

KLEVER MÁRCIO ANTUNES ARRUDA

**PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE,
FERRUGEM E MANCHA ANGULAR E ESTUDOS DE
ALELISMOS EM FEIJÃO COMUM**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

T

A779p
2009

Arruda, Klever Márcio Antunes, 1978-

Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular e estudos de alelismos em feijão comum / Klever Márcio Antunes Arruda. – Viçosa, MG, 2009.
xi, 129f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 116-129.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão - Doenças e pragas.
3. Feijão - Resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*. 4. Feijão - Resistência a *Pseudocercospora griseola*. 5. Feijão - Resistência a *Uromyces appendiculatus*. 6. Marcadores moleculares.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.3722

**PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE,
FERRUGEM E MANCHA ANGULAR E ESTUDOS DE
ALELISMOS EM FEIJÃO COMUM**

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

APROVADA: 14 de abril de 2009.



Pesq. Ana Lília Alzate Marin
(Co-orientadora)



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



Prof. Pedro Crescêncio Souza Carneiro



Pesq. Eveline Teixeira Caixeta



Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus pais Sílvio e Filomena.

Aos meus irmãos e sobrinhos.

Aos meus amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos professores Pedro Crescêncio Souza Carneiro e Cosme Damião Cruz, pela acessibilidade.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pelas sugestões na melhoria do corpo da tese.

Aos colegas do Programa de Melhoramento do Feijoeiro: Alisson, Andréia, Bruno, Demerson, Gislâyne, Glauco, Iara, Janaina, Jeziel, José Ângelo, José Eduardo, Lelisângela, Lucas, Luiz, Márcia Costa, Marilene, Marta, Renato, Rosângela, Suelen, Thiago, Valéria e Vanessa, pela amizade e importante colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular de Plantas: Arlindo, Beatriz, Cassiana, Daniele, Denise, Fábio, Fernanda, Gabriela, Gisele, Jorge, Josiane, Josie, Julierme, Loreta, Márcia Flores, Marcos, Mateus, Newton, Pedro, Polyana e Rafael, pela amizade e agradável convivência.

Ao amigo e estagiário Marcelo, pela grande ajuda prestada na execução deste trabalho.

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

Aos amigos de república, Leonardo Tuffi, Cláudio e Maurinho, pela convivência harmoniosa.

Aos funcionários Cássio, Gilberto, Gláucia, João Paulo, José Carlos e Reginaldo, pelo auxílio imprescindível na condução dos experimentos.

Em especial, ao Sr. José Pinto Rosa, pelo apoio constante nas atividades na casa de vegetação.

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 sua dissertação em fevereiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, na área de Melhoramento de Plantas e Biotecnologia, defendendo tese em abril de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Importância do feijoeiro	5
3.2. Doenças do feijoeiro e fontes de resistência	6
3.2.1. Fontes de resistência à mancha angular	9
3.2.2. Fontes de resistência à antracnose.....	10
3.2.3. Fontes de resistência à ferrugem	12
3.3. Estudos genéticos de herança e alelismo.....	14
3.4. Melhoramento genético do feijoeiro	14
3.4.1. Piramidação de genes de resistência assistida por marcadores moleculares.....	15
3.4.2. Melhoramento do feijão tipo carioca	20
CAPÍTULO 1	23
Obtenção e avaliação de linhagens de feijoeiro resistentes à antracnose, à ferrugem e à mancha angular	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Material genético.....	25
2.2. Local de condução dos experimentos....	25
2.3. Seleção assistida por meio de marcadores moleculares... ..	26
2.3.1. Análise de RAPD... ..	27
2.3.2. Análise de SCAR... ..	27
2.4. Caracterização da resistência de linhagens piramidadas.. ..	28
2.4.1. Inoculações com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	29
2.4.2. Inoculações com <i>Uromyces appendiculatus</i>	30
2.4.3. Inoculações com <i>Pseudocercospora griseola</i>	31
2.5. Avaliações de campo.....	31
2.5.1. Análise dos dados obtidos no campo.....	33
2.6. Cruzamentos teste.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1. Seleção assistida por marcadores moleculares e por inoculação.....	36
3.2. Caracterização da resistência das linhagens piramidadas.....	39
3.3. Análise dos dados obtidos nos ensaios de campo.....	45
3.4. Cruzamentos teste.....	49
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	51
CAPÍTULO 2.....	52
Introgressão dos genes de resistência à ferrugem <i>Ur-5</i> e <i>Ur-11</i> na linhagem Rudá-R1.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Material genético.....	54
2.2.. Local de condução dos experimentos.....	54

2.3. Obtenção da população segregante F ₂	54
2.4. Seleção assistida por marcadores moleculares.....	55
2.4.1. Extração e amplificação do DNA.....	55
2.5. Seleção por meio de inoculações.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1. Seleção assistida por inoculações.....	57
3.2. Seleção assistida por marcadores moleculares.....	57
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	61
 CAPÍTULO 3.....	62
Introgessão de genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular em linhagens elite de feijoeiro.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Material genético.....	64
2.2. Local de condução dos experimentos.....	65
2.3. Caracterização molecular dos genitores.....	66
2.4. Cruzamentos e obtenção das populações segregantes F ₂	66
2.5. Inoculações.....	66
2.5.1. Inoculação dos genitores.....	66
2.5.2. Inoculação das populações segregantes F ₂	67
2.6. Avaliações de campo.....	68
2.6.1. Análise dos dados obtidos no ensaio de campo.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1. Caracterização molecular dos genitores.....	72
3.2. Caracterização fenotípica dos genitores.....	73
3.3. Condução das populações segregantes.....	76
3.4. Análise dos dados obtidos no ensaio de campo.....	77
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	82
 CAPÍTULO 4.....	83
Caracterização dos genes de resistência à antracnose da cultivar de feijão comum Widusa.....	83
1. INTRODUÇÃO.....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.1. Genitores, cruzamentos e obtenção de sementes.....	86
2.2. Patótipos de <i>C. lindemuthianum</i>	86
2.3. Estudos de herança.....	87
2.4. Estudos de alelismo.....	87
2.5. Análises de qui-quadrado	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1. Estudos de herança.....	89
3.2. Estudos de alelismo.....	90
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	98

CAPÍTULO 5.....	99
Identificação dos alelos de resistência à antracnose <i>Co-1</i> ⁴ e <i>Co-3</i> ³ na cultivar de feijão comum AND 277.....	99
1. INTRODUÇÃO.....	99
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
2.1. Fontes dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i> e preparo do inóculo.....	101
2.3. Genitores, cruzamentos, análises genéticas e avaliação dos sintomas da doença.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1. Estudos de herança.....	104
3.2. Estudos de alelismo.....	106
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	114
CONCLUSÕES GERAIS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

RESUMO

ARRUDA, Klever Márcio Antunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009. **Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular e estudos de alelismos em feijão comum.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-orientadores: Ana Lília Alzate Marin, Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro.

O objetivo deste trabalho foi obter linhagens de feijão comum do grupo comercial “carioca” com resistência às principais doenças fúngicas da parte aérea do feijoeiro. Para isso, famílias $F_{2:3}$ previamente obtidas e selecionadas por apresentarem marcas moleculares relacionadas a genes de resistência à antracnose (*Co-10*, *Co-6*, *Co-5* e *Co-4*²), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha angular (*Phg-1*) foram avançadas até a completa fixação dos alelos de resistência. Em cada geração, marcadores moleculares do tipo SCAR associados aos genes de resistência foram utilizados para identificar plantas contendo todos os genes de interesse. Na geração F_6 , doze linhagens homozigotas foram identificadas (linhagens Rudá-R1) e utilizadas em cruzamentos com as cultivares/linhagens elite Pérola, BRSMG Talismã, VC 9, VC 3 e com uma isolinha da cultivar Rudá, piramidada para os genes *Ur-11*, *Ur-5* e *Ur-ON/Co-10* (linhagem Rudá-R2). Visando a seleção de famílias resistentes, populações F_2 obtidas dos cruzamentos das linhagens Rudá-R1 com as cultivares/linhagens elite Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 e VC 3 foram inoculadas com um patótipo de cada um dos agentes causais de antracnose, ferrugem e mancha angular. Já a população F_2 obtida do cruzamento Rudá-R1 x Rudá-R2 foi genotipada com marcadores moleculares do tipo SCAR estreitamente ligados aos genes *Co-6*, *Co-5*, *Co-4*² e *Ur-5*. As plantas F_2 selecionadas, por apresentarem resistência aos três patógenos, tiveram suas sementes multiplicadas, assim como as plantas selecionadas por apresentarem marcas moleculares relacionadas aos genes *Co-6*, *Co-5*, *Co-4*² e *Ur-5* (cruzamento Rudá-R1 x Rudá-R2). Adicionalmente, as doze linhagens homozigotas (Rudá-R1) foram avaliadas em dois ensaios de campo, realizados nas safras do “inverno” de 2007 e da “seca” de 2008, enquanto as famílias $F_{2:4}$ provenientes dos cinco cruzamentos supracitados foram avaliadas em campo apenas na safra da “seca” de 2008. O delineamento experimental utilizado nos dois experimentos foi o látice quadrado triplo. Uma caracterização da resistência das linhagens homozigotas (Rudá-R1) a diferentes patótipos de antracnose, ferrugem e mancha angular, também foi realizada, em casa de vegetação. A análise conjunta das duas safras evidenciou que a produtividade de grãos das linhagens homozigotas obtidas

(Rudá-R1) é equivalente à produtividade das cultivares modernas. No entanto, para o caráter aspecto de grão, estas linhagens são significativamente inferiores às testemunhas comerciais. Em relação à antracnose e à mancha angular, as doze linhagens apresentaram espectro de resistência idêntico ao dos genitores doadores G 2333 (*Co-4*² e *Co-5*) e AND 277 (*Phg-1*). No caso da ferrugem, uma maior variabilidade no espectro de resistência das linhagens foi observada, embora, de modo geral, elas tenham apresentado resistência comparável a do genitor doador Ouro Negro (*Ur-ON*). Dos cinco cruzamentos realizados com as linhagens Rudá-R1, apenas o cruzamento Rudá-R1 x Rudá-R2 não gerou famílias com aspecto de grão similar ao das cultivares modernas. No entanto, o potencial de extração de famílias superiores para o caráter rendimento de grãos foi o mesmo para as cinco populações avaliadas. Outro propósito deste trabalho foi caracterizar os genes que determinam a resistência à antracnose nas cultivares Widusa e AND 277. Para tanto, estas duas cultivares foram cruzadas com fontes de resistência à antracnose já caracterizadas. As populações segregantes obtidas destes cruzamentos foram avaliadas em relação à resistência a distintos patótipos do agente causal da antracnose. Como resultado ficou constatado que os genes de resistência à antracnose presentes nas cultivares Widusa e AND 277 segregam de forma independente dos locos de resistência *Co-4/Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Co-11*, mas que não segregam em relação aos locos *Co-1* e *Co-3/Co-9*. Como conclusão destes trabalhos, pode-se dizer que os marcadores moleculares empregados no processo de obtenção das linhagens Rudá-R1 foram eficientes na piramidação dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*; que estas linhagens constituem uma fonte adaptada de importantes genes de resistência a doenças para uso em programas de melhoramento do feijoeiro do Brasil; por fim, que tanto a cultivar Widusa quanto a AND 277 apresentam alelos de resistência à antracnose nos locos *Co-1* e *Co-3/Co-9*.

ABSTRACT

ARRUDA, Klever Márcio Antunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2009. **Pyramiding of resistance genes to anthracnose, rust and angular leaf spot and allelism studies in common bean.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-advisers: Ana Lília Alzate Marin, Everaldo Gonçalves de Barros and José Eustáquio de Souza Carneiro.

In order to get lines of common bean related to the commercial “carioca-type” with resistance to main fungal diseases of the aerial parts of the bean, $F_{2:3}$ families previously selected for the presence of molecular markers linked to anthracnose (*Co-10*, *Co-6*, *Co-5* and *Co-4²*), rust (*Ur-ON*) and angular leaf spot (*Phg-1*) resistance genes were advanced to complete fixation of resistance alleles. In each generation, SCAR molecular markers associated with resistant genes were used to identify plants containing all the genes of interest. In F_6 generation, twelve homozygous lines were identified (lines Rudá-R1) and utilized in crossings with the cultivars/lines elite Pérola, BRSMG Talismã, VC 9, VC 3 and with a isoline of the cultivar Rudá, already pyramided with the genes *Ur-11*, *Ur-5* and *Ur-ON/Co-10* (line Rudá-R2). Aiming at the selection of resistant families, F_2 populations from the cross between lines Rudá-R1 with cultivars/lines elite Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 and VC 3 were inoculated with a pathotype of anthracnose, rust and angular leaf spot causal agents. While the F_2 population from the cross Rudá-R1 x Rudá-R2 was genotyped with SCAR molecular markers closed related to genes *Co-6*, *Co-5*, *Co-4²*, and *Ur-5*. The F_2 plants selected, for showing resistance to three pathogens had their seeds multiplied, and the plants selected by molecular markers for the presence of molecular markers linked to genes *Co-6*, *Co-5*, *Co-4²* and *Ur-5* (crossing Rudá-R1 x Rudá-R2). Additionally, the twelve homozygous lines (Rudá-R1) were evaluated in two field analysis, realized in “winter” season of 2007 and of the “drought” of 2008, while the $F_{2:4}$ families descendant from five cross above were evaluated in the field only in the “drought” season of 2008. The experimental delineation utilized in two experiments was the triple lattice square. A characterization of the resistance of the homozygous lines (Rudá-R1) to different pathotypes of the anthracnose, rust and angular leaf spots was also realized in greenhouse. The conjoint analysis of the two harvests showed that the production of the homozygous lines grains (Rudá-R1) is equivalent to production of the modern cultivars. However, the grain aspects of the lines are significantly lower than commercial controls. In relation to anthracnose and angular spot, the twelve lines showed resistance spectrum identical to the donor parents G 2333 (*Co-4²* and *Co-5*) and AND 277 (*Phg-1*). In the

case of the rust, a higher variability in the resistance spectrum of the lines was observed, although, in general way, they showed comparable resistance to the donor parent Ouro Negro (*Ur-ON*). From five crossings realized with lines Rudá-R1, only the crossing Rudá-R1 x Rudá-2 did not generate families with spectrum of similar grain to the modern cultivars. However, the potential of extraction of superior families to the character yield of grain was the same for the populations evaluated. Other purpose of this work, was characterize the genes that determine the resistance to anthracnose in the cultivars Widusa and AND 277. For this, two cultivars were crossed with resistance sources to anthracnose already characterized. The segregating populations of these crossings were evaluated in relation to resistance to different pathotypes of the anthracnose causal agent. As result it was verified that the resistance genes to anthracnose presents in the cultivars Widusa and AND 277 segregate in a independent way of the resistance loci *Co-4/Co-4²*, *Co-5*, *Co-6* and *Co-11*, but those do not segregate in relation to loci *Co-1* and *Co-3/Co-9*. As conclusion of these works, it can say that the molecular markers used in the acquisition lines Rudá-R1 were efficient for pyramiding genes *Co-4²*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Phg-1* and *Ur-ON*; that these lines constitute an adapted source of important resistance genes to diseases for use in common bean breeding programs in Brazil; finally, that both the cultivar Widusa and AND 277 presents resistance alleles to anthracnose in the loci *Co-1* and *Co-3/Co-9*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um produto agrícola de grande importância econômica e social para o Brasil, por ser reconhecidamente uma excelente fonte de proteína, por apresentar grãos ricos em nutrientes essenciais como o ferro e por ser cultivado tanto por pequenos agricultores quanto por produtores que utilizam alta tecnologia.

O feijão tem ampla adaptação edafoclimática, o que permite seu cultivo durante todo o ano e 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, em Santa Catarina, no Paraná e no Rio de Janeiro. Nas demais regiões do país, o consumo é quase exclusivo do feijão tipo “carioca”, ou seja, feijão de cor creme com rajas marrons.

O Brasil é o maior produtor e o maior consumidor mundial de feijão, seguido da Índia e da China (FAO, 2008). Entretanto, ainda apresenta média de produtividade de cerca de 915 kg/ha (IBGE, 2009), muito aquém do potencial da cultura. As doenças que acometem o feijoeiro ainda constituem uma das principais causas da baixa produtividade dessa cultura no Brasil. A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, a ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* e a mancha angular causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* merecem destaque dentre as doenças foliares que acometem a cultura do feijoeiro no Brasil. Tal destaque se deve aos danos que podem causar, bem como ao grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas” ou “patótipos”, que estes fungos apresentam (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006).

