ e ‘Pérola R’ (Ragagnin et al., 2005; 2009); ‘Rudá R1’ (Arruda, 2005); e ‘Rudá R2’ (Souza, 2005a). Dessa forma, convencionou-se nomear as linhagens obtidas neste trabalho, derivadas das populações $F_{3:6}$ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] e $RC_3F_{2:6}$ (Pérola x Ouro Negro), por ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’, respectivamente. O resumo esquemático da estratégia de melhoramento empregada pode ser observado na Figura 1.

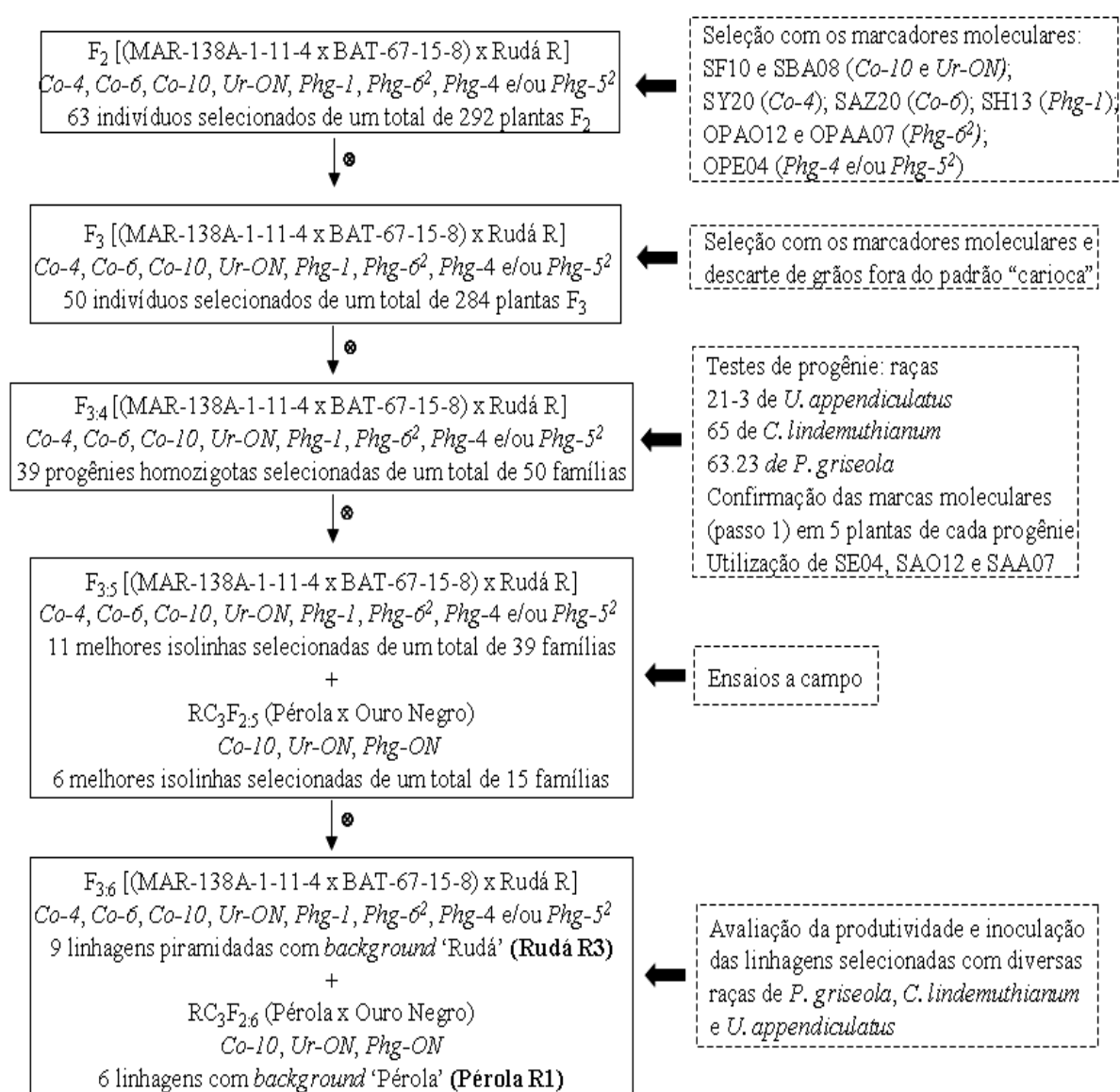


Figura 1. Diagrama representativo da estratégia de melhoramento usada na obtenção das linhagens ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’ simultaneamente resistentes à raças de mancha-angular, antracnose e ferrugem.

2.4. Análises moleculares

2.4.1. Extração de DNA

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

2.4.2. Análise com RAPD

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de RAPD em uma mistura de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 4 µM do *primer*, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. As amplificações foram efetuadas em termociclador modelo Robocycler (*Eppendorf* AG 22331, Hamburg, Alemanha), programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte sequência: 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.

2.4.3. Análise com SCAR

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de SCAR em uma mistura de 15 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 picomoles de cada *primer* específico, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador modelo Robocycler (*Eppendorf* AG 22331, Hamburg, Alemanha), programado para 1 etapa a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C (SAA19), 58 °C (SBA16), 59 °C (SH13), 60 °C (SAZ 20, SAS13, SY20, SBA08 e SAA07), 62 °C (SAO12) ou 65 °C (SN02, SF10, SAB03 e SE04) por 1 min e 72 °C por 90 s. Após os 35 ciclos, foi realizada

uma etapa final a 72 °C por 7 min. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2.

2.4.4. Eletroforese e fotodocumentação

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em SB 1X (hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico) (Brody & Kern, 2004), contendo brometo de etídio 0,2 mg/mL, por cerca de 2 h (SCAR) e 4 h (RAPD) a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

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

Marcador*	Seqüência (5' → 3')	#(cM)	Genes de resistência	Fonte de resistência	Referência
SY20 _{830a}	F: AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R: CCGTGGAACAACACACAAT	1,20	<i>Co-4</i>	TO	Queiroz et al., (2004a)
SAS13 _{950a}	F: CACGGACCGAATAAGCCACCAACA R: CACGGACCGAGG ATACAGTGAAAG	0,00	<i>Co-4</i> ²	G2333	Young et al., (1998)
SAB03 _{400a}	F: TGGCGCACACATAAGTTCTCACGG R: TGGCGCACACCATCAAAAAAGGTT	12,90	<i>Co-5</i>	G2333	Vallejo et al., (2001)
SAZ20 _{845a}	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	7,10	<i>Co-6</i>	AB 136	Queiroz et al., (2004a)
SBA08 _{560a}	F: CCACAGCCGACGGAGGAG R: GCCATGTTTTTTGTCCCC	2,20	<i>Co-10 e Ur-ON</i>	Ouro Negro	Corrêa et al., (2000)
SF10 _{1050a}	F: GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA R: GGAAGCTTGGCTATGATGGT	6,50	<i>Co-10 e Ur-ON</i>	Ouro Negro	Corrêa et al., (2000)
SBA16 _{669a}	F: TTCCACGTCTATTTTGCATCA R: CACGCATCACGCAGAACT	9,70	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	Queiroz et al., (2004b)
SAA19 _{650a}	F: TGAGGCGTGTCATGGATATAA R: GAGGCGTGTTGATAATTCTGG	10,10	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	Queiroz et al., (2004b)
SH13 _{520a}	F: GACGCCACCCCATTATGTT R: GCCACACAGATGGAGCTTTA	5,60	<i>Phg-1</i>	AND 277	Queiroz et al., (2004b)

*a: acoplamento; #(cM): distância genética (centi Morgan) dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência; F: forward; R: reverse.

Tabela 2. Continuação ...

Marcador*	Sequência (5' → 3')	#(cM)	Gene de resistência	Fonte de resistência	Referência
SEO4 _{640a}	F: TGACATGCCCCACTTAGTTAGA R: CATGCCATGATTACCTTCC	6,03	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	MAR-2	Capítulo 1
SAO12 _{950a}	F: GGTCTCAAGCTACAGCGAAA R: CGGTCTCGATGGTTCTGACT	7,02	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Capítulo 1
SAA07 _{950a}	F: CGCTCACTTATCGAAGATCG R: CGCTCACTGATTATAGACAAAATTACC	4,92	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Capítulo 1
OPX11 _{550a}	GGAGCCTCAG	5,80	<i>Ur-ON</i>	Ouro Negro	Faleiro et al., (2000)
OPE04 _{640a}	GTGACATGCC	5,80	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	MAR-2	Ferreira et al., (2000)
OPE04 _{650a}	GTGACATGCC	11,80	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	México 54	Sartorato et al., (2000)
OPAC14 _{2400a}	GTCGGTTGTC	6,60	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	México 54	Sartorato et al., (2000)
OPE04 _{650a}	GTGACATGCC	12,50	<i>Phg-3</i>	Cornell 49-242	Nietsche et al., (2000)
OPAO12 _{950a}	TCCCGGTCTC	5,83	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Caixeta et al., (2003)
OPAA07 _{950a}	CTACGCTCAC	5,10	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Caixeta et al., (2003)

*a: acoplamento; #(cM): distância genética (centi Morgan) dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência; F: forward; R: reverse

2.5. Ensaio a campo

2.5.1. Delineamento

O experimento foi instalado no plantio de “inverno” do ano de 2008. Os tratamentos constituíram de 39 linhagens ‘Rudá R3’, 15 linhagens ‘Pérola R1’, e seis testemunhas (‘BRSMG Majestoso’, ‘BRSMG Madrepérola’, ‘BRSMG Talismã’, ‘Pérola’, ‘Rudá’ e ‘Rudá R’). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, composto por três repetições de parcelas de duas linhas de 2,0 m de comprimento, espaçadas de 0,5 m, na densidade de 15 sementes/m.

O experimento foi conduzido utilizando-se o plantio convencional, no qual o solo foi previamente arado e gradeado. O suprimento de água, nos períodos de deficiência hídrica, foi mantido por irrigações suplementares. No plantio foram empregados 350 kg/ha do fertilizante formulado 8-28-16 e, aos 25 dias após a emergência das plantas, 150 kg/ha de sulfato de amônio, em cobertura. Por meio do uso de herbicidas, em pré-plantio e em pós-emergência, as plantas de feijão foram mantidas livres da competição de plantas daninhas. O controle de doenças não foi realizado no experimento.

2.5.2. Características avaliadas e análise de dados

Foram avaliadas visualmente a reação à mancha-angular (Pastor-Corrales & Jara, 1995) e a cor dos grãos (Ramalho et al., 1998). O tipo de grão foi avaliado considerando uma escala de notas de 1 a 5, sendo 1, o grão desejável, e 5 o totalmente fora do padrão “carioca”. A nota referente ao tipo dos grãos de cada tratamento foi atribuída comparativamente às notas atribuídas às testemunhas.

A produtividade foi determinada para todas as parcelas e expressa em kg/ha. Os dados de produtividade de grãos foram submetidos à análise de variância considerando os efeitos de tratamentos e a média como fixos, conforme o modelo estatístico:

$Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}$, em que:

Y_{ij} = observação referente ao tratamento i , no bloco j ;

μ = média geral;

t_i = efeito do i -ésimo tratamento. ($i = 1, 2, \dots, g+t$), sendo g o número de linhagens (54) e t o número de testemunhas (6);

b_j = efeito do bloco j ($j = 1, 2$ e 3)

e_{ij} = erro aleatório, $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Na análise de variância foi realizada a decomposição da fonte de variação tratamentos em testemunhas e linhagens, e esta última, por sua vez, foi decomposta em grupos. O esquema da análise de variância com as fontes de variação, graus de liberdade, quadrados médios, esperanças dos quadrados médios e o teste F estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Esquema da análise de variância e esperanças de quadrados médios para o modelo em blocos completos casualizados

FV	GL	SQ	QM	E(QM)	F
Blocos	$r-1$	SQB	QMB	$\sigma^2 + G\sigma_b^2$	
Tratamentos	$G-1$	SQT	QMT	$\sigma^2 + r\phi_T$	QMT/QMR
Genótipos (G)	$g-1$	SQL	QML	$\sigma^2 + r\phi_g$	QML/QMR
Testemunhas (Te)	$t-1$	SQTe	QMTe	$\sigma^2 + r\phi_{te}$	QMTe/QMR
G vs. Te	1	SQG vs. Te	QMGr		QMGr/QMR
Resíduo	$(r-1)(G-1)$	SQR	QMR	σ^2	
Total	$rG-1$	SQTo			

Genótipos correspondem a linhagens.

O coeficiente de variação ambiental foi estimado por meio da expressão:

$$CV_e(\%) = \frac{100\sqrt{\hat{\sigma}^2}}{M_g}, \text{ sendo } M_g = \text{média geral.}$$

Após a constatação de efeitos significativos para as fontes de variação, foi realizado o teste de médias de Dunnett a 1% de probabilidade. Este procedimento teve por finalidade realizar testes comparativos das médias de cada tratamento com cada testemunha. A diferença significativa entre a média de um tratamento e a de uma testemunha é avaliada tendo como referência a diferença mínima significativa, dada por:

$$\Delta = t_d \sqrt{\hat{V}(\hat{Y})}, \text{ em que:}$$

t_d : valor tabelado, para uso de Dunnett, que é função de n e n' , sendo n e n' o número de graus de liberdade para tratamento e resíduo, respectivamente.

$\hat{V}(\hat{Y})$: variância do contraste $\hat{Y} = \hat{m}_i - \hat{m}_j$, sendo:

$$\hat{V}(\hat{Y}) = \frac{2}{r} \text{QMR}, \text{ em que:}$$

QMR: quadrado médio do resíduo

r : número de repetições que deram origem às médias m_i (tratamentos) ou m_j (testemunhas)

Também foi realizado o teste de agrupamento de médias, segundo Scott & Knott (1974) a 1% de probabilidade. Este procedimento teve por finalidade dividir o grupo original de médias em subgrupos, em que as médias não diferissem estatisticamente entre si. Dessa forma, obtém-se:

$$\lambda = \frac{\pi B_0}{2(\pi - 2)\hat{\sigma}_0^2}, \text{ sendo:}$$

B_0 : valor máximo da soma de quadrados entre grupos, considerando-se todas as partições possíveis dos g tratamentos (no caso genótipos) em dois grupos.

$\hat{\sigma}_0^2$: variância obtida por meio de:

$$\hat{\sigma}_0^2 = \frac{1}{g + v} \left[\sum_{i=1}^g (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 + v s_{\bar{Y}}^2 \right], \text{ em que:}$$

$\bar{Y}_i$: média do tratamento i ($i=1, 2, \dots, g$);

$\bar{Y}$: média geral dos tratamentos a serem separadas;

g : número de médias a serem separadas;

v : número de graus de liberdade do resíduo; e

$$s_{\bar{y}}^2 = \frac{\text{QMR}}{r}, \text{ sendo:}$$

QMR: quadrado médio do resíduo;

r: número de observações que deram origem às médias a serem agrupadas.

A regra de decisão para estabelecer os grupos é dada por:

- Se $\lambda < \chi_{(\alpha, v_0)}^2$, todas as médias são consideradas homogêneas, não havendo mais partições dentro do grupo considerado.
- Se $\lambda \geq \chi_{(\alpha, v_0)}^2$, os dois grupos diferem significativamente. Estes dois grupos são testados separadamente para novas possíveis divisões. O teste prossegue até que sejam encontrados grupos com médias homogêneas.

O valor de qui-quadrado referencial é estabelecido em função do nível de significância α preestabelecido e do número de graus de liberdade, dado por:

$$v_0 = \frac{g}{\pi - 2}$$

A análise de variância, o teste de comparação de médias e a análise de agrupamento foram efetuadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2006).

2.6. Avaliação da reação aos patógenos

2.6.1. Avaliação da reação a *Pseudocercospora griseola*

A caracterização da reação à mancha-angular foi realizada utilizando os isolados descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Isolados de *P. griseola* coletados em diferentes localidades do estado de Minas Gerais

Isolado	Fenótipos de Virulência das Genótipos ¹												Raça	Local de coleta
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
A ₁ 13	a	b	c	d			g	h	i				15.7	Lagoa Formosa
A ₂ 4	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63.7	Lagoa Formosa
B ₁ 46	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Paracatu
B ₃ 8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Paracatu
B ₄ 4	a	b	c	d		f	g	h	i			l	47.39	Paracatu
B ₄ 6	a	b	c	d	e				l				31.4	Paracatu
B ₇ 50	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Paracatu
C ₁ 17	a	b					g	h	i		k		3.23	Unaí
C ₁ 28	a	b	c	d	e	f		h	i				63.6	Unaí
C ₂ 10	a	b	c		e		g	h	i		k		23.23	Unaí
CM ₁ 2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Canaã
CM ₃ 11	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Canaã
Cb20	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63.7	Coimbra
Cb21	a	b	c	d	e		g	h	i				31.7	Coimbra
SM32	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	SMA
Vic3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Viçosa
Vic7	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Viçosa

¹A: Don Timóteo, B: G 11796, C: Bolón Bayo, D: Montcalm, E: Amendoim, F: G 5686, G: PAN 72, H: G 2858, I: Flor de Mayo, J: México 54, K: BAT 332 e L: Cornell 49-242. As letras minúsculas indicam suscetibilidade do genótipo. SMA: São Miguel do Anta. Fonte: Balbi et al. (2009).

O inóculo de cada isolado foi reproduzido em placas de Petri contendo meio de molho de tomate. A suspensão foi filtrada em gase e posteriormente ajustada para a concentração final de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL (Sanglard et al., 2009a). As inoculações foram realizadas em ambas as superfícies de uma folha trifoliolada 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 uma câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $> 95\%$), onde permaneceram por 48 h, sob fotoperíodo de 12 h. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação onde permaneceram até serem avaliadas.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 15, 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade

proposta por Pastor-Corrales & Jara (1995): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Plantas com notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes; entre 3 e 6, com resistência intermediária; e entre 6 e 9, suscetíveis.

