

KLEVER MÁRCIO ANTUNES ARRUDA

**MELHORAMENTO DE FEIJÃO DO TIPO CARIOCA COM
ÊNFASE NA PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

T

A779m
2005 Arruda, Klever Márcio Antunes, 1978-
Melhoramento de feijão do tipo carioca com ênfase na
piramidação de genes de resistência à antracnose /
Klever Márcio Antunes Arruda. – Viçosa : UFV, 2005.
ix, 70f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão -
Resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*.
3. Marcadores genéticos. 4. Antracnose. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6522

KLEVER MÁRCIO ANTUNES ARRUDA

**MELHORAMENTO DE FEIJÃO DO TIPO CARIOCA COM
ÊNFASE NA PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2005.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Conselheiro)

Prof. Moacil Alves de Souza

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

*Aos meus pais Sílvio e Filomena.
Aos meus irmãos.
Aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sílvio Arruda Sobrinho e Filomena Antunes Luz, aos quais tenho muita gratidão, respeito e carinho.

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

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação e confiança em mim depositada.

Aos professores conselheiros Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro, pela atenção dispensada e pelas valiosas sugestões.

À Dra. Ana Lília Alzate-Marin, a quem sou muito grato pelos ensinamentos e conselhos, desde o período de Iniciação Científica.

Aos colegas do laboratório: Márcia Costa, Vilmar, Krystyano, Marcelo, Thiago, Carlos, Wagner, Maguida, Telma, Cassiana, Demerson, Jeziel, Edgard, Márcia Flores, Maria Fernanda, Rita, Newton, Francisco, Pedro Ivo, Arlindo, Simone, Taís, Fábio, João Paulo e Reginaldo, pela amizade e agradável convivência.

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

Aos amigos de república, Leonardo David Tuffi Santos e Leonardo Coelho Magalhães, pela convivência harmoniosa.

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

Ao amigo Geraldo Generoso, pela revisão lingüística.

BIOGRAFIA

KLEVER MÁRCIO ANTUNES ARRUDA, filho de Sílvio Arruda Sobrinho e Filomena Antunes Luz, nasceu em Vitória da Conquista, BA, em 10 de dezembro de 1978.

Cursou da 1^a à 8^a série na Escola Estadual Cel. José Venâncio de Souza, Águas Vermelhas, MG.

De 1994 a 1996, cursou o segundo grau profissionalizante na Escola Agrotécnica Federal de Salinas, Salinas, MG, obtendo o título de Técnico em Agropecuária.

Em março 1998, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, colando grau em março de 2003 como Engenheiro-Agrônomo.

Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, na área de Melhoramento de Plantas e Biotecnologia, defendendo tese em fevereiro de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Importância do feijoeiro comum.....	4
3.2. Doenças do feijoeiro.....	5
3.3. Melhoramento genético do feijoeiro.....	7
3.4. Piramidação de genes de resistência a doenças.....	8
3.5. Fontes de resistência.....	9
3.6. Marcadores moleculares aplicado ao melhoramento do feijoeiro.....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1.....	23
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS ELITES DE FEIJÃO DE GRÃO TIPO “CARIOCA” QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE..	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Local de condução dos experimentos.....	26
2.2. Material genético.....	26
2.3. Patótipos.....	27
2.4. Crescimento e inoculação do fungo.....	28
2.5. Avaliação dos sintomas.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4. CONCLUSÕES.....	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 2.....	38
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO CONTENDO OS GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE <i>Co-4²</i> E <i>Co-5</i>	38

1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Material genético.....	40
2.2. Patótipos.....	41
2.3. Crescimento, inoculação do fungo e avaliação da doença.....	41
2.4. Extração de DNA.....	41
2.5. Amplificação de DNA.....	41
2.6. Identificação de <i>primers</i> polimórficos e avaliação de distâncias genéticas.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1. Testes de progênie.....	43
3.2. Determinação da distância genética.....	44
3.3. Caracterização fenotípica.....	46
4. CONCLUSÕES.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 3.....	51
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM UM CULTIVAR DE FEIJÃO DE GRÃO TIPO CARIOCA.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. Local de condução dos experimentos.....	53
2.2. Material genético.....	53
2.3. Obtenção das populações segregantes.....	54
2.4. Seleção por meio de inoculação de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	55
2.4.1. Patótipo de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> utilizado na inoculação.....	55
2.4.2. Crescimento e inoculação do fungo.....	55
2.4.3. Avaliação dos intomas da mancha-angular.....	56
2.5. Seleção por meio de marcadores moleculares.....	56
2.5.1. Extração de DNA.....	57
2.5.2. Análise com RAPD.....	57
2.5.3. Análise com SCAR.....	58
2.6. Seleção por meio de inoculação de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	58
2.6.1. Patótipo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> utilizado na inoculação.....	58
2.6.2. Crescimento e inoculação do fungo e avaliação dos sintomas.....	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1. Obtenção dos híbridos simples.....	61
3.2. Obtenção dos híbridos duplos.....	61
3.3. Obtenção das populações segregantes F ₂	62
3.4. Identificação de plantas F ₂ com o alelo <i>Co-4</i> ²	63
4. CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CONCLUSÕES GERAIS.....	70

RESUMO

ARRUDA, Klever Márcio Antunes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Melhoramento de feijão do tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro

O objetivo geral deste trabalho foi piramidar genes de resistência à antracnose em um cultivar de feijoeiro de grão tipo “carioca”. Em uma primeira etapa, 30 linhagens elite de feijoeiro com grãos tipo “carioca”, desenvolvidas por diversos centros de pesquisa do país, e que têm se destacado em ensaios de competição, foram inoculadas com 18 patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. Os resultados das inoculações mostraram que a grande parte das linhagens é altamente suscetível à maioria dos patótipos avaliados. No entanto, de certa forma, os programas de melhoramento têm evoluído em relação ao desenvolvimento de cultivares de maior espectro de resistência, pois quatro das linhagens apresentaram resistência a todos os patótipos de ocorrência nacional avaliados. Para piramidar os dois principais genes de resistência à antracnose do cultivar G 2333, duas populações derivadas do cruzamento entre Rudá (recorrente) e G 2333 (doador) foram utilizadas. Uma população RC₁F₃ foi selecionada com base no marcador molecular OPAB3_{450C} ligado ao gene *Co-5*, e outra população RC₃F₅ foi selecionada com base no marcador OPAS13_{950C} ligado ao gene *Co-4*². Foram feitos testes de progênie por meio de inoculações com *C. lindemuthianum*; análises moleculares com *primers* RAPD para determinação das distâncias genéticas. Obteve-se 10 famílias homozigotas para o gene *Co-4*² e similares ao genitor recorrente, e sete famílias homozigotas para o gene *Co-5* e com distância genética relativa em relação ao genitor recorrente variando de 40,9 a 27,8%, com todas as famílias, apresentando características de grãos similares às do cultivar Rudá. Estas 17 famílias foram inoculadas com 12 patótipos de *C. lindemuthianum*, sendo 10 de ocorrência freqüente

no território nacional e outros dois de alta virulência, provenientes de outros países. As linhagens portadoras do gene *Co-5* comportaram-se como suscetíveis apenas aos patótipos estrangeiros, enquanto as linhagens portadoras do gene *Co-4*² apresentaram resistência a todos os patótipos, inclusive ao 2047. Com base nos dados de distância genética e espectro de resistência, as linhagens 1-46-7 (*Co-5*) e 19-1-1-7 (*Co-4*²) foram selecionadas para serem utilizadas na etapa final da piramidação. Essas duas linhagens foram cruzadas com a linhagem Rudá “R” portadora dos genes *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*. Plantas F₁ provenientes de cada cruzamento foram inter cruzadas e geraram sementes F₁. Das plantas F₁ obtidas destas sementes, foi extraído DNA para análise com marcadores moleculares estreitamente relacionados aos genes de resistência (SCAR Y20, AB3, AZ20, F10, BA8, H13 e RAPD AS13). Plantas F₁ que apresentaram marcas relacionadas a todos os genes de resistência foram submetidas à autofecundação para gerar sementes F₂. Destas, foram obtidas 505 plantas F₂, das quais o DNA foi extraído para novas análises moleculares. A partir destas análises, foram selecionadas 52 plantas F₂, contendo as sete marcas moleculares. Estas plantas foram autofecundadas, obtendo-se famílias F₃ que foram abertas em teste de progênie com o patótipo 2047, a fim de se diferenciar as plantas que possuem o alelo *Co-4*² das que possuem o alelo *Co-4*. Das 52 famílias abertas no teste de progênie, 18 apresentaram resistência não segregante ao patótipo 2047, o que permite dizer que estas famílias apresentam o alelo *Co-4*² fixado.

ABSTRACT

ARRUDA, Klever Márcio Antunes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Breeding of “carioca-type” common bean with emphasis in the pyramiding of resistance genes to the anthracnose.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and José Eustáquio de Souza Carneiro.

This work aimed to pyramid anthracnose resistance genes in a "carioca-type" common bean line. Initially, 30 elite “carioca-type” common bean lines developed by several research centers in the country, with outstanding performance in official trials, were inoculated with 18 pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum*. The inoculation results showed that most of the lines were highly susceptible to most of the pathotypes. They also showed that the breeding programs have advanced lately in the development of lines with larger resistance spectrum. Four lines were resistant to all the pathotypes tested that occur in Brazil. To pyramid the two main anthracnose resistance genes present in cultivar G 2333, two populations derived from crosses between Rudá (recurrent parent) and G 2333 (donor parent) were used. One population (BC₁F₃) underwent selection based on the presence of RAPD molecular marker OPB03_{450C} linked to the allele *Co-5*. The other population (BC₃F₅) was selected based on the marker OPAS13_{950C} linked to the allele *Co-4*². Progeny tests were performed by inoculations with *C. lindemuthianum*, and molecular analyses were done with RAPD primers for genetic distances determination. Ten homozygous families were obtained for the allele *Co-4*², all genetically similar to the recurrent parent. Seven homozygous families for the allele *Co-5* with relative genetic distance in relation to the recurrent parent varying from 40.9 to 27.8% were also obtained. All the selected families presented “carioca-type” grains like the recurrent parent Rudá. These 17 lines were inoculated with 12 *C. lindemuthianum* pathotypes, 10 of which frequently detected in

several growing regions in Brazil and two highly virulent pathotypes from other countries. The lines bearing the *Co-5* allele were susceptible only to the foreign pathotypes, while the lines bearing the *Co-4²* allele were resistant to all pathotypes, including pathotype 2047. Based on the genetic distance and resistance spectrum data lines 1-46-7 (*Co-5*) and 19-1-1-7 (*Co-4²*) were selected to be used in the final stage of the pyramiding process. These two lines were crossed with the line Rudá "R" bearing the alleles *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* and *Phg-1*. F₁ plants derived from each cross were intercrossed producing F₁ seeds. DNA was extracted from these plants for analyses with molecular markers closely linked to the resistance genes (SCAR Y20, AB3, AZ20, F10, BA8, H13 and RAPD AS13). F₁ plants bearing all the markers were selfed and a total of 505 F₂ plants were obtained. Molecular analyses of these plants revealed that 52 of them contained the seven molecular markers. These plants were selfed, and the resulting F₃ families were inoculated with pathotype 2047, in order to allow the distinction of plants bearing the *Co-4²* allele from the ones with the *Co-4* allele. From 52 F₃ families, 18 did not segregate for resistance to pathotype 2047. This result allows to conclude that these families have fixed the *Co-4²*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o feijoeiro-comum é um produto agrícola de grande importância econômica e social, por ser reconhecidamente uma excelente fonte de proteína, por apresentar grãos ricos em micronutrientes essenciais como o ferro, por ser um constituinte alimentar de baixo custo e por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que utilizam a alta tecnologia.

O feijão tem ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo durante todo o ano, em quase todos os estados do país, possibilitando constante oferta do produto no mercado. Quanto ao consumo, existem preferências de acordo com a região. O feijão preto é consumido principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio de Janeiro. Já nas demais regiões do país, o consumo é quase exclusivo do feijão tipo “carioca”.

Apesar da grande importância que esta cultura representa para o Brasil, o rendimento médio nacional é muito baixo (709 kg/ha), sendo inferior à produtividade média mundial (CONAB, 2004). Contudo, é grande o potencial desta cultura no Brasil, pois, em condições favoráveis, pode chegar a produzir 4000 kg/ha (VIEIRA *et al.*, 1999). Uma das razões que mais influenciam no baixo rendimento da cultura é o grande número de doenças às quais ela está sujeita (VIEIRA, 1983).

Entre as doenças consideradas de maior importância no território nacional, merecem destaque as doenças foliares de origem fúngica como a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*) (VIEIRA, 1983). Estas enfermidades são especialmente problemáticas porque os agentes causais apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas” ou “patótipos”.

Doenças fúngicas podem ser controladas por meio de práticas culturais, emprego de fungicidas, tanto via tratamento de sementes, quanto em pulverizações foliares e também pela resistência genética. Dentre as práticas culturais, podem ser utilizadas sementes livres do patógeno, com o objetivo de evitar a introdução de novos patótipos em áreas nas quais os mesmos inexistem, rotação de culturas e eliminação de restos culturais.

No Brasil, o controle químico tem sido utilizado principalmente pelos grandes produtores, pois esta prática, normalmente é onerosa. Entretanto, a maior parte da produção de feijão no país advém de pequenos e médios produtores que não utilizam este tipo de controle devido ao seu alto custo (SARTORATO, 2001a). O uso de cultivares resistentes é uma prática econômica e eficiente, além de ecologicamente correta (SARTORATO, 2001a). No entanto, a maioria dos cultivares identificados como resistentes a determinados patógenos são, normalmente, cultivares que apresentam características agrônômicas desfavoráveis ao seu cultivo comercial e/ou qualidade tecnológica indesejável para o seu uso na alimentação. Assim, uma das maneiras de contornar esse problema é através da transferência dos genes de resistência, presentes nesses cultivares, para cultivares elites, ou seja, cultivares com boa aceitação comercial e boa produtividade. Esse processo pode ser feito de modo pontual ou por meio da transferência de um conjunto de genes de diversas fontes para o cultivar adaptado. Este último processo, também denominado piramidação, é uma estratégia que vem sendo adotada em alguns programas de melhoramento de plantas autógamas (HITTALMANI *et al.*, 2000; KELLY *et al.*, 1995).

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem se dedicado à piramidação de genes de resistência a doenças do feijoeiro, como a antracnose, a ferrugem e a mancha-angular, com o auxílio de marcadores moleculares. Inicialmente, o programa priorizou a caracterização de genes de resistência e a identificação de marcadores moleculares estreitamente ligados a esses genes. Com o auxílio desses marcadores, por meio do método dos retrocruzamentos, várias linhagens de feijoeiro foram desenvolvidas, principalmente no *background* genético do cultivar “Rudá”. Atualmente essas linhagens têm sido intercruzadas, a fim de se obter um cultivar que possua um grande número de genes de resistência para essas doenças.