Doenças fúngicas podem ser controladas por meio de práticas culturais, pelo emprego de fungicidas e também pela resistência genética. O uso de cultivares resistentes é tido como o método mais efetivo, mais barato e mais fácil de ser adotado pelos produtores. A incorporação de resistência genética a doenças tem efeito estabilizador sobre as cultivares, evitando oscilação de rendimento de plantio para plantio, em função do ataque de patógenos. No entanto, a maioria das cultivares identificadas como resistentes a determinados patógenos são, normalmente, as que apresentam características agronômicas desfavoráveis ao seu cultivo comercial. Assim, uma das maneiras de contornar esse problema é por meio da transferência dos genes de resistência presentes nessas cultivares para cultivares elite, aquelas com boa aceitação comercial e de boa produtividade. Nesse contexto, a piramidação, uma estratégia de

melhoramento que consiste na combinação ou introdução de diferentes genes de resistência em uma única cultivar, tem sido sugerida para aumentar tanto o espectro quanto a durabilidade da resistência a diferentes patógenos (KELLY *et al.*, 1995; HITTALMANI *et al.*, 2000).

Um dos objetivos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro, conduzido no BIOAGRO/UFV, é a incorporação, assistida por marcadores moleculares, de genes de resistência a doenças em cultivares de feijão. Em trabalhos anteriores conduzidos neste programa, priorizou-se a identificação, a caracterização e a incorporação, por retrocruzamentos, de genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular na cultivar Rudá, de grãos tipo carioca. Posteriormente, isolinhas contendo individualmente os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), à mancha angular (*Phg-1*) e à ferrugem (*Ur-ON*) foram inter cruzadas e obtidas linhagens piramidadas para esses genes, denominadas de linhagens Rudá-R (RAGAGNIN *et al.*, 2009).

Visando ampliar o espectro de resistência à antracnose da linhagem Rudá-R, ARRUDA (2005) inter cruzou esta linhagem com isolinhas da cultivar Rudá que continham, em separado, os genes *Co-5* e *Co-4²* da cultivar G 2333 (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004a), selecionando famílias F_{2,3} com marcas moleculares estreitamente ligadas aos genes de resistência *Co-4²*, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*. Como nesta geração alguns locos ainda não se encontravam em homozigose, fez-se necessário que as famílias previamente selecionadas fossem avançadas até a completa fixação dos alelos de resistência.

O caráter dinâmico do melhoramento de plantas faz com que, a cada ano, novas cultivares, com vantagens agronômicas, comerciais e/ou culinárias, sejam desenvolvidas. Diante disso, é de suma importância que os genes de resistência agrupados no *background* genético Rudá sejam transferidos para cultivares de feijoeiro mais modernas, sem, contudo, esquecer a necessidade de se ampliar a base genética de resistência a doenças, já presente nesse *background*.

A ampla variabilidade apresentada pelos fungos que causam a antracnose, a ferrugem e a mancha angular exige esforços contínuos dos programas de melhoramento, no sentido de monitorar a variabilidade patogênica das espécies nos campos de produção, bem como, na identificação e caracterização de novos genes de resistência. Trabalhos conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV têm mostrado que a cultivar AND 277 apresenta amplo espectro de

resistência aos patótipos de *C. lindemuthianum* identificados no Brasil, bem como, a patótipos de alta virulência como o 2047, identificado na Costa Rica, e que é tido como um dos patótipos de maior virulência entre os já identificados. Também têm sido observados, por diferentes instituições de pesquisa, resultados contrastantes quanto ao controle genético da resistência à antracnose na cultivar Widusa (ALZATE-MARIN *et al.*, 2002a; FERREIRA *et al.*, 2003; GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006; RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2008), apesar de esta cultivar ser bastante conhecida, sendo, inclusive, pertencente à série diferenciadora internacional da antracnose. Assim, fazem-se necessários esforços de pesquisa no intuito de entender o controle genético da resistência à antracnose nessas cultivares.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram:

1. Obter linhagens de feijão de grãos tipo carioca com resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, a partir de uma população segregante obtida do intercruzamento da linhagem Rudá-R com isolinhas da cultivar Rudá que continham, em separado, os genes *Co-5* e *Co-4*²;
2. Piramidar os genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Phg-1*, *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* no *background* carioca Rudá;
3. Transferir genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular para cultivares e linhagens elite de feijão do grupo comercial carioca;
4. Realizar estudos de herança e de alelismo envolvendo a resistência a *C. lindemuthianum* conferida pelas cultivares Widusa e AND 277.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância do feijoeiro

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui um dos poucos alimentos ricos tanto em carboidratos (60%) como em proteínas (20 a 30%), além disso, contém lipídios e sais minerais (BARAMPAMA *et al.*, 1993). Uma alta produção nacional dessa espécie 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.

Além da relevância na alimentação, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, em razão de ser cultivado em grandes áreas e da mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que no cultivo do feijão sejam utilizados sete milhões de homens/dia-ciclo de produção, envolvendo aproximadamente 295.000 produtores só no estado de Minas Gerais (BORÉM e CARNEIRO, 2006).

A produção nacional de feijão na safra 2008 foi de 3,46 milhões de toneladas em uma área de 3,78 milhões de hectares. O estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor nacional, ficando atrás apenas do estado do Paraná. A produção do estado de Minas Gerais na safra 2008 foi de 584,3 mil toneladas, correspondendo a 16,9% da produção nacional (IBGE, 2009).

O consumo *per capita* de feijão no país está em torno de 17 kg/habitante/ano, garantindo ao Brasil a posição de maior consumidor mundial de feijão (FAO, 2008). Porém, esse índice de consumo é bem inferior ao apresentado no início da década de 70, cerca de 25 kg/habitante/ano. As possíveis causas do menor consumo desta leguminosa nas últimas décadas foram o êxodo rural, com alteração dos padrões de consumo da população, e a redução do preço de outras fontes proteicas (BORÉM e CARNEIRO, 2006).

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. As épocas recomendadas para semeadura concentram-se, basicamente, nos seguintes períodos: o chamado feijão das "águas", semeado nos meses de setembro a novembro, o feijão da "seca" ou safrinha, semeado de janeiro a março, e o de outono-inverno, nos meses de maio a julho. No plantio de outono-inverno, geralmente, o agricultor necessita irrigar a lavoura. Na época da "seca" nem sempre as chuvas são suficientes durante todo o ciclo da cultura, sendo conveniente, neste caso,

complementar com irrigação (EMBRAPA, 2008a). Embora esses períodos possam apresentar variações de ano a ano, pode-se constatar que há colheita praticamente o ano todo, e existe sobreposição de épocas em algumas regiões (FERREIRA *et al.*, 2002).

3.2. Doenças do feijoeiro e fontes de resistência

O feijoeiro é uma cultura sujeita ao ataque de vários patógenos, sendo esta uma das principais causas da sua baixa produtividade em território brasileiro. VIEIRA (1988) 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 mancha angular, a antracnose, a ferrugem, o mofo branco, a murcha de fusarium, o mosaico dourado e o crestamento bacteriano comum. As demais, apesar da menor importância, podem causar danos severos em condições específicas (VIEIRA, 1988).

A mancha angular, a antracnose e a ferrugem merecem destaque entre as doenças fúngicas foliares, porque os fungos causadores destas doenças apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, o que dificulta a obtenção de cultivares resistentes.

A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun (BRAUN e CROUS, 2006) era considerada de pequena importância econômica no estado de Minas Gerais até o final da década de 80. Segundo VIEIRA (1988), a doença não causava danos apreciáveis porque só aparecia no final do ciclo da cultura. Entretanto, atualmente a mancha angular tem sido apontada como a mais importante doença da parte aérea do feijoeiro, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios da “seca”, quando temperaturas amenas e ocorrência de orvalho são observadas nas principais regiões produtoras (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006). As perdas de rendimento são maiores, quanto mais precoce for o surgimento da doença, devido à desfolha pré-matura das plantas e a consequente redução do tamanho dos grãos, podendo comprometer até 70% da produção (SARTORATO e RAVA, 1992; JESUS JR. *et al.*, 2001).

Vários estudos têm demonstrado uma ampla variabilidade patogênica do fungo *P. griseola*. SARTORATO e ALZATE-MARIN (2004) mostraram, por meio de um levantamento feito na literatura sobre a variabilidade patogênica do fungo *P. griseola*, que no período de 1996 a 2002 foram identificados 51 patótipos de *P. griseola* no Brasil. Ainda segundo este levantamento, os patótipos mais frequentes e amplamente distribuídos no território nacional foram: 31.39, 63.23, 63.31, 63.39, 63.47, 63.55 e

63.63. Todos os patótipos citados foram classificados pela série diferenciadora proposta por PASTOR CORRALES e JARA (1995).

Em trabalhos mais recentes, não contemplados neste levantamento, GARCIA *et al.* (2006) estudaram 96 isolados de *P. griseola* obtidos no estado de Goiás e verificaram a ocorrência de sete patótipos (31.55, 63.23, 63.31, 63.39, 63.47, 63.55 e 63.63); os mais frequentes foram o 63.55 e o 63.63, ocorrendo 25 e 39 vezes, respectivamente. VITAL (2006) identificou seis patótipos de *P. griseola* (16.4, 31.15, 31.47, 39.63, 63.15 e 63.47) em sete isolados obtidos do estado de São Paulo. Na caracterização de 17 isolados coletados em diferentes localidades do estado de Minas Gerais, BALBI (2007) identificou doze patótipos (3.23, 15.7, 23.23, 31.4, 31.7, 47.39, 63.6, 63.7, 63.23, 63.31, 63.47, 63.63), sendo o 63.63 o mais frequente, com quatro ocorrências. Também em Minas Gerais, SILVA *et al.* (2008) verificaram a ocorrência de dez patótipos distintos (55.15, 63.07, 63.15, 63.23, 63.25, 63.27, 63.31, 63.47, 63.55 e 63.63); neste trabalho os patótipos identificados em maior frequência foram o 63.31 e o 63.63, representados por doze e 23 isolados, respectivamente, de um total de 48 estudados. Com isso, outros nove patótipos somam-se aos constatados no levantamento realizado por SARTORATO e ALZATE-MARIN (2004), totalizando 60 patótipos distintos.

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 diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos. O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 13 e 27°C, com um ótimo de 17°C e alta umidade relativa (SARTORATO *et al.*, 1996).

O agente causal da antracnose do feijoeiro também apresenta ampla diversidade patogênica. ALZATE-MARIN e SARTORATO (2004), em levantamento feito na literatura sobre a variabilidade patogênica do fungo *C. lindemuthianum*, mostram que no período de 1994 a 2002 foram identificados 50 patótipos de *C. lindemuthianum* no Brasil. Os patótipos 65, 73, 81 e 87 se apresentam como os mais frequentes e amplamente distribuídos pelo país. Todos os patótipos citados foram classificados por seus respectivos autores utilizando a série diferenciadora desenvolvida por PASTOR CORRALES (1992).

Outros trabalhos, não contemplados neste levantamento, corroboram sobre a variabilidade e a predominância de determinados patótipos do agente causal da antracnose. CARBONELL *et al.* (1999) caracterizaram vários isolados provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo, e identificaram nove patótipos (23, 31, 65, 73, 81, 87, 89, 95 e 127), predominando o 65, o 81 e o 89. Estudos realizados por SOMAVILLA e PRESTES (1999) relataram ocorrência de onze patótipos de *C. lindemuthianum* (5, 23, 64, 65, 67, 73, 81, 83, 87, 89 e 321), com base em um levantamento realizado em oito regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul; sendo os patótipos 81 e 65 os mais frequentes. A partir de 43 isolados provenientes de diferentes regiões produtoras de feijoeiro comum no Brasil, TALAMINI *et al.* (2004) identificaram dez patótipos de *C. lindemuthianum*, os quais, em ordem decrescente de frequência, foram: 65, 81, 337, 87, 73, 64, 593, 83, 89 e 8. SILVA *et al.* (2007) identificaram dez patótipos a partir de 48 isolados coletados no estado de Minas Gerais; os patótipos 65, 81 e 73 foram os mais frequentes. ISHIKAWA *et al.* (2008), ao estudar 53 isolados coletados entre os anos de 2004 e 2007 em três estados do Brasil (MG, SP e PR), identificaram 12 patótipos (0, 8, 9, 64, 65, 71, 72, 73, 81, 321, 329 e 337), sendo mais frequentes os 65, 81, 64 e 73. No estado do Paraná, SANSIGOLO *et al.* (2008) avaliaram 20 isolados, os quais foram classificados em 14 patótipos distintos (0, 10, 11, 17, 26, 27, 64, 72, 73, 75, 81, 83, 87, 89); o 73 e o 89 foram os mais frequentes. Com isso, outros nove patótipos somam-se aos constatados no levantamento realizado por ALZATE-MARIN e SARTORATO (2004), totalizando 59 patótipos distintos.

A ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger [sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.], dependendo das condições climáticas, do estágio de desenvolvimento das plantas e do uso de cultivares suscetíveis, pode ocasionar severos prejuízos na produção do feijoeiro (JESUS JR. *et al.*, 2001). Em decorrência da ferrugem, perdas superiores a 68% já foram relatadas em Minas Gerais (VIEIRA, 1988), onde a infecção ocorreu antes da floração e no plantio da “seca”. Temperaturas moderadas (17 a 22°C) e molhamento foliar durante períodos superiores a oito horas contínuas são condições que favorecem o progresso da doença (SILVA, 1992). Assim, a partir de 1980, com o cultivo de feijão de inverno sob condições irrigadas, principalmente na região do Brasil Central, a ferrugem passou a ser uma preocupação a mais para os produtores (VIEIRA *et al.*, 2005).

São vários os trabalhos relacionados à diversidade genética do fungo *U. appendiculatus*. MORA-NUÑEZ *et al.* (1992) identificaram 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 destes foram encontradas em mais de um estado. FALEIRO *et al.* (1999a) identificaram treze patótipos a partir de quinze 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.

Com base no método adotado pelo novo procedimento de classificação internacional (STEADMAN *et al.*, 2002), SOUZA *et al.* (2007a) classificaram doze isolados coletados no estado de Minas Gerais em sete patótipos distintos: 21-3, 29-3, 53-3, 53-19, 61-3, 63-3 e 63-19; sendo que os patótipos 63-19 e 63-3 foram os mais frequentes, representados por cinco e dois isolados, respectivamente.

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 incitadas por patógenos com elevado número de patótipos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Embora boa parte das linhagens e/ou cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento do Brasil ainda sejam suscetíveis à mancha angular, à antracnose e à ferrugem (MELO *et al.*, 2008), diversos pesquisadores têm identificado fontes de resistência às doenças fúngicas do feijoeiro comum, e é grande a quantidade de genes de resistência já identificados e caracterizados.

3.2.1. Fontes de resistência à mancha angular

Em relação à mancha-angular, as fontes de resistência conhecidas não conferem resistência a todos os patótipos identificados. A combinação de genes de resistência presentes em diferentes fontes, porém, pode vir a ser efetiva no controle de todos os patótipos identificados, ou, pelo menos, da maioria deles.

De acordo com estudos de variabilidade patogênica do fungo *P. griseola*, a partir de isolados coletados em diversas regiões do Brasil, as cultivares diferenciadoras Mesoamericanas: México 54, Cornell 49-242 e BAT 332, com incompatibilidade a 40, 31 e 31 patótipos, respectivamente; e a fonte Andina G 5686, com resistência a 34 patótipos, de um total de 60, são as principais fontes de resistência do Brasil (SARTORATO e ALZATE-MARIN, 2004; GARCIA *et al.*, 2006; VITAL, 2006; BALBI, 2007; SILVA *et al.* 2008). A associação dos genes de resistência à mancha angular presentes nas cultivares México 54, Cornell 49-242 e BAT 332 pode conferir

resistência a todos os patótipos identificados, exceto ao patótipo 63.63, o que demonstra a necessidade de identificação e caracterização de novas fontes de resistência à mancha angular, haja vista que o patótipo 63.63 é um dos mais frequentes e amplamente distribuído no território brasileiro.

Os principais genes de resistência à *P. griseola* identificados até o momento são derivados das cultivares AND 277 (*Phg-1* e/ou *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*²) (CARVALHO *et al.*, 1998; CAIXETA *et al.*, 2005), Mexico 54 (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*) (SARTORATO *et al.*, 1999; CAIXETA *et al.*, 2005); Cornell 49-242 (*Phg-3*), MAR-2 (*Phg-4* e *Phg-5*²) e BAT 332 (*Phg-6*²) (CAIXETA *et al.*, 2005).

Em um trabalho recente de caracterização das fontes de resistência à mancha angular, utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, em relação a 17 isolados de *P. griseola*, BALBI *et al.* (2008) observaram que as variedades Mexico 54, Cornell 49-242, BAT 332, AND 277 e MAR-2 foram resistentes a 11, 11, 8, 9 e 10 isolados, respectivamente. Em estudo realizado por NIETSCHKE *et al.* (2000a), verificou-se que o bloco gênico presente em AND 277 conferiu resistência a dezessete dos 25 patótipos de *P. griseola* avaliados. Isso evidencia o grande potencial de uso da cultivar AND 277 como fonte de genes de resistência à mancha angular.