2.6.2. Avaliação da reação a *Colletotrichum lindemuthianum*

A caracterização da resistência à antracnose foi realizada utilizando as raças 65, 73 e 89 de *C. lindemuthianum*, as quais foram caracterizadas por Rava et al. (1994) e Balardin et al. (1997). O inóculo de cada raça foi reproduzido em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Os tubos com o inóculo foram incubados por 10 dias em temperatura de 23°C, para produção dos conídios. As inoculações foram feitas 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 nº 15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por sete dias na câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), sob fotoperíodo de 12 h. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram até serem avaliadas. A avaliação dos sintomas da antracnose foi realizada 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 a 9, descrita por Pastor-Corrales (1992): 1- ausência de sintomas, 2 - até 1% das nervuras apresentando manchas 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. Lesões abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo, 9 - maioria das plantas mortas. Plantas com graus de 1 a 3 foram consideradas resistentes, e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.6.3. Avaliação da reação a *Uromyces appendiculatus*

A caracterização da resistência ao *U. appendiculatus* foi realizada utilizando as raças 21-3, 29-3 e 63-19, as quais foram classificadas por Souza et al. (2007). As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredósporos. As inoculações foram realizadas quando as folhas primárias apresentavam 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 as inoculações, seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a mancha-angular.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 292 genótipos F₂ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R], foram selecionados 63 com a presença das marcas moleculares ligadas aos respectivos genes: SF10_{1050a} e SBA08_{560a} (*Ur-ON* e *Co-10*); SY20_{830a} (*Co-4*); SAZ20_{845a} (*Co-6*); SH13_{520a} (*Phg-1*); OPA012_{950a} e OPAA07_{950a} (*Phg-6*²); OPE04_{640a} (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²). Para o plantio da geração seguinte, foram selecionados grãos dentro do padrão “carioca”, de *background* genético ‘Rudá’ (cor creme com estrias marrom claras, sem halo, de tamanho médio e não achatados). Segundo Marques Júnior et al. (1997) e Santos et al. (2001), a seleção precoce da característica tipo de grãos é bastante eficiente, devido a sua alta herdabilidade. Além disso, de acordo com Silva (2009), a seleção para grãos praticada durante o avanço de gerações não compromete o desempenho para produtividade, sendo o método *bulksel* uma estratégia promissora para o melhoramento do feijão quando a ênfase é para a produtividade e o aspecto dos grãos.

Na geração F₃ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] foram obtidos 50 genótipos portando todas as marcas moleculares amplificadas na geração anterior. Ainda em casa de vegetação, a geração F₄ [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] foi semeada em estrutura de famílias para a realização de testes de progênie. Foram inoculadas 50 famílias F_{3:4} [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] de forma seqüencial com os raças 21-3 de *U. appendiculatus*, 65 de *C. lindemuthianum* e 63.23 de *P. griseola* (Tabela 5). Foram descartadas nove famílias segregantes, sendo sete para ferrugem e duas para antracnose. As famílias segregantes para ferrugem não foram avaliadas para as demais doenças.

Devido a problemas de reprodutibilidade, o marcador OPX11_{550a} (Faleiro et al., 2003), ligado ao gene *Ur-ON*, não foi utilizado. Entretanto, de acordo com os padrões de segregação, pode-se inferir que os marcadores SF10_{1050a} e SBA08_{560a} foram eficientes no monitoramento do alelo *Ur-ON* nas gerações anteriores, visto que apenas a família ‘R3-12-43-1’ não o possuía.

Além das avaliações por meio de inoculações, foram escolhidas aleatoriamente cinco plantas de cada uma das 41 famílias não segregantes para análises moleculares. Foram utilizados novamente os mesmos marcadores moleculares dos passos anteriores, exceto OPAO12_{950a}, OPAA07_{950a} e OPE04_{500a}, os quais foram substituídos por SAO12_{950a}, SAA07_{950a} e SE04_{640a}. Foram identificadas 39 famílias que tiveram o DNA das cinco plantas amplificados com todas as marcas. Destas plantas, foram obtidas as sementes para o ensaio a campo (Figura 1).

Tabela 5. Testes de progênie de famílias F_{3:4} [(MAR-138A-1-11-4 x BAT-67-15-8) x Rudá R] inoculadas com as raças 63.23 de *P.griseola*, 65 de *C. lindemuthianum* e 21-3 de *U. appendiculatus*

Família	Ferrugem		Antracnose		Mancha-angular		Família	Ferrugem		Antracnose		Mancha-angular	
	21-3		65		63.23			21-3		65		63.23	
	R	S	R	S	R	S		R	S	R	S	R	S
R3-4-20-4	15	0	15	0	15	0	R3-14-26-15	13	0	13	0	13	0
R3-4-20-11	13	0	13	0	13	0	R3-15-25-7	12	2				
R3-4-20-16	15	0	15	0	15	0	R3-15-25-10	13	0	13	0	13	0
R3-4-20-27	15	0	15	0	15	0	R3-15-25-13	15	0	15	0	15	0
R3-7-23-10	14	0	14	0	14	0	R3-16-17-4	14	0	13	1		
R3-8-2-5	15	0	15	0	15	0	R3-16-17-9	15	0	15	0	15	0
R3-8-2-18	15	0	15	0	15	0	R3-16-17-12	12	0	12	0	12	0
R3-8-2-22	12	2					R3-16-17-13	13	0	13	0	13	0
R3-8-2-23	10	5					R3-21-18-3	14	0	14	0	14	0
R3-10-11-5	15	0	15	0	15	0	R3-21-18-5	15	0	15	0	15	0
R3-10-11-9	15	0	15	0	15	0	R3-21-18-9	14	0	14	0	14	0
R3-10-11-15	15	0	15	0	15	0	R3-21-18-11	15	0	15	0	15	0
R3-10-11-24	15	0	15	0	15	0	R3-21-18-17	15	0	15	0	15	0
R3-12-42-6	8	5					R3-21-18-19	15	0	15	0	15	0
R3-12-42-14	8	7					R3-21-18-22	15	0	15	0	15	0
R3-12-42-15	14	0	14	0	14	0	R3-21-18-25	11	0	11	0	11	0
R3-12-43-1	0	11					R3-27-11-18	12	0	12	0	12	0
R3-12-43-6	12	0	12	0	12	0	R3-27-11-26	15	0	15	0	15	0
R3-12-43-8	10	3					R3-35-6-2	15	0	15	0	15	0
R3-14-26-2	15	0	15	0	15	0	R3-35-6-8	14	0	14	0	14	0
R3-14-26-8	15	0	15	0	15	0	R3-35-6-10	15	0	15	0	15	0
R3-14-26-9	15	0	14	1			R3-35-6-13	14	0	14	0	14	0
R3-14-26-12	15	0	15	0	15	0	R3-35-6-17	15	0	15	0	15	0
R3-14-26-13	12	0	12	0	12	0	R3-35-6-20	13	0	13	0	13	0
R3-14-26-14	15	0	15	0	15	0	R3-35-6-21	14	0	14	0	14	0

R: resistente; S: suscetível; linhas grifadas referem-se a famílias segregantes.

Na Tabela 6 é apresentado o resumo da análise de variância referente à produtividade de grãos das linhagens avaliadas na safra de “inverno” de 2008. Pode-se observar que o coeficiente de variação ambiental foi baixo (3,62 %), indicando que o experimento apresentou alta precisão. Valores semelhantes para coeficiente de variação são relatados na literatura para a cultura do feijoeiro (Marques Júnior, 1997). Coeficientes de variação baixos, ou de alta precisão, são almejados pelos melhoristas, visto que proporcionam a obtenção de estimativas de parâmetros genéticos mais precisos, ou acurados, os quais são fundamentais nas tomadas de decisão no decurso de um programa de melhoramento (Falconer, 1987; Faleiro et al., 2002; Ramalho et al., 2005).

Tabela 6. Resumo da análise de variância da produtividade de grãos (kg/ha) referentes à avaliação das linhagens no inverno de 2008 em Coimbra, MG

FV	GL	QM
Blocos	2	2572,64
Tratamentos	59	230599,26**
Testemunhas	5	77872,37**
Linhagens	53	223810,78**
Grupo de linhagens ‘Rudá R3’	38	302082,80**
Grupo de linhagens ‘Pérola R1’	14	102855,53**
Grupo ‘Rudá R3’ vs. Grupo ‘Pérola R1’	1	610921,41**
Linhagens vs. Testemunhas	1	1354022,98**
Resíduo	118	16196,07
Média geral		3513,31
CV _e (%)		3,62

** significativo pelo teste F ($P \leq 0,01$).

Observou-se efeito significativo para a fonte de variação tratamentos ($P \leq 0,01$) (Tabela 6). Podemos ainda observar que a decomposição da fonte de tratamentos em linhagens e testemunhas foi também significativa ($P \leq 0,01$) indicando comportamento diferenciado destas.

Visto que as linhagens avaliadas foram obtidas a partir de cruzamentos envolvendo diferentes genitores (‘Rudá’, ‘Pérola’, ‘Ouro Negro’, ‘TO’, ‘AB 136’, ‘AND 277’, ‘MAR-2’ e ‘BAT 332’) os efeitos de linhagens foram decompostos em suas partes componentes: grupo de linhagens ‘Rudá R3’,

grupo de linhagens ‘Pérola R1’, e o contraste “entre grupos de linhagens”. Os dois grupos também apresentaram efeitos significativos ($P \leq 0,01$), indicando que dentro de cada um existe diferença entre as médias de suas linhagens, em pelo menos uma, em relação às demais. O contraste “entre grupos de linhagens” implica em diferença entre a média dos grupos, ou seja, existe diferença entre o desempenho médio, de um grupo em relação ao outro.

Analisando os valores das médias, verifica-se que, de maneira geral, houve semelhança de comportamento entre as linhagens e as testemunhas quanto à produtividade de grãos (kg/ha) (Tabela 7). Esta semelhança pode ser explicada pela utilização dos cultivares testemunhas ‘Rudá’ e ‘Pérola’, na formação das populações avaliadas (*background* genético).

Tabela 7. Comparação da produtividade de grãos (kg/ha) das linhagens e testemunhas avaliadas no inverno de 2008 em Coimbra, MG

Tratamentos	Limite inferior	Limite superior	Média
Linhagens ‘Rudá R3’	2800,00	4332,00	3464,83
Linhagens ‘Pérola R1’	2750,00	4010,00	3601,93
Testemunhas	3415,00	4112,00	3773,50

Por meio do teste de médias de Dunett ($P \leq 1\%$) mostrado na Tabela 8, pode-se observar que 46 das 54 linhagens avaliadas não diferiram estatisticamente suas produtividades de pelo menos uma das seis testemunhas (‘BRSMG Majestoso’, ‘BRSMG Madrepérola’, ‘BRSMG Talismã’, ‘Pérola’, ‘Rudá’ e ‘Rudá R’). Oito linhagens foram semelhantes a todas as testemunhas simultaneamente. A testemunha ‘Rudá’ foi a que alcançou maior produtividade neste trabalho (4032,33 Kg/ha), sendo identificadas 14 linhagens com produtividade similar.

O cultivar ‘Pérola’, o qual também foi usado como testemunha, é proveniente de seleção a partir do cultivar ‘Aporé’ (linhagem ‘LR 720982 CPL53’) realizada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Após avaliações em 57 ambientes, realizadas na Bahia (Região do Além São Francisco), em Goiás (incluindo o Distrito Federal), Mato Grosso e Minas

Gerais, a referida linhagem foi indicada para lançamento. Atualmente, ‘Pérola’ é o cultivar de feijão “carioca” mais plantado no Brasil, sendo que, no Estado de Minas Gerais, abrange cerca de 70% da área cultivada (Embrapa, 2010). Neste trabalho, 29 linhagens não diferiram em produtividade em relação a este cultivar, sendo identificadas oito com médias superiores (Tabela 8).

Tabela 8. Teste de médias para produtividade de grãos (kg/ha) das linhagens e testemunhas avaliadas na safra de “inverno” de 2008 em Coimbra, MG

Genótipos	*Médias		Genótipos	*Médias	
Rudá	4032,33	a	P1-56-41-16	3541,67	bcdef
BRSMG Talismã	3811,67	b	R3-14-26-14	3505,33	bcdef
BRSMG Majestoso	3785,33	c	R3-14-26-15	3493,33	cdef
Pérola	3768,67	d	R3-21-18-11	3476,67	def
BRSMG Madrepérola	3708,67	e	P1-41-6-12	3461,67	ef
Rudá R	3535,00	f	R3-21-18-19	3450,67	ef
R3-12-42-15	3948,00	abcde	R3-14-26-12	3435,00	ef
P1-78-23-1	3946,67	abcde	R3-14-26-13	3430,67	ef
R3-12-43-6	3943,33	abcde	R3-21-18-5	3425,67	ef
R3-15-25-13	3900,33	abcde	R3-10-11-5	3409,67	ef
R3-16-17-9	3855,00	abcde	P1-41-6-9	3406,67	ef
R3-27-11-26	3848,33	abcde	R3-35-6-20	3404,67	ef
P1-78-23-2	3786,67	abcdef	P1-29-44-7	3386,67	f
P1-88-16-5	3776,67	abcdef	P1-29-44-13	3362,00	f
R3-16-17-13	3760,33	abcdef	R3-35-6-21	3350,00	f
R3-27-11-18	3757,67	abcdef	R3-35-6-13	3283,33	f
P1-88-16-3	3750,00	abcdef	R3-35-6-8	3271,67	f
R3-15-25-10	3748,33	abcdef	R3-35-6-10	3244,67	f
P1-41-6-7	3743,33	abcdef	R3-35-6-17	3236,67	f
P1-41-6-4	3736,67	abcdef	R3-10-11-24	3231,67	f
R3-16-17-12	3718,00	bcdef	R3-10-11-9	3230,00	f
P1-41-6-8	3663,33	bcdef	R3-10-11-15	3180,00	
R3-21-18-22	3636,67	bcdef	R3-21-18-3	3175,00	
R3-14-26-8	3620,00	bcdef	R3-7-23-10	3141,33	
R3-21-18-9	3601,67	bcdef	R3-8-2-18	3140,33	
R3-21-18-17	3576,67	bcdef	R3-8-2-5	3101,67	
R3-14-26-2	3566,67	bcdef	R3-4-20-4	3046,00	
P1-41-6-5	3565,33	bcdef	R3-4-20-27	2986,67	
P1-56-41-3	3550,00	bcdef	R3-4-20-16	2956,67	
P1-56-41-4	3543,33	bcdef	R3-4-20-11	2848,33	

Testemunhas estão apresentadas em negrito; *médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem da testemunha correspondente (Dunett, $P \leq 1\%$); médias que não apresentam letras correspondentes, na coluna, possuem produtividade inferior a todas as testemunhas utilizadas (Dunett, $P \leq 1\%$); genótipos precedidos das letras R e P são pertencentes às populações ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’, respectivamente.

A seleção das linhagens para dar continuidade às avaliações do espectro de resistência às três doenças se baseou na produtividade e no tipo de grão.

Foram selecionadas as linhagens que tiveram produtividade superior a 3700 kg/ha, as quais foram agrupadas por meio do teste de Scott & Knott ($P \leq 1\%$) como as de maior produtividade (Tabela 9). Do resultado da seleção, foram obtidas 15 linhagens, sendo nove do grupo ‘Rudá R3’, e seis do grupo ‘Pérola R1’. Com relação ao aspecto dos grãos, todas as linhagens foram similares às testemunhas ‘Rudá’ e ‘Pérola’, de acordo com seus respectivos *background* genéticos.

Tabela 9. Seleção de linhagens por meio de análise de agrupamento de médias no inverno de 2008 em Coimbra, MG

Genótipos	Médias	NG	MA	Genótipos	Médias	NG	MA
Rudá	4032,33	a ¹	4,00 8,33	Rudá R	3535,00	b	4,00 7,66
R3-12-42-15	3948,00	a	4,00 6,66	R3-14-26-14	3505,33	b	4,00 8,00
P1-78-23-1	3946,67	a	2,50 7,33	R3-14-26-15	3493,33	c	3,66 4,66
R3-12-43-6	3943,33	a	3,92 8,00	R3-21-18-11	3476,67	c	4,00 7,00
R3-15-25-13	3900,33	a	3,92 3,00	P1-41-6-12	3461,67	c	2,16 8,00
R3-16-17-9	3855,00	a	4,08 7,00	R3-21-18-19	3450,67	c	4,00 7,66
R3-27-11-26	3848,33	a	3,92 6,33	R3-14-26-12	3435,00	c	4,00 5,00
BRSMG Talismã	3811,67	a	2,50 5,00	R3-14-26-13	3430,67	c	4,33 6,66
P1-78-23-2	3786,67	a	2,50 5,33	R3-21-18-5	3425,67	c	4,00 8,33
BRSMG Majestoso	3785,33	a	2,50 4,00	R3-10-11-5	3409,67	c	4,00 7,00
PON-88-16-5	3776,67	a	2,00 6,00	P1-41-6-9	3406,67	c	1,83 8,00
Pérola	3768,67	a	2,00 5,00	R3-35-6-20	3404,67	c	4,00 4,33
R3-16-17-13	3760,33	a	4,00 5,00	P1-29-44-7	3386,67	c	2,00 8,00
R3-27-11-18	3757,67	a	4,16 8,33	P1-29-44-13	3362,00	c	2,16 6,00
P1-88-16-3	3750,00	a	2,00 9,00	R3-35-6-21	3350,00	c	2,00 7,00
R3-15-25-10	3748,33	a	4,00 2,33	R3-35-6-13	3283,33	c	3,83 6,66
P1-41-6-7	3743,33	a	2,00 8,33	R3-35-6-8	3271,67	c	4,00 9,00
P1-41-6-4	3736,67	a	2,00 7,00	R3-35-6-10	3244,67	d	4,33 9,00
R3-16-17-12	3718,00	a	4,33 5,66	R3-35-6-17	3236,67	d	4,66 7,33
BRSMG Madrepérola	3708,00	a	1,50 3,66	R3-10-11-24	3231,67	d	4,00 7,00
P1-41-6-8	3663,33	b	2,50 6,33	R3-10-11-9	3230,00	d	4,00 7,00
R3-21-18-22	3636,67	b	3,66 6,66	R3-10-11-15	3180,00	d	4,00 8,00
R3-14-26-8	3620,00	b	4,00 8,00	R3-21-18-3	3175,00	d	3,33 8,00
R3-21-18-9	3601,67	b	4,00 7,66	R3-7-23-10	3141,33	d	4,00 6,33
R3-21-18-17	3576,67	b	4,33 5,00	R3-8-2-18	3140,33	d	4,00 5,00
R3-14-26-2	3566,67	b	4,00 9,00	R3-8-2-5	3101,67	d	4,33 7,00
P1-41-6-5	3565,33	b	2,00 7,00	R3-4-20-4	3046,00	e	4,00 6,00
P1-56-41-3	3550,00	b	2,00 6,00	R3-4-20-27	2986,67	e	4,00 7,00
P1-56-41-4	3543,33	b	2,00 6,00	R3-4-20-16	2956,67	e	4,00 7,00
P1-56-41-16	3541,67	b	2,00 6,00	R3-4-20-11	2848,33	e	4,16 7,00

Testemunhas estão apresentadas em negrito; NG: média das notas para os grãos; MA: média das notas para mancha-angular das três repetições; ¹médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Scott e Knott, $P \leq 1\%$); valores grifados identificam as linhagens selecionadas; genótipos precedidos das letras R e P são pertencentes às populações ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’, respectivamente.