2. OBJETIVOS

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

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar fenotipicamente 30 linhagens elites de feijoeiro de grãos tipo “carioca”, desenvolvidas por diversos centros de pesquisa nacionais, por inoculação de vários patótipos de *C. lindemuthianum* coletados em diferentes regiões produtoras de feijão do Brasil e do mundo;
- Obter linhagens de grãos tipo carioca que contenham os genes de resistência à antracnose *Co-5* e *Co-4²* presentes no genitor doador G 2333, e que sejam geneticamente mais próximas do genitor recorrente Rudá;
- Realizar cruzamentos entre uma isolinha do cultivar Rudá, que já possui piramidados cinco genes de resistência, sendo um para a ferrugem (*Ur-ON*), um para a mancha-angular (*Phg-1*) e outros três para antracnose (*Co-4*, *Co-10* e *Co-6*), com duas linhagens do Rudá que possuem isoladamente dois genes de resistência à antracnose (*Co-4²* e *Co-5*);
- Selecionar as plantas que possuírem marcas moleculares associadas aos genes *Ur-ON*, *Phg-1*, *Co-4²*, *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância do feijoeiro comum

O feijão constitui um dos poucos alimentos ricos tanto em carboidratos (60%) como em proteínas (20 a 30%); além disso, contém lipídios e sais minerais. A alta concentração desses componentes deve-se principalmente ao baixo conteúdo de água das sementes (10 a 15%) (VIEIRA *et al.*, 1998).

Atualmente, percebe-se a tendência de aumento do consumo do feijão, até mesmo em países onde, até então, seu uso ocorria em níveis baixíssimos. Isso se deve as suas propriedades recentemente descobertas. Observa-se que o feijão vem ganhando expressão, não só como alimento protéico, mas também, em razão dos conhecimentos mais recentes de suas qualidades terapêuticas, dentre as quais citam-se a sua capacidade de diminuir os níveis de colesterol sanguíneo (CHIARADIA e GOMES, 1997).

Quanto ao tipo, o feijão carioca domina o mercado brasileiro, mas há nichos de mercados para outros tipos de feijões. Pode-se dizer ainda que os consumidores de renda mais alta têm claramente suas preferências por outros tipos de feijão, criando um mercado para feijões com qualidades especiais, como por exemplo, com maior teor de fibra, ou mesmo para produtos industrializados (YOKOYAMA, 2002).

O Brasil é o segundo produtor mundial de feijão do gênero *Phaseolus*, e o primeiro da espécie *Phaseolus vulgaris*. A alta produção nacional é de suma importância pois o feijão, além de constituir um dos alimentos básicos da população brasileira, é um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos (EMBRAPA, 2004). A expectativa da produção de feijão-comum, no Brasil, para a safra 2004/2005 é de 3,061 milhões de toneladas, em uma área de 4,152 milhões de hectares (CONAB, 2004). Com certa tendência de crescimento, o consumo *per capita* de feijão no país é de 17,2

kg/habitante/ano, garantindo ao Brasil a posição de maior consumidor mundial de feijão (FAO, 2003).

Considerando a diversidade fisiográfica do país e a adaptação do feijoeiro às diversas condições de clima e solo, torna-se possível a exploração desta cultura em três épocas diferentes, no mesmo ano. A safra "das águas", cujo plantio é feito de agosto a novembro, com predominância na Região Sul; o plantio "da seca", realizado de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores; e a safra "de inverno", de abril a julho, realizada nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste (EMBRAPA, 2004). Embora esses períodos possam apresentar variações de ano a ano, pode-se identificar que há colheita praticamente o ano todo, e existe sobreposição de épocas em algumas regiões (FERREIRA, *et al.*, 2002).

Apesar da forte concorrência de produtos mais voltados para o mercado externo, o feijão continua numa posição de destaque no agronegócio brasileiro, pois, no período de 1990 a 2002, respondeu por 5,2% da renda agrícola total, sendo o oitavo produto em renda, ficando atrás da soja (17,1%), milho (13,9%), cana-de-açúcar (13,5%), café (8,1%), laranja (7,4%), banana (7,08%) e arroz (7,05%) (FERREIRA *et al.*, 2002).

3.2. Doenças do feijoeiro

O feijoeiro é uma cultura sujeita ao ataque de várias doenças, sendo esta uma das principais causas da sua baixa produtividade em território brasileiro. VIEIRA (1983) cita mais de 45 doenças, de maior ou menor importância, causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Em geral, as doenças mais importantes no Brasil são a antracnose, a mancha-angular, a ferrugem, o mofo-branco, o mosaico-dourado e o crestamento-bacteriano-comum. As demais, apesar da menor importância, podem causar danos severos em condições específicas (VIEIRA, 1983).

A antracnose, a ferrugem e a mancha angular, merecem destaque porque os fungos causadores destas doenças apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, o que dificulta os trabalhos dos programas de melhoramento que buscam o desenvolvimento de cultivares resistentes.

São vários os relatos, na literatura, de trabalhos relacionados à diversidade genética desses patógenos. MORA (1986) identificou 53 patótipos de ferrugem a partir de 80 isolados monopustulares coletados em oito estados brasileiros (SC, PR, SP, RJ, MG, ES, GO e PE) e apenas quatro desses patótipos foram encontradas em mais de um estado. FALEIRO *et al.* (1999) identificaram 13 patótipos a partir de 15 isolados

coletados em diferentes municípios de Minas Gerais e demonstraram a existência de patótipos diferentes em uma mesma folha, confirmando a alta variabilidade genética do patógeno por meio de marcadores moleculares.

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, era considerada de pequena importância no passado, pois aparecia no final de ciclo da cultura. Entretanto, hoje é considerada de grande importância, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou safrinha nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SARTORATO, 2001b), podendo causar redução de até 70% na produção. Esta doença causa sérios prejuízos, especialmente de abril a julho, quando são observadas baixas temperaturas e ocorrências de orvalho (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). Pensava-se que o número de patótipos de *P. griseola* fosse baixo (ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ, 1979). Entretanto, estudos recentes apontam para um número elevado. Foram identificados 13 patótipos de *P. griseola* a partir de isolados coletados no estado de Minas Gerais (NIETSCHE, 1997). As fontes de resistência conhecidas não conferem resistência a todos os patótipos. Quase todos os cultivares plantados no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular. Entretanto, fontes de resistência têm sido encontradas (VIEIRA *et al.*, 1999). SARTORATO *et al.* (1991) avaliaram alguns cultivares comerciais de feijoeiro frente a vários patótipos de *P. griseola* e encontraram ampla resposta de resistência para esses patótipos.

O agente causal da antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, também apresenta grande número de patótipos. Até o ano de 2002, foram identificados em território brasileiro 30 patótipos de *C. lindemuthianum* (RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; BALARDIN *et al.*, 1997; THOMAZELLA *et al.*, 2000, TALAMINI *et al.*, 2002).

As perdas causadas por *C. lindemuthianum* podem ser de até 100% quando são empregadas sementes contaminadas em regiões onde prevalecem condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (PELOSO, 1992).

3.3. O Melhoramento genético do feijoeiro

No Brasil, a maioria dos programas de melhoramento do feijoeiro visa o aumento da capacidade produtiva, bem como a resistência a patógenos (VIEIRA *et al.* 1999)

Num programa de melhoramento cujo objetivo é aumentar a capacidade produtiva do feijoeiro, diversas características morfológicas, fisiológicas e de rendimento devem ser consideradas. Nesse sentido, o progresso genético dos programas de melhoramento tem sido, em muitos casos, limitado, devido ao emprego de materiais do mesmo conjunto gênico no processo de hibridação (VIEIRA *et al.*, 1999).

No campo da resistência a doenças é que os melhoristas de feijão têm obtido os maiores sucessos. A incorporação de resistência a doenças tem efeito estabilizador sobre os cultivares, evitando oscilação de rendimento, de plantio para plantio, por efeito de maior ou menor ataque de patógenos. A resistência a doenças em um cultivar é de grande importância para aumentar a produção e reduzir o uso de defensivos agrícolas, o que representa economia para o produtor e preservação do ambiente. No entanto, outras características como tipo e qualidade do grão, arquitetura da planta, resistência a pragas, adaptação ao cultivo consorciado, adaptação à colheita mecanizada, resistência à seca, adaptação a solos pobres e ácidos e aumento da eficiência da fixação simbiótica de nitrogênio têm recebido atenção dos melhoristas, mas, em geral, estas últimas características ficam num segundo plano de importância (VIEIRA *et al.*, 1999).

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

3.4. Piramidação de genes de resistência a doenças

A piramidação de genes de resistência tem sido sugerida como estratégia para proporcionar resistência durável a diferentes patótipos de um mesmo patógeno. Apesar da combinação de genes para resistência mais durável não ser propósito recente, não há muitos exemplos na literatura de suas aplicações no melhoramento de plantas. Uma possível explicação para este fato é a dificuldade encontrada no processo de combinação de diferentes genes de resistência pelos métodos tradicionais de melhoramento.

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

A estratégia de melhoramento visando resistência a doenças é relativamente simples quando se objetiva a transferência de apenas um gene que confere resistência vertical. Neste caso, o procedimento mais indicado é o uso do método dos retrocruzamentos combinado com a inoculação artificial para seleção de indivíduos resistentes. No entanto, a extensa variabilidade de alguns fungos causadores de doenças foliares como a ferrugem, antracnose e mancha-angular, tem sido um desafio aos programas de melhoramento do feijoeiro. Nem sempre a resistência obtida é duradoura ou eficiente em todas as regiões de cultivo.

O conhecimento sobre a freqüência e a distribuição de raças, combinados com o uso de diferentes genes de resistência é necessário para o desenvolvimento de cultivares resistentes mais estáveis e adaptados às regiões de produção. Neste sentido, o conhecimento da variabilidade do patógeno é de suma importância para orientar os

programas de melhoramento, pois com base nestas informações é que são selecionados os genitores para os cruzamentos.

Em feijão, a piramidação de três genes de resistência à ferrugem, *UP-2*, *B-190* e *Ur-3* conferiu resistência a 63 dos 65 patótipos da ferrugem do feijoeiro caracterizados na coleção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA. Apenas os patótipos 58 e 67 superaram os genes dessa pirâmide (KELLY *et al.*, 1994). KELLY *et al.* (1995), usando a seleção assistida por marcadores moleculares, piramidaram quatro genes (*I*, *bc-u*, *bc-1²*, *bc-2²*, *bc-3*) que conferem resistência ao vírus do mosaico-comum do feijoeiro (BCMV).

Na cultura do arroz, quatro genes de resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram piramidados. Linhagens melhoradas com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas para a resistência a este patógeno. Observou-se que essas linhagens apresentaram níveis superiores de resistência e/ou maior espectro de resistência que linhagens (genitores) com apenas um gene. Este resultado pode ser devido à interação e/ou complementação entre genes de resistência (HUANG *et al.*, 1997).

SINGH *et al.* (2001) piramidaram os genes *xa5*, *xa13* e *Xa21* de resistência à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* no cultivar de arroz PR 106. Em inoculações em casa-de-vegetação, estes autores demonstraram que as combinações dos genes promoveram altos níveis de resistência aos isolados testados. Testes feitos no campo, em 31 ambientes, confirmaram as observações feitas em casa-de-vegetação.

3.5. Fontes de resistência

A identificação de fontes de resistência aos patógenos é uma etapa básica e fundamental em qualquer programa de melhoramento que visa ao desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b). É interessante que se tenha diversidade de fontes de resistência, para o sucesso na piramidação de genes de resistência complementares. O estudo da variabilidade genética do patógeno, bem como sua distribuição geográfica e a determinação de fontes com adequado nível de resistência, são pontos-chave em programas de melhoramento visando resistência a doenças elicítadas por patógenos com elevado número de patótipos.

Diversos pesquisadores têm identificado fontes de resistência a doenças fúngicas do feijoeiro comum, e é grande a quantidade de genes de resistência já identificados e caracterizados. No passado, o cultivar Cornell 49-242, fonte do gene de resistência à

antracnose do feijoeiro *Are* ou *Co-2* identificado por MASTENBROEK (1960) foi extensivamente utilizado e hoje faz parte das genealogias de um grande número de cultivares e linhagens provenientes do CIAT (ALZATE-MARIN *et al.*, 2001a). Esse gene, bem como outros encontrados em cultivares como Kaboon, Rio Tibagi, TO, TU, AB 136, G 2333 e outros (MENEZES e DIANESE, 1988b; TU, 1988; BALARDIN *et al.*, 1990), têm sido utilizados em diversos programas de melhoramento. O gene *Are*, entretanto, não fornece proteção contra diversos patótipos encontrados no Brasil (MENEZES e DIANESE, 1988a).

Em testes realizados em diversos centros de pesquisa, os cultivares G 2333, AB 136, TU, TO e PI 207.262 têm sido considerados os mais resistentes à antracnose (PASTOR-CORRALES, 1992; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994).

O cultivar G 2333 possui várias características desfavoráveis, como: hábito de crescimento IV (prostrado), sensibilidade ao fotoperíodo e grãos vermelhos e pequenos. Porém, é portador de uma pirâmide de genes que confere resistência a todas as raças de *C. lindemuthianum* que ocorrem no Brasil. Até o ano de 2002, foi relatada a resistência dos cultivares AB 136 e G 2333 a 30 patótipos de *C. lindemuthianum* identificados em diferentes regiões produtoras de feijão do Brasil (RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; BALARDIN *et al.*, 1997; THOMAZELLA *et al.*, 2000, TALAMINI *et al.*, 2002). Nestes mesmos trabalhos foi observado que os cultivares TU (gene *Co-5*) e TO (gene *Co-4*) apresentaram resistência a 29 e 26 dos 30 patótipos, respectivamente.

Os genes de resistência ao *C. lindemuthianum*, já caracterizados, são listados por BASSETT (2004) e estão presentes nos cultivares Dark Red Kidney (*Co-1*) (McROSTIE, 1919), Cornell 49-242 (*Co-2*) (MASTENBROEK, 1960), Mexico 222 (*Co-3*) (BANNEROT, 1965), TO (*Co-4*) (FOUILLOUX, 1976), G 2333 (*Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) (FOUILLOUX, 1976; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994), AB 136 (*Co-6* e *Co-8*) (SCHWARTZ *et al.*, 1982; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001b), BAT 93 (*Co-9*) (GEFFROY, *et al.*, 1999), Ouro Negro (*Co-10*) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a). Vários outros alelos foram identificados e estão presentes nos cultivares Kaboon (*Co-1*²) (MELOTTO e KELLY, 2000), Perry Marrow (*Co-1*³) (MELOTTO e KELLY, 2000), AND 277 (*Co-1*⁴) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003c), Widusa (*Co-1*⁵) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2002a), México 227 (*Co-3*²) (FOUILLOUX, 1976), SEL 1308 (*Co-4*²) (YOUNG *et al.*, 1998) e PI 207.262 (*Co-4*³) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2002b).

No programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV foi observado que o cultivar Ouro Negro (derivado de Honduras 35) apresentou resistência a 14 patótipos de *U.*

appendiculatus e a 17 patótipos de *C. lindemuthianum* (FALEIRO, 1997; ALZATE-MARIN *et al.* 2003a). ALZATE-MARIN *et al.* (2004) relataram que o cultivar Ouro Negro foi testado com 24 dos 94 isolados de *U. appendiculatus* mantidos pelo USDA (*United States Department of Agriculture*), mostrando reação de resistência a 22 patótipos. Em trabalhos prévios conduzidos pelo grupo pesquisa do BIOAGRO/UFV, foi verificada a independência dos genes de resistência a estas doenças no cultivar Ouro Negro (CORRÊA, 1999).