3.2.2. Fontes de resistência à antracnose

Estudos de variabilidade patogênica do fungo *C. lindemuthianum* realizados em diversos centros de pesquisa do Brasil têm apontado as cultivares G 2333, AB 136, TU, TO e PI 207.262 como as mais resistentes à antracnose (SOMAVILLA e PRESTES, 1999; CARBONELL *et al.* 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008).

A cultivar G 2333 possui várias características desfavoráveis, como hábito de crescimento IV (prostrado), sensibilidade ao fotoperíodo e grãos vermelhos e pequenos. Porém, é portadora de uma pirâmide de genes que confere resistência a todos os patótipos de *C. lindemuthianum* que ocorrem no Brasil. Tem sido relatada a resistência das cultivares G 2333 e AB 136 a todos os 59 patótipos de *C. lindemuthianum* identificados em diferentes regiões produtoras de feijão no país (SOMAVILLA e PRESTES, 1999; CARBONELL *et al.* 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008). Nestes mesmos trabalhos foi observado que as cultivares

TU e TO e PI 207262 apresentaram resistência a 57, 52 e 54 dos 59 patótipos, respectivamente.

Em relação à resistência presente na cultivar G 2333, YOUNG *et al.* (1998) propuseram três alelos (*Co-4*², *Co-5* e *Co-7*), sendo o *Co-4*² um alelo do loco *Co-4* da cultivar diferenciadora TO; o alelo *Co-5* encontrado nas cultivares TU e SEL 1360; e o alelo *Co-7*, identificado na própria cultivar G 2333 por PASTOR-CORRALES *et al.* (1994b). Resultados obtidos por ALZATE-MARIN *et al.* (2001a) demonstraram que dois genes independentes da cultivar G 2333 (*Co-4*² e *Co-5*), com alelos dominantes, são responsáveis pela resistência aos patótipos 73 e 89. Resultados semelhantes também haviam sido observados por PASTOR-CORRALES *et al.* (1994a) em relação ao patótipo 521.

ALZATE-MARIN *et al.* (1997) estudaram a herança da resistência da cultivar AB 136 com os patótipos 89, 64 e 73 nos cruzamentos com as cultivares diferenciadoras Michelite, Mexico 222 e Cornell 49-242, respectivamente. Os autores do referido estudo observaram que para os patótipos 89 e 64 os resultados indicaram um único gene dominante controlando a resistência, já para o patótipo 73 observou-se que dois genes independentes podem determinar a resistência em AB 136, um dominante (*Co-6*) e outro recessivo (*co-8*).

A cultivar Mesoamericana Honduras 35, introduzida no Brasil em 1991 como cultivar comercial “Ouro Negro” (ARAÚJO *et al.*, 1991), é um feijão de grãos pretos. CORRÊA (1999) e FALEIRO *et al.* (2000a) mostraram que a Ouro Negro possui um gene de resistência à antracnose e um gene de resistência à ferrugem, e que esses genes estão locados no mesmo grupo de ligação a 12,3 centimorgans (cM) de distância. ALZATE-MARIN *et al.* (2003a) definiram o gene de resistência à antracnose de Ouro Negro como distinto dos previamente caracterizados, nomeando-o como *Co-10*. A resistência presente em Ouro Negro mostrou-se efetiva contra 19 patótipos de *C. lindemuthianum* entre 22 testados (ALZATE-MARIN *et al.* 2003a; RAGAGNIN *et al.*, 2009).

A cultivar andina AND 277 tem sido utilizado pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV apenas como fonte de resistência à mancha angular, no entanto, esta cultivar tem mostrado amplo espectro de resistência à antracnose. RAGAGNIN (2004) observou resistência da cultivar AND 277 a vinte de 21 patótipos de *C. lindemuthianum* testados, merecendo destaque o fato desta cultivar apresentar incompatibilidade frente ao patótipo 2047. Este, identificado na Costa Rica, é tido como

um dos patótipos de maior virulência já identificados (BALARDIN e KELLY, 1998).

Programas de melhoramento do feijoeiro do Brasil e do mundo têm grande carência por genes de resistência à antracnose de origem Andina. Acredita-se que a combinação de genes de resistência de origem nos *pools* gênicos Andino e Mesoamericano em uma única cultivar possa oferecer uma resistência ampla e duradoura a este patógeno em certas regiões (MELOTTO e KELLY, 2000). Estudos de herança e alelismo feitos por ALZATE-MARIN *et al.* (2003b) mostraram que a cultivar AND 277 possui um gene dominante de resistência à antracnose e que este seria alelo do gene *Co-1*. No entanto, nenhuma outra cultivar possuindo o gene *Co-1* tem sido relatada como resistente à raça 2047. O gene *Co-4*², identificado na 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*. Tal fato alerta para a necessidade de realização de estudos mais completos sobre a caracterização da herança da resistência à antracnose da cultivar AND 277.

Os genes de resistência ao *C. lindemuthianum*, já caracterizados, são listados pela BIC (2008) e estão presentes nas 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/Co-3*) (FOUILLOUX, 1976; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994b; GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* 2008b), AB 136 (*Co-6* e *co-8*) (SCHWARTZ *et al.*, 1982; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997, 2001b), BAT 93 (*Co-9*), (GEFFROY *et al.*, 1999), recentemente o *Co-9* foi renomeado como *Co-3*³ (BIC, 2008), Ouro Negro (*Co-10*) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a), Michelite (*Co-11*) (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* 2007). Vários outros alelos foram identificados e estão presentes nas 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.*, 2003b), Widusa (*Co-1*⁵) (GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006), Mexico 227 (*Co-3*²) (FOUILLOUX, 1976), SEL 1308 (*Co-4*²) (YOUNG *et al.*, 1998) e PI 207.262 (*Co-9/Co-3*³ e *Co-4*³) (ALZATE-MARIN *et al.*, 2007).

3.2.3. Fontes de resistência à ferrugem

Em relação à ferrugem, a cultivar Ouro Negro, portadora do gene de resistência à ferrugem *Ur-ON*, assim provisoriamente denominado pelo fato de não ter sido ainda

completamente caracterizado, é a fonte de resistência mais utilizada no Brasil (FALEIRO *et al.*, 2004). Estudos de alelismo têm demonstrado que *Ur-ON* é independente dos genes *Ur-5* e *Ur-11* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004b). A cultivar Ouro Negro tem se mostrado resistente a todos os patótipos de *U. appendiculatus* identificados em Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 1999a; RAGAGNIN *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007a) e moderadamente resistente a populações do patógeno amostradas em Goiás, Bahia, Paraná e São Paulo (RIOS *et al.*, 2001). Segundo comunicação pessoal do Dr. J. R. Stavelly, citado por ALZATE-MARIN *et al.* (2004), quando testado com 24 dos 94 isolados do fungo *U. appendiculatus* preservados na micoteca do USDA, *Ur-ON* conferiu resistência a 23 deles. A cultivar Ouro Negro tem mantido sua incompatibilidade com a grande maioria dos patótipos com os quais tem sido testado desde a sua introdução no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2005; PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006).

Ao reclassificar doze isolados de *U. appendiculatus* coletados no estado de Minas Gerais, com base na nova série de cultivares diferenciadoras e no sistema binário de nomenclatura propostos no “3rd Bean Rust Workshop” (STEADMAN *et al.*, 2002), SOUZA *et al.* (2007a) observaram que as cultivares diferenciadoras Mexico 309, Mexico 235 e PI 181996 foram resistentes a todos os isolados caracterizados. Mexico 309 também se mostrou resistente a todos os onze isolados de *U. appendiculatus* identificados por SANTOS e RIOS (2000) no estado de Goiás. Além disso, foi incompatível com os patótipos 1 e 3, coletados no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás (RIOS *et al.*, 2001). Utilizando populações segregantes proveniente do cruzamento Rudá x México 309, SOUZA *et al.* (2007b) demonstraram, através de estudos de herança, que a resistência à ferrugem presente em México 309 é determinada por um único gene dominante.

O gene de resistência à ferrugem *Ur-11*, presente na linhagem Belmidak RR-3, merece destaque devido ao seu ótimo desempenho frente a patótipos de *U. appendiculatus* identificados em Minas Gerais, sendo resistente a todos com os quais foi testado, conforme demonstrado por FALEIRO *et al.* (1999b) e SOUZA (2007a).

A BIC (2008) relata que os genes de resistência ao *U. appendiculatus*, já caracterizados, estão presentes nas 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), Mexico 309 (*Ur-5*) (STAVELY, 1984), Olathe e Golden Gate Wax (*Ur-6*) (BALLANTYNE, 1978; GRAFTON *et al.*, 1985), Great Northern 1140 (*Ur-7*)

(AUGUSTIN *et al.*, 1972), U.S. #3 (*Ur-8*) (CHRIST e GROTH, 1982), Pompadour Checa (*Ur-9*) (FINKE *et al.*, 1986), Cape e Resisto (*Ur-10*) (WEBSTER e AINSWORTH, 1988), PI 181996 (*Ur-11* ou *Ur-3*²) (STAVELY, 1990; STAVELY, 1998), Pompadour Checa 50 (*Ur-12*) (JUNG *et al.*, 1998), Redlands Pioneer (*Ur-13*) (LIEBENBERG e PRETORIUS, 2004).

3.3. Estudos genéticos de herança e alelismo

A inferência de quantos e quais genes determinam o fenótipo (resistência/suscetibilidade) para uma determinada doença consiste basicamente no uso de duas metodologias: estudos de herança e estudos de alelismo.

Nos estudos de herança avaliam-se populações segregantes obtidas do cruzamento entre a fonte de resistência, a qual deseja-se determinar o controle gênico, e uma testemunha suscetível. O padrão de segregação irá determinar o número de genes envolvidos no controle do caráter.

De posse da informação de quantos genes estão envolvidos no controle do caráter, torna-se possível determinar quais são esses genes. Neste caso, deve-se fazer cruzamentos entre a fonte de resistência, cujos genes de resistência ainda são desconhecidos, e outras fontes de resistência previamente caracterizadas. A observação de pelo menos uma planta suscetível na população segregante avaliada indicará que os genitores possuem genes de resistência localizados em locos distintos. A observação de apenas plantas resistentes indicará que os genitores são portadores de genes de resistência que ocupam um mesmo loco (genes alélicos), ou que ocupam locos ligados em bloco.

As determinações do número e quais genes estão envolvidos no controle da resistência de certo genótipo são de grande importância para os programas que visam a piramidação de genes de resistência, pois fornecem subsídios para que os melhoristas identifiquem quais cruzamentos e, conseqüentemente, quais combinações alélicas são possíveis e mais vantajosas.

3.4. 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.*, 2005). No entanto, outras características como tipo e qualidade nutricional 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.

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.*, 2005). No campo da resistência a doenças, os melhoristas de feijão têm obtido resultados expressivos, uma vez que o controle genético da resistência a certos patógenos que acometem a cultura é de caráter qualitativo. A ampla variabilidade patogênica de alguns patógenos, como os fungos causadores da mancha angular, da antracnose e da ferrugem, entretanto, tem dificultado a obtenção de cultivares que se comportem como resistentes em várias regiões de produção e que, além disso, apresentem resistência duradoura, não comprometendo a vida útil da cultivar.

3.4.1. Piramidação de genes de resistência assistida por marcadores moleculares

Uma estratégia que tem sido sugerida no melhoramento que visa resistência a patógenos que apresentam grande variabilidade é a piramidação de genes de resistência (KELLY e MIKLAS, 1998; MAHUKU *et al.*, 2002; FALEIRO *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). O conceito de piramidação pode ser entendido sob dois aspectos, o restrito e o amplo. O restrito se refere ao acúmulo de genes, na planta, que conferem incompatibilidade a diferentes patótipos de um mesmo patógeno. Isso acarreta em um aumento do espectro de resistência à enfermidade e a torna possivelmente mais durável. O conceito amplo está relacionado à introgressão simultânea de genes de resistência a distintos patógenos, estratégia também conhecida como resistência múltipla. Neste caso, as vantagens já mencionadas se aplicam às diferentes doenças (PEDERSEN e LEATH, 1988; MICHELMORE, 1995).

Segundo SCHAFER e ROELFS (1985), a probabilidade de um patógeno superar a resistência de uma pirâmide com quatro ou seis genes é muito baixa. Para que isso ocorra, mutantes que surgem independentemente devem ser combinados, ou devem surgir simultaneamente ou sequencialmente no mesmo isolado. De acordo com esta teoria, a durabilidade de uma cultivar piramidada dependerá do número de genes de resistência a ser vencido pelo patógeno, ou seja, quanto maior o número de genes piramidados, mais difícil será suplantar a resistência.

O aspecto epidemiológico também dá um bom indício da validade da piramidação como estratégia para o controle genético de doenças. Estudando o patossistema *Melampsora lini* / *Linum marginale*, a partir de populações naturais de ambas as espécies, THRALL e BURDON (2003) demonstraram haver uma relação inversamente proporcional entre a fecundidade do patógeno (produção de esporos) e o acúmulo de virulência. Os autores observaram que as populações do fungo capazes de infectar um maior número de populações do hospedeiro apresentavam menor agressividade comparativa frente a um controle suscetível. Isto indica que o acúmulo de genes de virulência no patógeno, ou seja, a inativação conjunta de vários genes de avirulência, implica em um custo à sua adaptabilidade.

A piramidação de genes de resistência é considerada como uma estratégia eficiente no controle de patogenias, 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 uma mesma cultivar. Devido às interações epistáticas entre genes de resistência, muitos testes podem ser requeridos com diferentes patótipos, para assegurar que cada um dos alelos desejados esteja presente. Se vários genes estão sendo incorporados e pelo menos um deles confere resistência completa ao mesmo patógeno, a presença desse gene de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais.

Uma estratégia que tem sido utilizada para contornar esse problema é o uso da seleção indireta, a qual consiste na seleção para uma característica associada a um caráter de interesse a ser melhorado. Esta estratégia é vantajosa quando a herdabilidade da característica indireta e a sua correlação com o caráter de interesse são elevadas. Uma vez que os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente, as variações ambientais e a interação genótipos x ambientes podem ser eliminadas quando se usa estas ferramentas. A falta de epistasia entre marcadores também pode possibilitar a seleção para vários caracteres ao mesmo tempo.

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 ambas sejam transmitidas 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.

O uso de marcadores moleculares ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos, 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 será cada vez mais viável (MILACH e CRUZ, 1997; KUMAR, 1999).

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 (STAVELY, 2000; ALZATE-MARIN *et al.*, 2005; MIKLAS *et al.*, 2006). As informações geradas com o uso destes marcadores, associadas às informações relacionadas aos caracteres agronômicos 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/ou validado vários marcadores RAPD ligados a genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular. FALEIRO *et al.* (2000b) identificaram o marcador OPX11_{630a} ligado ao gene de resistência à ferrugem, presente na cultivar Ouro Negro, a uma distância de 5,8 cM. Também, na cultivar Ouro Negro, foram identificados os marcadores OPBA08_{530a} e OPF10_{1072a} ligados, respectivamente, a 6,0 e 4,3 cM de distância do gene de resistência à ferrugem (CORRÊA *et al.*, 2000); os marcadores OPAB16_{583a} e OPBA16_{669a} ligados a 10,4 cM de distância do gene de resistência à mancha angular (FALEIRO *et al.*, 2003). Ainda ligado ao gene de resistência à mancha angular da cultivar Ouro Negro, CORRÊA *et al.* (2001) identificaram os marcadores OPAA19_{400a} e OPM02_{425a} a 10,0 e 5,6 cM, respectivamente. Com relação à antracnose, ARRUDA *et al.* (2000) identificaram na cultivar TO os marcadores OPY20_{830a} e OPB03_{1800r} ligados a distâncias de 0,0 e 3,8 cM do gene *Co-4*. Na cultivar AB 136, ALZATE-MARIN *et al.* (1999) identificaram o marcador OPZ04_{560a} ligado ao gene que confere resistência à antracnose, a uma distância de 2,8 a 8,5 cM, em função do cruzamento e do patótipo avaliado. Nesta mesma cultivar, ALZATE-MARIN *et al.* (2000) identificaram o marcador OPAZ20_{940a}

ligado ao gene de resistência à antracnose *Co-6*, a uma distância de 7,4 cM. FALEIRO *et al.* (2000a) avaliaram uma população RC_3F_2 derivada do cruzamento de Rudá com Ouro Negro quanto à resistência à antracnose e 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. Nesta 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-MARIN *et al.* (2001a) avaliaram em populações $RC_3F_{2:3}$ (*Co-4*²) e $RC_1F_{2:3}$ (*Co-5*), derivadas do cruzamento entre as cultivares Rudá e G 2333, os marcadores OPAS13_{950a} (previamente reportado como ligado ao gene *Co-4*²) (YOUNG *et al.*, 1998) e OPAB03_{450a} (previamente reportado como ligado ao gene *Co-5*) (YOUNG e KELLY, 1997). No referido estudo os autores observaram que para a população $RC_3F_{2:3}$ o marcador OPAS13₉₅₀ estava ligado em acoplamento a 11,2 cM de distância do gene *Co-4*²; na população $RC_1F_{2:3}$ o marcador OPAB03₄₅₀ mostrou-se ligado em acoplamento a 16,4 cM de distância do gene *Co-5*. Neste mesmo estudo foi identificado na população $RC_3F_{2:3}$ o marcador OPH18_{1200a} ligado em fase de acoplamento a 5,6 cM do gene *Co-4*². Para a mancha angular, CARVALHO *et al.* (1998) identificaram o marcador OPH13_{490a} ligado a uma distância de 5,5 cM do gene de resistência *Phg-1* presente na linhagem AND 277. Os marcadores OPN02_{890a}, OPAC14_{2400a} e OPE04_{650a} foram identificados como ligados, respectivamente, a 5,9, 6,6 e 11,8 cM de distância do gene presente na cultivar Mexico 54, que confere resistência ao patótipo 63.19 de *P. griseola* (SARTORATO *et al.*, 1999). Segundo NIETSCHE *et al.* (2000b), os marcadores OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀ também estão ligados ao gene de resistência presente na cultivar Cornell 49-242, a uma distância de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente. CAIXETA *et al.* (2003) relataram que os marcadores OPAA07₉₅₀ e OPAO12₉₅₀ estão ligados a 5,1 e 5,8 cM, respectivamente, do gene de resistência ao patótipo 61.41 de *P. griseola* do cultivar BAT 332.