Nesta avaliação a campo, todas as linhagens obtidas foram suscetíveis à mancha-angular, exceto as linhagens ‘R3-15-25-10’ e ‘R3-15-25-13’, as quais apresentaram médias iguais a 2,33 e 3,00, respectivamente (Tabela 9). A partir de caracterizações fenotípicas, é possível verificar mais detalhadamente o incremento no espectro de resistência a determinado patógeno decorrente de introgressões gênicas, sendo uma etapa importante durante o processo de piramidação. Dessa forma, as 15 linhagens selecionadas pertencentes aos grupos ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’, além de seus progenitores, foram inoculadas em condições artificiais com raças de *P. griseola*, *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus* (Tabelas 10 e 11).

Com relação às avaliações para mancha-angular (Tabela 10), a linhagem ‘Rudá R’, progenitora do grupo de linhagens ‘Rudá R3’, apresentou suscetibilidade a 16 dos 17 isolados testados, demonstrando a ineficácia do gene *Phg-1* frente aos isolados obtidos por Balbi et al. (2009). As outras linhagens progenitoras ‘MAR-138A-1-11-4’ (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²) e ‘BAT- 67-15-8’ (*Phg-6*²) apresentaram resistência a oito isolados cada uma. A interpolação dos espectros de resistência das linhagens ‘MAR-138A-1-11-4’ e ‘BAT-67-15-8’ geram reações de resistência a 12 dos 17 isolados testados, as quais foram observadas na maioria das linhagens do grupo ‘Rudá R3’. Se forem considerados simultaneamente os espectros de resistência das linhagens ‘MAR-138A-1-11-4’ (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²), ‘BAT-67-15-8’ (*Phg-6*²), COR-25-12-9 (*Phg-3*) e ‘MEX-37-3-6-3’ (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*), potencialmente se alcançaria resistência a 15 dos 17 isolados testados, exceto B₁ 46 e B₇ 50, os quais foram classificados como raça 63.63. Nos últimos anos, boa parte dos isolados obtidos em diversos trabalhos têm sido classificados nesta raça, sendo considerada como uma das mais amplamente distribuídas e freqüentes no Brasil (Nietsche et al., 2002; Sartorato & Alzate-Marin, 2004; Oliveira et al., 2004; Sartorato, 2006; Garcia et al., 2006; Damasceno-Silva et al., 2009; Balbi et al., 2009). Entretanto, estes autores têm questionado o uso da atual série diferenciadora, sugerindo a inclusão de genótipos capazes de maior discriminação entre os isolados.

Tabela 10. Caracterização dos progenitores e linhagens selecionadas frente a isolados (raças) de *P. griseola*

Genótipos	Isolados (Raças) de <i>P. griseola</i>																
	A ₁ 13 (15.7)	A ₂ 4 (63.7)	B ₁ 46 (63.63)	B ₃ 8 (63.47)	B ₄ 4 (47.39)	B ₄ 6 (31.4)	B ₇ 50 (63.63)	C ₁ 17 (3.23)	C ₁ 28 (63.6)	C ₂ 10 (23.23)	CM ₁ 2 (63.63)	CM ₃ 11 (63.31)	Cb20 (63.7)	Cb21 (31.7)	SM32 (63.23)	Vic3 (63.23)	Vic7 (63.63)
MEX-37-3-6-3	*R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S
COR-25-12-9	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	S
MAR-138A-1-11-4	R	I	S	R	S	S	S	S	I	R	S	S	R	R	I	R	R
BAT-67-15-8	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
Rudá R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
R3-12-42-15	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	R	R
R3-12-43-6	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	I	I
R3-15-25-13	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R
R3-16-17-9	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	I	R
R3-27-11-26	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	S	S	R	R	S	I	I
R3-16-17-13	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	I	I
R3-27-11-18	R	I	S	R	I	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	R
R3-15-25-10	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R
R3-16-17-12	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	I	R
Ouro Negro	R	R	I	R	R	I	R	S	R	R	R	I	R	I	S	R	R
Pérola	I	I	I	I	I	S	I	I	S	I	I	S	I	I	S	S	R
P1-78-23-1	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R
P1-78-23-2	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R
P1-88-16-5	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R
P1-88-16-3	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R
P1-41-6-7	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R
P1-41-6-4	I	R	I	I	R	S	R	I	R	I	R	S	R	I	S	R	R

*Classificações obtidas pela média da avaliação de 12 plantas de cada genótipo; R: resistente (1 a 3); I: intermediário (3 a 6); S: suscetível (6 a 9).

Analizando as reações dos progenitores do grupo de linhagens ‘Pérola R1’, nota-se que o cultivar ‘Pérola’ foi suscetível ou intermediário a 16 dos 17 isolados testados, confirmando a tendência de suscetibilidade à mancha-angular deste cultivar (Ragagnin et al., 2003; Melo et al., 2008). Em contrapartida, o cultivar ‘Ouro Negro’ apresentou reações intermediárias a quatro isolados e de suscetibilidade a apenas dois. Este cultivar vem sendo recentemente recomendado como fonte de resistência à mancha-angular, apresentando médias de severidade notadamente inferiores à maioria dos isolados testados (Sartorato, 2006; Sanglard et al., 2009b). Considerando a Tabela 9, pode-se verificar a relevância do uso do cultivar ‘Ouro Negro’ como fonte de resistência, visto que foi o único progenitor a apresentar tolerância aos isolados B₁46 e B₇50, classificados como raça 63.63.

As linhagens ‘Pérola R1’ tiveram considerável melhora no espectro de resistência quando comparadas à linhagem progenitora ‘Pérola’, apresentando reações de incompatibilidade a oito isolados. Possivelmente, estas não alcançaram o mesmo espectro observado em ‘Ouro Negro’ devido aos vários ciclos de retrocruzamentos tendo ‘Pérola’ como progenitor recorrente, o que teria levado à perda de genes de efeito menor, não monitorados por meio dos marcadores moleculares utilizados por Sanglard et al. (2005) ligados ao gene *Phg-ON*.

Neste trabalho, as mesmas linhagens e cultivares progenitores, juntamente com os grupos de linhagens ‘Rudá R3’ e ‘Pérola R1’, foram caracterizados com alguns das mais freqüentes e agressivas raças de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus* (Tabela 11). De maneira geral, os resultados dão indícios de que as linhagens desenvolvidas mantiveram os genes de resistência à antracnose e ferrugem, oriundos de seus progenitores ‘Rudá R’ (*Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Ur-ON*) e ‘Ouro Negro’ (*Co-10* e *Ur-ON*), os quais foram anteriormente monitorados por meio de marcadores moleculares.

Tabela 11. Caracterização dos progenitores e linhagens selecionadas frente a raças de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*

Genótipos	Raças					
	<i>C. lindemuthianum</i>			<i>U. appendiculatus</i>		
	65	73	89	21-3	29-3	63-19
MEX-37-3-6-3	S	S	S	S	S	S
COR-25-12-9	S	S	S	S	S	S
MAR-138A-1-11-4	S	S	S	S	S	S
BAT-67-15-8	S	S	S	S	S	S
Rudá R	R	R	R	R	R	R
R3-12-42-15	R	R	R	R	R	R
R3-12-43-6	R	R	R	R	R	R
R3-15-25-13	R	R	R	R	R	R
R3-16-17-9	R	R	R	R	R	R
R3-27-11-26	R	R	R	R	R	R
R3-16-17-13	R	R	R	R	R	R
R3-27-11-18	R	R	R	R	R	R
R3-15-25-10	R	R	R	R	R	R
R3-16-17-12	R	R	R	R	R	R
Ouro Negro	S	R	R	R	R	R
Pérola	S	S	S	S	S	S
P1-78-23-1	S	R	R	R	R	R
P1-78-23-2	S	R	R	R	R	R
P1-88-16-5	S	R	R	R	R	R
P1-88-16-3	S	R	R	R	R	R
P1-41-6-7	S	R	R	R	R	R
P1-41-6-4	S	R	R	R	R	R

*Classificações obtidas pela média da avaliação de 12 plantas de cada genótipo; R: resistente; S: suscetível.

Uma das grandes críticas à estratégia de piramidação tem sido com relação à amostragem de patógenos possuidores de alta variabilidade patogênica, como é o caso de *P. griseola*. Existe a possibilidade de que algumas raças do patógeno não sejam encontradas durante o processo de coleta em uma determinada região, o que tornará ineficaz os futuros materiais piramidados com relação à resistência a campo.

Uma outra possibilidade para o controle da mancha-angular seria o desenvolvimento de cultivares multilinhas (Sartorato, 2006). Na estratégia de uso de multilinhas, ao contrário da piramidação, a pressão de seleção direcional é menos intensa, uma vez que sempre existirá uma isolinha suscetível. Neste sentido, têm-se como exemplos no Estado de Minas Gerais os trabalhos de Bruzi et al. (2007), Silva et al. (2007) e Silva (2008), os quais

destacam vantagens do uso de misturas constituídas por linhagens de feijoeiro com grãos “carioca”.

Considerando que os materiais piramidados dificilmente alcançarão espectros de resistência à mancha-angular, capazes de resistirem a todas as raças presentes em uma determinada região, estes poderiam compor as multilinhas, juntamente com outros materiais, de modo a propiciar maior estabilidade de produção. Apesar das dificuldades, os programas de melhoramento dispõem de um grande número de linhagens com padrão de cores muito semelhantes e com diferentes reações aos principais patógenos da cultura, que, teoricamente, poderiam ser misturadas sem maiores consequências no aspecto comercial.

Visando dinamizar e dar continuidade aos trabalhos de melhoramento para resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem, foram também realizados outros cruzamentos entre diversas isolinhas e cultivares: (MEX-37-3-6-3 x Rudá R); (Pérola R x Pérola R1); (Pérola R x BRSMG Talismã); (COR-25-12-9 x BRSMG Talismã); e (Rudá R3 x Rudá R1). Os genes de resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem foram monitorados em suas respectivas populações segregantes por meio de marcadores moleculares (Tabela 12).

As linhagens e populações selecionadas e caracterizadas neste trabalho apresentam características vantajosas, ou seja, potencialmente possuem importantes genes de resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem; e grãos tipo “carioca”. Algumas dessas 15 linhagens selecionadas deverão ser incluídas em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), onde serão complementados os dados de produtividade e resistência a doenças em uma rede expandida.

Tabela 12. Populações de feijão “carioca” portando diferentes combinações de marcas moleculares ligadas a genes de resistência à mancha-angular, antracnose e ferrugem

População	NI	Marcas moleculares (Genes)
F ₃ (MEX-37-3-6-3 x Rudá R)	32	SF10 _{1050a} e SBA08 _{560a} (<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>); SY20 _{830a} (<i>Co-4</i>); SAZ20 _{845a} (<i>Co-6</i>); SH13 _{520a} (<i>Phg-1</i>); OPE04 _{650a} (<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>); OPAC14 _{2400a} (<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>)
F ₁ [(MEX-37-3-6-3 x Rudá R) x Rudá R3]	26	SF10 _{1050a} e SBA08 _{560a} (<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>); SY20 _{830a} (<i>Co-4</i>); SAZ20 _{845a} (<i>Co-6</i>); SH13 _{520a} (<i>Phg-1</i>); OPE04 _{650a} (<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>); OPAC14 _{2400a} (<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>); SAO12 _{950a} e SAA07 _{950a} (<i>Phg-6</i> ²); OPE04 _{640a} (<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²) SE04 _{640a} (<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²)
F ₂ (Pérola R x Pérola R1)	56	SF10 _{1050a} e SBA08 _{560a} (<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>); SY20 _{830a} (<i>Co-4</i>); SAZ20 _{845a} (<i>Co-6</i>); SH13 _{520a} (<i>Phg-1</i>); SBA16 _{669a} e SAA19 _{650a} (<i>Phg-ON</i>)
F ₂ (Pérola R x BRSMG Talismã)	13	SF10 _{1050a} e SBA08 _{560a} (<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>); SY20 _{830a} (<i>Co-4</i>); SAZ20 _{845a} (<i>Co-6</i>); SH13 _{520a} (<i>Phg-1</i>)
F ₂ (COR-25-12-9 x BRSMG Talismã)	25	OPE04 _{650a} (<i>Phg-3</i>)
F ₂ (Rudá R3 x Rudá R1)	14	SF10 _{1050a} e SBA08 _{560a} (<i>Co-10</i> e <i>Ur-ON</i>); SAS13 _{950a} (<i>Co-4</i> ²); SAB03 _{400a} (<i>Co-5</i>) SAZ20 _{845a} (<i>Co-6</i>); SH13 _{520a} (<i>Phg-1</i>); SAO12 _{950a} e SAA07 _{950a} (<i>Phg-6</i> ²); SE04 _{640a} (<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²)

NI: número de indivíduos que apresentaram todas as marcas moleculares.

REFERÊNCIAS

- Abdelnoor, R. V.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. *Revista Brasileira de Genética*, 18:265-273, 1995.
- Alzate-Marin, A. L.; Menarim, H.; Carvalho, G. A.; Paula Júnior, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology*, 89:281-285, 1999.
- Alzate-Marin, A. L.; Cervigni, G. D. L.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30:333-342, 2005.
- Arruda, M. C. C.; Alzate-Marin, A. L.; Chagas, J. M.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology*, 90:758-761, 2000.
- Arruda, K. M. A. Melhoramento genético de feijão tipo “carioca” com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose. Viçosa, MG: UFV, 77p. Dissertação, (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- Balardin, R. S.; Jarosz, A.; Kelly, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology*, 87:1184-1191, 1997.
- Balbi, B. P.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52:56-57, 2009.
- Brody, R. J. & Kern, E. S. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, 36:214-216, 2004.
- Bruzi, A. T.; Ramalho, M. A. P.; Ferreira, D. F. Homeostasis of common bean populations with different genetic structures. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:111-116, 2007.

- Carvalho, G. A.; Paula Júnior, T. J.; Alzate-Marin, A. L.; Nietsche, S.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. Fitopatologia Brasileira, 23(4):482-485, 1998.
- Caixeta, E. T.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. Euphytica, 134:297-303, 2003.
- Castañó, J. Manual standard para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol. Cali, Colômbia: CIAT, 1985. 22p. (Mimeo.).
- Corrêa, R. X.; Costa, M. R.; Good God, P. I.; Ragagnin, V. A.; Faleiro, F. G.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. Crop Science, 40:804-807, 2000.
- Cruz, C. D. Programa Genes - versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 285p. 2006.
- Damasceno, J. D.; Sanglard, D. A.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Transfer of angular leaf spot resistance gene from Cornell 49-242 to the “carioca” cultivar Rudá. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 50:91-92, 2007.
- Damasceno-Silva, K. J.; Souza, E. A.; Freire, C. N. S.; Sartorato, A. Variability among *Pseudocercospora griseola* isolates by RAPD markers. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:58-59, 2009.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13-15, 1990.
- Embrapa Arroz e Feijão. Cultivares: Dados de mercado. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acessado em janeiro de 2010.
- Faleiro, F. G.; Vinhadelli, W. S.; Ragagnin, V. A.; Corrêa, R. X.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. Genetics and Molecular Biology, 23:399-402, 2000.
- Ferreira, C. F.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Nietsche, S.; Paula Jr, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. Crop Science, 40:1130-1133, 2000.