BASSETT (2004) relata que os genes de resistência ao *U. appendiculatus*, já caracterizados, estão presentes nos cultivares B 1627 (*Ur-1*), B 2090 (*Ur-2*), B 2055 (*Ur-2*²), Aurora (*Ur-3*), Nep-2 (*Ur-4*) e Early Gallatin (*Ur-4*) (BALLANTYNE, 1978), México 309 (*Ur-5*) (STAVELY, 1984b), Olathe e Golden Gate Wax (*Ur-6*) (GRAFTON *et al.*, 1985), GN 1140 (*Ur-7*) (AUGUSTIN *et al.*, 1972), U.S. #3 (*Ur-8*) (CHRIST e GROTH, 1982), Pompadour Checa (*Ur-9*) (FINKE *et al.*, 1986), PI 181996 (*Ur-11*) (JOHNSON *et al.*, 1995), PI 181996 (*Ur-3*²) (STAVELY, 1990)

Os principais genes de resistência ao *P. griseola*, já caracterizados, estão presentes nos cultivares AND 277 (*Phg-1*) (CARVALHO *et al.*, 1998), México 54 (*Phg-2*) (SARTORATO *et al.*, 1999), México 54 (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*), Cornell 49-242 (*Phg-3*), MAR 2 (*Phg-4*) e BAT 332 (*Phg-6*²) (CAIXETA, 2003).

Em estudo realizado por NIETSCHE *et al.* (2001), verificou-se que o gene *Phg-1* conferiu resistência a 17 de 25 patótipos de *P. griseola* avaliados.

Apesar desses cultivares serem boas fontes de resistência, eles não apresentam características agrônomicas e/ou culinárias desejáveis para o seu cultivo comercial. Daí a necessidade de transferir esses genes de resistência para cultivares elites.

3.6. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento do feijoeiro

Os marcadores moleculares podem ser utilizados de várias maneiras. Dentre elas podem ser citadas a identificação de origem parental, identificação de cultivares, atribuição de linhagens e grupos heteróticos, certificação de pureza genética, monitoramento de cruzamentos, estudos de diversidade e distância genética, construção de mapas genéticos e seleção assistida (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma metodologia que tem alcançado êxito é a da seleção indireta, a qual consiste na seleção para uma característica associada a um caráter de interesse a ser melhorado. Esta metodologia é vantajosa quando a herdabilidade da característica indireta e a sua correlação com o caráter de interesse são elevadas (BERED *et al.*,

1997). Uma vez que os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente, as variações ambientais e a interação genótipo x ambiente podem ser eliminadas. A falta de epistasia entre marcadores também pode possibilitar a seleção para vários caracteres ao mesmo tempo. O número de anos necessários para o processo de seleção também poderá ser reduzido, pois vários ciclos de seleção poderão ser praticados a cada ano (BERED *et al.*, 1997).

A seleção assistida por marcadores moleculares é baseada no conceito de que é possível inferir a presença de um gene pela presença de uma marca genética que está estreitamente ligada ao gene. Se a marca está localizada distante do gene, então a possibilidade de que sejam transmitidas juntas para indivíduos da progênie é reduzida, devido à ocorrência de eventos de recombinação. Portanto, um pré-requisito para a utilização de marcadores moleculares no processo de seleção é que as marcas estejam fortemente ligadas aos genes de interesse. Por esse motivo, a saturação de regiões no mapa genético de ligação é necessária (KUMAR, 1999). Por meio de marcadores moleculares ligados à característica de interesse, a seleção pode ocorrer nos primeiros estágios de desenvolvimento e os indivíduos superiores podem ser identificados com relativa facilidade (ZHANG e STOMMEL, 2001).

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

MICHELMORE (1995) cita a piramidação de genes de resistência como estratégia eficiente no controle de patogenicias, tendo em vista o aumento na durabilidade da resistência. No entanto, há determinadas restrições quanto ao uso dessa estratégia no melhoramento genético por métodos convencionais, tendo em vista a grande dificuldade de reconhecer a presença de diferentes genes de resistência em um mesmo cultivar (RAMAN *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2001). Uma série de cruzamentos-teste pode ser

necessária para determinar a presença dos genes, o que torna o processo muito trabalhoso (HUANG *et al.*, 1997).

Segundo PEDERSEN e LEATH (1988), combinar três ou quatro genes em um único cultivar e manter outras características superiores não é trabalho simples. Devido às interações epistáticas entre genes de resistência, muitos testes são requeridos com diferentes raças para assegurar que cada um dos alelos desejados esteja presente. Se vários genes estão sendo incorporados e todos eles conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (MILACH e CRUZ, 1997).

Estas limitações dificultaram, no passado, o uso da piramidação como uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável. Entretanto, a possibilidade de usar marcadores moleculares para monitorar a presença de genes de resistência em um genótipo, levantou novamente a questão do uso desta estratégia no melhoramento. Uma vez que os genes de resistência podem ser identificados por meio desta técnica, eles seriam facilmente acumulados num genótipo, via seleção assistida por marcadores moleculares.

MICHELMORE (1995) cita uma série de usos de marcadores moleculares em programas de melhoramento para resistência a patógenos: (i) podem auxiliar na preservação e exploração de germoplasma; (ii) permitem seleção baseada em marcadores; (iii) facilitam a geração de combinações particulares de genes de resistência; (iv) podem permitir, a médio prazo, a caracterização e manipulação de genes de resistência quantitativa; e (v) auxiliam a clonagem de genes de resistência que serão usados para obtenção de transgênicos.

Marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) têm sido identificados e utilizados no mapeamento de genes de resistência para importantes patógenos que causam doenças ao feijoeiro, em diversos programas de melhoramento (YOUNG *et al.*, 1998; STAVELY, 2000; MIKLAS *et al.*, 2000; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001a). As informações geradas com o uso destes marcadores, associadas às informações relacionadas aos caracteres agrônômicos e culinários têm sido utilizadas no direcionamento dos cruzamentos feitos pelos programas de melhoramento.

O grupo de pesquisa do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem identificado e validado vários marcadores RAPD ligados a genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha-angular. FALEIRO *et al.* (2000)

identificaram o marcador OPX11_{550a} ligado ao gene de resistência à ferrugem, presente no cultivar Ouro Negro, a uma distância de 5,8 cM. Também, no cultivar Ouro Negro, foi identificado o marcador OPBA08_{560a} ligado a 6,0 cM de distância do gene de resistência à ferrugem (CORRÊA *et al.*, 2000); e o marcador OPBA16_{669a} ligado a 10,4 cM de distância do gene de resistência à mancha-angular (FALEIRO *et al.*, 2003). ARRUDA *et al.* (2000) identificaram no cultivar TO os marcadores OPY20_{830a} e OPB03_{1800r} ligados a distâncias de 0,0 e 3,8 cM do gene *Co-4*. ALZATE-MARIN *et al.* (2000) identificaram o marcador OPAZ20_{940a} ligado ao gene de resistência à antracnose *Co-6* presente no cultivar AB 136 a uma distância de 7,4 cM. FALEIRO *et al.* (2000) avaliaram uma população RC₃F₂ derivada do cruzamento de Rudá com Ouro Negro, quanto à resistência à antracnose e à ferrugem, e observaram que os genes de resistência à ferrugem e à antracnose presentes em Ouro Negro estão ligados entre si a uma distância de 12,3 cM. Neste cultivar, o *primer* OPF10 revelou uma banda de 1050 pb (pares de base) ligada simultaneamente, em acoplamento, aos genes de resistência à antracnose e à ferrugem (CORRÊA, 1999). ALZATE-MARIM *et al.* (2001c) avaliaram em populações RC₃F_{2:3} (*Co-4*²) e RC₁F_{2:3} (*Co-5*), derivadas do cruzamento entre os cultivares Rudá e G 2333, os marcadores OPAS13₉₅₀ (previamente reportado como ligado ao gene *Co-4*²) (YOUNG *et al.*, 1998) e OPAB03₄₅₀ (previamente reportado como ligado ao gene *Co-5*) (YOUNG e KELLY, 1997), e observaram que para a população RC₃F_{2:3} o marcador OPAS13₉₅₀ estava ligado em acoplamento a 11,2 cM de distância do gene *Co-4*²; na população RC₁F_{2:3} o marcador OPAB03₄₅₀ mostrou-se ligado em acoplamento a 16,4 cM de distância do gene *Co-5*. CARVALHO *et al.* (1998) identificaram o marcador OPH13_{490a} ligado a uma distância de 5,5 cM do gene de resistência à mancha-angular presente na linhagem AND 277. CORRÊA *et al.* (2001) identificaram os marcadores OPAA19_{400a} e OPM02_{425a} ligados a 10,0 e 5,6 cM de distância do gene de resistência à mancha-angular presente no cultivar Ouro Negro. SARTORATO *et al.* (1999) identificaram os marcadores OPN02_{890a} e OPAC14_{2400a} ligados a 5,9 e 6,6 cM de distância do gene de resistência à mancha-angular presente no cultivar México 54.

Diversos marcadores SCAR têm sido desenvolvidos a partir dos marcadores RAPD identificados como ligados a genes de resistência a doenças do feijoeiro (CORRÊA *et al.*, 2000, NIETSCHÉ *et al.*, 2000, QUEIROZ *et al.*, 2004a, b, c).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1971. 381 p.
- ALVAREZ-AYALA, G.; SCHWARTZ, H.F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.22, 1979.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; MENARIM, H.; CHAGAS, J.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, 23:633-637, 2000.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C., BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:125-133, 2001a.
- ALZATE-MARIN A.L.; ALMEIDA, K.S.; RAGAGNIN, V.A.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a recessive gene conferring resistance to anthracnose in common bean lines derived from differential cultivar AB 136. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:117-118, 2001b.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; BAIA, G.S.; PAULA JR., T.J.; SOUZA, K.A.; COSTA, M.R.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. **Journal Phytopathology** 149:259-264, 2001c.
- ALZATE-MARIN A. L.; ARRUDA, K.M.; BARROS E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar Widusa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:110-111, 2002a.

- ALZATE-MARIN, A.L.; MORAIS, M.G.; MAURÍLIO, A.M.; BARROS, E.G. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar PI 207.262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:112-113, 2002b.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; PELOSO, M.J. Del; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agrícola**, 60:283-290, 2003b.
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:173-174, 2003c.
- ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, 152:60-64, 2004.
- ARRUDA, M.C.C.; ALZATE-MARIN, A.L.; CHAGAS, J.M.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance genes to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 90:758-761, 2000.
- AUGUSTIN, E.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli typica* Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 97:526-529, 1972.
- BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 15:243-245, 1990.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 50-53, 1997.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.
- BALLANTYNE, B.J. **The genetic bases of resistance to rust , caused by *Uromyces appendiculatus* in bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Sydney, Australia: New South Wales, 1978. 262p. (Tese de Doutorado). University of Sydney, 1978.
- BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Ann. Amélior. Plant.** 15:201–222, 1965.

- BASSETT, M.J. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:1-24, 2004.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, 27:513-520, 1997.
- 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. 90 p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CARVALHO, G.A.; PAULA Jr., T.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHKE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23:482-485, 1998.
- CHIARADIA, A.C.N.; GOMES, J.C. **Feijão: química, nutrição e tecnologia**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes. 1997. 180 p.
- CHRIST, B.J.; GROTH, J.V. Inheritance of resistance in three cultivars of beans to the bean rust pathogen and the interaction of virulence and resistance genes. **Phytopathology**, 72:771-773, 1982.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da agropecuária. Ano XIV, n^o 01. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf>>. Acesso em: fev. de 2005.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 116 p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD GOD, P.I.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.
- CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; OLIVEIRA, M.L.P.; NIETSCHKE, 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.
- EMBRAPA Arroz e Feijão. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão>. Acesso em: dez. de 2004.
- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* avar. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG, UFV, 1997. 65 p. (Tese de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

- FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; VINHADELLI, W.S.; PAULA Jr., T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18, 1999.
- FALEIRO, F.G.; 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.; SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.
- FAO. Agriculture data. Disponível em:<<http://www.fao.org>.2003>. Acesso em: dez. de 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FERREIRA, C.M.; PELOSO, M.J. Del; FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002. 47p. (documentos/EMBRAPA Arroz e feijão, 135).
- FINKE, M.L.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R. The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, 35:969-982, 1986.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:36-37, 1976.
- GEFFROY, V.; DELPHINE, S.; OLIVIRA, J.C.F.; SEVIGNA, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 12:774-784, 1999.
- GRAFTON, K.F.; WEISER, G.C.; LITTLEFIELD, L.J.; STAVELY, J.R. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, 25:537-539, 1985.
- HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T.V.; ZEIGLER, R.S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 7:1121-1128, 2000.
- HUANG, N.; ANGELES, E. R.; DOMINGO, J.; MAGPANTAY, G.; SINGH, S.; ZHANG, G.; KUMARAVADIEL, N.; BENNETT, J.; KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v 95, n.3, p.313-320, 1997.

- JOHNSON, E.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:659-664, 1995.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance, **Annual Review of Phytopathology**, 22:309-330, 1984.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; AFANADOR, L.; HALEY, S.D. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 37:15-16, 1994.
- KELLY, J.D.; AFANADOR, L.; HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212, 1995.
- KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, 17:143-182, 1999.
- LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário** (Belo Horizonte) 21:97-108, 2000.
- McROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.
- MASTENBROEK, C. A. Breeding programmer for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, 9:177-184, 1960.
- MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, 116:143-149, 2000.
- MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 78:650-655. 1988a.
- MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Resistance to races of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean cultivars grown in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 13:382-384. 1988b.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of diseases resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, v.15, p. 393-427, 1995.
- MIKLAS, P.N.; SMITH, J.R.; RILEY, R.; GRAFTON, K.F.; SINGH, S.P.; JUNG, G.; CONE, D.P. marker-assisted breeding for pyramiding resistance to common bacterial blight in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:39-40, 2000.
- MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v.27, n.4, p.685-689, 1997.

- MORA, N.O.A. **Variabilidade patogênica de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. no Brasil e o problema da identificação de raças fisiológicas.** Viçosa, MG, UFV, 1986. 68 p. (Tese de Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant Disease, An Advanced Treatise.** New York: Academic Press, 1979. p. 23-46.
- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris*.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 47 p. (Tese de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; ROCHA, R.C.; PAULA JR., T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, 148:117–121, 2000.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del *primer* taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina.** Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. **Plant Disease**, 78:959-962, 1994.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas.** Viçosa, MG, Editora UFV, 1998. p. 375-433.
- PEDERSEN, W.L.; LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, 26:369-378, 1988.
- PELOSO, M.J. Del. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina.** Cali, Colômbia, 1992. p. 86-108. (Doc. de trabajo nº 113)
- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLAD, D.A.; ARRUDA, K. M.A.; SOUZA, T.L.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:237-238, 2004a.
- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLAD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; SOUZA, T.L.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:249-250, 2004b.

- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; SOUZA, T.L.P.O.; SANGLAD, D.A.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271–272, 2004c.
- RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B. Melhoramento do feijão. **Informe Agropecuário**, 8:16-19, 1982.
- RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B.; PEREIRA FILHO, I.A. Choise of parents for dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding. **Revista Brasileira de Genética**, 11: 391-400, 1988.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.P.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora UFG, 1993, 271p.
- RAMAN, H.; READ, B.J.; BROWN, A.H.D.; ABBOTT, D.C. Molecular Markers and Pyramiding of Multiple Genes for Resistance to Scald in Barley. Australia, **Proceedings of the 9th Australian Barley Technical Symposium**, 1999 (Abstracts)
- RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia brasileira**, 19:167-172, 1994.
- SARTORATO, A., RAVA, C.A., MENTEN, J.O. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. **Fitopatologia Brasileira**, 16:43-46, 1991.
- SARTORATO, A.; NIETSCHE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:21-22, 1999.
- SARTORATO, A. Resistência do feijoeiro comum à mancha angular. In: I Congresso brasileiro de melhoramento de plantas, 2001, **Resumos**.Goiânia: GO, 2001a.CD-Room, Resumo 25.
- SARTORATO, A. Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum. In: I Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2001, **Resumos**.Goiânia:GO, 2001b. CD-Room, Resumo 26.
- SCHAFER, J.F.; ROELFS, A.P. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence, **Phytopathology**, 75:749-750, 1985.
- SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 31:741-754, 1982.