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; NIETSCHE *et al.*, 2000b; QUEIROZ *et al.*, 2004a, b, c).

As principais etapas executadas durante o desenvolvimento de um programa de piramidação de genes de resistência a doenças assistido por marcadores moleculares são: (i) identificação dos patótipos mais virulentos e prevalentes do patógeno, e com isso, a caracterização das fontes de resistência promissoras para a região a qual se destinam as novas cultivares; (ii) estudo da herança genética do mecanismo de

incompatibilidade aos patótipos identificados, a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência selecionadas e a cultivar suscetível de interesse; (iii) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência; (iv) obtenção de linhagens contendo os genes de resistência e as marcas moleculares correspondentes, mais frequentemente, via retrocruzamentos, e (v) piramidação dos alelos de resistência a partir de intercruzamentos entre as linhagens obtidas. Durante a condução de um programa desta natureza, as seguintes atividades são, também, consideradas como de rotina: (i) caracterização contínua da variabilidade genética do patógeno e do hospedeiro; (ii) caracterização e introdução de novas fontes de resistência ao programa; e (iii) identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Alguns exemplos em que a estratégia da piramidação de genes tem sido usada são reportados nos seguintes trabalhos:

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 estas linhagens apresentaram níveis superiores de resistência e/ou maior espectro de resistência que linhagens (genitores) com apenas um gene. Este resultado pode ser explicado devido à interação e/ou complementação entre genes de resistência (HUANG *et al.*, 1997).

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 cinco genes (*I*, *bc-u*, *bc-1²*, *bc-2²* e *bc-3*) que conferem resistência ao vírus do mosaico-comum do feijoeiro (BCMV). O USDA, em colaboração com as Estações de Experimentação Agrícola de Michigan, Nebraska e North Dakota, EUA, desenvolveram um total de 52 linhagens contendo genes piramidados para o BCMV e/ou para a ferrugem, com distintas combinações alélicas e em diferentes *backgrounds* genéticos (PASTOR-CORRALES, 2003). Outras linhagens de feijoeiro comum com genes piramidados para uma ou mais enfermidades são relatadas por KELLY *et al.* (2003), MUTLU *et al.* (2005) e BLAIR *et al.* (2007).

Em trabalhos conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, RAGAGNIN *et al.* (2009) piramidaram genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha angular (*Phg-1*) na cultivar de *background* carioca Rudá. Posteriormente COSTA *et al.* (2006) e COSTA (2007) utilizaram a pirâmide de genes no *background* carioca como genitor doador em retrocruzamentos com as cultivares Diamante Negro e Ouro Vermelho, que possuem grãos pretos e vermelhos, respectivamente. No intuito de tornar mais eficiente a pirâmide de resistência à antracnose do *background* carioca Rudá, ARRUDA (2005) substituiu o gene *Co-4* pela sua forma alélica *Co-4²* e introduziu o alelo *Co-5*, no material previamente obtido. O alelo *Co-4²* é o mais efetivo entre os alelos de resistência à antracnose já caracterizados, conferindo resistência a todos os patótipos de *C. lindemuthianum* identificados no Brasil. SOUZA (2005) piramidou os genes de resistência *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*, também no *background* carioca, utilizando a cultivar Rudá como genitor recorrente. Além disso, novas fontes de resistência à mancha angular (MAR-2, Mexico 54, BAT 332 e Cornell 49-242), têm sido adicionadas ao programa (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANGULARD *et al.*, 2007).

Um exemplo natural de genes piramidados é o da linhagem de feijão G 2333, utilizada como fonte de resistência à antracnose. Essa linhagem apresenta três alelos dominantes e independentes conferindo resistência a 380 isolados de *C. lindemuthianum* (YOUNG e KELLY, 1996). No Brasil ainda não foram identificados isolados de *C. lindemuthianum* capazes de suplantam a resistência da linhagem G 2333.

3.4.2. Melhoramento do feijão tipo carioca

Em 1970, o Programa de Melhoramento de Feijão do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou a primeira cultivar de feijão do tipo carioca, denominada de “Carioca” (ALMEIDA *et al.*, 1971). Esta cultivar, 30% mais produtiva do que outras variedades de feijão da época (Jalo, Mulatinho, Rosinha, Chumbinho, etc.), revolucionou o cultivo no país, com profundas alterações nos padrões de grãos produzidos e consumidos no Brasil (ALMEIDA, 2000). A preferência quanto aos tipos de feijões varia de região para região. Contudo, atualmente os feijões do tipo carioca representam em torno de 70% do feijão consumido (EMBRAPA, 2008b).

Com a intensificação do cultivo do feijão tipo carioca, os melhoristas procuraram obter novas linhagens, e nos últimos 30 anos foram obtidas centenas delas; que diferem, principalmente, com relação à tonalidade da cor creme do tegumento. Com

essa disponibilidade, o mercado passou a exigir detalhes de cor, formato e tamanho dos grãos.

A preferência dos consumidores de feijões do tipo carioca é por feijões de tegumento opaco, cor creme com rajas marrom-claras e fundo claro em relação aos feijões brilhantes e de fundo escuro. Isso ocorre devido à associação do brilho e da cor escura do grão com a dificuldade de cozimento (RAMALHO *et al.*, 2004). Uma possível explicação para a rejeição de grãos de fundo escuro é que a cor creme do fundo escurece após certo período de armazenamento e, com isso, a capacidade de absorção de água é reduzida, levando a um aumento no tempo de cozimento e à pior qualidade do produto final (RAMALHO e ABREU, 2006). Desse modo, todo feijão com fundo mais escuro é considerado como velho e de difícil cozimento. Assim os produtores e, conseqüentemente, os melhoristas têm se dedicado aos feijões mais claros, cuja cor se mantenha pelo maior tempo possível.

O escurecimento precoce dos grãos possivelmente depende do genótipo e do ambiente. Em relação ao ambiente, destacam-se a umidade no momento da colheita, o tempo de secagem dos grãos e as condições de armazenamento, principalmente no que se refere à umidade, à temperatura e à luminosidade. Ao que tudo indica, também a quantidade de polifenóis, especificamente o tanino, deve contribuir para o escurecimento mais acelerado dos grãos (JUNK-KNIEVEL *et al.*, 2007; SILVA, 2007).

Outro fator de fundamental importância na aceitação do tipo de grão refere-se à cor do halo em torno do hilo. Linhagens de halo amarelo, como a cultivar Carioca 80, lançada pelo IAC, apresentaram problemas de cozimento (RAMALHO e ABREU, 2006). De acordo com LEAKEY (1988), o gene J, responsável pela cor do halo e pelo brilho dos grãos, também acelera o processo de escurecimento. Assim, cultivares de grãos do tipo carioca de halo amarelo dificilmente serão aceitas pelos consumidores.

Os programas de melhoramento de feijoeiro do Brasil têm obtido, nos últimos anos, várias cultivares com tipo de grão carioca, a maioria com vantagens em termos de produtividade e resistência às doenças, em relação à cultivar Carioca original. Contudo, a aceitação de algumas delas foi baixa, fato que culminou na saída dessas cultivares do mercado, após alguns anos de cultivo, pois detalhes de cor, tamanho e forma do grão restringiram suas comercializações (RAMALHO e ABREU, 2006).

A cultivar Rudá, desenvolvida pelo CIAT, introduzida no Brasil como linhagem A285 pela Embrapa Arroz e Feijão, é um exemplo de cultivar recomendada e que teve aceitação limitada por não atender as exigências de mercado. Essa cultivar é oriunda do

cruzamento entre “Carioca” e “Rio Tibagi”. Após avaliação em vários ambientes, GO, DF, MG, ES, MS e PR, ela foi recomendada para cultivo nesses estados em 1992 (EMBRAPA, 2008b). Apesar desta cultivar apresentar bom potencial produtivo, seus grãos são pequenos e com tonalidade do fundo creme e rajas mais escuras, além de ser suscetível a maioria dos patótipos dos agentes causais da antracnose, da ferrugem e da mancha angular.

De um subprograma de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares conduzido pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV foi obtida a linhagem Vi 4899. Esta linhagem é proveniente do cruzamento entre o genitor recorrente Rudá e o genitor doador Ouro Negro. Na média de dezesseis ensaios regionais (VCU) na região sul do Brasil, esta linhagem mostrou superioridade de 13% em produtividade de grãos, quando comparada à média das testemunhas Carioca e Pérola. Além disso, apresentou reação de incompatibilidade a dez patótipos de *U. appendiculatus* e dezessete de *C. lindemuthianum*, e teor de proteína superior ao da cultivar Pérola. No ano de 2005, a linhagem Vi 4899 foi indicada para cultivo nos três estados do sul do país, com o nome “BRSMG Pioneiro” (MOREIRA *et al.*, 2005).

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV, ao utilizar marcadores moleculares na seleção assistida de genes de resistência a doenças, tem alcançado grande sucesso na obtenção de linhagens com amplo espectro de resistência a importantes doenças fúngicas do feijoeiro. A obtenção de linhagens do grupo comercial carioca com aspecto de grão superior ao do genitor recorrente Rudá, porém, praticamente não tem sido observada nos subprogramas de retrocruzamentos. Este fato torna necessário que cultivares “cariocas” com melhor aspecto de grão sejam incorporadas ao programa de melhoramento.

Fica evidente que no melhoramento de feijões do tipo carioca, além da produtividade, a resistência a doenças e o aspecto do grão são de suma importância para que uma nova cultivar possa se manter no mercado.

CAPÍTULO 1

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

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está sujeito ao ataque de vários patógenos, sendo esta uma das principais causas da sua baixa produtividade em território brasileiro. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., a ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus* e a mancha angular causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun merecem destaque dentre as doenças que acometem a cultura do feijoeiro no Brasil, devido aos danos que podem causar, bem como pelo grande número de formas patogênicas especializadas ou “patótipos” que estes fungos apresentam (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006).

Várias estratégias podem ser usadas no controle das doenças incitadas por esses patógenos, entretanto, o uso de cultivares resistentes é tido como o método mais efetivo, barato e fácil de ser adotado pelos produtores. A piramidação, uma estratégia de melhoramento que consiste na combinação ou introdução de diferentes genes de resistência em uma única cultivar, tem sido sugerida para aumentar tanto o espectro quanto a durabilidade da resistência às doenças (HITTALMANI *et al.*, 2000; KELLY *et al.*, 1995).

Em trabalhos anteriores do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV) priorizou-se a identificação, a caracterização e a incorporação, por retrocruzamentos, de genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular na cultivar de grãos tipo carioca Rudá. Posteriormente, isolinhas contendo individualmente os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), à mancha angular (*Phg-1*) e à ferrugem (*Ur-ON*) foram inter cruzadas e obtidas linhagens piramidadas para esses genes, denominadas de linhagens Rudá-R (RAGAGNIN *et al.*, 2009). Trabalhos conduzidos nesse mesmo programa mostraram que linhagens de *background* Rudá, que contêm, em separado, os genes *Co-5* e *Co-4*² da cultivar G 2333,

apresentam um amplo espectro de resistência aos patótipos de *C. lindemuthianum* identificados até o momento; as linhagens que possuem o alelo *Co-4*² apresentaram resistência a todos os patótipos testados (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004a). No intuito de tornar mais eficiente a pirâmide de resistência à antracnose do *background* carioca Rudá, ARRUDA (2005) substituiu na cultivar Rudá-R o gene *Co-4* pela sua forma alélica *Co-4*² e introduziu o alelo *Co-5*. Como resultado desse trabalho, foram selecionadas dezoito famílias F_{2:3}, cujas plantas F₂ apresentaram marcas moleculares estreitamente ligadas aos genes de resistência *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: obter linhagens contendo os genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*; avaliar em campo o desempenho produtivo e em casa de vegetação o espectro de resistência das linhagens piramidadas, quanto à reação a vários patótipos de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Foram utilizadas dezoito famílias $F_{2:3}$, previamente obtidas por ARRUDA (2005). Estas famílias foram obtidas a partir do cruzamento de uma isolinha da cultivar Rudá piramidada com os genes *Co-4*, *Co-6*, *Ur-ON/Co-10* e *Phg-1* (RAGAGNIN *et al.*, 2009) com duas outras isolinhas da cultivar Rudá, que continham em separado os genes *Co-4*² e *Co-5*, provenientes da cultivar G 2333. Nas avaliações em campo e em casa de vegetação, foram acrescentados como testemunhas o genitor recorrente Rudá e as fontes de resistência utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (G 2333, AB 136, AND 277 e Ouro Negro), além das linhagens Rudá-R, G 19-1-1-7 e G 1-46-7 que foram inter cruzadas para a piramidação dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens com alelos de resistência à antracnose, à ferrugem e à 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</i> , <i>Co-4</i> , <i>Co-6</i> e <i>Ur-ON/Co-10</i>
G 1-46-7	Rudá/G 2333	Antracnose	<i>Co-5</i>
G 19-1-1-7	Rudá/G 2333	Antracnose	<i>Co-4</i> ²

2.2. Local de condução dos experimentos

A seleção assistida dos alelos de resistência aos patógenos, utilizando marcadores moleculares, bem como a multiplicação e o preparo dos inóculos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Plantas, situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV), Viçosa-MG.

As etapas relacionadas às avaliações de patógenos sob inoculação artificial foram realizadas em câmaras de nevoeiro e em casa de vegetação, pertencentes ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro conduzido no BIOAGRO/UFV.

Os experimentos de campo foram conduzidos na Estação Experimental de Coimbra, Coimbra-MG, (690 m de altitude, 20° 45' S de latitude e 42° 51' W de longitude) pertencente ao Departamento de Fitotecnia/UFV.

Os cruzamentos e a obtenção de populações segregantes foram feitos em casa de vegetação, pertencentes ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

2.3. Seleção assistida por meio de marcadores moleculares

As famílias F_{2:3}, previamente obtidas no trabalho de ARRUDA (2005), foram conduzidas por autofecundações, utilizando-se o método genealógico. Nas gerações F₄ e F₅ foram realizadas seleções baseadas em marcadores moleculares ligados aos genes de resistência (Tabela 2). Em cada geração, apenas as plantas que apresentaram marcas moleculares para todos os alelos de resistência foram selecionadas e avançadas por autofecundação.

Tabela 2. Marcadores moleculares ligados em fase de acoplamento aos genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, utilizados na execução do trabalho

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Fonte de Resistência	Referências
SCAR Y20 ₈₃₀	1,2	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCAR AS13 ₉₅₀	0,0	<i>Co-4</i> ²	G 2333	YOUNG <i>et al.</i> (1998)
SCAR AB03 ₄₀₀	12,9	<i>Co-5</i>	G 2333	VALLEJO <i>et al.</i> (2001)
SCAR AZ20 ₈₄₅	7,1	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (2000), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCAR F10 ₁₀₇₂	4,3	<i>Ur-ON/Co-10</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2000)
SCAR BA08 ₅₃₀	6,0	<i>Ur-ON/Co-10</i>	Ouro Negro	CORREA <i>et al.</i> (2000)
SCAR H13 ₅₂₀	5,6	<i>Phg-1</i>	AND 277	CARVALHO <i>et al.</i> (1998), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)
OPX11 ₆₃₀	5,8	<i>Ur-ON/Co-10</i>	Ouro Negro	FALEIRO <i>et al.</i> (2000b)

cM: (centimorgan) distância genética dos marcadores moleculares em relação aos genes de resistência.