- Falconer, D. S. Introdução à genética quantitativa. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- Faleiro, F. G.; Ragagnin, V. A.; Cruz, C. D.; Brommonschenkel, S. H.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Selection of common bean lines based on yield, grain type, growth habit and disease resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2:507-514, 2002.
- Faleiro, F. G.; Ragagnin, V. A.; Schuster, I.; Corrêa, R. X.; Good-God, P. I.; Bronmonschenkel, S. H.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 28:59-66, 2003.
- Garcia, R. A. V.; Carneiro, M. S.; Sartorato, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 49:209-210, 2006.
- Kelly, J. D.; Gepts, P.; Miklas, P. N.; Coyne, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82:135-154, 2003.
- Johnson, R. A. Critical analysis of durable resistance, *Annual Review Phytopathology*, 22:309-330, 1984.
- Marques Júnior, O. G.; Ramalho, M. A. P.; Ferreira, D. F.; Santos, J. B. Viabilidade do emprego de notas na avaliação de alguns caracteres do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres*, 44:411-420, 1997.
- Melo, C. L. P.; Ragagnin, V. A.; Arruda, K. M. A.; Barros, E. G.; Carneiro, P. C. S.; Paula Júnior, T. J.; Moreira, M. A.; Carneiro, J. E. S. Caracterização fenotípica e molecular de genitores de feijão tipo “carioca” quanto à resistência a patógenos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:495-504, 2008.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Rocha, R. C.; Paula Júnior, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *Phytopathology*, 148:117-121, 2000.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Alzate-Marin, A. L.; Costa, M.; Rocha, R. C.; Caixeta, E. T.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. *Summa Phytopathologica*, 28(4):331-335, 2002.

- Oliveira, E. J.; Alzate-Marin, A. L.; Borém, A.; Melo, C. L. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. Fitopatologia brasileira, 29:220-223, 2004.
- Oliveira, E. J.; Alzate-Marin, A. L.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Molecular marker-assisted selection for development bean lines resistant to angular leaf spot. Plant Breeding, 124:572-575, 2005.
- 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, p. 212-239 (Doc de trabajo, 113). CIAT, Cali. 1992.
- Pastor-Corrales, M. A. & Jara, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común em América Latina. Fitopatologia Colombiana, 19(1):15-24, 1995.
- Paula Júnior, T. J.; Zambolim, L. Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds.) Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais. 2ed. Viçosa, MG, Editora UFV, 2006. p. 359-414.
- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Costa, M. R.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:237-238, 2004a.
- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Costa, M. R.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G. Moreira, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:249-250, 2004b.
- Ragagnin, V. A.; Alzate-Marin, A. L.; Souza, T. L. P. O.; Arruda, K. M. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. Fitopatologia Brasileira, 28:591-596, 2003.
- Ragagnin, V. A.; Alzate-Marin, A. L.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Use of molecular markers to pyramiding multiple genes for resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot in the common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 48:94-95, 2005.

- Ragagnin, V. A.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Alzate-Marin, A. L.; Carneiro, J. E. S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. *Plant Breeding*, 28:156-163, 2009.
- Ramalho, M. A. P.; Pirola, L. H.; Abreu, A. F. B. Alternativas na seleção de plantas de feijoeiro com porte ereto e grão tipo “carioca”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(12):1989-1994, 1998.
- Ramalho, M. A. P.; Ferreira, D. F.; Oliveira, A. C. *Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas*. 2ed. Lavras: Editora UFLA, 2005. 322 p.
- Rava, C.; Purchio, A.; Sartorato, A. Caracterização de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia brasileira*, 19:167-172, 1994.
- Sanglard, D. A.; Souza, T. L. P. O.; Sousa, C. S.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Molecular marker assisted backcrossing for developing lines with cv. Pérola genetic background, resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 48:84-85, 2005.
- Sanglard, D. A.; Damasceno, J. D.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Introgression of angular leaf spot resistance genes in common bean isolines. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 50:101-102, 2007.
- Sanglard, D. A.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *Pseudocercospora griseola*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52:62-63, 2009a.
- Sanglard, D. A.; Ribeiro, C. A. G.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Reaction of common bean cultivars and elite lines to isolates of *Pseudocercospora griseola*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52:64-65, 2009b.
- Sanjay, K.; Verulkar, S.; Chandel, G.; Zhang, Y.; Huang, B.; Bennett, J. Genetic analysis and pyramiding of two gall midge resistance genes (Gm-2) and (Gm-6t) in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 122:327-334, 2001.
- Santos, V. S.; Ramalho, M. A. P.; Carneiro, J. E. S.; Abreu, A. F. B. Implications of early selection for grain type in common bean genetic breeding. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 44:13-14, 2001.

- Sartorato, A.; Nietsche, S.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 42:21-22, 1999.
- Sartorato, A.; Nietsche, S.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. Fitopatologia Brasileira, 25:637-642, 2000.
- Sartorato, A. & Alzate Marin, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:235-237, 2004.
- Sartorato, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. Fitopatologia Brasileira, 31:192-194, 2006.
- Scott, A. J. & Knott, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics, North Carolina, 30(3):507-512, 1974.
- Servin, B.; Martin, O. C.; Mézard, M.; Hospital, F. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. Genetics, 168:513-523, 2004.
- Silva, V. M. P.; Ramalho, M. A. P.; Abreu, A. F. B.; Silva, F. B. Estimation of competition parameters in common bean plants. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 7:360-366, 2007.
- Silva, F. B. Estimates of parameters of compensation and stability for the development of multilines in common bean. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 8:346-352, 2008.
- Silva, L. C. Estratégias de condução de populações segregantes no melhoramento genético do feijoeiro. Viçosa, MG: UFV, 67p. Tese, (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- Souza, T. L. P. O. Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo “carioca”. Viçosa, MG: UFV, 113p. Dissertação, (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Sanglard, D. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Identification of races of selected isolates of *Uromyces appendiculatus* from Minas Gerais (Brazil) based on the new international classification system. Fitopatologia Brasileira, 32:104-109, 2007.
- Stavely, J. R.; Freytag, G. F.; Steadman, J. R.; Schwartz, H. F. The 1983 Bean Rust Workshop. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 26:4-6, 1983.

- Vallejo, V. & Kelly, J. D. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* gene in common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 44:121-122, 2001.
- Young, R. A. & Kelly, J. D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. Crop Science, 37:940-946, 1997.
- Young, R.; Melotto, M.; Nodari, R. O.; Kelly, J. D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar "G2333". Theoretical Applied Genetics, 96:87-94, 1998.

CAPÍTULO 3

Caracterização do gene de resistência à mancha-angular presente no cultivar de feijoeiro comum ‘Ouro Negro’

Resumo: A mancha-angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, tem sido considerada uma das principais doenças do feijoeiro. Importantes fontes de resistência foram identificadas e caracterizadas: ‘México 54’, ‘AND 277’, ‘MAR-2’, ‘Cornell 49-242’ e ‘BAT 332’. O programa de piramidação de genes de resistência à mancha-angular, conduzido na UFV, tem utilizado também o cultivar ‘Ouro Negro’ como fonte de resistência para essa doença. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o gene de resistência à mancha-angular presente em ‘Ouro Negro’ perante as cinco fontes citadas. Estas foram cruzadas com o cultivar ‘Ouro Negro’ (testes de alelismo) e com o cultivar ‘Rudá’ (estudos de herança). Para confirmar a hibridação das populações F₁ de cada cruzamento, analisou-se a forma, tamanho, cor e brilho das sementes F₂, exceto no cruzamento de Ouro Negro x Cornell 49-242, onde foi utilizado o marcador molecular SF10_{1050a}. Para cada cruzamento dos testes de alelismo, foi usada uma raça com reação de incompatibilidade para os dois parentais e que já havia sido utilizada em trabalhos anteriores. As frequências das classes fenotípicas nas populações F₂ foram testadas pelo teste de qui-quadrado. Também foram amplificadas amostras de DNA de todos os genitores com diversos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à mancha-angular, anteriormente identificados. Os padrões de segregação dos estudos de herança e dos testes de alelismo indicaram que ‘Ouro Negro’ possui pelo menos um loco distinto das demais fontes de resistência testadas. Análises moleculares não revelaram especificidade entre os genes de resistência e o padrão de bandas nos genótipos estudados.

Palavras-chave: *Pseudocercospora griseola* – *Phaseolus vulgaris* – testes de alelismo – estudos de herança – fontes de resistência.

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representa um dos alimentos básicos consumidos pela população brasileira economicamente menos favorecida, uma vez que constitui fonte de proteínas de baixo custo em sua dieta diária (Schwartz et al., 1996). Apesar da grande importância que esta cultura representa para o Brasil, o seu rendimento médio nacional ainda é muito baixo, inferior a 900 kg/ha (Conab, 2010). Um dos fatores que explicam essa situação é o grande número de doenças que acometem o feijoeiro. A mancha-angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, se inclui entre as doenças que provocam grandes prejuízos aos produtores (Sartorato & Rava, 1994; Rava, 2002).

Resistência estável a patógenos de plantas com extensiva variabilidade fisiológica requer contínua avaliação do germoplasma e eventual introgressão de diferentes genes em genótipos comerciais (Young & Kelly, 1996). Para facilitar essa introgressão, além de identificar as fontes de resistência e estudar a herança dos genes de resistência presentes nessas, é necessário realizar testes de alelismo para identificar genes distintos que poderão ser piramidados em materiais de interesse.

De acordo com Ramalho et al. (2008), o teste de alelismo é comumente usado para determinar se diversos fenótipos de um dado caráter, observados numa população de indivíduos, resultam da participação de uma série de alelos ou da interação gênica. Este teste consiste em cruzar os indivíduos portadores dos vários fenótipos, dois a dois, em todas as combinações possíveis e estudar as segregações fenotípicas nas descendências. Se for constatada uma herança diferente da monogênica, tem-se um caso de interação gênica e não de alelismo múltiplo.

Em estudos de genes de resistência de plantas a patógenos, tem-se utilizado o teste de alelismo como metodologia e objetivos diferentes do descrito por Ramalho et al. (2008). Neste caso, são feitos cruzamentos entre dois genótipos resistentes e as plantas F₂ destes cruzamentos são analisadas. O

aparecimento de plantas suscetíveis indica que os pais têm genes de resistência localizados em locos distintos. A observação de apenas plantas resistentes indica que os dois genitores são portadores de gene(s) de resistência em um mesmo loco, podendo ser alélicos ou ligados em bloco (Ehdaie & Baker, 1999). Testes de alelismo utilizando essa metodologia têm sido extensivamente utilizados (Alzate-Marin et al., 2003; Caixeta et al., 2005; Souza et al., 2007; Arruda et al., 2008a; 2008b; Souza et al., 2009).

Em experimentos sobre a genética da resistência do feijoeiro à mancha-angular, Busogoro et al. (1999) constataram que há interação do tipo gene-a-gene no patossistema *Phaseolus vulgaris* – *Pseudocercospora griseola*, à semelhança do que ocorre na interação entre o linho e o fungo agente causal da ferrugem do linho (*Melampsora lini*), descrito por Flor (1942). Além disso, foram identificadas resistências monogênicas dominantes eficazes no controle de múltiplas raças, ou seja, genes R de amplo espectro, podendo exercer efeito epistático sobre outros semelhantes.

De acordo com levantamentos sobre variabilidade patogênica do fungo *P. griseola* realizados a partir de isolados coletados em diversas regiões do Brasil, podemos destacar as genótipos ‘AND 277’, ‘MAR-2’, ‘México 54’, ‘Cornell 49-242’ e ‘BAT 332’ como algumas das principais fontes de resistência (Nietsche et al., 2001; Sartorato & Alzate-Marin, 2004; Garcia et al., 2006; Damasceno-Silva et al., 2008; Balbi et al., 2009). Nos cruzamentos de ‘Cornell 49242’ com ‘Rosinha G-2’ e ‘Caraota 260’, foi observada herança monogênica dominante (Sartorato et al., 1993). No cruzamento entre ‘Ouro Negro’ e ‘US Pinto 111’, encontrou-se herança monogênica dominante presente no cultivar ‘Ouro Negro’ e monogênica recessiva em ‘US Pinto 111’ (Corrêa et al., 2001). A resistência presente nos genótipos ‘AND 277’, ‘MAR-2’, ‘México 54’, ‘Cornell 49242’ e ‘BAT 332’, em cruzamentos com o cultivar ‘Rudá’, também revelou herança monogênica e dominante (Carvalho et al., 1998; Ferreira et al., 2000; Sartorato et al., 2000; Nietsche et al., 2000; Caixeta et al., 2003). Caixeta et al. (2005) fizeram testes de alelismo entre as fontes de resistência ‘México 54’, ‘MAR-2’, ‘Cornell 49242’, ‘AND 277’ e

‘BAT 332’, e observaram uma maior complexidade que a encontrada nos estudos anteriores. Foi demonstrado que ‘Cornell 49242’ 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 outro *Phg-5*² (forma alélica de *Phg-5*); ‘BAT 332’ possui a forma alélica *Phg-6*²; e ‘AND 277’ possui as formas alélicas *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*². Estas informações são importantes no processo de piramidação de genes de resistência, pois entendendo a relação existente entre os genes, o melhorista tem a oportunidade de escolher os genitores para seu programa de melhoramento com as combinações mais favoráveis destes (Alzate-Marin et al., 2005).

O cultivar ‘Ouro Negro’ (Honduras 35), possuidor de um gene de resistência à mancha-angular, provisoriamente denominado de *Phg-ON*, pelo fato de ainda não ter sido caracterizado, tem sido uma das fontes de resistência a *P. griseola* de maior espectro perante as raças já caracterizadas (Sartorato et al., 2006; Sanglard et al., 2009a). Assim, o presente trabalho objetivou caracterizar o gene R para resistência à mancha-angular, presente em ‘Ouro Negro’, com relação às outras cinco fontes relatadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e cruzamentos

O material genético utilizado foi fornecido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colômbia), pelo Banco de Germoplasma do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV), pelo USDA (Beltsville, Maryland, EUA) e pela Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia, GO, Brasil). Algumas das características dos genótipos utilizados neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características dos genótipos utilizados nos testes de alelismo e estudos de herança

Genótipos	Flor	Conjunto gênico	Tipo de grão	Tamanho da semente
BAT 332	Roxa	Mesoamericano	Mulatinho	Pequena
México 54	Roxa	Mesoamericano	Mulatinho	Grande
Cornell 49-242	Roxa	Mesoamericano	Preto	Pequena
MAR-2	Branca	Mesoamericano	Carioca	Média
AND 277	Rosa	Andino	Manteigão	Grande
Ouro Negro	Roxa	Mesoamericano	Preto	Média
Rudá	Branca	Mesoamericano	Carioca	Pequena

2.1.1. Testes de alelismo

Os genótipos ‘Cornell 49-242’, ‘México 54’, ‘AND 277’, ‘MAR-2’, ‘BAT 332’ e ‘Rudá’ foram cruzadas com ‘Ouro Negro’. Em todos os casos, Ouro Negro foi o doador de pólen. As populações F_2 de cada cruzamento foram usadas para o teste de alelismo. Para assegurar que as sementes F_1 de cada cruzamento fossem realmente resultado de hibridação, analisou-se a cor, formato, tamanho e brilho das sementes F_2 (Figura 1). No caso do cruzamento entre ‘Ouro Negro’ e ‘Cornell 49-242’, os quais possuem sementes de aspecto semelhante, foi utilizado o marcador molecular SF10_{1050a} (Corrêa et al., 2000) capaz de identificar os híbridos na geração F_1 .

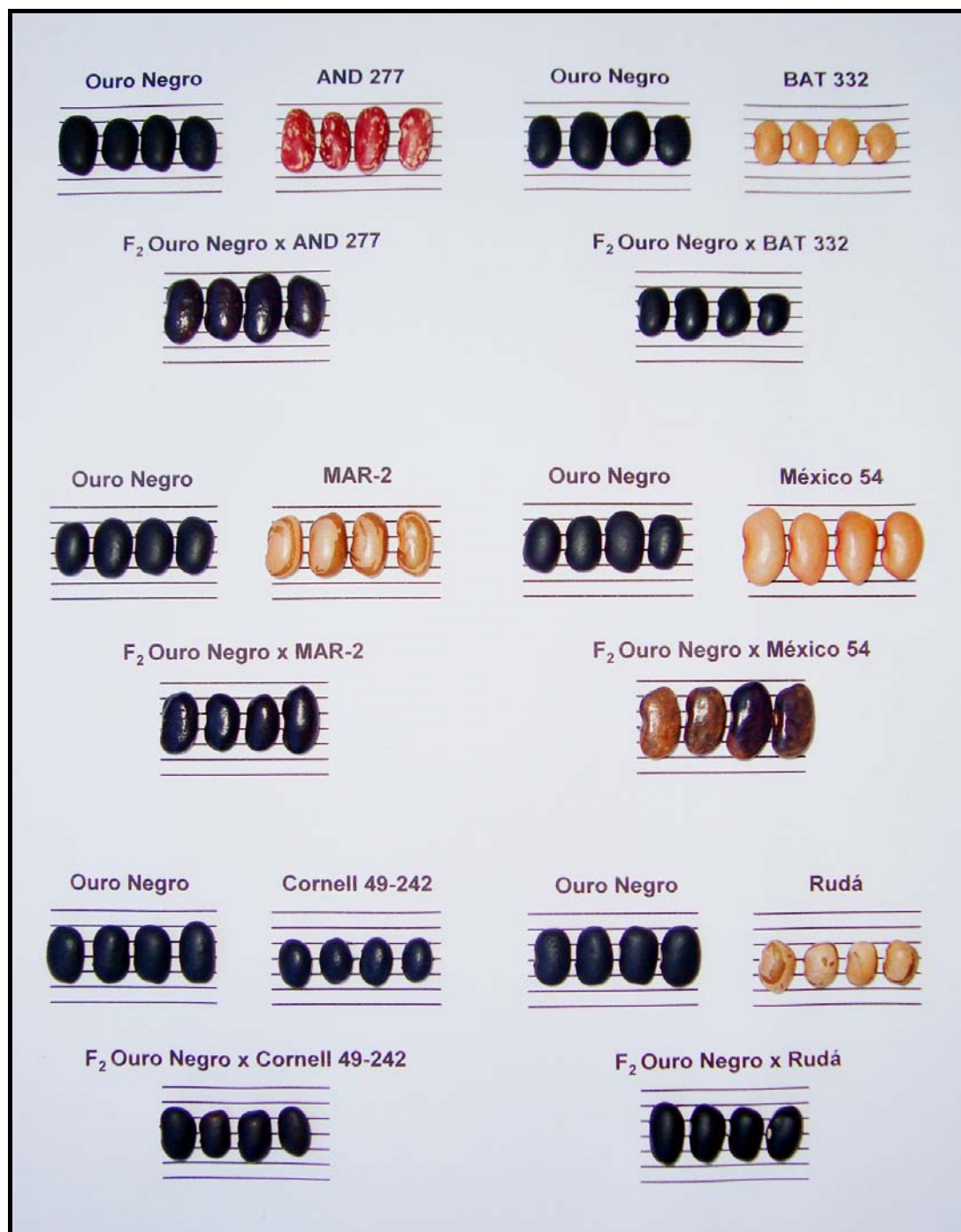


Figura 1. Aspectos da forma, tamanho, cor e brilho das sementes dos genitores e suas respectivas populações F_2 utilizadas nos testes de alelismo.