- SINGH, S.; SIDHU, J.S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D.S.; DHALIWAL, H. S.; KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:1011-1015, 2001.
- STAVELY, J.R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology**, 74:834, 1984b. (Abstract).
- STAVELY, J.R. Genetic of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80:1056, 1990. (Abstract).
- STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:1-4, 2000.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; FERNANDEZ, F.R.; ISHIKAWA, F.H. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão-comum em Minas Gerais. In: VII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 2002, **Resumos**. Viçosa: MG, 2002, p. 187-189.
- THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.
- TU, J. C. Control of bean anthracnose caused by the delta and labda races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. **Plant Disease**, 72:5-8. 1988.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Editora UFV, 1983. 231 p.
- VIEIRA, C.; PAULA Jr, T.J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 596 p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 273-349, 1999.
- YOKOYAMA, L.P. O feijão no Brasil no período de 1984/85 a 1999/2000: aspectos conjunturais. In: VII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Viçosa/MG, 2002. **Anais...** Viçosa/MG, 2002. p.654.
- 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.
- ZHANG, Y.; STOMMEL, J.R. Development of SCAR and CAPS markers linked to the *beta* gene in tomato. **Crop Science**, 41:602-1608, 2001.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS ELITES DE FEIJÃO DE GRÃO TIPO “CARIOCA” QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância agronômica, econômica e social, sobretudo porque é cultivado por pequenos agricultores, cuja finalidade é apenas subsistencial, e grandes produtores que utilizam a alta tecnologia. O feijão pode ser cultivado praticamente o ano inteiro em todo o território nacional, gerando grande número de empregos no campo. Além disso, essa leguminosa constitui o alimento básico da população brasileira, e é a principal fonte protéica para as classes de baixa renda. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris*, sendo esta cultura o terceiro grão em área cultivada na safra 2004/2005, com área plantada superior a 4,1 milhões de ha (CONAB, 2004).

No entanto, a maioria dos cultivares de feijão comum é afetada por inúmeras doenças, que produzem severas perdas na produção (VIEIRA, 1983). A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., está entre as principais doenças que atacam a cultura do feijoeiro. As perdas causadas por *C. lindemuthianum* podem ser de até 100%, quando se empregam sementes contaminadas, em regiões onde prevalecem condições ideais para o desenvolvimento da doença

(PELOSO, 1992). Além de debilitar ou mesmo causar a morte da planta, outro dano é a ocorrência de manchas escuras nos grãos, o que deprecia o valor comercial.

A alta umidade relativa do ar e temperaturas entre 13 e 26 °C favorecem o surgimento da enfermidade. Entre os fatores que contribuem para a disseminação do patógeno encontram-se as chuvas moderadas freqüentes acompanhadas de ventos e, na disseminação à curta distância, o salpico de chuva sobre os resíduos de colheita (PASTOR-CORRALES, 1985). A disseminação a longas distâncias realiza-se, principalmente, por meio de sementes, insetos e o homem (SINGH, 1990; PASTOR-CORRALES, 1985).

O uso da resistência genética no controle de doenças, como a antracnose, é tido como eficiente e barato, além de ecologicamente correto (SARTORATO, 2001), podendo ser usado tanto por pequenos como por grandes produtores. Portanto, entende-se a necessidade e importância de estudos relacionados à resistência genética dos cultivares.

LANZA *et al.* (1997), FALEIRO *et al.* (1996), FALEIRO *et al.* (1999) e NIETSCHKE *et al.* (1998) estudaram o comportamento de cultivares comerciais de feijão quanto à resistência/suscetibilidade à ferrugem, antracnose e mancha-angular, e concluíram que a maioria dos cultivares comerciais testados era suscetível. Isso ocorre porque os agentes causais dessas enfermidades apresentam alta variabilidade genética. RAVA *et al.* (1994); BALARDIN (1997); BALARDIN *et al.* (1997); THOMAZELLA *et al.* (2000) e TALAMINI *et al.* (2002) citam 30 distintos patótipos de *C. lindemuthianum* já identificados no Brasil.

Dependendo dos patótipos que prevaleçam numa certa região, um cultivar de feijão pode comportar-se como resistente ou suscetível. Muitas vezes, um cultivar resistente torna-se suscetível porque foi infectado por uma nova raça. Isso aconteceu com os feijões pretos “Milionário 1732” e “Rico 1735”, lançados em 1983, que além de muito produtivos, eram resistentes à ferrugem (VIEIRA, 1983). Contudo, poucos anos depois de distribuídos, passaram a ser infectados. O feijão “Manteigão Fosco 11”, lançado em 1960 como resistente à ferrugem, foi muito atacado no período de 1968 a 1970, porém, mais tarde voltou à condição de resistente (VIEIRA, 1972), evidentemente por causa da modificação do quadro de patótipos.

Pelo exposto, deduz-se que o constante monitoramento do quadro de patótipos prevaletentes em determinada região, juntamente com a caracterização fenotípica da resistência/suscetibilidade das linhagens de feijoeiro desenvolvidas pelos programas de

melhoramento, são fundamentais para que determinada recomendação de cultivar venha a ter sucesso. Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar fenotipicamente 30 linhagens elites de feijoeiro de grãos tipo “carioca”, desenvolvidas por diversos centros de pesquisa nacionais, frente a vários patótipos de *C. lindemuthianum* coletados em diferentes regiões produtoras de feijão do Brasil e do mundo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Para avaliar a resistência/suscetibilidade das linhagens de feijoeiro à antracnose, foram semeadas doze sementes de cada uma das 30 linhagens elites e de cultivares testemunhas, para cada um dos patótipos do agente causal da antracnose testados. As sementes foram semeadas diretamente em bandejas plásticas contendo uma mistura de solo, esterco curtido e adubo formulado 4-14-8. As plantas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, até o momento da inoculação.

A parte referente à multiplicação do patógeno e preparo do inóculo foi realizada no laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

2.2. Material genético

Os materiais genéticos utilizados foram 30 linhagens de grãos tipo “carioca”, desenvolvidas por diversos centros de pesquisa do país, algumas já lançadas como cultivares e outras que têm se destacado em ensaios de valor de cultivo e uso (Tabela 1). Foram utilizados também, como testemunhas, os cultivares usados como fontes de genes de resistência a doenças pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV: G 2333 (*Co-4*² e *Co-5*), TO (*Co-4*) e AB 136 (*Co-6*), AND 277 (*Phg-1*) e o cultivar Ouro Negro (*Co-10* e *Ur-ON*).

Tabela 1. Relação das linhagens elites avaliadas e suas respectivas instituições de origem.

<i>LINHAGEM</i>	<i>ORIGEM</i>
LP-98-31	Instituto Agronômico do Paraná
UTFB-0018	CEFET – Pato Branco
UTF-0029	CEFET – Pato Branco
Vi-4599C	Universidade Federal de Viçosa
GEN 12	Instituto Agronômico de Campinas
UTF-0013	CEFET – Pato Branco
Pérola	EMBRAPA Arroz e Feijão
LP 98-20	Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR
CNFC 9500	EMBRAPA Arroz e Feijão
VC 2	Universidade Federal de Viçosa
Carioca 1070	IAPAR/CENA
CNFC 8017	EMBRAPA Arroz e Feijão
VC 4	Universidade Federal de Viçosa
Vi 0699C	Universidade Federal de Viçosa
GEN 12-2	Instituto Agronômico de Campinas - IAC
UTF-0037	CEFET – Pato Branco
FT Bonito	FT Pesquisa e Sementes
Vi-4899C	Universidade Federal de Viçosa
VC 5	Universidade Federal de Viçosa
OPS-82	Universidade Federal de Lavras
LH-11	Universidade Federal de Lavras
UTF-0031	CEFET – Pato Branco
IAPAR-81	Instituto Agronômico do Paraná
UTF-0019	CEFET – Pato Branco
LP 98-76	Instituto Agronômico do Paraná
UTFB-0022	CEFET – Pato Branco
CNFC 9437	EMBRAPA Arroz e Feijão
Talismã	Universidade Federal de Lavras
VC 3	Universidade Federal de Viçosa
UTF-0030	CEFET – Pato Branco

2.3. Patótipos

Os patótipos 55, 64, 65, 67, 73, 75, 81, 83, 87, 89, 95, 117 e 453 fazem parte das 25 raças de *C. lindemuthianum* coletadas em diferentes regiões do Brasil e caracterizadas por RAVA *et al.* (1994). As culturas originais destes patótipos foram fornecidas pelos Drs. Carlos A. Rava e Aloísio Sartorato (EMBRAPA Arroz e Feijão). Os patótipos 1033 (Honduras) e 2047 (Costa Rica) foram caracterizados por BALARDIN *et al.* (1997). O patótipo 1033 foi fornecido pelo Dr. James Kelly, da Universidade do Estado de Michigan (EUA) e o patótipo 2047 foi fornecido pelo Dr. João Bosco dos Santos, da Universidade Federal de Lavras. Os patótipos 85, 449 e 593 foram caracterizados pelo grupo de pesquisa do BIOAGRO/UFV. Estas culturas são mantidas na micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Com o objetivo de confirmar a identidade dos isolados de *C. lindemuthianum*, estes foram previamente inoculados nas 12 variedades diferenciadoras internacionais para antracnose do feijoeiro (PASTOR-CORRALES, 1992).

2.4. Crescimento e inoculação do fungo

Isolados do fungo, mantidos em meio BDA (batata-dextrose-ágar), foram repicados, separadamente, para tubos autoclavados contendo meio vagem (vagem de feijão cozida parcialmente imersa em BDA) em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminações. Após repicagem, os tubos foram vedados e transferidos para estufa a 24°C, onde permaneceram por 7-8 dias, tempo suficiente para a esporulação do fungo. Seis dias após a emergência das plântulas, preparou-se suspensões, de cada isolado, contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/ml, que foram utilizadas na inoculação das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação, transferiu-se as plantas para câmaras de nevoeiro individuais, mantidas a 20-22°C, sob fotoperíodo de 12 h e umidade relativa superior a 95%, onde permaneceram por 5 a 7 dias até serem avaliados os sintomas da doença.

2.5. Avaliação dos sintomas

A avaliação deu-se a partir da análise visual dos sintomas da antracnose de cada planta. Para isto, utilizou-se uma escala de severidade de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES (1992). Nessa escala os valores são: 1- Ausência de sintomas; 2- Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; 3- Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 4- Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; 5- Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 6- Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos e pecíolos; 7- Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolos; 8- Manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas; lesões abundantes no caule, ramos e pecíolo; 9- Maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o que se observa na Tabela 2, as reações das diferenciadoras para antracnose TO, AB 136 e G 2333 estão de acordo com os resultados observados por RAVA *et al.* (1994) e BALARDIN *et al.* (1997), mostrando um amplo espectro de resistência, com destaque para os cultivares AB 136 e G 2333, que apresentaram incompatibilidade com todas as raças nacionais avaliadas. Até o ano de 2002, foi relatada a resistência dos cultivares AB 136 e G 2333 a 30 patótipos de *C. lindemuthianum* identificados em diferentes regiões produtoras de feijão do Brasil (RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; BALARDIN *et al.*, 1997; THOMAZELLA *et al.*, 2000, TALAMINI *et al.*, 2002). Segundo estes mesmos autores, os cultivares TU (gene *Co-5*), PI 207.262 e TO (alelos do gene *Co-4*) apresentaram resistência a 29, 29 e 26 dos 30 patótipos estudados, respectivamente. O cultivar PI 207.262 faz parte da genealogia de vários cultivares elite do CNPAF-EMBRAPA e de cultivares melhorados, como o EMGOPA 201 (Ouro) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003c).

O cultivar AND 277, que possui o gene de resistência à mancha-angular *Phg-1* (CARVALHO *et al.*, 1998), tem sido utilizado pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, apenas como fonte de resistência à mancha-angular. No entanto, este cultivar mostrou amplo espectro de resistência à antracnose, apresentado suscetibilidade a apenas quatro dos patótipos testados. Merece destaque o fato deste ter sido o único cultivar, além do G 2333, a apresentar incompatibilidade frente ao patótipo 2047. Esta raça identificada na Costa Rica é tida como uma das raças de maior virulência já identificadas (BALARDIN, 1997; BALARDIN e KELLY, 1998). Programas de melhoramento do feijoeiro do Brasil e do mundo têm grande carência de genes de resistência à antracnose de origem Andina. Estudos de herança e alelismo feitos por ALZATE-MARIN *et al.* (2003b) mostraram que o cultivar AND 277 possui

um gene dominante de resistência à antracnose e que este seria alelo do gene *Co-1* presente no cultivar Dark Red Kidney (McROSTIE, 1919). Porém, o gene *Co-4²*, identificado no cultivar G 2333 (YOUNG *et al.*, 1998) é tido, até o momento, como o único gene de resistência à antracnose já caracterizado capaz de conferir resistência ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*. Isso alerta para a necessidade de que estudos mais completos de caracterização da herança da resistência à antracnose do cultivar AND 277 sejam realizados.

O cultivar Ouro Negro, apesar de ter apresentado suscetibilidade apenas a cinco dos 18 patótipos avaliados, apresentou suscetibilidade aos patótipos 65 e 87, importantes pela ampla distribuição no território nacional (RAVA *et al.*, 1994). Este cultivar tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento por apresentar bom potencial produtivo e resistência múltipla a patógenos de grande importância na cultura do feijoeiro como *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum* (FALEIRO, 1997; FALEIRO *et al.*, 2000; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a; RAGAGNIN *et al.*, 2003).

As linhagens Vi 0699C, Vi 4899C e Vi 4599C são provenientes de retrocruzamentos assistido por marcadores moleculares conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, que usou como genitores os cultivares Rudá (recorrente) e Ouro Negro (doador). As linhagens Vi 0699C e Vi 4899C apresentaram espectro de resistência à antracnose bastante similar ao do Ouro Negro. Porém, a linhagem Vi 4599C apresentou suscetibilidade à maioria dos patótipos estudados. RAGAGNIN *et al.* (2003) avaliaram a reação destas linhagens frente a vários patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, e observaram que as linhagens Vi 0699C e Vi 4899C apresentaram resistência a todos os patótipos de *U. appendiculatus* por eles testados; a linhagem Vi 4599C apresentou comportamento segregante frente a todos os patótipos de *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*. Tal fato faz atentar para a necessidade dos programas de melhoramento para resistência a doenças, conduzirem as famílias segregantes até a completa fixação dos alelos de resistência.