Na geração F₅ foi realizado um teste de progênie baseado em marcadores moleculares (Tabela 2), onde cada família F₅ teve pelo menos doze plantas analisadas; as famílias que apresentaram homozigose das marcas relacionadas aos genes de resistência foram submetidas a um teste de progênie com o patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, com o objetivo de discriminar plantas que possuíam o alelo *Co-4*² das que possuíam o alelo *Co-4*. Sementes produzidas pelas plantas F₆ resistentes ao patótipo 2047 foram multiplicadas para serem posteriormente avaliadas em ensaios de competição, em campo, e para serem avaliadas em casa de vegetação quanto à resistência a vários patótipos dos agentes causais da antracnose, da ferrugem e da mancha angular.

Em cada geração das famílias piramidadas, folhas das plantas foram coletadas e armazenadas em *freezer* a -80°C até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi feita de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995).

2.3.1. Análise de RAPD

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção, por meio da análise da presença de marcas moleculares ligados à resistência, foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com WILLIAMS *et al.* (1990). O *primer* OPX11 foi adquirido 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, MgCl_2 2 mM, 100 μM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μM do *primer*, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para uma etapa inicial de 94°C por 3 min seguida 40 ciclos, cada um constituído da seguinte sequência: 15 segundos a 94°C , 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C . Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C .

Após a amplificação foram adicionados a cada amostra 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 $\mu\text{g/ml}$), submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada durante um período de aproximadamente quatro horas, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.3.2. Análise de SCAR

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR em mistura de reação de 15 μL contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto para o *primer*, que foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* específico. O termociclador foi programado para uma etapa inicial de 94°C por 3 min seguida 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 65°C

(SCAR Y20, F10 e AB03), 60°C (SCAR AZ20 e BA08), 59°C (SCAR H13) por 1 minuto; 72°C por 90 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos.

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 SB 1X [hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico - BRODY e KERN (2004)]. A separação eletroforética foi realizada durante um período de aproximadamente 1,5 hora, a 120 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os produtos da amplificação do primer SCARAZ20 foram aplicados em gel de poliacrilamida nativo a 8%/TAE 1X (tris-acetato 40 mM, 1mM EDTA).

2.4. Caracterização da resistência de linhagens piramidadas

O espectro de resistência das linhagens de feijão de *background* carioca Rudá, piramidadas com os genes de resistência *Co-4²*, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* foram avaliadas quanto à reação a vários patótipos de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* (Tabela 3). Para tanto, foram semeadas quinze sementes de cada genótipo para cada patótipo avaliado. Os genótipos avaliados constaram das linhagens piramidadas, do genitor recorrente Rudá e das fontes de resistência usadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV: G 2333 (*Co-4²* e *Co-5*), AB 136 (*Co-6*), AND 277 (*Phg-1*) e Ouro Negro (*Ur-ON/Co-10*).

Tabela 3. Patótipos de *C. lindemuthianum* (CL), *U. appendiculatus* (UA) e *P. griseola* (PG) utilizados na caracterização fenotípica de linhagens piramidadas

Patógeno	Patótipo	Isolado	Patógeno	Patótipo	Isolado
CL	8	LV101 ^(a)	UA	29-15	1.1.1.1 ^(b)
CL	9	UFV01 ^(b)	UA	53-3	2.1.3.1 ^(b)
CL	55	264 ^(c)	UA	53-7	4.1.4.1 ^(b)
CL	65	400 ^(c)	UA	63-19	2 ^(b)
CL	71	LV96 ^(a)	PG	31.7	Coimbra 21 ^(b)
CL	73	497 ^(c)	PG	31.17	97-2 ^(b)
CL	81	538 ^(c)	PG	47.39	B ₄ 4 ^(b)
CL	89	1A ₂ ^(b)	PG	63.7	Coimbra20 ^(b)
CL	453	457 ^(c)	PG	63.19	48-1 ^(b)
CL	2047 ^(d)		PG	63.23	158-1 ^(b)
UA	21-3	2.2.3.1 ^(b)	PG	63.47	B ₃ 8 ^(b)
UA	29-3	10 ^(b)	PG	63.55	29-3 ^(b)

^(a) isolados identificados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Lavras;

^(b) isolados identificados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV; ^(c) isolados caracterizados por RAVA *et al.* (1994); ^(d) patótipo caracterizado por BALARDIN *et al.* (1997).

Para a avaliação da reação a *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, as sementes foram pré-germinadas em papel germitext, em câmara de germinação a 30°C. Após a emissão da radícula, as sementes foram transferidas para bandejas plásticas (60 x 40 x 12 cm) contendo uma mistura de solo e substrato agrícola Plant Max® devidamente adubada; no caso da mancha angular, a semeadura foi feita em vasos plásticos de 2,5 L, contendo uma mistura de solo e esterco curtido, devidamente adubada.

2.4.1 Inoculações com *Colletotrichum lindemuthianum*

Para a determinação do padrão de resistência/suscetibilidade das linhagens piramidadas e das testemunhas, foram realizadas inoculações utilizando-se dez patótipos de *C. lindemuthianum* (Tabela 3).

A produção de inóculo dos distintos patótipos de *C. lindemuthianum* foi feita de forma separada, a partir de culturas monospóricas mantidas em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Os isolados do fungo foram repicados para tubos de ensaio contendo o meio esterilizado BDA com vagens de feijão cozidas parcialmente imersas, em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminações. Após repicagem, os tubos foram vedados e transferidos para BOD a 24°C, onde permaneceram por sete a nove dias, tempo suficiente para produção dos conídios utilizados na inoculação. A inoculação foi feita oito dias após o plantio, utilizando-se uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15 acionado por um compressor elétrico.

Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas entre cinco a sete dias em câmara de nevoeiro ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ e $>95\%$ de umidade relativa), sob fotoperíodo de doze horas. Após este período foi feita a avaliação dos sintomas da antracnose, com base na escala de 1 a 9, descrita por RAVA *et al.* (1993). Onde: 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. Os genótipos que apresentaram graus médios de reação de 1 a 3,5 foram considerados resistentes, e aqueles que apresentaram graus médios superiores a 3,5, foram considerados como suscetíveis.

2.4.2. Inoculações com *Uromyces appendiculatus*

Para a avaliação da resistência à ferrugem, foram utilizados seis patótipos de *U. appendiculatus* identificados por FALEIRO *et al.* (1997) e reclassificados por SOUZA *et al.* (2007a) (Tabela 3). As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredósporos. A inoculação foi realizada quando as folhas primárias apresentaram aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de oito dias após o plantio. Os uredósporos, na concentração de $2,0 \times 10^4$ esporos/mL, foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e aspergidos em ambas as superfícies foliares com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de doze horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas, cerca de quinze dias após a inoculação.

Na avaliação dos sintomas foram considerados seis graus de reação, segundo a escala proposta no “The Bean Rust Workshop”. Onde: 1- ausência de pústulas; 2- manchas necróticas sem esporulação; 3- pústulas esporulando com diâmetro < 300 µm; 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300 a 499 µm; 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500 a 800 µm; 6- pústulas esporulando com diâmetro > 800 µm (STAVELY *et al.*, 1983). Os genótipos que apresentaram graus médios de reação 1 a 3,5 foram considerados resistentes, e aqueles que apresentaram graus médios superiores a 3,5 foram considerados como suscetíveis. O grau de severidade da doença foi determinado mediante a observação visual das pústulas em ambas as faces das folhas primárias, sendo utilizado, como auxílio nas observações, o diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985).

2.4.3. Inoculações com *Pseudocercospora griseola*

A caracterização da resistência à mancha angular foi realizada utilizando-se de dez patótipos de *P. griseola* classificados por NIETSCHE (1997 e 2000b) e BALBI *et al.* (2007) (Tabela 3). O inóculo de cada patótipo foi obtido a partir da multiplicação do fungo em placas de Petri contendo uma mistura de água destilada, molho de tomate, ágar, carbonato de cálcio (CaCO_3) e estreptomicina. A inoculação foi realizada após o aparecimento da segunda folha trifoliolada, em ambas as superfícies do primeiro par de folhas trifolioladas, com uma suspensão do patógeno, previamente preparada e ajustada para concentração de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL. Os procedimentos de inoculação e transferência para a câmara de nevoeiro e para a casa de vegetação foram idênticos aos realizados no ensaio de ferrugem.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 e 25 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995): Onde: 1- plantas sem sintomas da doença; 2- presença de até 3% de lesões; 3- presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4- presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5- presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20-25% da área foliar; 8- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; 9- sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, os genótipos que apresentaram graus médios de reação 1 a 3,5 foram considerados resistentes, e aqueles que apresentaram graus médios superiores a 3,5, foram considerados como suscetíveis.

2.5. Avaliações de campo

Para determinar o potencial de rendimento das linhagens piramidadas, foram montados dois ensaios de competição: um com plantio em agosto/2007 (plantio de “inverno”) e outro com plantio em março/2008 (plantio da “seca”). No primeiro experimento, o sistema de plantio adotado foi o de plantio direto; no segundo, o sistema convencional, no qual o solo foi previamente arado e gradeado.

Os tratamentos constituíram-se de doze linhagens piramidadas com os genes de resistência (*Co-4²*, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*). Como testemunhas foram

utilizados os genitores empregados no processo de obtenção destas linhagens (Rudá, G 2333, AB 136, Ouro Negro, AND 277, Rudá-R, G 1-46-7, G 19-1-1-7) e as linhagens/cultivares de grãos tipo carioca: Pérola, BRSMG Talismã, Majestoso, VC 3 e VC 6.

No plantio de “inverno”, o delineamento experimental utilizado foi o látice quadrado triplo, com parcelas de duas linhas de 2,0 m de comprimento, espaçadas em 45 cm, com densidade de 15 sementes por metro; no plantio da “seca”, o delineamento experimental utilizado foi o látice quadrado triplo, com parcelas de duas linhas de 1,5 m de comprimento, espaçadas em 50 cm, com densidade de 15 sementes por metro. O suprimento de água nos períodos de déficit hídrico foi mantido por meio de irrigações suplementares. Nos dois plantios foram aplicados 350 kg/ha do formulado 8-28-16 de N-P-K; aos 25 dias após a emergência das plantas foram aplicados 150 kg/ha de sulfato de amônio, em cobertura. O controle de plantas daninhas e de pragas foi realizado de acordo com o recomendado para a cultura. Para o plantio da “seca” foram realizadas duas aplicações de fungicida para controle do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Estas aplicações foram feitas preventivamente em função das condições ambientais favoráveis e de um histórico de ocorrência de grande incidência de mofo-branco na área utilizada para implantação do experimento.

Além do rendimento, foi avaliado, nas duas safras, o aspecto dos grãos. Para avaliação desta característica foram atribuídas notas à cultivar Rudá (nota 4,0) e a quatro testemunhas com padrão comercial de grãos: BRSMG Talismã (nota 2,5), Majestoso (nota 2,5), Pérola (nota 2,0) e VC-3 (nota 1,5). A menor nota atribuída (nota 1,0) referiu-se ao grão tipicamente carioca, de cor creme com estrias marrom-claras, fundo claro, halo creme, peso médio de 100 sementes de 22 a 24 g e não achatado. A maior nota (nota 5,0) referiu-se ao grão de cor creme com estrias marrom-escuras, fundo escuro, com halo não creme, peso médio de 100 sementes menor que 22 g e achatado (RAMALHO *et al.*, 1998). A nota 5,0 também foi atribuída aos grãos pertencentes a outros grupos comerciais.

A nota referente ao tipo dos grãos de cada tratamento foi atribuída comparativamente às notas atribuídas às testemunhas. Assim, uma amostra de cada repetição foi examinada por três avaliadores, ficando atribuída a nota prevalecente entre os três.

Na safra de “inverno”, em função de uma alta incidência de ferrugem que ocorreu no campo experimental, foi avaliado o padrão de resistência/suscetibilidade das

linhagens piramidadas quanto às populações de *U. appendiculatus* prevalentes naquela condição ambiental. A avaliação dos sintomas foi feita conforme apresentado no item 2.4.2.

2.5.1. Análise dos dados obtidos no campo

Os dados referentes à produtividade de grãos foram submetidos a análise de variância por ambiente (safras). Os efeitos de tratamentos e a média foram considerados como fixos, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + r_j + b_{k(j)} + e_{ijk}; \quad (1)$$

em que:

Y_{ijk} : observação referente ao tratamento i , no bloco k , dentro da repetição j ;

μ : média geral do experimento;

t_i : efeito do tratamento i ($i = 1, 2, \dots, 25$ para safra de “inverno”; $i = 1, 2, \dots, 169$ safra da “seca”);

r_j : efeito da repetição j ($j = 1, 2, 3$);

$b_{k(j)}$: efeito do bloco k dentro da repetição j ($k = 1, 2, \dots, 5$ para safra de “inverno”; $k = 1, 2, \dots, 13$ para safra da “seca”);

e_{ijk} : erro experimental associado à observação Y_{ijk} , assumindo $e_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Considerou-se que a heterogeneidade do solo dentro de cada bloco não é capaz de influenciar os caracteres aspecto dos grãos e severidade da ferrugem, sendo adotado, portanto, para as análises de variância o modelo estatístico de blocos ao acaso.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}; \quad (2)$$

em que:

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

μ = média geral do experimento;

t_i = efeito tratamento i ($i = 1, 2, \dots, 25$ para a safra de “inverno”; $i = 1, 2, \dots, 169$ para a safra da “seca”);

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

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

Assim como para a característica produtividade de grãos, as características aspecto dos grãos e severidade da ferrugem tiveram os efeitos de tratamentos e média considerados como fixos.

Análises de variância conjunta foram realizadas para as características de produtividade (médias ajustadas dos tratamentos comuns nas duas safras) e aspecto dos grãos (médias dos tratamentos comuns nas duas safras), conforme RAMALHO *et al.* (2005). A pressuposição de homogeneidade de variâncias residuais foi atendida para a realização das análises conjuntas, conforme PIMENTEL-GOMES (1990). Todos os efeitos foram considerados como fixos, exceto o efeito de bloco e o erro médio, conforme o modelo a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + a_k + (ta)_{ik} + r_{j(k)} + e_{ijk}; \quad (3)$$

em que:

Y_{ijk} : observação referente ao tratamento i dentro da repetição j , no ambiente (safra) k ;

μ : média geral;

t_i : efeito do tratamento i ($i = 1, 2, \dots, 25$);

a_k : efeito do ambiente k ($k = 1, 2$);

$(ta)_{ik}$: efeito da interação entre o tratamento i e o ambiente (safra) k ;

$r_{j(k)}$: efeito da repetição j dentro do ambiente (safra) k ($j = 1, 2$);

e_{ijk} : erro experimental médio associado à observação Y_{ijk} .

As médias de produtividade, aspecto de grão e severidade da ferrugem foram submetidas ao teste de Dunnet. Além de análises de teste de média, o programa GENES (CRUZ, 2006) foi utilizado nas análises de variância individuais das características para as quais foi adotado o modelo estatístico de blocos ao acaso (aspecto dos grãos e severidade da ferrugem). O programa computacional MSTAT-C (MSU, 1991) foi utilizado nas análises de variâncias individuais da característica produtividade de grãos, para a qual foi adotado o modelo estatístico látice quadrado triplo.

2.6. Cruzamentos teste

O *primer* SAB3_{400a} tem mostrado estar ligado ao gene *Co-5* a uma distância de aproximadamente 15,0 cM (VALLEJO *et al.*, 2001; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001a; ALZATE-MARIN *et al.*, 2002b). Essa distância relativamente grande torna limitada a sua utilização em programas de piramidação de genes de resistência. Entretanto, este é o único *primer* disponível, até o momento, para monitorar o gene *Co-5*. O *primer* SAZ20_{845a} mapeado a 7,1 cM do loco *Co-6* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2004b) tem apresentado como inconveniente adicional grande dificuldade de discriminação dos genótipos. Para este *primer*, tanto indivíduos suscetíveis quanto os

resistentes têm apresentado marcas moleculares de tamanhos extremamente similares e, portanto, de difícil distinção em gel de agarose, sendo necessária a sua separação em gel de poliacrilamida a 8%.