2.1.1. Estudos de herança

Os genótipos ‘MAR-2’, ‘México 54’, ‘BAT 332’ e ‘Cornell 49-242’ foram cruzados com ‘Rudá’. Em todos os casos, ‘Rudá’ foi o genitor feminino. Para assegurar que as populações F_1 de cada cruzamento foram

produtos de hibridação, analisou-se a cor, formato, tamanho e brilho das sementes F_2 (Figura 2). As populações segregantes F_2 foram usadas nos estudos de herança.

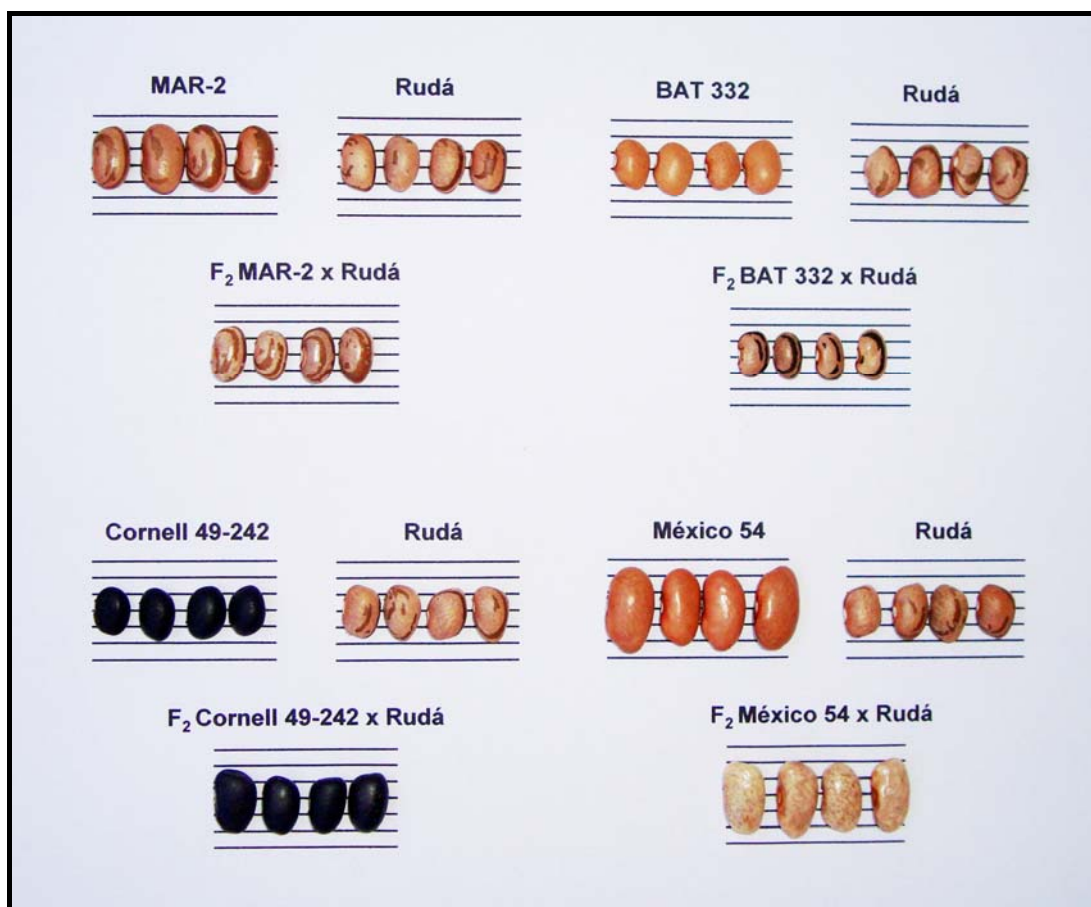


Figura 2. Aspectos da forma, tamanho, cor e brilho das sementes dos genitores e suas respectivas populações F_2 utilizadas nos estudos de herança.

2.2. Avaliações fenotípicas

2.2.1. Raças e preparo do inóculo

Os isolados utilizados no trabalho pertencem à micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Foram usadas as raças 63.23 e 63.39 de *P. griseola*, conforme a Tabela 2. Estas foram escolhidas por apresentarem reações de incompatibilidade com os genitores e terem sido utilizadas no estudo de alelismo conduzido por Caixeta et al. (2005).

Tabela 2. Cruzamentos, raças e reações fenotípicas usados para a caracterização genética da resistência à mancha-angular presente no cultivar ‘Ouro Negro’

Cruzamento G1 x G2	Raças (isolados) de <i>P. griseola</i>	Reação fenotípica G1 x G2
Ouro Negro x AND 277	63.23 (158-1)	R x R
Ouro Negro x BAT 332	63.39 (29-3)	R x R
Ouro Negro x MAR-2	63.23 (158-1)	R x R
Ouro Negro x MAR-2	63.39 (29-3)	R x R
Ouro Negro x México 54	63.23 (158-1)	R x R
Ouro Negro x México 54	63.39 (29-3)	R x R
Ouro Negro x Cornell 49-242	63.23 (158-1)	R x R
Ouro Negro x Rudá	63.23 (158-1)	R x S
Ouro Negro x Rudá	63.39 (29-3)	R x S
^a AND 277 x Rudá	63.23 (158-1)	R x S
BAT 332 x Rudá	63.39 (29-3)	R x S
México 54 x Rudá	63.23 (158-1)	R x S
México 54 x Rudá	63.39 (29-3)	R x S
MAR-2 x Rudá	63.23 (158-1)	R x S
^b MAR-2 x Rudá	63.39 (29-3)	R x S
Cornell 49-242 x Rudá	63.23 (158-1)	R x S

G1: genitor 1; G2: genitor 2; ^adados obtidos por Carvalho et al. (1998); ^bdados obtidos por Ferreira et al. (2000); R: genótipo quando inoculado com a raça responde com uma reação de resistência; S: reação de suscetibilidade.

O inóculo de cada raça consistiu de uma suspensão de conídios preparada raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade crescendo a 24°C sobre placas contendo uma mistura de água destilada, molho de tomate, ágar e carbonato de cálcio (CaCO₃). Essa suspensão foi filtrada em gase e posteriormente ajustada para concentração final de 2,0 x 10⁴ conídios/mL (Sanglard et al., 2009b).

2.2.2. Inoculação e avaliação da doença

As inoculações foram realizadas em ambas as superfícies da primeira folha trifoliolada 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 uma câmara de nevoeiro (20 ± 1°C e umidade

relativa >95%), onde permaneceram por 48 h, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram até serem avaliadas.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por Pastor-corrales & Jara (1995): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes, e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.3. Análises moleculares

2.3.1. Extração de DNA

Cerca de 300 mg de folha dos indivíduos F₁ (Ouro Negro x Cornell 49-242) e dos genitores utilizados nos testes de alelismo foram triturados em um Politron (Nova Técnica) na presença de 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)). As etapas seguintes foram executadas de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

2.3.2. Análise com RAPD

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de RAPD em uma mistura de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 4 µM do *primer*, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3. As amplificações foram efetuadas em termociclador modelo Robocycler (*Eppendorf* AG 22331, Hamburg, Alemanha), programado para 40 ciclos constituídos 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.

2.3.3. Análise com SCAR

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de SCAR em uma mistura de 15 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 picomoles de cada *primer* específico, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador modelo Robocycler (*Eppendorf* AG 22331, Hamburg, Germany), programado para 1 etapa a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C (SAA19), 58 °C (SBA16), 59 °C (SH13), 60 °C (SAA07), 62 °C (SAO12) ou 65 °C (SE04 e SN02) por 1 min e 72 °C por 90 s. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 min (Tabela 3).

2.3.4. Eletroforese e fotodocumentação

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em SB 1X (hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico - Brody & Kern (2004)), contendo brometo de etídio 0,2 mg/mL, por cerca de 2 horas (SCAR) e 4 horas (RAPD) a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Tabela 3. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro comum

Marcador*	Seqüência (5' → 3')	#(cM)	Genes de resistência	Fonte de resistência	Referência
SBA16 _{669a}	F: TTCCACGTCTATTTTGCATCA R: CACGCATCACGCAGAACT	9,70	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	Queiroz et al. (2004)
SAA19 _{650a}	F: TGAGGCGTGTCAATGGATATAA R: GAGGCGTGTGATAATTCTGG	10,10	<i>Phg-ON</i>	Ouro Negro	Queiroz et al. (2004)
SH13 _{520a}	F: GACGCCACACCCATTATGTT R: GCCACACAGATGGAGCTTTA	5,60	<i>Phg-1</i>	AND 277	Queiroz et al. (2004)
SN02 _{890a}	F: ACCAGGGGCATTATGAACAG R: ACCAGGGGCAACATACTATG	3,20	<i>Phg-3</i>	Cornell 49-242	Nietsche et al. (2000)
SN02 _{890a}	F: ACCAGGGGCATTATGAACAG R: ACCAGGGGCAACATACTA	5,90	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	México 54	Sartorato et al. (2000)
SEO4 _{500a}	F: TGACATGCCCCACTTAGTTAGA R: CATGCCATGATTACCTTCC	6,03	<i>Phg-4</i> e/ou <i>Phg-5</i> ²	MAR-2	Capítulo 1
SAO12 _{950a}	F: GGTCTCAAGCTACAGCGAAA R: CGGTCTCGATGGTTCTGACT	7,02	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Capítulo 1
SAA07 _{950a}	F: CGCTCACTTATCGAAGATCG R: CGCTCACTGATTATAGACAAAATTACC	4,92	<i>Phg-6</i> ²	BAT 332	Capítulo 1
OPE04 _{650a}	GTGACATGCC	11,80	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	México 54	Sartorato et al. (2000)
OPE04 _{650a}	GTGACATGCC	12,50	<i>Phg-3</i>	Cornell 49-242	Nietsche et al. (2000)
OPAC14 _{2400a}	GTCGGTTGTC	6,60	<i>Phg-2</i> e/ou <i>Phg-5</i> e/ou <i>Phg-6</i>	México 54	Sartorato et al. (2000)

*a: acoplamento; #(cM): distância genética (centi Morgan) dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência; F: forward; R: reverse.

2.4. Análise estatística

As frequências das classes fenotípicas obtidas foram testadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2), conforme apresentado a seguir:

$$\chi_c^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}, \text{ em que:}$$

O_i = número observado de indivíduos na i -ésima classe fenotípica;

E_i = número esperado de indivíduos na i -ésima classe fenotípica; e

k = número de classes fenotípicas.

Os valores do χ_t^2 (qui-quadrado tabelado) foram obtidos em função do nível de significância do teste (α) e do número de graus de liberdade. As seguintes hipóteses foram elaboradas:

H_0 : não há discrepância entre as frequências observadas e esperadas;

H_1 : as frequências observadas e esperadas são discrepantes.

Para as conclusões foi verificado:

Se $\chi_c^2 \leq \chi_t^2$, não se rejeita H_0 ;

Se $\chi_c^2 > \chi_t^2$, rejeita-se H_0 .

Com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2006), foram analisadas nove proporções fenotípicas: 3:1 (um gene dominante); 15:1 (dois genes dominantes independentes); 9:7 (dois genes dominantes complementares); 13:3 (dois genes epistáticos, um dominante e um recessivo); 63:1 (três genes dominantes independentes); 57:7 (um gene dominante e dois complementares); 27:37 (três genes dominantes complementares); 61:3 (dois genes dominantes e um recessivo); 49:15 (um gene dominante e dois recessivos). Foi considerada a proporção fenotípica que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu o menor valor de qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivar ‘Ouro Negro’ foi inoculado com um conjunto de raças de *P. griseola*, sendo essas as mesmas utilizadas nos testes de alelismo realizados por Caixeta et al. (2005) (Tabela 4). O objetivo foi identificar aquelas passíveis de serem usadas nos testes de alelismo e estudos de herança, considerando o cultivar alvo da caracterização, ‘Ouro Negro’; juntamente com os genótipos ‘MAR-2’, ‘BAT 332’, ‘México 54’, ‘Cornell 49-242’, ‘AND 277’ e ‘Rudá’.

Tabela 4. Reação dos genótipos de feijão ‘MAR-2’, ‘BAT 332’, ‘México 54’, ‘Cornell 49-242’, ‘AND 277’ ‘Ouro Negro’ e ‘Rudá’ a diferentes raças de *P. griseola*.

Genótipos	Raças (Isolados)			
	63.23 (158-1)	63.39 (29-3)	63.19 (48-1)	31.17 (97-2)
MAR-2	R	R	R	R
BAT 332	S	R	S	S
México 54	R	R	R	R
Cornell 49-242	R	S	R	R
AND 277	R	S	R	R
Ouro Negro	R	R	S	S
Rudá	S	S	S	S

R: reação de resistência; S: reação de suscetibilidade.

Segundo Ehdaie & Baker (1999), em cruzamentos entre dois genótipos resistentes, o aparecimento de plantas suscetíveis na população F_2 indica que os pais possuem genes de resistência que estão localizados em locos diferentes. O não aparecimento de plantas suscetíveis nesse mesmo cruzamento indica que os dois genitores são portadores de gene(s) de resistência em um mesmo loco, ou seja, que são alélicos ou ligados em bloco. Assim, foram escolhidas as raças 63.23 e 63.39 por apresentarem reações de incompatibilidade entre ‘Ouro Negro’ e as cinco fontes de resistência (Tabela 4). Com base nestas avaliações, a raça 63.23 de *P. griseola* foi inoculada em quatro populações F_2 para os testes de alelismo, conforme pode ser observado na Tabela 5. Considerando as populações F_2 (Ouro Negro x AND 277), F_2 (Ouro Negro x Cornell 49-242) e F_2 (Ouro Negro x MAR-2), foi obtido o padrão de segregação típico de dois genes 15:1 (dois genes dominantes

independentes), indicando que provavelmente cada um destes genótipos contribui com um gene dominante para a reação de resistência. A população F_2 (Ouro Negro x México 54) diferiu das demais ao apresentar uma segregação de 63:1 (três genes dominantes independentes), possivelmente por haver a participação simultânea de dois dos três genes caracterizados em México 54 para resistência a esta raça. O estudo de herança com a população F_2 (México 54 x Rudá) que resultou em uma segregação de 15:1 com a mesma raça 63.23, reforçam esta idéia (Tabela 5).

Resultado semelhante foi observado nas inoculações com a raça 63.39, onde as populações F_2 (Ouro Negro x México 54) e F_2 (Ouro Negro x MAR-2) também apresentaram segregações de 63:1 e 15:1, respectivamente. A população F_2 (Ouro Negro x BAT 332) segregou em 13:3 para esta raça, um comportamento típico de herança digênica onde dois genes epistáticos, um dominante e um recessivo, atuam. As populações F_2 (Ouro Negro x AND 277) e F_2 (Ouro Negro x Cornell 49-242) não foram testadas com a raça 63.39 devido à suscetibilidade de AND 277 e Cornell 49-242 (Tabela 5). Da mesma forma foi dispensado o teste com a população F_2 (Ouro Negro x BAT 332) para a raça 63.23 (Tabela 5).

Em trabalhos anteriores, heranças do tipo dominante e monogênica foram observadas durante a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a diferentes raças de *P. griseola*. Nestes, o cultivar ‘Rudá’ foi cruzado com as seguintes fontes de resistência a mancha-angular: ‘AND 277’ (raça 63.23) (Carvalho et al., 1998); ‘MAR-2’ (raça 63.39) (Ferreira et al., 2000); ‘México 54’ (raça 63.19) (Sartorato et al., 2000); ‘Cornell 49-242’ (raça 31.17) (Nietsche et al., 2000) e ‘BAT 332’ (raça 61.41) (Caixeta et al., 2003). Entretanto, Nietsche et al. (2001), utilizando diversas raças de *P. griseola*, relataram diferentes espectros de resistência com relação a estas fontes de resistência, indicando que esses genótipos deveriam possuir diferentes fatores de resistência.

A partir destes questionamentos, Caixeta et al. (2005) executou uma análise conjunta visando um melhor entendimento da relação de

independência desses genes. A utilização de diferentes cruzamentos e diferentes raças demonstrou uma maior complexidade que a relatada anteriormente na caracterização da herança da resistência desses genótipos. Como resultados dos estudos de alelismo realizados por Caixeta et al. (2005), ficou demonstrado que ‘Cornell 49242’ 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 outro *Phg-5*² (forma alélica de *Phg-5*); ‘BAT 332’ possui a forma alélica *Phg-6*²; e ‘AND 277’ possui as formas alélicas *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*².