Destacaram-se, entre todas as linhagens analisadas, as linhagens GEN 12, GEN 12-2, VC 2, VC 3, UTFB 0022 e UTF 0029; as quatro primeiras por serem as únicas a apresentarem resistência a todos os patótipos analisados que ocorrem no Brasil; as duas últimas por apresentarem suscetibilidade apenas ao patótipo 449 entre os patótipos de ocorrência nacional. MELO *et al.* (2004) avaliaram a reação destas linhagens a sete patótipos de *Phaeoisariopsis griseola*, e observaram que elas apresentaram resistência

frente a cinco dos patótipos. Este resultado mostra que estas linhagens são fontes promissoras de resistência tanto à antracnose, quanto à mancha-angular.

As linhagens LP 98-20, Pérola, UTF 0013, UTF 0019, IAPAR 81 e Carioca 1070 apresentaram suscetibilidade a praticamente todos os patótipos avaliados. A linhagem Pérola tem sido amplamente difundida entre os agricultores devido às suas características de grão e ao bom potencial produtivo, cerca de 4000 kg/ha (EMBRAPA, 2004). Outra linhagem que merece atenção é a Carioca 1070, por ser de ciclo precoce (cerca de 75 dias) que se adequaria muito bem ao cultivo “safrinha” ou cultivo “da seca”. Neste cultivo, quanto menor o ciclo, menor seria o risco da cultura passar por estresses hídricos. A linhagem Talismã apresentou reação de compatibilidade a seis dos 18 patótipos analisados, entre eles patótipos importantes como o 87, representando o comportamento médio das demais linhagens estudadas. Esta linhagem, além de possuir grãos do tipo “carioca”, apresenta boas propriedades culinárias, como tempo médio de cocção de 28 min e 30 s, 9,8% de sólidos solúveis e 23,8% de proteínas (ABREU *et al.*, 2004). Recomendada para o estado de Minas Gerais no ano de 2002 e para o estado do Paraná em 2003 (ABREU *et al.*, 2004), esta linhagem pode ainda ser recomendada para outras regiões do país. No que se refere à produtividade, em avaliações de campo constatou-se que a linhagem Talismã foi, em média, 10,6% superior às testemunhas Carioca e Pérola (sendo este último o cultivar mais plantado no Brasil) (RAMALHO *et al.*, 2002). Assim, seria altamente justificável a introgressão de genes de resistência a doenças em linhagens como a Carioca 1070 e a Talismã.

Tabela 2. Reação de linhagens de feijão a *Colletotrichum lindemuthianum*, sob inoculação artificial.

Material	Patótipo																	
	55	64	65	67	73	75	81	83	85	87	89	95	117	449	453	593	1033	2047
LP 98-20	3,6*	3,7	9	9	7,8	8,3	8,4	7	9	9	7	8,8	8	9	9	9	8	9
LP 98-31	1,4	4,6	9	1	2,3	1,7	1,3	1,5	8	9	1	1,7	1,7	9	1	2,4	2,4	5
LP 98-76	1	9	7,8	1,7	1	1	1	1	8,4	5,5	1,2	2,6	1	7,5	1	1	1	7,9
UTF 0013	5,3	7	3,8	3,7	1,9	4,3	1,5	3,1	9	7,4	2,4	1,8	2,6	9	9	1	9	9
UTF 0037	2,3	3,3	3	3,7	3,7	2,3	1,6	1	1	1	1	1	1,6	2	1,7	3,2	1	9
UTFB 0018	1,4	1,2	2,2	1	1	1	1,5	1	5	4,2	1	1	1	5,8	2,7	1	3,7	9
UTF 0019	4,4	7,4	6,5	8,2	6,7	7,5	6,1	7,2	9	9	7,4	2,4	7,2	9	9	9	9	9
UTFB 0022	1	1,6	1,6	1	1	1,7	1	1,8	1,6	1,9	1	1	1,7	5,2	1	1	1	9
UTF 0029	2	1,4	2,4	2,3	2	1,7	1,3	1	1	2,2	1,6	1,7	2,3	5,2	1	1	3,0	9
UTF 0030	1,7	1,5	4,5	3	2	1,5	2,2	2,1	6,1	2,3	3	5	1,7	6,3	3	1	8	7,6
UTF 0031	1,3	1,5	1,5	1	1,7	1,7	1	1,7	6,3	5	1	1	1	7,4	5	5,1	9	9
Vi 0699C	1	3,8	8,3	1	1,4	1	1	1	8,6	8	1	1	1,5	9	1	1	1	9
Vi 4599C	1,3	5,5	9	5	6,6	5,7	4,6	3,8	9	9	2,8	3,5	6,4	5	4,3	1	9	8
Vi 4899C	1	4,6	9	1,7	1,9	1,2	1	2,2	9	9	1	1	1	9	9	1	1	9
VC 2	1,4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,3	1	1,6	1	1	1	3,2	9
VC 3	1	1	1	1	1	1,7	1	1	1	2,1	1,7	1	1	1,2	1	1	7	9
VC 4	1,8	1,3	1,7	1,8	1,7	4,3	1	2,2	1	8	1,5	1,7	2,8	2,3	2,8	1	9	8
VC 5	1	1,2	1	1	1	7,5	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	3,7	9
GEN 12	1,2	1	1	1,7	1	1	1,7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
GEN 12-2	1	1	1	1	1,5	1	1	2,3	1	1	1	1	2,2	1	1	1	3,8	9
Talismã	1,4	1	3,1	1	1	1	1	2	9	4	1	1	1	9	9	1	9	9
CNFC 8017	1	1,2	2,3	1	1	1,2	1,6	1	9	9	1	1,7	1	9	9	1,2	8	9
CNFC 9437	1	9	9	1	1	1	1	1	8	9	1	1	1	9	1	1	1	8,3
CNFC 9500	1,2	6,5	9	1	1,2	1	1	1	8	9	1	1	1	9	2,6	1	1	9
OPS 82	1	1,2	9	1	1	1	1,7	1	8	7	1	1,6	1	9	1	1	1	9
LH 11	1	1	1,2	1	1	2,1	1,4	1,2	8	1	1	1,2	1	9	9	1	1,1	4,6
FT Bonito	1,2	1	3,7	1	1	1,4	1	1	9	1,9	1	2	1	9	1	1	9	9
IAPAR 81	5,9	1,7	4,8	4,3	2,4	5,5	5,7	2,2	9	5,7	5	3,7	5,7	9	8	7	4,8	6,4
Carioca1070	8	1	9	4,2	1,7	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9	9	1,8	3,6
Pérola	3,6	1,5	9	7,7	4	9	9	7	9	9	6,5	9	9	9	9	9	6,2	6
TO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	9	5	3	9
AB 136	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,7	9
G 2333	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ouro Negro	1	2	9	2,3	1	1	1	1	8	9	1	1	1	9	1	1	1	9
AND 277	6	1	1	1	1	1	1	1	7	6	1	1	1	1	1	1	1	1

*Grau de severidade da doença (média da avaliação de 12 plantas). Linhagens com média igual ou superior a 3,6 foram consideradas como suscetíveis.

Apesar dos genótipos utilizados nesse estudo constarem de linhagens já bastante avançadas, algumas comportaram-se como multilinhas frente aos vários patótipos testados. Neste caso, algumas plantas da mesma linhagem mostraram resistência com nota mínima (grau 1) e outras suscetibilidade com notas máximas (grau 8 ou 9) a um mesmo patótipo.

Duas seriam as explicações para esse comportamento, primeiramente o simples fato de uma possível contaminação das linhagens em experimentos de campo ou simplesmente nas suas multiplicações. A segunda explicação seria a falta de testes de progênie relacionados à reação das linhagens frente a estes patótipos, no processo de condução das famílias realizado pelos programas de melhoramento. Isso se torna mais evidente quando são observadas as reações dos cultivares testemunhas TO, AB 136, G 2333, Ouro Negro e AND 277, os quais apresentaram reações praticamente invariáveis entre as plantas de um mesmo cultivar. Este fato é explicável, uma vez que esses cultivares vêm sendo multiplicados por vários ciclos em condições de casa-de-vegetação, sem riscos de contaminações.

Seria recomendável que um trabalho de purificação, no intuito de selecionar as plantas com maior espectro de resistência, fosse conduzido nas linhagens que comportaram-se como multilinhas frente aos patótipos estudados.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a maioria das linhagens de feijoeiro de grão tipo “carioca” avaliada, não apresenta níveis satisfatórios de resistência à antracnose, mostrando a necessidade de maior empenho dos programas de melhoramento no sentido de desenvolverem cultivares com espectros de resistência mais amplos. Por outro lado, conclui-se que tem havido progresso significativo, no que tange ao espectro de resistência das linhagens de grãos tipo “carioca”, lançadas nos ensaios de valor de cultivo e uso regionais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E.S.; GONÇALVES, F.M.A.; SANTOS, J.B.; PELOSO, M.J.D.; FARIA, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; PEREIRA FILHO, I.A. “BRSMG Talismã”: common bean cultivar with carioca grain type. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:319-320, 2004.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:173-174, 2003b.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; PELOSO, M.J. Del; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agrícola**, 60:283-290, 2003c.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 50-53, 1997.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.
- BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:1038-1047, 1998.
- CARVALHO, G.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHKE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23:482-485, 1998.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da agropecuária, Ano XIV, n^o 01. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf>>. Acesso em: fev. de 2005.

EMBRAPA Arroz e Feijão. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão>>. Acesso em: dez. de 2004.

FALEIRO, F. G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* avar. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro.** Viçosa, MG, UFV, 1997. 65 p. (Tese de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

FALEIRO, F.G.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BARROS, E.G.; FREITAS, M.A.S.; MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21:123-125, 1996.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; VINHADELLI, W.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18, 1999.

FALEIRO, F.G.; 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.

LANZA, M.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; VINHADELLI, W.S.; MORANDI, M.A.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 22:560-562, 1997.

McROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.

MELO, C.L.P.; CARNEIRO, J.E.S.; RAGAGNIN, V.A.; CRUZ, L.C.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Evaluation of common bean elite lines developed in Brazil for angular leaf spot resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 231-232, 2004.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR., T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, 45:567-571, 1998.

PASTOR-CORRALES M. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ FERNÁNDEZ and SCHOONHOVEN (eds) **Frijol: Investigación y Producción.** Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali Colombia, p 172-180, 1985.

- PASTOR-CORRALES, M. A. Recomendaciones y acuerdos del *primer taller de antracnosis en América Latina*. In: PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PELOSO, M.J. Del. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed.). **La antracnosis Del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, 1992. p. 86-108. (Doc de trabajo, 113)
- RAGAGNIN, V.A.; ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; ARRUDA, K.M.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596, 2003.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S.; GONÇALVES, F.M.A.; SANTOS, J.B.; PELOSO, M.J. Del; FARIA, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; PEREIRA FILHO, I.A. **O “Talismã” de sua lavoura de feijoeiro**. Goiânia, GO. EMBRAPA - Arroz e Feijão, 2002. (Comunicado Técnico 36).
- RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19:167-172, 1994.
- SARTORATO, A. Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas 1, 2001, **Resumos**.Goiânia:GO, 2001. CD-Room, Resumo 26.
- SINGH, S.P. Bean Genetics. In: SCHOONHOVEN, A., VOYSEST, O. (Ed). **Common Beans: Research for crop improvement**. Cali: CAB international-CIAT. p. 199-247, 1990.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; FERNANDEZ, F.R.; ISHIKAWA, F.H. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão-comum em Minas Gerais. In: **VII congresso nacional de pesquisa de feijão**. Viçosa, MG. p. 187-189, 2002. (Resumo)
- THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.
- VIEIRA, C. Resistência horizontal às doenças e diversidade genética no melhoramento do feijoeiro no Brasil. **Revista Ceres**, 19:261-279, 1972.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.
- 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 2

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO CONTENDO OS GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE *Co-4²* E *Co-5*

1. INTRODUÇÃO

A antracnose, elicitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib., é uma das doenças mais destrutivas que afetam o feijoeiro comum, no Brasil e no mundo (PASTOR-CORRALES, 1985).

O cultivar G 2333, um dos doze cultivares diferenciadores internacionais para antracnose do feijoeiro, é um dos mais resistentes a este patógeno. Uma coleção de 380 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, provenientes de diferentes partes do mundo mostraram incompatibilidade frente a este cultivar (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994, RAVA *et al.*, 1994; THOMAZELLA *et al.*, 2000). Até o presente momento, não há relatos na literatura de patótipos de ocorrência nacional que tenham conseguido quebrar a resistência do cultivar G 2333.

Estudos genéticos indicam que o cultivar G 2333 possui três genes de resistência com herança independente: *Co-4²* (alelo do *Co-4*), *Co-5* e um terceiro gene ainda não completamente caracterizado, preliminarmente denominado de *Co-7* (YOUNG *et al.*, 1998). Devido ao seu amplo espectro de resistência, este cultivar vem sendo utilizado em vários programas de melhoramento visando resistência à antracnose.

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO tem se concentrado na piramidação de genes de resistência aos patógenos, utilizando como genitor recorrente o cultivar Rudá, de grão tipo carioca e porte ereto.

Numa primeira etapa, a ênfase do programa do BIOAGRO foi à obtenção de isolinhas resistentes à antracnose, ferrugem e mancha-angular, por meio de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares. Para a antracnose uma das fontes de resistência utilizada foi o cultivar G 2333.

Tendo em vista o número de genes de resistência à antracnose do cultivar G 2333, este programa objetivou inicialmente gerar isolinhas do cultivar Rudá, contendo genes individuais provenientes do cultivar G 2333. Durante o processo de piramidação de genes é fundamental a obtenção de isolinhas portadoras de genes isolados e identificados para posteriores intercruzamentos. As inoculações com patótipos conhecidos aos quais os genes apresentam suscetibilidade é uma alternativa, porém, nem sempre esses patótipos estão disponíveis nos programas de melhoramento. Neste caso, o uso de marcadores moleculares previamente identificados como ligados a um determinado gene pode auxiliar no processo de seleção. Com base no exposto, em trabalhos anteriores, populações RC₃F₄ (contendo o gene *Co-4*²) e RC₁F₃ (contendo o gene *Co-5*), derivadas do cruzamento entre Rudá e G 2333 foram selecionadas com base em marcadores moleculares RAPD ligados aos genes *Co-5* (OPB03_{450C}) e *Co-4*² (OPAS13_{950C}).

Visando dar continuidade a esse programa de melhoramento, o presente trabalho teve como objetivo geral obter linhagens resistentes e geneticamente mais próximas do genitor recorrente Rudá, oriundas do cruzamento Rudá x G 2333.

Os objetivos específicos deste trabalho foram: (i) selecionar linhagens derivadas do cruzamento Rudá x G 2333, homozigotas resistentes para os genes *Co-4*² e *Co-5*; (ii) determinar por meio de marcadores RAPD a distância genética entre linhagens RC₁F₅, provenientes do cruzamento entre os cultivares Rudá e G 2333 que possuem o gene *Co-5*, em relação ao progenitor recorrente Rudá; e (iii) determinar o espectro de resistência destas linhagens a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, em uma primeira etapa, 10 famílias RC₃F₄ e mais 10 famílias RC₁F₃ foram abertas em teste de progênie, para que pela inoculação com o patótipo 89 do agente causal da antracnose, fossem identificadas as famílias que apresentassem os genes fixados. Na segunda etapa, padrões de amplificação de bandas DNA (*fingerprint*) foram utilizados para selecionar plantas RC₁F₅, que além de possuírem o gene *Co-5*, apresentassem uma maior proporção do genoma do genitor recorrente Rudá. Por fim, gerações avançadas das famílias que possuem os genes de resistência em homozigose foram submetidas a uma caracterização fenotípica frente a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum*.