Diante de tais dificuldades técnicas, foram realizados cruzamentos teste para certificar-se que ao final do processo de piramidação os genes de resistência à antracnose *Co-5* e *Co-6* realmente se encontravam fixados. Para isto, uma linhagem com marcas moleculares associadas aos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*/ foi cruzada com as fontes de resistência AB 136 (*Co-6*) e SEL 1360 (*Co-5*). Populações F₂ obtidas dos dois cruzamentos, os três genitores e a testemunha suscetível Rudá foram inoculadas com o patótipo 65 do agente causal da antracnose. Os procedimentos de preparo do inóculo, inoculação e avaliação da doença deram-se conforme descrito no item 2.4.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção assistida por marcadores moleculares e por inoculação

A seleção por meio de marcadores moleculares foi realizada nas gerações F₄ e F₅, sendo que na geração F₄ foram utilizados apenas os marcadores moleculares do tipo SCAR (Tabela 2). Somente na geração F₅ foram utilizados todos os marcadores. Esse procedimento foi adotado devido a dificuldades encontradas na reprodutibilidade do marcador RAPD OPX11₆₃₀. Além disso, dois marcadores moleculares do tipo SCAR (SF10₁₀₇₂ e SBA08₅₃₀) já estavam disponíveis no monitoramento dos genes *Ur-ON/Co-10*.

No primeiro ciclo de seleção, executado neste trabalho, cada uma das dezoito famílias F_{2:3} teve aproximadamente dez plantas F₄ selecionadas aleatoriamente e genotipadas com marcadores moleculares. De aproximadamente 180 plantas F₄ analisadas, apenas doze apresentaram todas as marcas moleculares relacionadas aos genes de interesse, representando sete das dezoito famílias F_{2:3} (Tabela 4). No caso dos genes que possuem duas marcas moleculares relacionadas (*Co-4*² e *Ur-ON/Co-10*), plantas que apresentaram apenas uma marca molecular relacionada ao gene de resistência foram descartadas, como por exemplo, o genótipo 3-2-92 (Tabela 4). As doze plantas F₄ com todas as marcas moleculares associadas aos genes de resistência foram selecionadas e autofecundadas para formarem famílias F_{4:5}.

Tabela 4. Padrão de presença/ausência das marcas moleculares nas linhagens genitoras e nas progênes F₄

Genótipos	Marcadores Moleculares						
	H13 ₅₂₀ (Phg-1)	F10 ₁₀₇₂ (Ur-ON/Co-10)	BA08 ₅₃₀ (Ur-ON/Co-10)	AB03 ₄₀₀ (Co-5)	Y20 ₈₃₀ (Co-4 ²)	AS13 ₉₅₀ (Co-4 ²)	AZ20 ₈₄₅ (Co-6)
Rudá-R	+	+	+	-	+	+	+
G 19-1-1-7	-	-	-	-	+	+	-
G 1-46-7	-	-	-	+	-	-	-
2-4-109*	+	+	+	+	+	+	+
2-4-110*	+	+	+	+	+	+	+
15-2-99*	+	+	+	+	+	+	+
15-2-100*	+	+	+	+	+	+	+
15-3-102*	+	+	+	+	+	+	+
29-6-52*	+	+	+	+	+	+	+
33-2-67*	+	+	+	+	+	+	+
427-1-21*	+	+	+	+	+	+	+
427-3-85*	+	+	+	+	+	+	+
257-1-28*	+	+	+	+	+	+	+
257-1-29*	+	+	+	+	+	+	+
165-4-32*	+	+	+	+	+	+	+
3-2-92**	+	+	-	+	+	+	+

+ = presença da marca, - = ausência da marca, * plantas selecionadas, ** planta descartada

A importância de avançar apenas os genótipos que apresentaram todas as marcas moleculares está no princípio de que, ao final do processo de fixação dos genes, quando as linhagens encontrarem-se em homozigose, quanto maior for o número de marcas moleculares associadas a esses genes, maiores serão as possibilidades de transferência dos alelos de resistência para outros *backgrounds*, utilizando-se da seleção assistida por marcadores moleculares.

Sementes F₅, obtidas das plantas F₄ selecionadas com marcadores moleculares, foram avaliadas visualmente quanto ao aspecto dos grãos; cinco famílias F_{4:5} com aspecto de grão inferior ao da cultivar Rudá foram descartadas, e as sete famílias selecionadas foram genotipadas com os marcadores SCAR relacionados aos genes de resistência. Nesta etapa de genotipagem, para cada planta F₄ selecionada, aproximadamente quinze plantas F₅ foram analisadas com marcadores moleculares.

Na genotipagem da geração F_{4:5}, apenas para os marcadores SBA08₅₆₀ (*Ur-ON/Co-10*) e SAB03₄₀₀ (*Co-5*) foram observadas famílias segregantes. A presença de famílias segregantes na geração F_{4:5} referentes ao marcador SAB3₄₀₀ pode ter ocorrido devido não apenas ao fato da planta F₄ selecionada estar em heterozigose, como também devido a eventuais eventos de recombinação, já que o primer SAB03_{400a} se encontra a uma distância relativamente grande em relação ao gene *Co-5* (VALLEJO *et al.*, 2001; ALZATE-MARIN *et al.*, 2001a; ALZATE-MARIN *et al.*, 2002b). Em relação ao marcador SBA08_{560a}, a ocorrência de recombinantes em maior frequência do que para o marcador SF10_{1072a}, que também marca os genes *Ur-ON/Co-10*, já era esperada, devido à maior distância em que o marcador SBA8_{560a} encontra-se do gene *Ur-ON* (CORRÊA *et al.*, 2000).

Duas plantas F₅ com marcas moleculares relacionadas a todos os genes de resistência foram escolhidas para representar cada uma das sete famílias F_{4:5} e constituir quatorze famílias F_{5:6}, as quais foram analisadas em teste de progênie com o patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*. A amplificação do DNA destas quatorze plantas selecionadas com o marcador RAPD OPX11 revelou a presença de uma banda de 630 pares de bases. Esta marca foi previamente reportada como ligada em acoplamento ao gene *Ur-ON* (FALEIRO *et al.*, 2000b). Vale ressaltar que os marcadores OPX11_{630a} e SF10_{1072a} flanqueiam o gene *Ur-ON* (FALEIRO *et al.*, 2000b), o que reforça as garantias de que o gene *Ur-ON* não foi perdido durante o processo de piramidação, mostrando que os marcadores SF10_{1072a} e SBA08_{560a} foram eficientes no monitoramento deste gene. Em função dos genes *Ur-ON* e *Co-10* compartilharem o mesmo grupo de ligação a uma

distância de 12,3 cM (CORRÊA, 1999; FALEIRO *et al.*, 2000), é razoável considerar que os marcadores SF10_{530a} e SBA8_{560a} também foram eficientes no monitoramento do gene *Co-10*.

Ao avaliar quinze plantas F₆ de cada uma das quatorze plantas F₅ previamente selecionadas, nove famílias mostraram-se totalmente resistentes ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, permitindo inferir que as plantas F₅ correspondentes apresentam o alelo *Co-4*² fixado (Tabela 5). Outras três comportaram-se como segregantes, apresentando plantas suscetíveis e resistentes, provavelmente, em razão das plantas F₅ correspondentes a estas famílias ainda encontrarem-se em heterozigose para o alelo *Co-4*². As duas outras famílias apresentaram o total das plantas suscetíveis, podendo-se dizer que as plantas F₅ apresentaram marcas associadas apenas ao alelo *Co-4*, que não confere resistência ao patótipo utilizado na inoculação.

Tabela 5. Famílias F_{5,6} selecionadas por apresentarem marcas moleculares relacionadas a todos os genes de resistência, além de aspecto do grão similar ao da cultivar Rudá

Família	Planta F ₅	Reação ao patótipo 2047	Genótipo
33-2-67	49	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
33-2-67	50	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
427-1-21	11	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
427-1-21	60	Homozigota S	<i>Co-4</i> / <i>Co-4</i>
427-3-85	31	Heterozigota	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i>
427-3-85	33	Heterozigota	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i>
29-6-52	28	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
29-6-52	25	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
15-2-100	26	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
15-2-100	42	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
15-3-102	39	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
15-3-102	43	Homozigota R	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i> ²
2-4-110	57	Heterozigota	<i>Co-4</i> ² / <i>Co-4</i>
2-4-110	59	Homozigota S	<i>Co-4</i> / <i>Co-4</i>

R= Resistente, S= Suscetível

Foi necessário realizar um teste de progênie com o patótipo 2047 de *C. lindemuthianum* devido ao fato de o *Co-4*² ser um alelo do gene *Co-4* presente na linhagem Rudá-R; e para que o alelo *Co-4*² fosse fixado nas novas linhagens piramidadas, tornou-se necessário que o gene *Co-4* fosse substituído. Entretanto, como o gene *Co-4* e seu alelo foram selecionados com base nos mesmos marcadores moleculares (SAS13 e SY20), a distinção entre as plantas que apresentaram marcas relacionadas ao alelo *Co-4*², foi possível apenas por meio da inoculação com o patótipo

2047 de *C. lindemuthianum*. Vale salientar que, dos genes monitorados no presente trabalho, somente o *Co-4*² é capaz de conferir resistência ao patótipo 2047.

As duas famílias que mostraram homozigose para a suscetibilidade ao patótipo 2047 foram descartadas e as plantas resistentes das famílias heterozigotas e homozigotas resistentes foram avançadas a partir dessa geração na forma de *bulk* dentro de família, por considerar que o material já se encontrava em alto nível de homozigose. Com isso foram obtidas doze linhagens com grãos tipo carioca em homozigose para os marcadores SH13, SF10, SBA08, SAB03, SY20, SAS13 e SAZ20 e com resistência ao patótipo 2047.

3.2. Caracterização da resistência das linhagens piramidadas

Estudos realizados por RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.* (2007, 2008) sugeriram que os locos de resistência à antracnose do feijoeiro comum são organizados em *clusters* de vários genes, cada um conferindo resistência a um ou a poucos patótipos. Os autores dos referidos trabalhos também ressaltaram que a existência de recombinação *intra-cluster* pode ser de considerável importância prática, pois genes raça-específicos presentes em diferentes haplótipos do mesmo *cluster* poderiam ser piramidados por recombinação genética dentro do respectivo *cluster*; após o acúmulo dos genes de resistência específica, o novo haplótipo recombinante poderia ser introgridido em variedades suscetíveis, praticamente como um loco simples. No entanto, devemos considerar que, se por um lado a recombinação *intra-cluster* cria a possibilidade supracitada, ela também cria a possibilidade de que a seleção via marcadores moleculares não seja plenamente efetiva no monitoramento da transferência da resistência para cultivares comerciais, por mais próximo que o marcador esteja do *cluster* de resistência.

Como o modelo de resistência determinada por genes agrupados em *cluster* também parece se aplicar aos casos da resistência do feijoeiro à mancha angular e à ferrugem, a caracterização fenotípica das linhagens obtidas no presente trabalho torna-se importante para determinar se os níveis de resistência presentes nos genótipos fontes se mantiveram nas linhagens piramidadas.

As doze linhagens piramidadas avaliadas neste trabalho apresentaram resistência aos dez patótipos de *C. lindemuthianum* testados (Tabela 6), espectro de resistência idêntico ao da linhagem genitora G 19-1-1-7 (gene *Co-4*²) e ao da fonte de resistência G 2333. As linhagens genitoras G 1-46-7, Rudá-R e as fontes de resistência AB 136 e

Ouro Negro apresentaram amplo espectro de resistência, com as três primeiras apresentando suscetibilidade apenas ao patótipo 2047, e a última mostrando suscetibilidade apenas aos patótipos 65 e 2047. O amplo espectro de resistência à antracnose das linhagens G 1-46-7, G 19-1-1-7 e da cultivar Ouro Negro corrobora resultados previamente obtidos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a, 2004a; RAGANIN *et al.*, 2003).

Como ainda não foram identificados, no Brasil, patótipos de *C. lindemuthianum* capazes de suplantar a resistência dos genes presentes nas cultivares G 2333 (*Co-4*², *Co-5* e *Co-3/Co-7*) e AB 136 (*Co-6* e *co-8*) (SOMAVILLA e PRESTES, 1999; CARBONELL *et al.* 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008), espera-se que a resistência presente nas doze linhagens piramidadas obtidas no presente trabalho seja efetiva a todos os patótipos desse patógeno já identificados em território nacional.

Tabela 6. Severidade de antracnose em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum*

Genótipos	Patótipos de <i>C. lindemuthianum</i>									
	8	9	55	71	65	73	81	89	453	2047
G 2333	1,0*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
AB 136	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0
Ouro Negro	1,0	2,1	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0
G 1-46-7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	8,7
G 19-1-1-7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
Rudá-R	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	9,0
Rudá	9,0	9,0	4,0	1,0	9,0	9,0	9,0	9,0	7,0	9,0
33-2-67-49	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1
33-2-67-55	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	2,1
427-3-85-31	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
427-3-85-33	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
427-1-21-11	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
29-6-52-28	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
29-6-52-25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
15-2-100-26	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0
15-2-100-42	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
15-3-102-39	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1
15-3-102-43	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,4	1,0
2-4-110-57	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9. Genótipos com notas médias superiores a 3,5 foram considerados suscetíveis.

No caso da mancha angular, as doze linhagens apresentaram resistência a seis de dez patótipos avaliados e espectro de resistência correspondente ao da linhagem genitora Rudá-R e ao da fonte de resistência AND 277 (Tabela 7). CAIXETA *et al.* (2005), por meio de estudos de alelismo entre fontes de resistência à mancha angular,

demonstraram que AND 277 possui os genes *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*², mas há a possibilidade de que um destes genes seja uma forma alélica do gene *Phg-1*, anteriormente identificado por CARVALHO *et al.* (1998). Como na obtenção das linhagens avaliadas neste estudo o marcador molecular utilizado no processo de seleção do gene de resistência à mancha angular foi o SCAR H13₅₂₀, que está ligado em fase de acoplamento a 5,6 cM do gene *Phg-1*, pode-se inferir que este gene responde por grande parte do espectro de resistência da cultivar AND 277. Por outro lado, a cultivar Ouro Negro apresentou resistência a todos os patótipos de *P. griseola* aos quais a AND 277 e as linhagens piramidadas mostraram-se suscetíveis.

Tabela 7. Severidade de mancha angular em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *P. griseola*

Genótipos	Patótipos de <i>P. griseola</i>									
	31.7	31.17	47.39	63.7	63.19	63.23	63.31	63.47	63.55	63.63
AND 277	1,9*	1,6	4,3	1,0	1,0	2,0	1,8	8,0	7,9	6,3
Ouro Negro	1,0	9,0	1,6	1,0	8,0	1,0	9,0	1,0	1,6	1,0
G 1-46-7	4,0	8,0	3,1	8,0	6,0	8,5	9,0	4,8	7,0	2,9
G 9-1-1-7	4,5	8,0	2,5	6,2	5,1	7,4	8,2	5,4	9,0	1,3
Rudá-R	1,0	1,0	7,5	1,0	1,0	1,0	1,5	8,6	9,0	8,1
Rudá	6,4	9,0	3,0	6,7	8,0	7,5	8,7	5,0	9,0	1,2
33-2-67-49	1,0	1,0	8,3	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	9,0	7,8
33-2-67-55	1,0	1,0	7,6	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	9,0	7,1
427-3-85-31	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,0	9,0	7,8
427-3-85-33	1,0	1,0	7,9	1,0	1,0	1,0	1,0	8,7	9,0	9,0
427-1-21-11	1,0	1,0	8,1	1,0	1,0	1,0	1,0	6,4	9,0	7,3
29-6-52-28	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,2	9,0	6,3
29-6-52-25	1,0	1,0	8,2	1,0	1,0	1,0	1,0	8,4	9,0	4,2
15-2-100-26	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,6	9,0	6,1
15-2-100-42	1,0	1,0	8,4	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	9,0	8,3
15-3-102-39	1,0	1,0	8,6	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	9,0	4,7
15-3-102-43	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,5	9,0	6,8
2-4-110-57	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	9,0	9,0

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9. Genótipos com notas médias superiores a 3,5 foram considerados suscetíveis.

Ao estudar a herança da resistência aos patótipos 63.39 e 31.23 em populações derivadas de Ouro Negro e US Pinto 111, CORRÊA *et al.* (2001) concluíram que a resistência à mancha angular proveniente de Ouro Negro é conferida por um único gene dominante. SARTORATO (2006) estudou a reação de 28 genótipos de feijoeiro quanto à reação a oito patótipos de *P. griseola*; a cultivar Ouro Negro enquadrou-se entre as de maior grau de resistência, sendo a única a apresentar resistência ao patótipo 63.63.