Além das fontes de resistência à mancha-angular mencionadas, destaca-se também o cultivar ‘Ouro Negro’ (Honduras 35), o qual apresenta características agronômicas e culinárias desejáveis, além de uma boa capacidade de combinação em cruzamentos com outros genótipos. O programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV, bem como outros grupos de pesquisa no Brasil, tem utilizado este cultivar como fonte de resistência a mancha-angular no melhoramento do feijão (Sanglard et al., 2005; Sartorato, 2006; Melo et al., 2008). No presente trabalho, testes de alelismo foram realizados para verificar se as fontes de resistência ‘AND 277’, ‘MAR-2’, ‘México 54’, ‘Cornell 49-242’ e ‘BAT 332’ compartilham, ou possuem locos distintos aos de ‘Ouro Negro’.

Os dados obtidos estão de acordo com o trabalho realizado por Caixeta et al. (2005). Provavelmente, um mesmo gene presente em ‘Ouro Negro’ esteja atuando na resistência às raças 63.23 e 63.39 simultaneamente, visto que os padrões de segregação das populações F₂ (Ouro Negro x México 54) e F₂ (Ouro Negro x MAR-2) apresentaram os mesmos valores considerando as duas raças. Além disso, os estudos de herança entre ‘Ouro Negro’ e ‘Rudá’ para as mesmas revelaram segregações de 3:1, típico de herança monogênica com relação alélica de dominância completa (Tabela 5). A partir destes valores, pode-se inferir que ‘Ouro Negro’ possui pelo menos um loco diferente de ‘AND 277’, ‘México 54’, ‘MAR-2’, ‘Cornell 49-242’ e ‘BAT 332’, considerando os padrões de segregação às raças 63.23 e 63.39.

Tabela 5. Testes de alelismo para caracterização genética da resistência à *P. griseola* presente em ‘Ouro Negro’, relativo aos genótipos ‘AND 277’, ‘BAT 332’, ‘México 54’, ‘MAR-2’ e ‘Cornell 49-242’

População F ₂ G1 x G2	Raça (isolado)	Nº de plantas F ₂		^a Proporção esperada		Valor de χ^2	P(%)	Símbolo do loco	
		R	S	R	S			G1	G2
Ouro Negro x AND 277	63.23 (158-1)	432	25	15	1	0,4739	49,1170	F	A, B, C
Ouro Negro x BAT 332	63.39 (29-3)	404	92	13	3	0,0132	90,8413	F	E
Ouro Negro x México 54	63.23 (158-1)	551	8	63	1	0,0627	80,2239	F	B, D, E
Ouro Negro x México 54	63.39 (29-3)	376	4	63	1	0,6422	42,2889	F	B, D, E
Ouro Negro x MAR-2	63.23 (158-1)	415	24	15	1	0,4593	49,7915	F	C, D
Ouro Negro x MAR-2	63.23 (29-3)	398	28	15	1	0,0757	78,3150	F	C, D
Ouro Negro x Cornell 49-242	63.23 (158-1)	396	25	15	1	0,0698	79,1579	F	A
Ouro Negro x Rudá	63.23 (158-1)	226	71	3	1	0,1898	66,3187	F	?
Ouro Negro x Rudá	63.39 (29-3)	354	111	3	1	0,3161	57,3943	F	?
^b AND 277 x Rudá	63.23 (158-1)	145	48	3	1	0,0017	96,6850	A, B, C	?
BAT 332 x Rudá	63.39 (29-3)	396	129	3	1	0,0514	82,0595	E	?
México 54 x Rudá	63.23 (158-1)	376	28	15	1	0,3194	57,1950	B, D, E	?
México 54 x Rudá	63.39 (29-3)	355	22	15	1	0,1105	73,9551	B, D, E	?
MAR-2 x Rudá	63.23 (158-1)	387	125	3	1	0,0937	75,9462	C, D	?
^c MAR-2 x Rudá	63.39 (29-3)	121	37	3	1	0,2109	64,6007	C, D	?
Cornell 49-242 x Rudá	63.23 (158-1)	303	98	3	1	0,0673	79,5262	A	?

G1: símbolo designado para o genitor 1 do cruzamento e G2: símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento; R: resistência; S: suscetibilidade; ^aforam testadas nove proporções, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu menor qui-quadrado (χ^2); P(%): probabilidade do valor estimado; A, B, C, D e E: locos caracterizados por Caixeta et al. (2005); (?): não caracterizado; ^bdados obtidos por Carvalho et al. (1998); ^cdados obtidos por Ferreira et al. (2000).

Na análise dos marcadores moleculares dos tipos RAPD e SCAR identificados em trabalhos anteriores como ligados a genes de resistência presentes nos genótipos deste estudo (Sartorato et al., 1999; 2000; Nietsche et al., 2000; Queiroz et al., 2004), pode-se observar que apenas os marcadores SAO12_{950a}, SAA07_{950a} e SH13_{520a} são específicos (Tabela 6). O marcador SH13_{520a} quando testado nas fontes de resistência, só esteve presente em ‘AND 277’. Com exceção de ‘BAT 332’ e ‘Ouro Negro’, a banda SN02_{890a} foi observada em todas as outras fontes de resistência. OPAC14_{2400a}, marcador ligado ao(s) gene(s) de ‘México 54’, foi também encontrado em ‘MAR-2’. O marcador OPE04_{650a} foi amplificado em ‘México 54’, ‘Cornell 49-242’ e ‘Ouro Negro’. Os fragmentos produzidos pelos marcadores SAO12_{950a} e SAA07_{950a} só estiveram presentes em ‘BAT 332’, onde foram previamente identificados. SAA19_{650a} e SBA16_{560a} geraram bandas em vários genótipos além de ‘Ouro Negro’ (Tabela 6).

Estes dados não concordam com os obtidos nos testes de alelismo, conforme já havia observado Caixeta (2002) utilizando marcadores RAPD. Os marcadores moleculares não podem, portanto, ser usados para auxiliar no entendimento da complexidade destas fontes de resistência à mancha-angular. Possivelmente, vários dos genes presentes nos seis genótipos estão organizados em *cluster* (bloco gênico). Estudos mais detalhados poderão ser obtidos quando o genoma de *Phaseolus vulgaris* estiver seqüenciado.

Dados da genética clássica e molecular mostram que genes que determinam resistência a doenças em plantas estão, freqüentemente, agrupados no genoma. Os genes de resistência a doenças R compreendem um largo e diverso grupo de seqüências relacionadas no genoma de plantas (Michelmore & Meyers, 1998). Assim, genes de resistência têm sido identificados em complexos, regiões altamente duplicadas com múltiplos genes organizados em tandem, e possivelmente codificando resistência a diversos patógenos, o que explicaria o aparecimento das bandas amplificadas em vários genótipos por conservação de seqüências. Muitos genes R em plantas são denominados como membros de uma família de um gene ancestral (Mindrinis et al., 1994).

Tabela 6. Caracterização molecular dos genótipos utilizado nos testes de alelismo por meio de marcadores moleculares

Genótipos	Genes de resistência	Marcadores moleculares								
		OPAC14 ₂₄₀₀	OPE04 ₆₅₀	SE04 ₆₄₀	SAO12 ₉₅₀	SAA07 ₉₅₀	SAA19 ₆₅₀	SBA16 ₅₆₀	SN02 ₈₉₀	SH13 ₅₂₀
MAR-2	*Phg-4 e Phg-5 ²	+	-	+	-	-	+	-	+	-
BAT 332	*Phg-6 ²	-	-	-	+	+	+	+	-	-
México 54	*Phg-2, Phg-5 e Phg-6	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Cornell 49-242	*Phg-3	-	+	-	-	-	-	+	+	-
AND 277	*Phg-1, Phg-2 ² , Phg-3 ² e Phg-4 ²	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ouro Negro	Phg-7	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Rudá	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Phg-7: denominação proposta neste trabalho; (?): não caracterizado; (+): presença de banda; (-): ausência de banda; *dados obtidos por Caixeta (2005).

Os testes de alelismo têm especial importância para programas de melhoramento cujo objetivo é a piramidação de diferentes genes que conferem resistência a diferentes raças de um patógeno. A piramidação de genes tem sido sugerida como uma estratégia de obtenção de genótipos com resistência durável. O acúmulo de genes de resistência com efeitos maiores em um genótipo retarda o aparecimento de novas raças do patógeno (Kelly et al., 2003; Servin et al., 2004). A base para a estabilidade da resistência reside na redução da adaptação do patógeno quando vários genes de avirulência devem ser inativados para “quebrar” a resistência do hospedeiro (Van der Plank, 1984).

A partir das avaliações realizadas neste trabalho, sugere-se que o loco presente no cultivar ‘Ouro Negro’ e distinto das demais fontes de resistência estudadas, receba a denominação de *Phg-7*. Esta nomenclatura estaria de acordo com o prosseguimento dos trabalhos realizado por Caixeta et al. (2005). No Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV foram desenvolvidas diversas isolinhas com grãos “carioca”, “preto” e “vermelho” contendo genes de resistência à mancha-angular derivados dos genótipos ‘AND 277’, ‘BAT 332’, ‘MAR-2’, ‘México 54’ e ‘Cornell 49-242’ (Alzate-Marin et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Costa et al., 2006; Sanglard et al., 2007; Ragagnin et al., 2009). O intercruzamento destes materiais com linhagens derivadas de ‘Ouro Negro’ se justifica e possivelmente traria incremento no espectro de resistência às raças de *P. griseola*.

REFERÊNCIAS

- Abdelnoor, R. V.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. *Revista Brasileira de Genética*, 18:265-273, 1995.
- Alzate-Marin, A. L.; Costa, M. R.; Arruda, K. M. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Characterization of the anthracnose resistance locus present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. *Euphytica* (Wageningen), 133:165-169, 2003.
- Alzate-Marin, A. L.; Arruda, K. M. A.; Souza, K. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Introgression of *Co-4*² and *Co-5* anthracnose resistance genes into “carioca” common bean cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:446-451, 2004.
- Alzate-Marin, A. L.; Cervigni, G. D. L.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30:333-342, 2005.
- Arruda, K. M. A.; Alzate-Marin, A. L.; Oliveira, M. S. G.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. . Inheritance studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 51:170-171, 2008a.
- Arruda, K. M. A.; Alzate-Marin, A. L.; Oliveira, M. S. G.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Evidence that anthracnose resistance in common bean cultivar Widusa is conferred by more than one gene. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 51:172-173, 2008b.
- Balbi, B. P.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52:56-57, 2009.
- Brody, R. J. & Kern, E. S. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, 36:214-216, 2004.
- Busogoro, J. P.; Jijakli, M. H.; Lepoivre, P. Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breeding*, 118:417-423, 1999.

- Caixeta, E. T. Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro. Viçosa, MG: UFV, 2002. 90p. Tese, (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- Caixeta, E. T.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 134:297-303, 2003.
- Caixeta, E. T.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. *Euphytica*, 145:237-245, 2005.
- Carvalho, G. A.; Paula Jr, T. J.; Alzate-Marin, A. L.; Nietsche, S.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, 23(4):482-485, 1998.
- CONAB. Levantamento de avaliação da safra 2007/2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em janeiro de 2010.
- Corrêa, R. X.; Costa, M. R.; Good God, P. I.; Ragagnin, V. A.; Faleiro, F. G.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. *Crop Science*, 40:804-807, 2000.
- Corrêa, R. X.; Good-God, P. I. V.; Oliveira, M.L. P.; Nietsche, S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, 26:27-32, 2001.
- Costa, M. R.; Tanure, J. P. M.; Arruda, K. M. A.; Carneiro, J. E. S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Pyramiding of anthracnose angular leaf spot and rust resistance genes in black and red bean cultivars. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 49:187-188, 2006.
- Cruz, C. D. Programa GENES - versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 285p. 2006.
- Damasceno-Silva, K. J. D.; Souza, E. A.; Sartorato, A.; Freire, C. N. S. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. *Phytopathology*, 156:602-606, 2008.

- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15, 1990.
- Ehdaie, B. & Baker, C. A. Inheritance and allelism for resistance to Russian wheat aphid in an Iranian spring wheat. *Euphytica*, 107:71-78, 1999.
- Ferreira, C. F.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Nietsche, S.; Paula Jr, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Science*, 40:1130-1133, 2000.
- Flor, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669, 1942.
- Garcia, R. A. V.; Carneiro, M. S.; Sartorato, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 49:209-210, 2006.
- Kelly, J. D.; Gepts, P.; Miklas, P. N.; Coyne, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82:135-154, 2003.
- Michelmore, R. W. & Meyers, B. C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process. *Genome Research*, 8:1113-30, 1998.
- Mindrinos, M.; Katagiri, F.; Yu, G. L.; Ausubel, F. M. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, 78:1089-1099, 1994.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Rocha, R. C.; Paula Júnior, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *Phytopathology*, 148:117-121, 2000.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Paula Júnior, T. J.; Ferreira, C. F.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Euphytica*, 117:77-84, 2001.
- Oliveira, E. J.; Alzate-Marin, A. L.; Borém, A.; Fagundes, S. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Molecular marker-assisted selection for development bean lines resistant to angular leaf spot. *Plant Breeding*, 124:572-575, 2005.
- Pastor-Corrales, M. A. & Jara, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común em América Latina. *Fitopatologia Colombiana*, 19:15-24, 1995.

- Queiroz, V. T.; Sousa, C. S.; Costa, M. R.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:237-238, 2004.
- Ragagnin, V. A.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Alzate-Marin, A. L.; Carneiro, J. E. S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. Plant Breeding, 28:156-163, 2009.
- Ramvalho, M. A. P.; Santos, J. B.; Pinto, C. A. B. P. Alelismo múltiplo. In: Genética na agropecuária, Lavras: Ed. UFLA, 2008. p.159-176.
- Rava, C. A. Influência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha-angular em feijoeiro comum. Summa Phytopathologica, 28:65-69, 2002.
- Sanglard, D. A.; Souza, T. L. P. O.; Sousa, C. S.; Ragagnin, V. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Molecular marker assisted backcrossing for developing lines with cv. Pérola genetic background, resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 48:84-85, 2005.
- Sanglard, D. A.; Damasceno, J. D.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Introgression of angular leaf spot resistance genes in common bean isolines. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 50:101-102, 2007.
- Sanglard, D. A.; Ribeiro, C. A. G.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Reaction of common bean cultivars and elite lines to isolates of *Pseudocercospora griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:64-65, 2009a.
- Sanglard, D. A.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *Pseudocercospora griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:62-63, 2009b.
- Sartorato, A. & Rava, C. A. Mancha-angular. In: Sartorato, A. & Rava, C. A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.41-68.
- Sartorato, A.; Nietsche, S.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. Fitopatologia Brasileira, 25:637-642, 2000.

- Sartorato, A. & Alzate-Marin, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:235-237, 2004.
- Sartorato, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. Fitopatologia Brasileira, 31:92-194, 2006.
- Servin, B.; Martin, O. C.; Mézard, M.; Hospital, F. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. Genetics, 168:513-523, 2004.
- Souza, T. L. P. O.; Dessaune, S. N.; Sanglard, D. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro (*Ur-ON*) does not correspond to *Ur-³⁺*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 50:119-120, 2007.
- Souza, T. L. P. O.; Alzate-Marin, A. L.; Faleiro, F. G.; Barros, E. G. Pathosystem common bean-*Uromyces appendiculatus*: host resistance, pathogen specialization, and breeding for rust resistance. Pest Technology, 2:56-69, 2008.
- Schwartz, H. F. Rust Bean. In: Brink, M. A.; Nuland, D. S.; Franc, G. D. (Eds.). Dry Bean Production and Pest Management. Fort Collins: Cooperative Extension Resources Center, 1996. 106p.
- Van der Plank, J. E. Disease resistance in plants. New York: Academic Press, 1984. 194p.
- Young, R.A. & Kelly, J. D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. Plant Disease, 80:650-654, 1996.

CAPÍTULO 4

Reação de cultivares e linhagens elite de feijão comum a isolados de *Pseudocercospora griseola* coletados no estado de Minas Gerais

Resumo: Vinte e cinco genótipos, incluindo cultivares e linhagens do Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram avaliados quanto à reação a 24 isolados do fungo *Pseudocercospora griseola*, agente incitador da mancha-angular do feijoeiro. Estes genótipos foram inoculados 15 dias após o plantio com uma suspensão contendo $2,0 \times 10^4$ conídios mL⁻¹. Os sintomas foram avaliados aos 15, 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando uma escala de nove graus. Foram inoculadas 12 plantas de cada genótipo na densidade de quatro plantas por vaso. Médias com notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes; entre 3 e 6, com resistência intermediária; e entre 6 e 9, suscetíveis. Os genótipos ‘Ouro Negro’, ‘Diamante Negro’ e ‘BRSMG Majestoso’ apresentaram reação de resistência a 17, 15 e 17 dos isolados testados, respectivamente. Com exceção dos três genótipos acima citados, os andinos foram os que apresentaram maiores níveis de resistência, apresentando médias de severidade da doença notadamente inferiores em relação aos demais genótipos.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* – *Pseudocercospora griseola* – resistência à mancha-angular – fontes de resistência – co-evolução.

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores que limitam a produtividade e o desempenho do feijoeiro são as enfermidades. Entre as doenças de maior importância no território nacional, merece destaque a mancha-angular incitada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. Como fonte primária de inóculo do patógeno inclui-se sementes contaminadas e restos de plantas infectadas. Em ambos os casos, os conídios produzidos são disseminados para as folhas pela ação do vento, respingos de chuva, ou ambos (Pria et al., 1999).