2.1. Material genético

Os genótipos utilizados nos testes de progênie constam dos genitores testemunhas G 2333 (resistente), Rudá (suscetível), juntamente com 10 famílias RC₃F₄ e 10 famílias RC₁F₃, derivadas de cruzamentos entre estes cultivares.

Na caracterização fenotípica utilizou-se as linhagens RC₃F₇ e RC₁F₅, contendo, respectivamente, os genes *Co-4²* e *Co-5*. As mesmas linhagens RC₁F₅ foram também utilizadas para a determinação da distância genética, com vista a identificação das mais próximas do genitor recorrente Rudá.

Semeou-se, em média, 12 sementes de cada genótipo para cada raça de *C. lindemuthianum* avaliada. As sementes foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 L, contendo uma mistura de solo, esterco curtido e adubo formulado 4-14-8. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação.

2.2. Patótipos

O patótipo 89 de *C. lindemuthianum* foi utilizado na seleção das linhagens homozigotas resistentes para os genes *Co-4*² e *Co-5*. Na caracterização fenotípica foram utilizadas os patótipos 7, 55, 64, 65, 73, 81, 87, 89, 119, 453, 1033 e 2047 de *C. lindemuthianum*.

2.3. Crescimento, inoculação do fungo e avaliação da doença

Os procedimentos de inoculação e avaliação da doença deram-se de acordo com o exposto nos itens 2.4 e 2.5 do capítulo 1.

2.4. Extração de DNA

Foi coletada uma folha primária de cada uma das linhagens RC₁F₅ e dos progenitores. Estas foram conservadas a -80⁰C, para posterior extração de DNA. A extração de DNA das folhas realizou-se com base no protocolo descrito por DOYLE & DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995).

2.5. Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada segundo a técnica de RAPD-PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990), utilizando-se o termociclador Perkin-Elmer modelo 9600. Cada ciclo de amplificação dos fragmentos de DNA foi constituído de uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de ligação do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) ao DNA molde, a 35°C por 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. Depois de 40 ciclos, foi efetuada a última etapa de extensão a 72°C por 7 minutos. Cada reação de amplificação de 25 µl continha 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,0 mM de MgCl₂; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 mM de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA); e uma unidade de *Taq* DNA polimerase.

Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra 2 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética deu-se durante um período de cerca de 3 h, a 110 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados

sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) e analisados posteriormente.

2.6. Identificação de *primers* polimórficos e avaliação de distâncias genéticas

Para a identificação dos *primers* polimórficos, necessários na determinação da distância genética das linhagens, foram testados aleatoriamente entre os progenitores, aproximadamente 120 *primers* RAPD.

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

As distâncias genéticas entre os genitores e as linhagens foram determinadas com base nos padrões de bandas de DNA, pelo método euclidiano para dados binários, com auxílio do programa *Statistic* (*STATISTIC PROGRAM* - STATSOFT, Inc., 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de progênie

A verificação de homozigose para o gene *Co-5* das famílias RC₁F₃ e para o gene *Co-4*² das famílias RC₃F₅, após inoculação com o patótipo 89, deu-se a partir da análise dos sintomas de antracnose de cada planta. Das dez famílias RC₁F₃ avaliadas, quatro apresentaram todas as plantas resistentes ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, o que permite inferir que estas quatro famílias possuem o loco do gene *Co-5* em homozigose (Tabela 1).

Tabela 1. Proporção de plantas resistentes e suscetíveis nas famílias RC₁F₃ de Rudá x G 2333.

Plantas RC ₁ F ₃ (Rudá x G 2333)	Número de plantas		Observações
	Resistentes	Suscetíveis	
1-7	6	4	Heterozigota
1-13	7	3	Heterozigota
1-16	5	2	Heterozigota
1-25	9	1	Heterozigota
1-28	6	4	Heterozigota
1-36	11	1	Heterozigota
1-37	27	0	Homozigota
1-38	26	0	Homozigota
1-42	26	0	Homozigota
1-46	24	0	Homozigota

Todas as plantas das dez famílias RC₃F₅ analisadas foram resistentes ao patótipo 89 *C. lindemuthianum*, comprovando assim a homozigosidade do gene *Co-4*², nestas famílias (Tabela 2).

As dez famílias contendo o gene *Co-4*² foram selecionadas, por possuírem grãos com características bastante similares ao do cultivar Rudá, como a cor creme com rajas marrons e halo claro. Estas famílias foram avançadas, por autofecundações, por mais

duas gerações, ou seja, até a RC_3F_7 , para que então fosse feita a caracterização fenotípica.

Apesar de terem sido identificadas quatro famílias com o gene *Co-5* em homozigose (1-37, 1-38, 1-42 e 1-46), apenas dentro da família 1-46 foram identificadas plantas com características de grãos tipo carioca aceitáveis comercialmente. Dentro desta família, foram selecionadas sete plantas com boas características de grãos, as quais foram avançadas, por autofecundações, por mais duas gerações, ou seja, até a RC_1F_5 , para que então fosse feita a determinação da distância genética e a caracterização fenotípica.

Tabela 2. Proporção de plantas resistentes e suscetíveis nas famílias RC_3F_5 de Rudá x G 2333.

Plantas RC_3F_5 (Rudá x G2333)	Número de plantas		Observações
	Resistentes	Suscetíveis	
19-1-1-1	13	0	Homozigota
19-1-1-2	10	0	Homozigota
19-1-1-3	10	0	Homozigota
19-1-1-4	11	0	Homozigota
19-1-1-5	10	0	Homozigota
19-1-1-6	10	0	Homozigota
19-1-1-7	13	0	Homozigota
19-11-1-1	12	0	Homozigota
19-11-1-3	12	0	Homozigota
19-11-1-2	12	0	Homozigota

3.2. Determinação da distância genética

Dos 120 *primers* testados, 36 foram polimórficos entre os genitores, gerando um total de 61 polimorfismos. Os *primers* RAPD identificados como polimórficos foram os seguintes: OPA-20, OPAA-18, OPAK-16, OPAS-06, OPAS-09, OPAS-12, OPAS-14, OPAT-20, OPAU-11, OPAV-11, OPAV-14, OPAW-07, OPAW-19, OPAX-01, OPAX-02, OPAX-05, OPAX-06, OPAX-09, OPAX-11, OPAX-14, OPAY-10, OPAY-11, OPBE-02, OPBE-05, OPBE-19, OPBE-20, OPBF-08, OPBF-09, OPBF-10, OPBF-15, OPBF-16, OPBF-19, OPBG-07, OPBG-15, OPBH-01 e OPBH-20.

Como exemplo, na Figura 1, podem ser visualizados os produtos das ampliações, obtidos com o *primer* OPBG-07, do DNA dos genitores Rudá, G 2333 e das linhagens RC_1F_5 resultantes deste cruzamento.

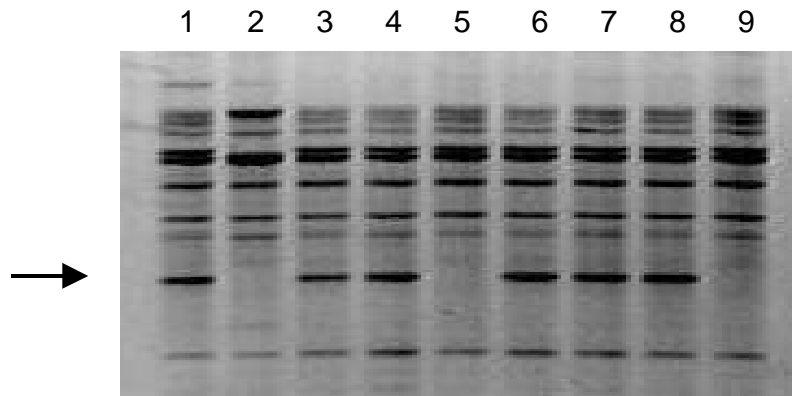


Figura 1. Análise eletroforética de produtos de amplificação do DNA dos cultivares Rudá (1), G 2333 (2) e linhagens RC₁F₅ (3-9) obtida com o *primer* OPBG-07. A seta indica a banda polimórfica entre os genitores.

As distâncias genéticas relativas, com base nos marcadores RAPD, entre as plantas RC₁F₅ e o genitor recorrente Rudá, variaram de 27 a 40%. A Tabela 3 mostra as distâncias genéticas relativas, entre progenitor doador G 2333, o genitor recorrente Rudá e as linhagens RC₁F₅.

O uso de marcadores moleculares possibilitou identificar, entre as plantas portadoras do gene *Co-5*, aquelas que possuem a maior porção do genoma do parental recorrente, no caso, as plantas RC₁F₅ 1-46-5 e 1-46-7, que apresentaram recuperação do genoma recorrente, superior a 72%.

Tabela 3. Distâncias genéticas relativas entre os cultivares Rudá, G 2333 e linhagens RC₁F₅.

	G 2333	1-46-1	1-46-2	1-46-3	1-46-5	1-46-6	1-46-7	1-46-8
RUDÁ	1	0,311475	0,409836	0,377049	0,278689	0,295082	0,278689	0,344262
G 2333	0	0,688525	0,590164	0,622951	0,721312	0,704918	0,721312	0,655738
1-46-1		0	0,131148	0,163934	0,065574	0,04918	0,098361	0,163934
1-46-2			0	0,196721	0,131148	0,114754	0,196721	0,196721
1-46-3				0	0,196721	0,213115	0,163934	0,196721
1-46-5					0	0,016393	0,098361	0,131148
1-46-6						0	0,114754	0,147541
1-46-7							0	0,065574
1-46-8								0

3.3. Caracterização fenotípica

A inoculação das linhagens RC₃F₇ e RC₁F₅ com os 12 patótipos de *C. lindemuthianum* demonstrou que as linhagens de grãos tipo carioca, derivadas do cruzamento entre o cultivar G 2333 e Rudá, possuem amplo espectro de resistência, pois todas as linhagens contendo o gene *Co-4*² apresentaram resistência frente a todos os patótipos avaliados; as linhagens contendo o gene *Co-5* apresentaram suscetibilidade apenas às raças estrangeiras 1033 e 2047 (Tabela 4).

Este mesmo espectro de resistência foi observado para os cultivares de feijoeiro não adaptados e de grãos pretos Seleção 1308 e TU, que possuem os mesmos genes de resistência *Co-4*² e *Co-5*, respectivamente (ARRUDA *et al.*, 2001; RAVA *et al.*, 1994).

O gene *Co-4*², presente nos cultivares G 2333 e Seleção 1308, linhagem derivada de G 2333, é tido como o mais efetivo alelo de resistência à antracnose, entre os já caracterizados, sendo o único capaz de conferir resistência ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, identificado na Costa Rica e tido como um dos mais virulentos do mundo (BALARDIN, 1997; BALARDIN e KELLY, 1998; ARRUDA *et al.*, 2001).

O gene *Co-5*, presente nos cultivares ESAL 696, G 2333 e TU, confere resistência a todos os patótipos de *C. lindemuthianum* encontrados no Brasil, com exceção do patótipo 585 (RAVA *et al.*, 1994).

A maioria das linhagens segregou para o patótipo 453, apresentando plantas resistentes e plantas com notas baixas, nunca superiores ao grau 4. Para este patótipo, apenas as linhagens 1-46-7 e 1-46-8, portadoras do gene *Co-5*, apresentaram o total das plantas avaliadas com nota mínima. Em relação às linhagens portadoras do gene *Co-4*², a linhagem 19-1-1-7 foi a que apresentou o melhor espectro de resistência, com nota média de apenas 1,5 frente ao patótipo 453.

Os dados relacionados à distância genética e à reação aos vários patótipos testados mostram que as linhagens 1-46-7 (*Co-5*) e 19-1-1-7 (*Co-4*²) são as mais apropriadas para serem usadas no programa de piramidação de genes de resistência a doenças do feijoeiro, conduzido pelo BIOAGRO/UFV.

Tabela 4. Reação de linhagens RC₁F₅ e RC₃F₇ do cruzamento Rudá x G 2333 a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum*.

Material	Patótipo											
	7	55	64	65	73	81	87	89	119	453	1033	2047
RC₁F₅												
1-46-1	1*	1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	9	9
1-46-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	9	9
1-46-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	9	9
1-46-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,3	9	9
1-46-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,9	9	9
1-46-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9
1-46-8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9
RC₃F₇												
19-11-1-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
19-11-1-2-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,1	1	1
19-11-1-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,9	1	1
19-1-1-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
19-1-1-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,5	1	1
19-1-1-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,3	1	1
19-1-1-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,7	1	1
19-1-1-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2	1	1
19-1-1-6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,1	1	1
19-1-1-7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1	1
Testemunha												
RUDÁ	5,8	3,3	8	9	8	9	4	9	9	7	9	9
G 2333	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* Grau de severidade da doença (média da avaliação de 12 plantas). Linhagens com média igual ou superior a 3,6 foram consideradas como suscetíveis.

4. CONCLUSÕES

Foram obtidas linhagens adaptadas de grão tipo “carioca”, geneticamente similares ao cultivar Rudá contendo separadamente e em homozigose os genes de resistência à antracnose *Co-4²* e o *Co-5*, presentes no cultivar G 2333.

As linhagens obtidas apresentam amplo espectro de resistência ao agente causal da antracnose, destacando-se a linhagem 19-1-1-7, portadora do gene *Co-4²*, que apresentou resistência a todas as raças avaliadas. Isso evidencia o grande potencial dessas linhagens como fonte de resistência à antracnose (genes *Co-5* e *Co-4²*) e mesmo como material promissor para recomendação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18:265-273, 1995.
- ARRUDA, K.M; ALZATE-MARIN, A.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização dos cultivares de feijoeiro Ouro Negro e Sel. 1308 com raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira** 26 (suplemento):381. XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, SP, Brasil, 2001.
- BALARDIN, R.S. Traditional and molecular characterization of variability in *Colletotrichum lindemuthianum*. **PhD Thesis**, Michigan State University, Michigan, 1997.
- BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:1038-1047, 1998.
- DOYLE, J, J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.
- PASTOR-CORRALES M. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ FERNÁNDEZ e SCHOONHOVEN (eds) **Frijol: Investigación y Producción**. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali Colombia, p. 172-180, 1985.
- PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. **Plant Disease**, 78: 959-962, 1994.
- RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19:167-172. 1994.
- STATSOFT, INC. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK, 1995.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.

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

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

PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM UM CULTIVAR DE FEIJÃO DE GRÃO TIPO CARIOCA

1. INTRODUÇÃO

Várias estratégias podem ser usadas no controle de doenças, entretanto o uso de cultivares geneticamente resistentes é tido como o método mais efetivo, barato e fácil de ser adotado pelos produtores (SARTORATO, 2001). A principal desvantagem no uso de cultivares resistentes é a possível quebra da resistência, causada pelo surgimento de novos patótipos do patógeno (McDERMOTT, 1993). O agente causal da antracnose do feijoeiro, *Colletotrichum lindemuthianum*, é um patógeno de alta variabilidade (BALARDIN e KELLY, 1998; SHARMA *et al.*, 1999; SICARD *et al.*, 1997; TALAMINI *et al.*, 2002), e não há nenhum gene de resistência que seja efetivo contra todos os patótipos conhecidos deste patógeno.