A cultivar Rudá apresentou suscetibilidade a oito dos dez patótipos de *P. griseola*, mostrando-se resistente somente aos patótipos 47.39 e 63.63, justamente dois dos quatro patótipos que a AND 277 e as linhagens piramidadas apresentaram suscetibilidade (Tabela 7). Como todas as isolinhas da cultivar Rudá que contém os

genes de resistência individualizados tiveram grande parte do genoma do genitor recorrente Rudá recuperado por retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares (RAGAGNIN *et al.*, 2003; ALZATE-MARIN *et al.*, 2004), era de se esperar que o gene de resistência presente em Rudá, que confere resistência aos patótipos 47.39 e 63.63, tivesse sido transferido para as isolinhas e, conseqüentemente, tivesse se manifestado nas linhagens piramidadas obtidas no presente trabalho.

Uma possível explicação para que a resistência aos patótipos 47.39 e 63.63 presente em Rudá não tenha sido manifestada nas linhagens piramidadas é que o gene que determina a resistência nesta cultivar encontra-se em repulsão com algum dos marcadores relacionados aos genes *Phg-1*, *Co-6* e *Ur-ON/Co-10*.

A resistência aos patótipos 47.39 e 63.63 das linhagens G 1-46-7 e G 19-1-1-7, praticamente similar ao da cultivar Rudá, sugere que a seleção para os genes *Co-5* e *Co-4*² não interferiu na manifestação da resistência, provavelmente, proveniente de Rudá. Além disso, uma completa recuperação do *background* genético de Rudá não se mostrou necessária para que a resistência aos patótipos 47.39 e 63.63 de *P. griseola* se manifestasse. Isso porque a linhagem G 1-46-7 é proveniente de um único ciclo de retrocruzamento, apresentando apenas 72,13% de similaridade com o genitor recorrente Rudá (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004a).

Em relação à ferrugem, uma maior variabilidade no espectro de resistência das linhagens piramidadas foi observada embora, de modo geral, elas tenham apresentado resistência comparável a da linhagem genitora Rudá-R e a fonte de resistência Ouro Negro (Tabela 8).

As linhagens 427-3-85-31, 427-3-85-33, 427-1-21-11, 15-2-100-26, 15-2-100-42, 15-3-102-39, 15-3-102-43 e 2-4-110-57 foram as que apresentaram espectro de resistência mais amplo, comportando-se como resistentes aos seis patótipos de *U. appendiculatus* avaliados. Quatro linhagens apresentaram suscetibilidade a pelo menos um patótipo: linhagens 33-2-67-49 e 29-6-52-25 (patótipos 29-15, 53-7 e 63-19), linhagem 29-6-52-28 (patótipos 29-15 e 63-19) e linhagem 33-2-67-55 (patótipos 63-19). As linhagens que apresentaram suscetibilidade a algum patótipo de *U. appendiculatus* têm origem comum na população segregante F₂ da qual foram obtidas as linhagens piramidadas; linhagens 33-2-67-49 e 33-2-67-55 (planta 33) e as linhagens 29-6-52-25 e 29-6-52-28 (planta 29).

Tabela 8. Severidade de ferrugem em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*

Genótipos	Patótipos de <i>U. appendiculatus</i>					
	21-3	29-15	29-3	53-3	53-7	63-19
Ouro Negro	1,5*	3,0	2,3	2,0	3,0	3,0
Rudá-R	1,1	3,0	2,3	1,0	2,4	3,4
Rudá	4,0	4,2	4,0	4,0	4,4	4,5
33-2-67-49	2,5	3,6	3,0	1,7	3,6	4,8
33-2-67-55	2,2	3,1	3,0	1,0	3,5	4,5
427-3-85-31	1,0	3,1	2,2	1,0	3,0	3,0
427-3-85-33	1,3	3,3	2,2	2,0	3,0	3,2
427-1-21-11	1,0	3,0	2,0	2,0	3,0	2,8
29-6-52-28	1,1	3,7	3,0	1,3	3,1	4,2
29-6-52-25	1,0	3,8	3,0	2,0	3,7	4,4
15-2-100-26	1,0	3,2	2,8	2,0	3,2	3,1
15-2-100-42	1,7	3,3	2,5	1,4	3,2	3,2
15-3-102-39	1,4	2,9	2,0	1,3	3,0	3,1
15-3-102-43	1,5	3,2	2,0	1,2	3,4	3,2
2-4-110-57	1,6	2,8	1,7	1,3	2,6	2,7

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 6. Genótipos com notas médias superiores a 3,5 foram considerados suscetíveis.

Na identificação dos marcadores OPBA08530 e OPF10₁₀₇₂, CORRÊA *et al.* (2000) utilizaram a mistura de quatro patótipos de *U. appendiculatus* para avaliar a resposta de resistência/suscetibilidade de 303 famílias F_{2:3}, provenientes do cruzamento US Pinto 111 x Ouro Negro. Na identificação do marcador OPX11₆₃₀ foi utilizada a mistura de oito patótipos do agente causal da ferrugem em uma população de 214 indivíduos F₂, também originada do cruzamento US Pinto 111 x Ouro Negro (FALEIRO *et al.*, 2000b). Em ambos os estudos, os autores observaram que um único gene dominante ou bloco gênico confere resistência à ferrugem em Ouro Negro. No entanto, FALEIRO *et al.* (2003), ao analisarem a segregação da resistência de uma população de 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL), obtidas do cruzamento Rudá x Ouro Negro, observaram que a resistência à ferrugem da cultivar Ouro Negro a alguns patótipos é típica de uma característica monogênica, enquanto que para outros patótipos é uma característica governada por dois genes dominantes e independentes.

Segundo FLOR (1955), para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. De acordo com esta teoria, denominada de teoria gene-a-gene, os genes que conferem resistência raça-específica (genes de efeito maior ou genes R) atuam diferenciadamente com o genótipo do patógeno (patótipo). Em feijão, os estudos de diversidade e de organização genômica dos genes R têm mostrado que existem vários genes raça-específicos e que estes têm sido mapeados em poucos locos, os quais podem ser constituídos por genes isolados, por genes organizados em *clusters* e por genes que

possuem diferentes alelos (FALEIRO *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2003; MIKLAS *et al.*, 2006).

Uma possível explicação para a variabilidade observada no espectro de resistência à ferrugem das linhagens piramidadas no presente trabalho é que a resistência de Ouro Negro seja determinada por um bloco gênico e que, no decorrer da obtenção das linhagens, genes de resistência de efeito menor, complementares ao gene dominante monitorado pelos marcadores moleculares, foram perdidos. A maior similaridade entre a cultivar Ouro Negro e a linhagem Rudá-R também pode ser justificada pela metodologia aplicada na obtenção desta linhagem. Desde a etapa de retrocruzamentos para obtenção da linhagem Rudá (*Ur-ON/Co-10*) até os intercruzamentos para obtenção da linhagem Rudá-R (*Co-4*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*), além de marcadores moleculares, misturas de patótipos do agente causal da ferrugem foram utilizadas para selecionar os genótipos de maior espectro de resistência (RAGAGNIN, 2004). Se realmente a resistência à ferrugem em Ouro Negro for determinada pela complementaridade de genes de efeito menor com um gene dominante, a metodologia empregada por RAGAGNIN (2004) certamente reduziu as possibilidades de que os genes de efeito menor fossem perdidos ou mesmo que interações que contribuem para a resistência deixassem de ser selecionadas.

Um alto índice de recombinantes (plantas com marca molecular associada ao gene *Ur-ON*, porém suscetível ao patótipo 21-3 de *U. appendiculatus*) foi observado em linhagens oriundas do cruzamento da cultivar Diamante Negro x Rudá-R (COSTA, 2007). A autora argumenta que a possível explicação para os resultados seja a ocorrência de eventos de recombinação, levando a perda da associação da marca com o gene de resistência, ou mesmo a perda de genes de efeito menor ao longo dos ciclos de seleção, já que esta se deu apenas via marcador molecular. Como neste trabalho os marcadores moleculares mostraram-se eficientes em monitorar o gene ou bloco gênico que confere resistência ao patótipo 21-3 de *U. appendiculatus*, somos levados a crer que a explicação mais provável para os resultados obtidos por COSTA (2007) seja a ocorrência de eventos de recombinação que levaram à perda de associação entre a marca molecular e o gene de resistência.

3.3. Análise dos dados obtidos nos ensaios de campo

As doze linhagens com os genes de resistência (*Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*) em homozigose, juntamente com treze testemunhas, foram avaliadas quanto à produtividade, ao aspecto dos grãos e à severidade da ferrugem na safra de “inverno” de 2007. Na safra da “seca” de 2008, devido à necessidade de controle químico do mofo-branco, não foi observada ocorrência de doenças foliares em níveis suficientes a permitir a avaliação. Assim, nesta safra foram avaliadas apenas a produtividade e o aspecto dos grãos.

Os resumos das análises de variância relativos às avaliações feitas nas safras de “inverno”/2007 e da “seca”/2008 são apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Com exceção do caráter severidade da ferrugem, que apresentou coeficiente de variação experimental (CV) de 20,53%, os coeficientes de variação dos caracteres produtividade e aspecto de grão situaram-se abaixo de 15%, indicando boa precisão experimental nas duas safras. Conforme MARQUES JR. (1997), estes valores estão dentro do observado para a cultura do feijoeiro em experimentos desta natureza. O maior CV observado para a severidade da ferrugem é justificável, dada a subjetividade e a dificuldade associadas à avaliação desta característica em campo.

O delineamento em látice mostrou pouca eficiência (3,89%) em relação ao delineamento em blocos ao acaso para o experimento montado na safra de “inverno”/2007, o que indica uma boa uniformidade do solo onde foi conduzido o experimento, bem como dos tratamentos culturais executados no ciclo da cultura. Para o experimento conduzido na safra da “seca”/2008, a eficiência do delineamento em látice, em relação ao delineamento em blocos ao acaso, foi de 42,20%. Essa maior eficiência, provavelmente, ocorreu-se devido a problemas de encharcamento observados em três blocos na fase de estabelecimento da cultura, o que visivelmente comprometeu o desempenho das plantas cultivadas nestas áreas.

Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre os tratamentos para o caráter severidade da ferrugem (Tabela 9), porém, o desdobramento dos tratamentos não revelou diferenças significativas entre as linhagens piramidadas, o que já era esperado, uma vez que todas estas linhagens foram selecionadas com base em marcas moleculares relacionadas a um único gene ou bloco gênico de resistência à ferrugem. O contraste significativo ($P \leq 0,01$) linhagens vs. testemunhas revela que existe diferença entre as médias destes dois grupos.

Tabela 9. Resumo das análises de variância dos caracteres severidade de ferrugem (FE), aspecto de grãos (AG) e produtividade (kg/ha), de doze linhagens piramidadas e testemunhas, Coimbra-MG, safra de “inverno”/2007

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		FE	AG	Produtividade
Tratamentos	24	1,644**	2,520**	1409943,01**
Linhagens Piramidadas (LP)	11	0,596 ^{ns}	0,355**	515015,75**
Testemunhas (T)	12	2,220**	4,715**	2105989,58**
LP vs T	1	6,248**	0,000 ^{ns}	2901579,27**
Erro Efetivo	48 ^a ou 36 ^b	0,409	0,0494	178506,20
CV(%)		20,53	6,33	13,99
Média Geral		3,12	3,51	3019,55
Média das LP		2,81	3,51	2814,82
Eficiência do Látice		-	-	103,89

^{ns} e ** não significativo, significativo pelo teste F a 1% de probabilidade, respectivamente.

^a Grau de liberdade do erro efetivo dos caracteres aspecto de grão e reação à ferrugem, analisados em blocos.

^b Grau de liberdade do erro efetivo do caráter produtividade de grãos, analisado em látice.

Tabela 10. Resumo das análises de variância dos caracteres aspecto de grãos e produtividade (kg/ha), de doze linhagens piramidadas e testemunhas, Coimbra-MG, safra da “seca”/2008

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Aspecto do Grão	Produtividade
Tratamentos	168	1,440**	277427,99**
Linhagens Piramidadas (LP)	11	0,199**	169099,98 ^{ns}
Testemunhas (T)	156	1,361**	262365,87**
LP vs T	1	27,473**	3818728,66**
Erro Efetivo	336 ^a ou 300 ^b	0,0991	179890,98
CV(%)		10,67	11,49
Média Geral		2,94	3691,07
Média das LP		3,79	3377,15
Eficiência do Látice	-	-	142,20

^{ns} e ** não significativo, significativo pelo teste F a 1% de probabilidade, respectivamente.

^a Grau de liberdade do erro efetivo do caráter aspecto de grão, analisado em blocos.

^b Grau de liberdade do erro efetivo do caráter produtividade de grãos, analisado em látice.

Considerando-se o caráter aspecto de grão, a análise de variância conjunta das safras de “inverno”/2007 e “seca”/2008 revelou que houve diferenças significativas a 1% de probabilidade entre os tratamentos e todos os seus desdobramentos (Tabela 11). Revelou ainda que não houve interações significativas de nenhum dos grupos com os ambientes (safras), o que já era esperado em função da pouca influência que o ambiente exerce sobre este caráter (PEREIRA, *et al.*, 2004; BALDONI *et al.*, 2006).

Ao considerar a análise de variância conjunta em relação à produtividade de grãos, não foi constatada variabilidade entre as linhagens piramidadas (Tabela 11). Se

considerarmos que as linhagens desenvolvidas neste trabalho foram obtidas a partir do cruzamento de genótipos com *background* Rudá praticamente recuperado, é de se esperar que as linhagens obtidas sejam altamente homogêneas. Interações significativas para o caráter rendimento de grãos ($P \leq 0,01$) foram observadas para todos os grupos de tratamentos em relação às safras. A ocorrência de interações significativas entre o caráter rendimento de grãos e o ambiente é comum na cultura do feijoeiro (CARNEIRO, 2002; ROCHA, 2008).

Tabela 11. Resumo das análises de variância conjuntas dos caracteres aspecto de grãos e produtividade (kg/ha), de doze linhagens piramidadas e testemunhas, Coimbra-MG, safras de “inverno”/2007 e “seca”/2008

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Aspecto de grãos	Produtividade
Ambientes (safras)	1	1,127**	14562110,69**
Tratamento	24	5,086**	1142090,99**
Linhagens Piramidadas (LP)	11	0,506**	261821,88 ^{ns}
Testemunhas Comerciais (TC)	3	1,069**	514951,95*
Testemunhas Não Comerciais (TNC)	8	5,299**	1905738,59**
Entre Grupos	2	35,453**	3869689,25**
Tratamentos x Ambientes	24	0,081 ^{ns}	758967,64**
LP x Ambientes	11	0,048 ^{ns}	422293,84**
TC x Ambientes	3	0,083 ^{ns}	1459128,30**
TNC x Ambientes	8	0,094 ^{ns}	1127796,61**
Entre Grupos x Ambientes	2	0,215 ^{ns}	85116,57 ^{ns}
Erro médio	336 ^a ou 300 ^b	0,093	179742,61

^{ns}, ** e * não significativo, significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

^a Grau de liberdade do erro efetivo do caráter aspecto de grão, analisado em blocos.

^b Grau de liberdade do erro efetivo do caráter produtividade de grãos, analisado em látice.

Testemunhas comerciais compreendem as cultivares/linhagens: Pérola, Talismã, Majestoso e VC 3.

Todas as linhagens piramidadas mostraram-se resistentes ou moderadamente resistentes à ferrugem na avaliação de campo, embora, cinco das doze linhagens avaliadas não tenham diferido estatisticamente (Dunnet a 1% de probabilidade) do genitor recorrente Rudá. Ao considerar como resistentes apenas os genótipos com severidade média da ferrugem menor ou igual a 3,5, os genótipos G 2333, Rudá e VC 3 mostraram-se suscetíveis. O fato de a cultivar Rudá ter apresentado nota média superior a 4,0 e as linhagens piramidadas terem apresentado espectro de resistência à ferrugem equivalente ao espectro apresentado pelo genitor doador Ouro Negro evidencia a importância da introgressão do gene *Ur-ON* no *background* carioca Rudá.

Apesar da alta variabilidade genética atribuída ao patógeno *U. appendiculatus*, a cultivar Ouro Negro tem se mostrado resistente a todos os patótipos identificados em Minas Gerais (FALEIRO *et al.*, 1999a; SOUZA *et al.*, 2007a) e moderadamente

resistente a populações do patógeno amostradas em Goiás, Bahia, Paraná e São Paulo (RIOS *et al.*, 2001).

A constatação da variabilidade para o aspecto de grão entre as linhagens piramidadas obtida pela análise de variância conjunta foi confirmada pelo teste de médias de Dunnet, a 1% de probabilidade. Mesmo tendo sido identificadas linhagens com aspecto de grão superior ao do genitor Rudá, porém, todas as linhagens piramidadas mostraram-se estatisticamente inferiores às testemunhas de grãos tipo carioca com padrão comercial (Tabela 12).