A penetração do fungo se dá pelos estômatos das folhas e à medida que ocorre a colonização, o micélio do fungo se estende do parênquima esponjoso às células paliçádicas e posteriormente às células da epiderme superior. O desenvolvimento intracelular do fungo nos tecidos necrosados se dá a partir do nono dia, ficando seu crescimento restrito aos feixes vasculares, dando a forma angular às lesões. Com o progresso da infecção, pode ocorrer a união de várias lesões numa mesma folha, o que causa necrose parcial, amarelecimento das folhas e por fim, sua queda prematura. Nas folhas primárias, as lesões, de coloração castanho-acinzentada, não possuem formato bem característico, geralmente com formato circular. Nas vagens, as manchas têm tamanho e conformação variáveis, mas são geralmente circulares ou ovais, de cor castanho-avermelhadas podendo apresentar bordas com coloração mais escura. Vagens infectadas apresentam sementes pouco desenvolvidas ou totalmente enrugadas (Barros et al., 1957). No caule e nos pecíolos as lesões são pardo-avermelhadas e alongadas (Vieira, 1988; 1994; Paula Júnior & Zambolim, 1998).

Esta doença foi considerada de pequena importância no passado, pois aparecia no final do 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” nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, podendo causar redução de até 70% na produção (Sartorato, 2001). O aparecimento precoce da doença pode ser devido a: (i)

plantio da cultura em novas épocas, especialmente outono-inverno-primavera, quando as temperaturas são favoráveis, havendo a cultura ou restos de cultura contaminados no campo durante todo o ano; (ii) plantio irrigado com pivô-centrais, que propicia condição de alta umidade, favorável à doença; (iii) utilização de sementes contaminadas, introduzindo o patógeno em novas regiões; (iv) utilização de cultivares com base genética de resistência à doença muito restrita; (v) possíveis alterações no quadro das raças do patógeno ao longo dos anos (Paula Júnior & Zambolim, 1998). Acredita-se que o plantio de materiais suscetíveis aliado a um ambiente favorável tenha proporcionado condições ideais à sua evolução (Pria et al., 1999).

Dentre as diversas estratégias que podem ser empregadas no controle da doença, a utilização de cultivares comerciais com adequado nível de resistência proporciona uma proteção adicional, dentro de um sistema de manejo integrado (Sartorato, 1989; Guzmán et al., 1995; Sartorato et al., 1996; Sartorato, 2001).

Diversos estudos têm sido realizados visando conhecer a variabilidade genética de *P. griseola* por meio da série de genótipos diferenciadoras (Pastor-Corrales & Jara, 1995; Nietzsche et al., 2001; Sartorato & Alzate-Marin, 2004; Oliveira et al., 2004; Sartorato, 2005; 2006; 2007; Stenglein & Balatti, 2007; Damasceno-Silva et al., 2008). No estado de Minas Gerais, pode-se destacar o recente trabalho realizado por Balbi et al. (2009). Estes pesquisadores coletaram folhas de feijoeiro apresentando sintomas de mancha-angular em 33 áreas de cultivo, distribuídas em nove cidades. Foram amostradas oito localidades no município de Paracatu; sete em Lagoa Formosa; cinco em São Miguel do Anta; quatro em Canaã; três em Coimbra; duas nos municípios de Manhumirim, Unaí e Viçosa e uma em Alto Jequitibá. No total, foram obtidos 78 isolados monospóricos de *P. griseola*. Destes, foram caracterizados 31 isolados classificados em 15 raças distintos, o que indicou uma grande variabilidade patogênica.

O constante monitoramento do quadro de raças prevalecentes em cada região, juntamente com a caracterização da resistência/suscetibilidade dos

cultivares e linhagens elite de feijoeiro, desenvolvidos pelos programas de melhoramento, são fundamentais para que as recomendações venham a ter sucesso. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a reação de diversos cultivares e linhagens elite de feijoeiro aos isolados de *P. griseola* obtidos por Balbi et al. (2009).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O grupo de genótipos avaliados quanto a resistência/susceptibilidade à mancha-angular reuniu importantes cultivares dos grupos “carioca”, “preto” e “vermelho”. Além destes, foram avaliados materiais de grãos tipo “jalo” e resultantes do Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV (Tabela 1).

Tabela 1. Cultivares e linhagens elite de feijão comum avaliados quanto à reação a isolados de *P. griseola*

Genótipos	Conjunto gênico	Tipo de grão	Linhagem/Cultivar
BJ-1	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-2	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-3	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-4	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-5	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-6	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-7	Andino	Jalo	Linhagem
BJ-8	Andino	Jalo	Linhagem
Jalo EEP 558	Andino	Jalo	Cultivar
Jalo MG 65	Andino	Jalo	Cultivar
CAL 143	Andino	Jalo	Cultivar
Rudá	Mesoamericano	Carioca	Cultivar
Rudá R*	Mesoamericano	Carioca	Linhagem
Pérola	Mesoamericano	Carioca	Cultivar
Pérola R*	Mesoamericano	Carioca	Linhagem
BRSMG Talismã	Mesoamericano	Carioca	Cultivar
VC-6	Mesoamericano	Carioca	Linhagem
BRSMG Madrepérola	Mesoamericano	Carioca	Cultivar
BRSMG Majestoso	Mesoamericano	Carioca	Cultivar
Diamante Negro	Mesoamericano	Preto	Cultivar
Ouro Negro	Mesoamericano	Preto	Cultivar
Meia Noite	Mesoamericano	Preto	Cultivar
Valente	Mesoamericano	Preto	Cultivar
Ouro Vermelho	Mesoamericano	Vermelho	Cultivar
Vermelhinho	Mesoamericano	Vermelho	Cultivar

*Linhagens obtidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro desenvolvido na UFV.

2.2. Raças

Foram utilizados isolados reconhecidamente virulentos e de elevada agressividade pertencentes à Micoteca do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, localizado na UFV (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *P. griseola* pertencentes à Micoteca do BIOAGRO/UFV

Isolado	Fenótipos de Virulência das Genótipos ¹												Raça	Local de coleta
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
A ₁ 13	a	b	c	d			g	h	i				15.7	Lagoa Formosa
A ₂ 4	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63.7	Lagoa Formosa
A ₂ 12	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Lagoa Formosa
B ₁ 46	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Paracatu
B ₃ 8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63.47	Paracatu
B ₄ 4	a	b	c	d		f	g	h	i			l	47.39	Paracatu
B ₄ 6	a	b	c	d	e				I				31.4	Paracatu
B ₇ 50	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Paracatu
C ₁ 1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Unaí
C ₁ 17	a	b					g	h	i		k		3.23	Unaí
C ₁ 28	a	b	c	d	e	f		h	i				63.6	Unaí
C ₂ 10	a	b	c		e		g	h	i		k		23.23	Unaí
CM ₁ 2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Canaã
CM ₃ 11	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63.31	Canaã
Cb20	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63.7	Coimbra
Cb21	a	b	c	d	e		g	h	i				31.7	Coimbra
SM ₂ 11	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	SMA
SM20	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	SMA
SM28	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	SMA
SM32	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	SMA
Vic3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Viçosa
Vic7	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Viçosa
Ma14	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63.23	Manhumirim
AJ12	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63.63	Alto Jequitibá

¹A: Don Timóteo, B: G 11796, C: Bolón Bayo, D: Montcalm, E: Amendoim, F: G 5686, G: PAN 72, H: G 2858, I: Flor de Mayo, J: México 54, K: BAT 332 e L: Cornell 49-242. As letras minúsculas indicam suscetibilidade do genótipo. SMA: São Miguel do Anta. Fonte: Balbi et al. (2009).

2.3. Avaliação da reação a *Pseudocercospora griseola*

Sementes de cada genótipo foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg da formulação 4-14-8 por m³ de substrato. Os vasos contendo plantas de cada genótipo foram mantidos em casa de vegetação até o momento da inoculação. Os inóculos de cada isolado foram obtidos pela multiplicação do fungo em placas de Petri contendo uma mistura de água destilada, molho de tomate, ágar e carbonato de cálcio (CaCO₃) (Sanglard et al., 2009). As placas foram incubadas por 10 dias a 24°C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. As inoculações foram realizadas 15 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo $2,0 \times 10^4$ conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies da primeira folha trifoliolada, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n° 15 acionado por um compressor elétrico. Após as inoculações, as plantas foram transferidas para uma câmara de nevoeiro (20 ± 1°C e >95% de umidade relativa), onde permaneceram por 48 h, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram transferidas para uma casa de vegetação (20 ± 5°C), onde permaneceram até serem avaliadas. A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 15, 18 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por Pastor-Corrales & Jara (1995). Foram inoculadas 12 plantas de cada genótipo na densidade de quatro plantas por vaso. Plantas com notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes; entre 3 e 6, com resistência intermediária; entre 6 e 9, suscetíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos confirmam a grande dificuldade encontrada na identificação de genótipos com resistência ampla à mancha-angular. Dos 14 genótipos mesoamericanos testados, oito foram suscetíveis a pelo menos 12 isolados (Tabela 3). Entretanto, os genótipos ‘Ouro Negro’, ‘Diamante Negro’ e ‘BRSMG Majestoso’ foram resistentes a 17, 15 e 17, dos 24 isolados testados, respectivamente. Além disso, também foram os que apresentaram médias de severidade notadamente inferiores.

O cultivar ‘Ouro Negro’ possui tegumento preto, alta produtividade e boas qualidades culinárias. Este foi introduzido no Brasil como Honduras 35 e recomendado em 1991 (Araújo et al., 1991). ‘Ouro Negro’ apresenta também resistência a 13 raças de *Uromyces appendiculatus* coletadas no Estado de Minas Gerais (Faleiro et al., 1999). Alzate-Marin et al. (2004) relataram que o cultivar ‘Ouro Negro’ foi testado com 24 dos 94 isolados de *U. appendiculatus* mantidos pelo USDA (*Beltsville United States Department of Agriculture*), mostrando reação de resistência a 22 raças, resistência intermediária a uma raça, e suscetibilidade somente à raça 108. O cultivar Ouro Negro possui também boa capacidade de combinação em cruzamentos com cultivares do tipo “carioca” (Faleiro et al., 2002). Além disso, possui um gene de resistência à antracnose designado *Co-10* (Alzate-Marin et al., 2003). Por meio da técnica de inoculações sequenciais com raças de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Uromyces appendiculatus*, demonstrou-se que os genes de resistência a estes patógenos estão ligados a uma distância de 12,3 cM (Faleiro et al., 2000). Tais características justificam seu freqüente uso em programas de melhoramento. Sartorato (2006) avaliou a reação de 28 genótipos de feijoeiro quanto à resistência a oito raças de *P. griseola*, sendo que ‘Ouro Negro’ destacou-se como o de maior grau de resistência, o que está de acordo com a tendência observada neste trabalho.

Tabela 3. Reação de 25 genótipos de feijão comum a 24 isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais

Genótipos	Raças (isolados) de <i>P. griseola</i>																							
	15.7 (A ₁ 13)	63.7 (A ₂ 4)	63.63 (A ₂ 12)	63.63 (B ₁ 46)	63.47 (B ₃ 8)	47.39 (B ₄ 4)	31.4 (B ₄ 6)	63.63 (B ₅ 50)	63.63 (C ₁ 1)	3.23 (C ₁ 17)	63.6 (C ₁ 28)	23.23 (C ₂ 10)	63.63 (C _M 1,2)	63.31 (C _M 11)	63.7 (C _B 20)	31.7 (C _B 21)	63.63 (C _M 1,1)	63.63 (C _M 20)	63.63 (C _M 28)	63.23 (C _M 32)	63.23 (V _{ic} 3)	63.63 (V _{ic} 7)	63.23 (Ma14)	63.63 (A ₁ 12)
BJ-1	3,4	5,8	5,5	5,0	4,0	6,6	2,5	5,3	4,8	6,0	6,0	7,2	2,6	3,2	4,2	3,0	4,6	7,7	3,1	4,0	2,5	5,2	3,8	4,2
BJ-2	2,5	7,3	5,9	5,6	2,8	4,0	3,8	5,4	6,1	5,0	3,5	4,1	4,0	3,5	5,2	4,9	6,2	5,5	2,5	1,4	7,9	5,0	4,6	3,6
BJ-3	6,0	2,5	3,6	3,4	7,1	5,5	4,0	5,0	3,2	2,1	3,1	6,0	4,6	5,5	4,1	5,9	7,2	7,1	1,7	3,7	3,7	4,0	5,8	7,0
BJ-4	3,7	3,8	4,9	6,7	5,4	3,5	1,9	4,1	1,9	3,8	3,4	5,5	7,4	3,0	7,6	4,0	4,0	3,6	2,6	7,0	5,6	3,8	6,0	4,2
BJ-5	5,5	6,1	6,0	3,5	3,1	7,9	3,9	3,1	4,0	3,0	1,7	5,1	3,3	4,7	5,1	3,8	4,2	3,6	2,6	1,1	4,0	3,1	6,2	3,1
BJ-6	3,1	5,0	6,0	7,0	4,8	5,5	7,2	5,0	7,1	2,2	3,4	3,1	4,6	1,9	6,0	5,5	3,5	8,6	4,2	5,0	4,3	6,0	2,7	3,5
BJ-7	4,2	4,5	4,2	3,8	8,5	4,7	3,3	5,6	4,5	4,3	3,7	5,2	4,2	2,9	7,1	3,1	4,4	3,6	1,6	4,5	4,3	3,5	5,1	1,5
BJ-8	3,0	7,0	3,9	4,4	2,0	4,6	2,9	5,7	3,3	8,0	3,8	2,5	3,6	3,1	4,5	5,5	8,4	4,5	2,4	4,1	8,0	3,5	4,9	5,1
Jalo EEP 558	1,5	4,5	4,1	2,8	5,0	7,5	3,0	2,5	6,6	4,7	2,1	3,8	2,0	5,4	6,1	3,2	7,5	5,8	5,5	4,9	3,0	6,0	3,8	3,4
Jalo MG 65	3,5	5,4	5,3	5,0	6,5	3,0	2,2	6,0	5,0	4,5	3,9	3,7	5,2	6,1	2,0	3,4	7,0	6,6	3,5	2,2	6,3	4,1	5,0	3,5
CAL 143	4,3	2,5	5,5	3,3	4,0	4,0	7,0	5,9	4,1	2,3	4,5	1,2	4,6	3,9	4,0	6,0	3,6	4,3	2,3	3,7	4,0	1,1	7,7	2,8
Rudá	8,0	9,0	7,2	7,9	8,3	7,5	8,2	5,6	8,6	7,5	6,7	7,8	8,0	5,0	6,4	8,9	6,0	8,8	5,5	7,5	8,1	8,9	6,6	9,0
Rudá R	8,6	7,0	6,9	7,2	8,3	8,7	7,2	6,5	7,7	7,1	8,2	6,9	8,0	7,5	6,8	4,8	7,8	8,6	7,4	7,6	8,7	4,6	7,0	6,8
Pérola	4,2	4,0	6,4	4,4	3,6	4,3	6,2	5,3	2,9	3,1	7,0	5,3	5,4	6,2	4,2	3,2	3,6	2,5	6,6	7,9	6,2	1,1	4,4	5,0
Pérola R	6,0	6,6	5,0	5,7	5,3	7,8	4,1	5,1	6,7	4,0	4,5	6,3	2,6	5,3	5,0	7,0	7,6	5,0	5,8	3,0	8,6	7,1	1,7	5,9
BRSMG Talismã	3,5	3,9	3,7	7,0	2,9	1,7	4,2	3,0	5,5	3,0	2,8	6,1	4,4	7,7	2,7	4,3	3,5	3,3	5,2	1,5	7,1	7,3	2,9	8,8
VC-6	2,8	7,5	8,2	2,2	6,4	8,0	6,7	4,9	3,1	6,8	7,2	6,1	4,1	7,0	3,9	8,0	8,0	4,3	7,0	1,4	6,0	5,1	2,0	5,0
BRSMG Madrepérola	3,0	4,2	7,6	8,0	8,9	2,2	3,5	6,1	6,5	4,2	7,0	8,2	3,0	7,6	2,6	3,4	8,7	4,7	6,4	3,5	7,1	7,2	1,1	8,0
BRSMG Majestoso	1,9	1,2	4,0	1,2	1,8	6,2	2,9	1,0	1,7	2,0	3,1	1,1	2,0	3,5	1,7	1,1	1,2	1,2	1,8	6,5	3,2	1,9	2,4	7,0
Diamante Negro	3,4	6,9	2,5	1,5	4,0	1,2	1,9	2,7	4,0	2,2	2,1	3,0	4,3	2,1	6,0	2,0	1,1	2,8	6,5	5,0	6,7	3,5	2,0	1,1
Ouro Negro	1,9	1,4	2,5	3,5	2,5	2,7	5,5	1,2	2,7	6,8	1,3	2,9	2,5	3,4	1,2	4,4	1,8	3,0	2,0	6,1	1,7	2,6	3,0	6,6
Meia Noite	7,9	6,4	8,6	7,2	4,2	9,0	8,2	6,0	6,7	2,8	2,0	8,5	5,5	5,9	3,1	7,6	7,8	7,5	5,8	8,0	7,7	5,0	4,7	6,0
Valente	6,5	4,1	8,0	1,5	7,2	7,5	3,0	6,2	2,9	7,3	8,0	3,3	4,1	6,6	5,0	1,2	5,3	5,5	7,3	6,0	4,4	7,1	5,4	7,7
Ouro Vermelho	9,0	8,7	7,0	4,6	9,0	8,2	7,6	8,7	7,0	9,0	8,6	9,0	9,0	7,7	6,6	5,0	7,2	8,2	5,6	9,0	8,6	2,9	7,0	7,3
Vermelhinho	8,2	8,4	7,9	8,2	6,7	7,6	9,0	7,7	8,6	9,0	4,4	2,8	7,7	8,1	9,0	9,0	9,0	8,8	7,1	8,5	8,4	6,4	6,0	8,2

Médias de severidade calculadas pela avaliação de 12 plantas de cada genótipo; verde: resistência; amarelo: resistência intermediária; vermelho: suscetibilidade.