Várias estratégias de melhoramento têm sido utilizadas para incorporar resistência a uma série de patógenos que atacam a cultura do feijoeiro. A piramidação, uma estratégia que requer uma completa compreensão da estrutura da população do patógeno e da efetividade dos genes de resistência disponíveis, consiste na combinação ou introdução de diferentes genes de resistência em um único cultivar, normalmente um cultivar elite. Esta estratégia tem sido sugerida para aumentar tanto o espectro quanto a durabilidade da resistência às doenças (BALARDIN e KELLY, 1998; MAHUKU *et al.*, 2002). Trabalhos recentes têm demonstrado que o acúmulo de genes de resistência

confere maior resistência ao cultivar do que a soma da resistência observada nas linhagens paternas (YOSHIMURA *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001).

Em trabalhos anteriores do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV priorizou-se a identificação, caracterização e incorporação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar Rudá, de grãos tipo carioca. Posteriormente, as isolinhas contendo individualmente os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), mancha-angular (*Phg-1*) e ferrugem (*Ur-ON*) foram intercruzadas e obtidas linhagens piramidadas para esses genes, denominadas de linhagens Rudá “R” (RAGAGNIN, 2004). Contudo, em relação à antracnose, outros genitores apresentaram altos níveis de resistência. É o caso, por exemplo, da linhagem G 2333 portadora dos genes *Co-4²*, *Co-5* e *Co-7*. Trabalhos conduzidos por esse mesmo programa mostraram que linhagens que contêm, em separado, os genes *Co-5* e *Co-4²* do cultivar G 2333, apresentam um amplo espectro de resistência aos patótipos de *C. lindemuthianum* identificados, até o momento, no Brasil. As linhagens que possuem o alelo *Co-4²* apresentaram resistência a todos os patótipos testados, inclusive patótipos de alta virulência como o patótipo 2047, identificado na Costa Rica (BALARDIN, 1997; BALARDIN e KELLY, 1998; ARRUDA *et al.*, 2001). Atualmente, com o auxílio de marcadores moleculares estreitamente relacionados aos genes de resistência, é possível piramidar esses genes em cultivares elites com boas características agrônomicas.

Uma vez que o alelo *Co-4²* é reconhecido como o mais efetivo entre os genes de resistência à antracnose já caracterizados (AWALE e KELLY, 2001; BALARDIN e KELLY, 1998; YOUNG *et al.*, 1998), seria de grande valor piramidá-lo com outros genes que conferem resistência a doenças do feijoeiro.

O objetivo deste trabalho foi a introgressão de dois genes de resistência à antracnose (*Co-5* e *Co-4²*), em uma isolinha do cultivar de feijão tipo “carioca” Rudá, que já possui piramidados alguns genes de resistência à ferrugem, mancha-angular e à própria antracnose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os cruzamentos foram realizados em condições de casa-de-vegetação, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Sementes de cada genótipo, em cada geração obtida, foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 L contendo uma mistura de solo, esterco curtido e adubo formulado 4-14-8.

A parte referente à seleção assistida dos alelos de resistência aos patógenos, utilizando marcadores moleculares, foi realizada no laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

2.2. Material genético

As linhagens utilizadas como genitoras neste trabalho foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Nos últimos anos, este programa tem se concentrado na piramidação de genes de resistência a doenças foliares de origem fúngica como a antracnose, a ferrugem e a mancha-angular, com auxílio de marcadores moleculares. Ao longo desse processo, várias isolinhas foram desenvolvidas, principalmente no *background* “carioca” Rudá. Essas isolinhas foram obtidas por retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares, a partir de cruzamentos originais feitos entre o cultivar suscetível Rudá e os genitores doadores Ouro Negro, AB 136, TO, G 2333 e AND 277.

Em trabalhos anteriores, quatro linhagens obtidas inicialmente foram intercruzadas, concentrando os genes de resistência *Phg-1*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Ur-ON* numa linhagem denominada Rudá “R” (RAGAGNIN, 2004) (Tabela 1).

Este trabalho consistiu em dar continuidade ao programa de melhoramento do BIOAGRO, visando a piramidação de dois novos genes de resistência à antracnose,

oriundos do cultivar G 2333, na linhagem Rudá “R”, previamente obtida. Para tal propósito, foram selecionadas dentro de populações derivadas do cruzamento do genitor recorrente Rudá com o genitor doador G 2333, duas linhagens, uma contendo o gene *Co-5* (linhagem G 1-46-7) e outra contendo o gene *Co-4²* (linhagem G 19-1-1-7) (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens fontes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, selecionadas para serem utilizadas no programa de piramidação de genes de resistência do BIOAGRO/UFV.

Linhagem	Genealogia	Doença	Genes de Resistência
Rudá “R”	Rudá/AND 277/TO/ AB 136/Ouro Negro	Mancha-angular, Antracnose e Ferrugem	<i>Phg-1, Co-4, Co-6, Co-10 e Ur-ON</i>
G-1-46-7	Rudá/G 2333	Antracnose	<i>Co-5</i>
G-19-1-1-7	Rudá/G 2333	Antracnose	<i>Co-4²</i>

2.3. Obtenção das populações segregantes

Em uma primeira etapa, as combinações foram realizadas de forma direcionada, em dois esquemas de cruzamentos conduzidos separadamente, em que a linhagem Rudá “R” foi o genitor doador de pólen. Destes cruzamentos foram obtidos dois híbridos simples F₁ (G-1-1-7 x Rudá “R”) e F₁ (G-19-1-1-7 x Rudá “R”).

Tendo-se em vista que o material proveniente do cultivar G 2333 é suscetível e que a linhagem Rudá “R” é resistente ao agente causal da mancha-angular, as plantas F₁ dos dois cruzamentos foram avaliadas em relação à resistência à mancha-angular, com o objetivo de confirmar se os híbridos eram verdadeiros. Os híbridos que apresentaram resistência à mancha-angular foram selecionados, para serem inter cruzados, objetivando agrupar todos os genes de resistência em um único genótipo. As plantas obtidas desse inter cruzamento (híbrido duplo) foram avaliadas quanto à presença dos genes, por meio de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência.

Após a obtenção do híbrido duplo, em todas as gerações foram utilizados marcadores moleculares ligados aos genes de resistência (Tabela 2), para que se procedesse a seleção. A partir do híbrido duplo, a população foi conduzida utilizando-se o método genealógico.

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

As inoculações com *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha-angular, foram realizadas em duas etapas da condução do trabalho. Inicialmente, na identificação de híbridos simples verdadeiros, provenientes dos cruzamentos das linhagens G-1-1-7 x Rudá “R” e G-19-1-1-7 x Rudá “R”; posteriormente, na eliminação de plantas F₂ que não possuíam o gene *Phg-1*; reduzindo assim, o número de plantas a serem analisadas com os marcadores moleculares.

2.4.1. Patótipo de *Phaeoisariopsis griseola* utilizado na inoculação

O isolado 55.1 (raça 31.24) de *Phaeoisariopsis griseola* utilizado neste trabalho foi classificado por NIETSCHÉ (2000). Esta cultura é mantida na micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Este patótipo foi escolhido de acordo com os resultados de uma inoculação prévia realizada nas linhagens Rudá “R”, G 1-46-7 e G 19-1-1-7, com alguns isolados de *Phaeoisariopsis griseola*; que mostraram que a linhagem Rudá “R” comporta-se como resistente (grau 1) e as linhagens G 1-46-7 e G 19-1-1-7 comportam-se como suscetíveis (grau 9).

2.4.2. Crescimento e inoculação do fungo

Para o preparo do inóculo, um disco de meio BDA, contendo micélio do fungo foi macerado em tubo contendo água estéril. A suspensão resultante foi distribuída uniformemente em placas de petri contendo meio de cultura constituído de molho de tomate, Ágar e CaCO₃. As placas foram incubadas em BOD a 24°C, durante 14 dias, até que o fungo esporulasse. O inóculo foi preparado a partir destas placas, adicionando-se água destilada às placas e raspando-se a superfície das mesmas com uma espátula.

A inoculação foi realizada após o aparecimento da segunda folha trifoliolada, sobre a qual uma suspensão de conídios do patógeno, previamente preparada e ajustada para concentração de 2×10^4 conídios/ml de água, foi aspergida em ambas as superfícies do primeiro par de folhas trifolioladas, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro (20 ± 2°C e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação (20 ± 5°C), onde permaneceram até o momento da avaliação.

2.4.3. Avaliação dos sintomas da mancha-angular

A severidade da mancha angular foi avaliada visualmente aos 18 e 25 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995), em que: 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 25-30% da área foliar, geralmente associadas a tecidos cloróticos, os quais podem coalescer e formar extensas áreas infectadas; 9- sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentarem graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.5. Seleção por meio de marcadores moleculares

Os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular foram utilizados em duas etapas: (i) na identificação das plantas F_1 do híbrido duplo, resultante do intercruzamento dos híbridos simples, que apresentasse marcas para todos os genes envolvidos no processo de piramidação; (ii) na avaliação das plantas F_2 resultantes da autofecundação do híbrido duplo, que apresentasse resistência ao agente causal da mancha-angular. Na Tabela 2 estão descritos os marcadores utilizados, a fase de ligação e a distância destes em relação aos genes de resistência.

Tabela 2. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular, utilizados no processo de seleção.

Marcador	Distância (cM) e Fase	Gene de Resistência	Fonte de Resistência	Referências
SCAR Y20 _{830a} *	1,2 – acoplamento	<i>Co-4</i>	TO	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
OPAS13 ₉₅₀ *	11,2 – acoplamento	<i>Co-4</i> ²	G 2333	YOUNG <i>et al.</i> (1998)
SCAR AB3 ₄₀₀	16,4 – acoplamento	<i>Co-5</i>	G 2333	VALLEJO e KELLY (2001)
SCAR AZ20 _{845a}	7,1 – acoplamento	<i>Co-6</i>	AB 136	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCAR F10 ₁₀₅₀	6,5 – acoplamento	<i>Ur-ON</i> e <i>Co-10</i>	Ouro Negro	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SCAR BA8 _{560a}	2,2 – acoplamento	<i>Ur-ON</i> e <i>Co-10</i>	Ouro Negro	CORRÊA <i>et al.</i> (2000)
SCAR H13 _{520a}	5,6 – acoplamento	<i>Phg-1</i>	AND 277	QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)

* Estes marcadores geram bandas tanto nos genótipos que possuem o gene *Co-4*, como nos que possuem o alelo *Co-4*².

2.5.1. Extração de DNA

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

2.5.2. Análise com RAPD

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção por meio da análise da presença de marcadores moleculares ligados à resistência foram amplificadas pela técnica de RAPD de acordo com WILLIAMS *et al.* (1990). Os *primers* foram adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

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

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 1,5 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada durante um período de aproximadamente três horas, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotodigitalizadas sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.5.3. Análise com SCAR

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR em uma mistura de reação de 25 µl, contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios de RAPD, exceto em relação aos *primers*, que para esta técnica foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* SCAR específico (Tabela 2). O termociclador foi programado para 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 65°C (SCAR Y20, F10 e AB03) ou 60°C (SCAR AZ20 e BA08) ou 59°C (SCAR H13) por 1 minuto e 72°C por 90 segundos. Após os 35 ciclos, foi feita uma etapa de extensão de 7 minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

2.6. Seleção por meio de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum*

A inoculação com *C. lindemuthianum*, agente causal da antracnose, foi realizada na última etapa de condução deste trabalho, com o propósito de distinguir entre as plantas F₂, que apresentasse marcas relacionadas a todos os genes de resistência, aquelas que possuíam o alelo *Co-4*² daquelas que possuíam o alelo *Co-4*. Para isto, foram avaliadas as progênes das plantas F₂ que apresentaram marcas relacionadas a todos os genes de resistência. De cada planta F₂ foram semeadas, em bandejas plásticas, dez sementes F₃.

2.6.1. Patótipo de *C. lindemuthianum* utilizado na inoculação

O patótipo utilizado para tal propósito foi o patótipo 2047, originário da Costa Rica e caracterizado por BALARDIN *et al.* (1997). A cultura original deste patótipo foi fornecida pelo Dr João Bosco dos Santos, da Universidade Federal de Lavras.

Este patótipo foi escolhido de acordo com os resultados de uma inoculação prévia realizada nas linhagens Rudá “R”, G 1-46-7 e G 19-1-1-7, com alguns isolados de *C. lindemuthianum* de alta virulência; as linhagens Rudá “R” e G 1-46-7

comportaram-se como suscetíveis (grau 9) e a linhagem G 19-1-1-7 (gene *Co-4*²) comportou-se como resistente (grau 1) ao patótipo 2047. Vale salientar que este é o único patótipo disponível, capaz de distinguir as plantas que possuem o gene *Co-4*² das que possuem o gene *Co-4*.

2.6.2. Crescimento e inoculação do fungo e avaliação dos sintomas

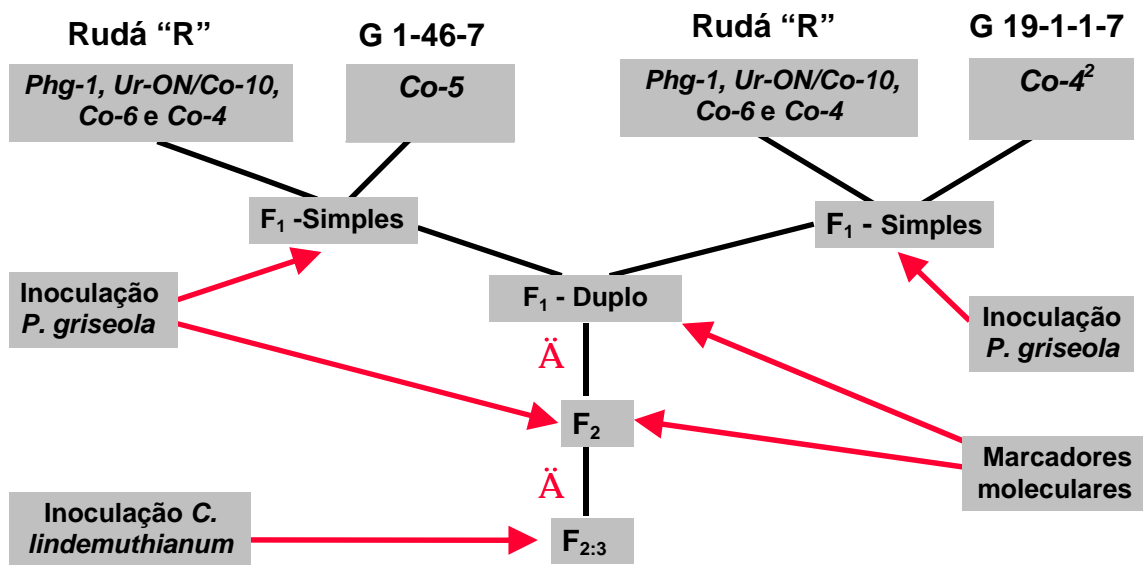
O patótipo 2047, mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar), foi repicado para tubos autoclavados contendo meio vagem (vagem de feijão cozida, parcialmente imersa em BDA), em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminações. Após repicagem, os tubos foram vedados e transferidos para uma BOD a 24°C, onde permaneceram por 7-8 dias, tempo suficiente para a esporulação do fungo.

Seis dias após a emergência das plântulas F₃, uma folha primária de cada planta foi coletada e colocada em uma placa de petri contendo uma lâmina de papel-filtro umedecida com água destilada. Uma suspensão do patótipo 2047 contendo 1,2 x 10⁶ conídios/ml foi então preparada e utilizada na inoculação de cada uma das folhas primárias, previamente coletadas. A inoculação deu-se através da simples imersão das folhas na suspensão de esporos. Após a inoculação, as folhas foram retornadas para as placas de petri, as quais foram então tampadas e incubadas em BOD com temperatura de 19°C e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram por 5 a 7 dias até serem avaliados os sintomas da doença.

A avaliação dos sintomas da doença deu-se de acordo com item 2.5 do Capítulo 1.

A Figura 1 resume as etapas executadas em todo processo de condução do trabalho, desde os cruzamentos até o teste de progênie, utilizando plantas F₃.

Figura 1. Procedimentos para incorporação dos genes *Co-5* e *Co-4²* na linhagem de feijoeiro Rudá “R”.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção dos híbridos simples

Dos cruzamentos iniciais, da linhagem Rudá “R” (genitor masculino) com a linhagem detentora do gene *Co-5* (G 1-46-7) e a que possui o gene *Co-4²* (G 19-1-1-7), foram obtidas 122 e 140 sementes F₁ (híbrido simples), respectivamente. De cada híbrido foram semeadas 80 sementes F₁, cujas plantas resultantes foram inoculadas com o isolado 55-1 de *Phaeoisariopsis griseola*. Desta inoculação foram identificadas 42 plantas resistentes, resultantes do cruzamento Rudá “R” x G 1-46-7; e 47 plantas resistentes, resultantes do cruzamento. As plantas que apresentaram suscetibilidade ao agente causal da mancha angular foram descartadas, pois trata-se de produtos de autofecundação.

3.2. Obtenção dos híbridos duplos

Plantas F₁ resistentes à mancha angular, provenientes de cada cruzamento, foram inter cruzadas e geraram 152 sementes F₁ (híbrido duplo). Destas, foram obtidas 142 plantas adultas, das quais foi extraído o DNA para análise com marcadores moleculares estreitamente ligados aos genes de resistência.

Entre mais de dez marcadores moleculares (RAPD e SCAR) citados na literatura como estreitamente ligados aos genes de resistência envolvidos neste trabalho, apenas sete prestaram-se para monitorar a presença dos genes nas etapas de seleção (SCAR Y20, AB3, AZ20, F10, BA8, H13; RAPD AS13). Os demais não foram úteis por não serem polimórficos entre os genitores Rudá “R”, G 1-46-7 e G 19-1-1-7.

Entre as 142 plantas F₁ (híbrido duplo) analisadas, apenas seis apresentaram marcas para todos os genes de resistência envolvidos na piramidação. Estas plantas foram então selecionadas e submetidas à autofecundação.

Na Tabela 3, tem-se a representação dos possíveis genótipos das plantas selecionadas por meio dos marcadores moleculares, nesta etapa; bem como a probabilidade associada a cada genótipo, considerando-se que os genes apresentam segregação independente, com exceção do *Co-10* e *Ur-ON* (FALEIRO, 2000). Os genótipos dos genitores (híbridos simples) envolvidos nesta etapa de cruzamentos seriam os seguintes:

Rudá “R” x G 1-46-7 = (*Co-4/co-4 Co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/co-10 Phg-1/phg-1*)

Rudá “R” x G 19-1-1-7 = (*Co-4/Co-4² co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/co-10 Phg-1/phg-1*)

A partir do cruzamento dos genitores F₁(Rudá “R” x G 1-46-7) x F₁(Rudá “R” x G 19-1-1-7), seriam possíveis de serem obtidos 108 genótipos distintos. Destes, apenas oito seriam de interesse, sendo os possíveis genótipos das plantas selecionadas por meio dos marcadores moleculares.

Tabela 3. Relação dos possíveis genótipos selecionados e sua respectiva probabilidade de ocorrência.

<i>Descrição</i>	<i>Probabilidade</i>
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/Co-6 Co-10/Co-10 Phg-1/Phg-1</i>	(1/2)(1/2) (1/4)(1/4)(1/4) = 1/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/Co-6 Co-10/Co-10 Phg-1/phg-1</i>	(1/2)(1/2) (1/4)(1/4)(2/4) = 2/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/Co-6 Co-10/co-10 Phg-1/Phg-1</i>	(1/2)(1/2) (1/4)(2/4)(1/4) = 2/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/Co-6 Co-10/co-10 Phg-1/phg-1</i>	(1/2)(1/2) (1/4)(2/4)(2/4) = 4/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/Co-10 Phg-1/Phg-1</i>	(1/2)(1/2) (2/4)(1/4)(1/4) = 2/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/Co-10 Phg-1/phg-1</i>	(1/2)(1/2) (2/4)(1/4)(2/4) = 4/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/co-10 Phg-1/Phg-1</i>	(1/2)(1/2) (2/4)(2/4)(1/4) = 4/256
<i>Co-4²/Co-4 Co-5/co-5 Co-6/co-6 Co-10/co-10 Phg-1/phg-1</i>	(1/2)(1/2) (2/4)(2/4)(2/4) = 8/256
Todos os genótipos desejados	27/256

A tabela mostra a necessidade de se trabalhar com uma população suficientemente grande para que todos os genótipos desejáveis tenham a possibilidade de serem obtidos.

3.3. Obtenção da população segregante F₂

A autofecundação das seis plantas F₁, selecionadas com base nos marcadores moleculares, gerou um total de 512 sementes F₂ que, quando semeadas, possibilitaram a obtenção de 505 plantas F₂. Destas, 75 foram descartadas após terem sido inoculadas com *P. griseola*, por comportarem-se como suscetíveis à mancha angular. Este resultado permitiu inferir que estas plantas não possuíam o gene *Phg-1* de resistência à mancha angular. Este procedimento possibilitou uma economia significativa de tempo e de recursos, nas análises moleculares das plantas F₂, em função da redução do número de plantas a ser analisado com os marcadores.

Das análises moleculares na população F₂, foram obtidas 52 plantas contendo marcas de todos os sete marcadores moleculares utilizados neste trabalho.

Como o *Co-4*² é um alelo do gene *Co-4* presente na linhagem Rudá “R”, para que o alelo *Co-4*² seja fixado ao genótipo da linhagem Rudá “R”, torna-se necessário que o alelo *Co-4* seja substituído. Porém, como o gene *Co-4* e o seu alelo foram selecionados com base nos mesmos marcadores moleculares (RAPD AS13 e SCAR Y20), a distinção entre as plantas F₂ que apresentaram marcas relacionadas ao alelo *Co-4*², só foi possível por meio da inoculação das progênies F_{2:3} com o patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*.

Os marcadores SBB14₁₀₅₀ e SH18₁₁₅₀, que seriam de grande importância na identificação dos genótipos que carregam o alelo *Co-4*², não geraram banda na linhagem G 19-1-1-7, que possui o alelo *Co-4*², mas apenas no cultivar G 2333. AWALE e KELLY (2001) observaram que marcadores SBB14 e SH18 estavam ligados em fase de acoplamento a uma distância de 4,2 cM (SH18) e 5,8 cM (SBB14) do gene *Co-4*²; observaram também que estes marcadores não geraram bandas nos cultivares TO (*Co-4*) e PI 207262 (*Co-4*³). Isso possibilitaria a distinção entre genótipos que possuem o alelo *Co-4*² dos que possuem o alelo *Co-4*, apenas por meio das análises moleculares, sem a necessidade de inoculações.

Curiosamente, o marcador OPH18₁₂₀₀ foi identificado em trabalhos conduzidos por ALZATE-MARIN *et al.* (2001) em uma população RC₃F_{2:3} que possui alelo *Co-4*², derivada do cruzamento entre os cultivares Rudá e G 2333. Neste trabalho, o marcador OPH18₁₂₀₀ mostrou-se ligado em acoplamento ao gene *Co-4*² a uma distância de apenas 5,6 cM. Como a linhagem G 19-1-1-7 utilizada neste trabalho como genitor doador do gene *Co-4*² foi obtida a partir de seleções feitas na população RC₃F_{2:3}, analisadas por ALZATE-MARIN *et al.* (2001), acredita-se que no processo de avanço e seleção desta população, a marca gerada pelo *primer* OPH18 tenha sido perdida, possivelmente devido a um evento de recombinação no sítio de ligação do *primer*. Nas várias etapas de seleção aplicadas na obtenção da linhagem G 19-1-1-7, apenas inoculações com patótipos de *C. lindemuthianum* e análises com o marcador AS13, foram utilizadas para monitorar a presença do gene *Co-4*².

3.4. Identificação de plantas F₂ com o alelo *Co-4*²

Visando identificar plantas portadoras do alelo *Co-4*², foram inoculadas 52 progênies F_{2.3} correspondentes às plantas selecionadas inicialmente com os marcadores moleculares referidos na Tabela 2. Das 52 progênies inoculadas com o patótipo 2047, 18 mostraram-se totalmente resistentes, permitindo inferir que as plantas F₂ correspondentes apresentam o alelo *Co-4*² fixado. Outras 15 comportaram-se como segregantes, apresentando plantas suscetíveis e resistentes, provavelmente, em razão das plantas F₂ correspondentes a estas famílias, ainda encontrarem-se em heterozigose para o alelo *Co-4*². Para as famílias restantes, que apresentaram o total das plantas suscetíveis, pode-se dizer que as plantas F₂ apresentaram marcas associadas apenas ao alelo *Co-4*, que não confere resistência ao patótipo utilizado na inoculação.

Na continuidade deste trabalho, as famílias que apresentaram o alelo *Co-4*² fixado, serão analisadas com marcadores moleculares para todos os genes que estão sendo piramidados, a fim de se identificar as famílias que possuam genes fixados. As famílias F_{2.3} selecionadas serão conduzidas por autofecundações, utilizando-se do método genealógico. Para os testes de progênie, serão utilizadas tanto informações obtidas a partir dos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência como inoculações, em condições controladas, com patótipos de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*.

4. CONCLUSÕES

Foram obtidos genótipos de feijão de grãos do tipo “carioca”, contendo os genes de resistência *Phg-1*, *Ur-ON/Co-10*, *Co-6*, *Co-5* e *Co-4²*, o último já fixado.

No prosseguimento deste trabalho, quando todos os genes estiverem fixados, um material de alto valor como cultivar e/ou genitor para uso em programas de melhoramento do feijoeiro, terá sido obtido; espera-se que a associação dos genes *Co-5* e *Co-4²* com os genes *Co-6* e *Co-10*, resulte em cultivares com resistência durável à antracnose, tanto no Brasil como em outras partes do mundo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18:265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; BAIA, G.S.; PAULA JR., T.J.; SOUZA, K.A.; COSTA, M.R.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. **Journal Phytopathology**, 149:259-264, 2001.
- ARRUDA, K.M; ALZATE-MARIN, A.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização dos cultivares de feijoeiro Ouro Negro e Sel. 1308 com raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira** 26 (suplemento):381. XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, SP, Brasil, 2001.
- AWALE, H.E.; KELLY, J. D. Development of SCAR markers linked to the *Co-4²* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:119-120, 2001.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul - Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 22:50-53, 1997.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.
- BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:1038-1047, 1998.
- CARVALHO, G.A.; PAULA JR., T.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHKE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23:482-485, 1998.

- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 116 p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD GOD, P.I.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- 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.
- HUANG, N.; ANGELES, E.R.; DOMINGO, J.; MAGPANTAY, G.; SINGH, S.; ZHANG, G.; KUMARAVADIEL, N.; BENNETT, J.; KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, 95(3):313-320, 1997.
- MAHUKU, G. S.; JARA, C. E.; CAJIAO, C.; BEEBE, S. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, 86(12):1383-1387, 2002.
- McDERMOTT, J. M. 1993. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, 31:353-357.
- NIETSCHKE, S. Mancha angular do feijoeiro-comum: **Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 65 p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR., T.J., FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, 117:77–84, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19:15-22, 1995.
- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; SOUZA, T.L.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:237-238, 2004a.

- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; SOUZA, T.L.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:249-250, 2004b.
- RAGAGNIN, V.A. **Piramidação de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular em feijão do tipo carioca**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 79 p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19:167-172. 1994.
- SARTORATO, A. Resistência do feijoeiro comum à mancha angular. In: I Congresso brasileiro de melhoramento de plantas, 2001, **Resumos**. Goiânia: GO, 2001a. CD-Room, Resumo 25.
- SHARMA, P.N., KUMAR, A., SHARMA, O.P., SUD, D.; TYAGI, P.D. Pathogenic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* and evaluation of resistance in *Phaseolus vulgaris* in the north-western Himalayan region of India. **Journal Phytopathology**, 147:41-45, 1999.
- SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 87:807-813, 1997.
- SINGH, S.; SIDHU, J.S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D.S.; DHALIWAL, H.S.; KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:1011-1015, 2001.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; FERNANDEZ, F.R.; ISHIKAWA, F.H. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão-comum em Minas Gerais. In: VII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 2002, **Resumos**. Viçosa: MG, 2002, p. 187-189.
- THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDA J. B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.
- 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.
- WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

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

YOUNG, R.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar G 2333. **Theoretical Applied Genetics**, 96:87-94, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização fenotípica de 30 linhagens elites de feijoeiro de grãos tipo “carioca”, desenvolvidas por diversos centros de pesquisa nacionais, frente a várias raças de *C. lindemuthianum* coletadas em diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil e no mundo, permitiu concluir que a maioria das linhagens de feijoeiro de grão tipo “carioca” avaliada, não apresenta níveis satisfatórios de resistência à antracnose, mostrando a necessidade de maior empenho dos programas de melhoramento no sentido de desenvolverem cultivares com espectros de resistência mais amplos. Por outro lado, conclui-se que tem havido um progresso significativo, no que tange ao espectro de resistência das linhagens de grãos tipo “carioca”, lançadas nos ensaios de valor de cultivo e uso regionais.

A partir de populações derivadas do cruzamento Rudá x G 2333, foram obtidas linhagens adaptadas de grão tipo “carioca”, geneticamente similares ao cultivar Rudá; contendo separadamente e em homozigose os genes de resistência à antracnose *Co-4*² e o *Co-5*, presentes no cultivar G 2333. Estas linhagens apresentam amplo espectro de resistência ao agente causal da antracnose, destacando-se a linhagem 19-1-1-7 portadora do gene *Co-4*², que apresentou resistência a todas as raças avaliadas. Isso evidencia o grande potencial dessas linhagens como fonte de resistência à antracnose (genes *Co-5* e *Co-4*²) e mesmo como material promissor para recomendação. No prosseguimento deste trabalho, os genes de resistência à antracnose *Co-5* e *Co-4*² foram introgridos em uma isolinha do cultivar Rudá, que já possui piramidados alguns genes de resistência à ferrugem, à mancha-angular e à própria antracnose. Por meio de seleções com inoculações artificiais de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, bem como, seleções com marcadores moleculares estreitamente relacionados aos genes de resistência de interesse, foram obtidos genótipos de feijão de grãos do tipo “carioca”, contendo os genes de resistência *Phg-1*, *Ur-ON/Co-10*, *Co-6*, *Co-5* e *Co-4*², o último já fixado.

Na continuidade deste trabalho, quando todos os genes estiverem fixados, um material de alto valor como cultivar e/ou genitor para uso em programas de melhoramento do feijoeiro, terá sido obtido; espera-se que a associação dos genes *Co-5* e *Co-4*² com os genes *Co-6* e *Co-10*, resulte em cultivares com resistência durável à antracnose, tanto no Brasil como em outras partes do mundo.