O cultivar ‘Diamante Negro’ também pertence ao grupo comercial “preto”, sendo originário de cruzamentos realizados no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, e selecionado pela Embrapa Arroz e Feijão. Possui um alto potencial de produtividade, podendo chegar a 3.500 Kg/ha. Além de ser produtivo, também possui resistência ao cretamento bacteriano e mosaico comum (Embrapa, 2009).

O cultivar ‘BRSMG Majestoso’, pertencente ao grupo “carioca”, originou-se do cruzamento entre ‘Ouro Negro’ e ‘Pérola’. Desse experimento, uma das linhagens selecionadas foi a ‘OP-NS-331’ que, após ter participado de 43 ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), no período de 2002 a 2004, se destacou em produtividade, tipo de grão e resistência a patógenos; sendo recomendado para o Estado de Minas Gerais. Este cultivar, sob inoculação artificial, foi resistente a quatro raças do fungo incitador da antracnose (*C. lindemuthianum*): 55, 89, 95 e 453. Nos ensaios a campo, apresentou reação intermediária ao fungo *P. griseola*, e resistência ao vírus do mosaico comum (Abreu et al., 2007).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV, foram desenvolvidas isolinhas com grãos do tipo “carioca” contendo os genes: *Ur-ON* e *Co-10*, que conferem resistência à ferrugem e à antracnose, respectivamente, provenientes de Ouro Negro; *Co-4* e *Co-6*, que conferem resistência à antracnose, provenientes de ‘TO’ e ‘AB 136’; *Phg-1*, que confere resistência à mancha-angular, proveniente de ‘AND 277’. Ragagnin et al., (2009) inter cruzaram estes materiais concentrando os genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1* nas linhagens denominadas de ‘Rudá R’ e ‘Pérola R’, as quais foram também testadas neste trabalho. Nos ensaios conduzidos na Estação Experimental da UFV em Coimbra-MG, foi observado que as duas linhagens não obtiveram, em condições de campo, desempenho satisfatório para a resistência à *P. griseola*. Possíveis razões para isso seriam a grande variabilidade do patógeno, a ineficácia de um único gene de resistência (*Phg-1*) incorporado nessas linhagens, e o surgimento de novas raças ainda não caracterizadas. No presente trabalho, ‘Pérola R’ e ‘Rudá R’ foram

suscetíveis a oito e 22 isolados, respectivamente, dentre os 24 testados (Tabela 3). Além disso, essas linhagens juntamente com os cultivares de grãos vermelhos (‘Ouro Vermelho’ e ‘Vermelhinho’) alcançaram as maiores médias de severidade. Para contornar estes problemas, seria importante a introgressão de novos genes advindos de materiais que possuam resistência vertical completa e/ou do tipo oligogênica; e que estes sejam estrategicamente inter cruzados, de modo a aumentar o espectro da resistência.

Quando interações entre dois ou mais organismos produzem respostas evolutivas em cada um deles, ocorre um processo denominado de co-evolução. As forças evolutivas atuam no processo de co-evolução, gerando variabilidade nas espécies envolvidas. Por meio de mutações, surgem novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados graças à recombinação genética. Estes podem ser dispersos no momento em que ocorrem migrações de indivíduos de um local a outro. Neste processo, os indivíduos de uma das espécies envolvidas na interação co-evolutiva atuam exercendo pressão de seleção sobre os da outra espécie, e vice-versa (Barbieri, 2003). O patossistema *Phaseolus vulgaris*/*Pseudocercospora griseola* é um exemplo.

Vários pesquisadores descreveram a variabilidade entre isolados de *P. griseola* de diferentes áreas ao redor do mundo. Brock (1951), ao estudar a resistência de genótipos de feijão (‘Brown Beauty’, ‘Stringless Black Calentine’, ‘Pinto’ e ‘Red Mexican’) à mancha-angular, observou que 13 isolados australianos apresentaram diferentes padrões de virulência. Embora tais resultados tenham sido questionados, pois não foram utilizadas culturas monospóricas, foi ressaltada pioneiramente a ocorrência de variabilidade entre os isolados, alertando para o perigo de utilização de apenas um cultivar em um dado campo de produção.

Após isso, trabalhos importantes foram realizados por Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales & Jara (1995) acerca da diversidade genética de *P. griseola* e de sua co-evolução com o feijoeiro na América Latina. Os resultados confirmaram a separação dos fenótipos de virulência em dois grupos: o primeiro, denominado andino, que apresenta reação de

compatibilidade preferencialmente com genótipos de origem andina e, o segundo, denominado mesoamericano, que apresenta reação de compatibilidade tanto com genótipos de origem andina, quanto com os de origem mesoamericana. Os resultados indicaram ainda, que os isolados andinos de *P. griseola* tiveram evolução paralela com genótipos de feijão de origem andina; enquanto os isolados mesoamericanos tiveram evolução concomitante com genótipos de origem mesoamericana e andina. Neste trabalho, todos os isolados apresentaram fenótipos de virulência tipicamente do acervo mesoamericano, uma vez que foram capazes de incitar doença em genótipos do conjunto gênico mesoamericano e andino (Balbi et al., 2009).

Orozco & Araya (2005) ainda demonstraram que, em locais onde são cultivados exclusivamente feijões do tipo mesoamericano, ocorre uma pressão de seleção sobre as populações de *P. griseola* prevalecentes, que conduz ao incremento de raças correspondentes ao acervo genético do hospedeiro, como ocorre no Brasil. Este mesmo processo ocorre nas regiões de cultivo exclusivo de feijão do *pool* gênico andino, prevalecendo raças andinas de *P. griseola*.

Esse tipo de comportamento confirma que, em Minas Gerais, há predominância de raças do grupo mesoamericano, como ocorre no restante do país (Nietsche et al., 2000). Isso se deve, ao fato de que, no Brasil, a maioria dos cultivares plantados pertencem ao conjunto gênico mesoamericano. Conseqüentemente, a pressão de seleção favoreceu raças de origem mesoamericana, as quais são mais adaptadas aos genótipos mesoamericanos, apesar de incitarem doença nos dois grupos.

Esta característica foi também claramente observada neste trabalho, pois as linhagens andinas ‘BJs’ (‘BJ-1’ a ‘BJ-8’) e os cultivares ‘Jalo EEP 558’, ‘Jalo MG 65’ e ‘CAL 143’ manifestaram sintomas amenizados da doença para a maioria dos isolados testados, quando comparados ao grupo de genótipos mesoamericanos (Tabela 3). As linhagens ‘BJs’ são provenientes do Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Lavras (UFLA), as quais foram avaliadas nos ensaios do VCU-Cores ciclo 2004/2005 (Bruzi et al., 2007). Estes feijões amarelos e grandes do grupo “jalo”

apresentaram um elevado percentual de reações de resistência intermediária, ou seja, em 68,18% dos casos, foram obtidas médias que se enquadram nos graus de severidade entre 3 e 6; considerando cada interação genótipo por isolado (Figura 1). Somando os percentuais de resistência e resistência intermediária, obtém-se um total de 85,23%.

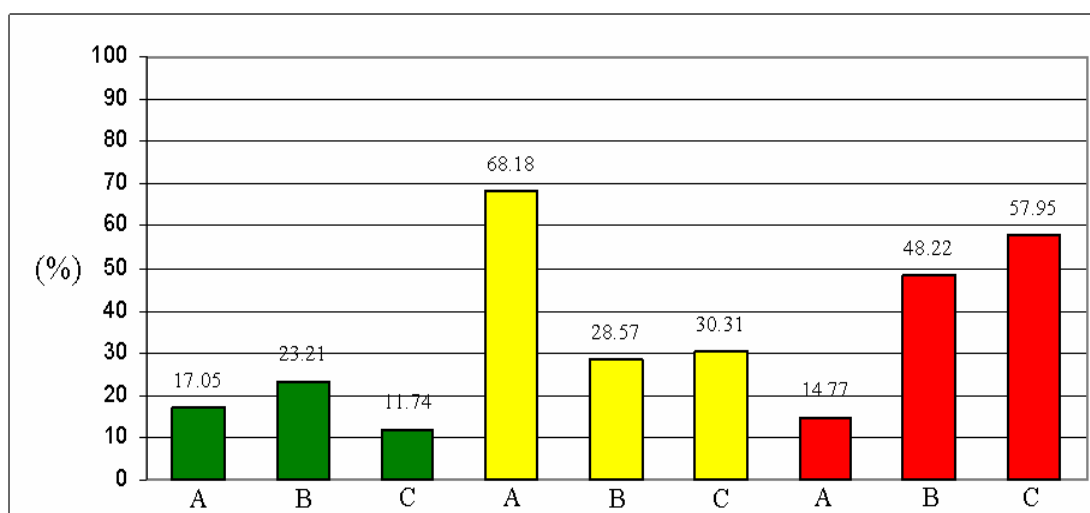


Figura 1. Percentuais de reações de resistência (verde), resistência intermediária (amarelo) e suscetibilidade (vermelho). A: valores obtidos considerando os 11 genótipos de origem andina testados para os 24 isolados de *P. griseola*. B: valores obtidos considerando os 14 genótipos de origem mesoamericana testados para os 24 isolados de *P. griseola*. C: valores obtidos considerando 11 genótipos de origem mesoamericana testados para os 24 isolados de *P. griseola* (exceto 'BRSMG Majestoso', 'Diamante Negro' e 'Ouro Negro').

Por outro lado, considerando-se apenas os genótipos de feijões mesoamericanos, foram obtidos os valores de 23,21%, 28,57% e 48,22% para resistência, resistência intermediária e suscetibilidade, respectivamente (Figura 1). Comparado ao grupo de genótipos andinos, foi observada uma sensível queda no valor da soma de reações de resistência e resistência intermediária, as quais totalizam apenas 51,78% das avaliações. Isto está de acordo com a maior especialização co-evolutiva das raças mesoamericanas em incitar maiores graus de severidade da doença em genótipos de feijão também mesoamericanos.

Desconsiderando o computo das avaliações dos cultivares ‘Ouro Negro’, ‘Diamante Negro’ e ‘BRSMG Majestoso’ para a obtenção dos percentuais referentes aos genótipos mesoamericanos, obtém-se ainda maior suscetibilidade (57,95%) e menor resistência (11,74%) (Figura 1).

Em vista dos dados observados, ou seja, considerando a presença de poucos genótipos com resistência a um grande número de raças, pode-se concluir que apenas a utilização da resistência vertical completa não é a melhor estratégia a ser utilizada no controle desta doença. Dessa forma, sugere-se que sejam também utilizados como fonte de resistência, genótipos que apresentem os mais altos graus de resistência horizontal e parcial. Outra possibilidade relevante para o controle da mancha-angular seria a utilização de cultivares multilinhas (Sartorato, 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho são de relevante importância para programas de melhoramento, pois direcionam os trabalhos de identificação de fontes de resistência.

REFERÊNCIAS

- Abreu, A. B. F.; Ramalho, M. A. P.; Carneiro, J. E. S.; Peloso, M. J.; Paula Jr, T. J.; Farias L. C.; Melo, L. C.; Barros, E. G.; Moreira, M. A.; Pereira Filho, I. A.; Martins, M.; Santos, J. B.; Rava, C. A.; Costa, J. G. C.; Sartorato, A. BRSMG Majestoso: another common bean cultivar of “carioca” grain State of Minas Gerais. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:403-405, 2007.
- Alzate-marin, A. L.; Costa, M. R.; Arruda, K. M. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. *Euphytica*, 133:165-169, 2003.
- Alzate-Marin, A. L., Souza, T. L. P. O.; Ragagnin, V. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. *Journal of Phytopathology*, 152:60-64, 2004.
- Araújo, G. A. A.; Vieira, C., Souza Filho, B. F. ‘Ouro Negro’: Nova genótipo de feijão-preto para os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Viçosa, MG: Epamig, 1991. (Boletim Técnico Nº1).
- Balbi, B. P.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 52:56-57, 2009.
- Barbieri, R. L. Evolução dos Organismos. In: Loreta Brandão de Freitas; Fernanda Bered. (Org.). *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, 277-290.
- Barros, O.; Cardona, R.; Skiles, R. L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. *Phytopathology*, 47(1):3, 1957.
- Brock, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, Collingwood, 3(1):25-30, 1951.
- Bruzi, A. T.; Ramalho, M. A. P.; Abreu. A. F. B. Performance of common bean families from cross between of andean and mesoamerican lines on grain yield and resistance to *Phaeoisariopsis griseola*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 31(3):650-655, 2007.

- Damasceno-Silva, K. J. D.; Souza, E. A.; Sartorato, A.; Freire, C. N. S. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. *Phytopathology*, 156:602-606, 2008.
- Embrapa Arroz e Feijão. Cultivares de feijão: Diamante Negro (1991). Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm>>. Acessado em janeiro de 2009.
- Faleiro, F. G.; Vinhadelli, W. S.; Ragagnin, V. A.; Zambolim, L.; Paula Júnior, T. J.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Identification of physiological races of *Uromyces appendiculatus* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 24:166-169, 1999.
- Faleiro, F. G.; Vinhadelli, W. S.; Ragagnin, V. A.; Corrêa, R. X.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 23:399-402, 2000.
- Faleiro, F. G.; Ragagnin, V. A.; Cruz, C. D.; Bronmonschenkel, S. H.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Selection of common bean lines based on yield, grain type, growth habit and disease resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2:507-514, 2002.
- Guzmán, P.; Gilbertson, R. L.; Nodari, R.; Johnson, W. C.; Temple, S. R.; Mandela, D.; Mkandawire, A. B. C.; Gepts, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*, 85(5):600-607, 1995.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Paula Júnior, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. *Revista Ceres*, 45(273):567-572, 2000.
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G. A.; Paula Júnior, T. J.; Ferreira, C. F.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Euphytica*, 117(1):77-84, 2001.
- Oliveira, E. J.; Alzate-Marin, A. L.; Borém, A.; Melo, C. L. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. *Fitopatologia brasileira*, 29:220-223, 2004.
- Orozco, S.; Araya, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. *Fitopatologia Brasileira*, 30(6):589-593, 2005.

- Pastor-Corrales, M. A. & Jara, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol común em América Latina. Fitopatologia Colombiana, 19(1):15-24, 1995.
- Paula Júnior, T. J. & Zambolim, L. Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas, Viçosa, MG: Editora UFV, 1998, 375-433.
- Pria, M. D.; Silva, O. C.; Costa, J. L. S.; Souza, E. D. T.; Berni, R. F. Diagnose das doenças. In: Canteri, M. G.; Pria, M. D.; Silva, O. C. (Eds.). Principais doenças fúngicas do feijoeiro – Orientações para manejo ecológico, Ponta Grossa, PR: UEPG, 1999, 17-33.
- Ragagnin, V. A.; Souza, T. L. P. O.; Sanglard, D. A.; Arruda, K. M. A.; Costa, M. R.; Alzate-Marin, A. L.; Carneiro, J. E. S.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. Plant Breeding, 28:156-163, 2009.
- Sanglard, D. A.; Balbi, B. P.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *Pseudocercospora griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 52:62-63, 2009.
- Sartorato, A. Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. Piracicaba, SP: ESALQ, 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 1989.
- Sartorato, A.; Rava, C. A.; Rios, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: Araújo, R. S.; Rava, C. A.; Stone, L. F.; Zimmermann, M. J. O. (Coord.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafós, 1996, 669-700.
- Sartorato, A. Resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Resumos, Goiânia:GO, 2001, Resumo 25.
- Sartorato, A. & Alzate-Marin, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 47:235-237, 2004.
- Sartorato, A. Resistance of Andean and Mesoamerican common bean genotypes to *Phaeoisariopsis griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 48:88-89, 2005.
- Sartorato, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. Fitopatologia Brasileira, 31:92-194, 2006.

- Sartorato, A. Common bean genotypes resistant to angular leaf spot, rust and anthracnose. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 50:103-104, 2007.
- Stenglein, S. A. & Balatti, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, 68,(4-6):158-167, 2006.
- Vieira, C. Doenças e Pragas do feijoeiro. Viçosa: Imprensa Universitária, 1988. 231p.
- Vieira, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. In: Informe Agropecuário, 17(178):46-53, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

Capítulo 1: Foram validados os marcadores SAA07_{950a}, SAO12_{950a} e SE04_{640a} como sendo ligados a locos de resistência à mancha-angular do feijoeiro comum. Os marcadores SAA07_{950a} e SAO12_{950a} monitoram o loco de resistência à raça 63.47, presente em ‘BAT 332’, às distâncias de 4,92 cM e 7,02 cM, respectivamente. O SE04_{640a} está ligado a 6,03 cM do loco de resistência à raça 63.39, presente em ‘MAR-2’.

Capítulo 2: Foram obtidas 15 linhagens de feijão “carioca”; com produtividades similares aos cultivares ‘Rudá’ e ‘Pérola’; e resistentes à raças de mancha-angular, antracnose e ferrugem. Também foram obtidas populações segregantes contendo novas combinações de genes de resistência para as três doenças.

Capítulo 3: A partir de testes de alelismo e estudos de herança, foi caracterizado o loco de resistência à mancha-angular presente em ‘Ouro Negro’ como sendo distinto dos genótipos ‘AND 277’, ‘BAT 332’, ‘Cornell 49-242’, ‘México 54’ e ‘MAR-2’. Propõe-se que este receba a denominação *Phg-7*, em concordância com a nomenclatura existente.

Capítulo 4: Os genótipos ‘Ouro Negro’, ‘Diamante Negro’ e ‘BRSMG Majestoso’ apresentaram reação de resistência a 17, 15 e 17; do total de 24 isolados de *P. griseola* testados, respectivamente. Com exceção dos três genótipos de feijão acima citados, os andinos foram os que revelaram maiores níveis de resistência, com médias de severidade da doença notadamente inferiores em relação aos demais genótipos.