Tabela 12. Médias de severidade de ferrugem (safra de “inverno”/2007), aspecto de grão e produtividade (conjunta das safras de “inverno”/2007 e “seca”/2008) de doze linhagens piramidadas e treze testemunhas, Coimbra-MG

Genótipo	Produtividade (Kg/ha)	Aspecto de Grão	Severidade da Ferrugem
G 19-1-1-7	3843,21 bcde*	3,58	2,67 a
Rudá-R	3591,43 abcde	4,00 a	3,00 ab
VC 6	3556,22 abcde	2,25 bcd	3,33 ab
427-3-85-31	3430,90 abcd	3,83 a	2,33 a
AB 136	3352,68 abcd	5,00	2,17 a
427-3-85-33	3345,75 abcd	3,50	3,00 ab
15-2-100-42	3228,28 abcd	3,33	3,00 ab
33-2-67-49	3223,23 abcd	3,66 a	3,50 ab
15-3-102-39	3181,33 abcd	4,00 a	2,67 a
15-2-100-26	3123,18 abcd	3,25	2,67 a
2-4-110-57	3117,71 abcd	3,58	3,50 ab
15-3-102-43	3090,70 abcd	4,08 a	3,00 ab
G 2333	3019,07 abc	5,00	5,67 b
G 1-46-7	3008,34 abc	3,66 a	2,83 ab
AND 277	2971,16 abc	5,00	3,00 ab
33-2-67-55	2948,96 ab	3,41	2,33 a
29-6-52-28	2900,23 ab	3,91 a	2,33 a
29-6-52-25	2828,60 ab	3,33	2,67 a
427-1-21-11	2732,93 ab	3,91 a	2,67 a
Majestoso	3124,34 a	2,33 c	3,33 ab
Talismã	3418,78 b	2,41 b	3,00 ab
Pérola	3666,55 c	2,25 d	3,33 ab
VC 3	3786,41 d	1,50 e	4,00 ab
Rudá	4190,59 e	4,16 a	4,33 b
O. Negro	4597,49 e	5,00	3,50 a

* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem da testemunha correspondente pelo teste de Dunnet, a 1% de probabilidade.

Obs.: as testemunhas estão em negrito.

A comparação entre as médias de produtividade, obtidas das análises conjuntas das safras de “inverno”/2007 e “seca”/2008 também foi realizada pelo teste de Dunnet, a 1% de probabilidade (Tabela 12). Este teste mostrou que todas as linhagens piramidadas se equiparam estatisticamente a pelo menos duas testemunhas comerciais

(Majestoso e Talismã). Oito das doze linhagens piramidadas não diferiram estatisticamente das quatro testemunhas comerciais do grupo carioca, no entanto, nenhuma das linhagens piramidadas igualou a produtividade obtida pela cultivar Rudá, que obteve a segunda maior produtividade média dos dois ensaios (4190,59 Kg/ha), ficando atrás apenas da cultivar Ouro Negro. Características como alta produtividade, boas qualidades culinárias e resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular têm feito com que a cultivar Ouro Negro seja utilizada como genitora em vários cruzamentos destinados à obtenção de cultivares comerciais (MOREIRA *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2006).

3.4. Cruzamentos teste

A linhagem 427-1-21-11 foi escolhida entre as doze linhagens piramidadas para ser avaliada em cruzamentos teste com as fontes de resistência AB 136 e SEL 1360. Esta linhagem foi uma das que apresentou melhor espectro de resistência, comportando-se como resistente aos seis patótipos de *U. appendiculatus* avaliados em casa de vegetação (Tabela 8).

Uma população F₂, derivada do cruzamento 427-1-21-11 x SEL 1360 e constituída por 556 plantas, e outra população F₂, derivada do cruzamento 427-1-21-11 x AB 136 e constituída de 447 plantas foram inoculadas com o patótipo 65 de *C. lindemuthianum*. Este patótipo foi utilizado pelo fato de se sobrepor ao efeito do gene *Co-10* presente na linhagem piramidada 427-1-21-11, ficando a resistência à antracnose desta linhagem condicionada apenas aos genes *Co-4*², *Co-5* e *Co-6*.

O número de plantas avaliadas neste experimento mostrou-se ideal, considerando-se que o número de indivíduos F₂ a serem avaliados para que se possa observar pelo menos um indivíduo suscetível é dado pela seguinte fórmula:

$$C = 1 - (\alpha)^n$$

Onde:

C = Probabilidade de ocorrer pelo menos um indivíduo suscetível

α = erro (probabilidade de ocorrer apenas indivíduos resistentes)

n = número de indivíduos amostrados

Considerando-se que a resistência nas duas populações segregantes é controlada por três genes dominantes e independentes, teremos:

$$(3 \text{ genes}) \rightarrow \alpha = P(A-B-C-) = 1 - \left(\frac{1}{4}\right)^3 = \left(\frac{63}{64}\right) = 0,984375$$

Para certeza = 99,9%, temos:

$$0,999 = 1 - (\alpha)^n$$

$$n = \frac{\log 0,001}{\log \alpha} = \frac{\log 0,001}{\log 0,984375} = 438,6 \sim 439 \text{ plantas}$$

Como resultados das inoculações, não foram observados indivíduos F_2 suscetíveis em nenhum dos cruzamentos. Sendo possível inferir, assim, com certeza superior a 99,9%, que os dois genitores envolvidos em cada cruzamento possuem formas alélicas do mesmo gene, consequentemente, a linhagem 427-1-21-11 realmente possui os genes *Co-5* e *Co-6*.

A realização de cruzamentos teste para confirmar a presença dos genes *Co-6* (SAZ20_{845a}) e *Co-5* (SAB3_{400a}) justificou-se pelo fato de os marcadores moleculares utilizados para monitorar a presença destes dois genes não se encontrarem tão estreitamente ligados aos respectivos genes de resistência. Além disso, a presença do gene *Co-4*² na pirâmide impede a identificação de qualquer outro gene de resistência à antracnose pela inoculação direta das linhagens.

Apesar das limitações inerentes a alguns marcadores, a seleção assistida por marcadores moleculares mostrou-se eficiente no processo de piramidação de genes de resistência, conduzido no presente trabalho.

Em função das limitações que compreendem os cruzamentos teste, seja pela dificuldade de implementação, seja pelo tempo demandado, a identificação de maior quantidade de marcadores moleculares relacionados aos genes de resistência contemplados no presente estudo faz-se necessária.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Visando obter linhagens de feijão do grupo comercial “carioca” com resistência a importantes doenças fúngicas da parte aérea do feijoeiro, famílias F_{2:3} previamente obtidas e selecionadas por apresentarem marcas moleculares relacionadas a genes de resistência à antracnose (*Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*), à ferrugem (*Ur-ON*) e à mancha angular (*Phg-1*) foram avançadas até a fixação dos alelos. Em cada geração, marcadores moleculares do tipo SCAR associados aos genes de resistência foram utilizados para identificar plantas contendo todos os alelos de interesse.

Doze linhagens de *background* carioca Rudá, piramidadas com os genes de resistência *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* foram obtidas. Em inoculações artificiais em casa de vegetação, estas linhagens apresentaram espectro de resistência à antracnose, à mancha angular e à ferrugem equivalente ao espectro apresentado pelas fontes doadoras dos genes de resistência. Isso mostra que os marcadores moleculares empregados no processo de obtenção das linhagens foram eficientes na seleção assistida dos genes de resistência.

Foram conduzidos dois ensaios de competição com as linhagens piramidadas, nas safras de “inverno” de 2007 e “seca” de 2008. A comparação entre as médias de produtividade obtidas das análises conjuntas das duas safras mostrou que todas as linhagens piramidadas se equipararam estatisticamente às testemunhas comerciais Majestoso e Talismã; oito das doze linhagens piramidadas não diferiram estatisticamente das testemunhas comerciais Majestoso, Talismã, VC 3 e Pérola. No entanto, para o caráter aspecto de grão, a comparação entre as médias obtidas das análises conjuntas das duas safras mostrou que apesar de terem sido obtidas linhagens com aspecto de grão superior ao do genitor Rudá, todas elas mostraram-se estatisticamente inferiores às testemunhas de grãos tipo carioca com padrão comercial.

Dada a dificuldade ou mesmo impossibilidade que seria monitorar a piramidação dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* por técnicas convencionais como inoculações, conclui-se que a seleção assistida por marcadores moleculares foi imprescindível para o desenvolvimento das linhagens de feijoeiro obtidas no presente trabalho. O amplo espectro de resistência às doenças fúngicas antracnose, ferrugem e mancha angular e o bom potencial produtivo das doze linhagens obtidas faz com que elas constituam um material promissor para uso em programas de melhoramento do feijoeiro.

CAPÍTULO 2

INTROGRESSÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM *Ur-5* e *Ur-11* NA LINHAGEM PIRAMIDADA RUDÁ-R1

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). 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 das camadas sociais de menor poder aquisitivo. No entanto, a produtividade nacional dessa cultura é considerada baixa. São vários os fatores que contribuem para o baixo rendimento médio da cultura do feijoeiro, entre eles podemos destacar os estresses abióticos como déficit hídrico, as altas temperaturas e a deficiência nutricional, assim como os estresses bióticos ocasionados por pragas e doenças.

O feijoeiro é suscetível a inúmeras doenças fúngicas, bacterianas e viróticas. 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 (*Pseudocercospora griseola*). Estas enfermidades são especialmente problemáticas porque seus agentes causais apresentam grande variabilidade patogênica, o que dificulta o desenvolvimento de cultivares que sejam resistentes em diferentes campos de produção e ao longo de vários anos de cultivo.

A estratégia de melhoramento que consiste em agrupar em um mesmo genótipo vários genes de resistência a patótipos distintos de um mesmo patógeno é denominada de piramidação. Esta é uma estratégia que vem sendo adotada em alguns programas de melhoramento de plantas autógamas com o propósito de tornar mais amplo e duradouro o espectro de resistência a determinadas enfermidades (KELLY *et al.*, 1995; HITTALMANI *et al.*, 2000; ALZATE MARIN *et al.*, 2005). Entretanto, apenas com o uso de métodos convencionais de melhoramento, dificilmente consegue-se viabilizar o processo de piramidação, principalmente em função de dificuldades encontradas na identificação dos diferentes alelos de resistência agrupados em um mesmo genótipo. Por

isso, os marcadores moleculares têm sido frequentemente utilizados ao longo do processo de melhoramento para monitorar a piramidação dos genes de interesse (STAVELY, 2000; KELLY *et al.*, 2003; ALZATE MARIN *et al.*; 2005).

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem se dedicado a 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 da cultivar de grão tipo carioca “Rudá”. Atualmente essas linhagens têm sido intercruzadas, a fim de se obter uma cultivar que possua um grande número de genes de resistência para essas doenças (ARRUDA, 2005; SOUZA, 2005; RAGAGNIN *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi a introgressão de dois novos genes de resistência à ferrugem (*Ur-5* e *Ur-11*) em uma isolinha da cultivar de feijão carioca Rudá, que já possui piramidados genes de resistência à antracnose (*Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*), à mancha angular (*Phg-1*) e à própria ferrugem (*Ur-ON*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

O material genético utilizado como genitor no processo de piramidação constou das doze linhagens piramidadas previamente relatadas no CAPÍTULO 1, as quais, aqui, serão denominadas de Rudá-R1, e de oito linhagens piramidadas com três genes de resistência à ferrugem, obtidas por SOUZA (2005), aqui denominadas de Rudá-R2. A genealogia e os genes de resistência presentes nestes genótipos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens fontes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, utilizadas para piramidação de genes de resistência

Linhagem	Genealogia	Doença	Genes de Resistência
Rudá-R1	Rudá/AND 277/TO/ AB 136/Ouro Negro/ G 2333	Antracnose, Ferrugem e Mancha angular	<i>Co-4²</i> , <i>Co-5</i> , <i>Co-6</i> , <i>Ur-ON / Co-10</i> e <i>Phg-1</i>
Rudá-R2	Rudá/Mexico 309/ Belmidak RR-3/ Ouro Negro	Ferrugem e Antracnose	<i>Ur-5</i> , <i>Ur-11</i> e <i>Ur-ON/Co-10</i>

2.2. Local de condução dos experimentos

Os cruzamentos, a obtenção da população segregante F₂, a inoculação e a avaliação da resistência à mancha angular e à antracnose foram realizados em casa de vegetação, pertencente ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG.

A seleção assistida dos alelos de resistência utilizando marcadores moleculares, a multiplicação e o preparo dos inóculos dos patógenos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

2.3. Obtenção da população segregante F₂

Cruzamentos entre as linhagens Rudá-R1 e Rudá-R2 foram realizados de forma direcionada, utilizando como doadora de pólen a linhagem Rudá-R1, que possui o gene *Phg-1* de resistência à mancha angular, e como receptora de pólen a linhagem Rudá-R2, que possui a pirâmide de genes de resistência à ferrugem, mas que é susceptível à mancha angular. As plantas F₁ obtidas desse cruzamento foram avaliadas em relação à resistência à mancha angular, com o objetivo de confirmar se as plantas F₁ eram

realmente híbridas. Os híbridos que apresentaram resistência à mancha angular foram selecionados e avançados por autofecundação, obtendo-se a população segregante F₂.

2.4. Seleção assistida por marcadores moleculares

A população F₂ obtida foi avaliada quanto à presença de marcas moleculares relacionadas aos genes de resistência (Tabela 2), procedendo-se à seleção dos genótipos que apresentaram marcas moleculares relacionadas a todos os genes de resistência em questão.

Antes do uso dos marcadores moleculares na seleção dos genótipos desejáveis, fez-se necessária a validação desses marcadores nas linhagens genitoras. Essa validação constituiu-se em observar a existência de polimorfismo entre os genitores, e ocorreu devido à possibilidade de que uma marca relacionada a um determinado gene presente em uma das linhagens também se manifeste na outra linhagem, sem que, contudo, esta linhagem possua o gene (marca inespecífica).

Tabela 2. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, utilizados na genotipagem das plantas F₂

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Fonte de Resistência	Referências
SCAR Y20 _{830a}	1,2	<i>Co-4</i>	TO	ARRUDA <i>et al.</i> (2000), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCAR AB03 _{400a}	12,9	<i>Co-5</i>	G 2333	VALLEJO <i>et al.</i> (2001)
SCAR AZ20 _{845a}	7,1	<i>Co-6</i>	AB 136	ALZATE-MARIN <i>et al.</i> (2000), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)
SCAR H13 _{520a}	5,6	<i>Phg-1</i>	AND 277	CARVALHO <i>et al.</i> (1998), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004a)
SCAR I19 _{460a}	3,3	<i>Ur-5</i>	México 309	HALEY <i>et al.</i> (1993), SOUZA <i>et al.</i> (2007b)
SCAR AE19 _{890r}	1,0	<i>Ur-11</i>	Belmidak RR-3	JOHNSON <i>et al.</i> (1995), QUEIROZ <i>et al.</i> (2004b)

cM = distância em centimorgans, ^a ligado em acoplamento, ^r ligado em repulsão

2.4.1. Extração e amplificação do DNA

Folhas das plantas da população F₂ foram coletadas e armazenadas 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).

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção foram amplificadas pela técnica de SCAR, os produtos da amplificação foram separados por eletroforese e fotodocumentados, conforme descrito no item 2.3.2 do CAPÍTULO 1.

Para os *primers* SCAR I19_{460a} e SCAR AE19_{890r}, as temperaturas de anelamento adotadas foram, respectivamente, de 50 e 58°C, conforme QUEIROZ *et al.* (2004c) e SOUZA *et al.* (2005).

2.5. Seleção por meio de inoculações

Inoculações com os agentes causais de mancha angular e de antracnose foram realizadas com o objetivo de reduzir o número de plantas a serem genotipadas. A seleção de plantas resistentes à mancha angular foi realizada em duas fases do trabalho, na identificação de híbridos, resultantes do cruzamento das linhagens genitoras, e na população segregante F₂; já a inoculação com o agente causal da antracnose foi feita apenas na população segregante F₂.

O agente causal de mancha angular utilizado foi o isolado 97-2 classificado por NIETSCHE (2000a) como patótipo 31.17; o agente causal da antracnose utilizado foi o patótipo 2047, caracterizado por BALARDIN *et al.* (1997). As multiplicações dos fungos, o preparo dos inóculos, as inoculações e as avaliações dos sintomas foram feitas como descrito nos itens 2.4.1 e 2.4.3 do CAPÍTULO 1. Estes patótipos foram escolhidos de acordo com os resultados de inoculações prévias realizada nas linhagens genitoras. As inoculações permitiram constatar que a linhagem que contém a pirâmide de genes de resistência à ferrugem (Rudá-R2) é suscetível tanto ao patótipo 31.17 de *P. griseola* quanto ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, enquanto a linhagem Rudá-R1 é resistente aos dois patótipos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do cruzamento da linhagem Rudá-R1 com a linhagem Rudá-R2 foram obtidas 82 sementes F₁. Estas foram semeadas e as plantas resultantes foram inoculadas com o isolado 97-2 de *P. griseola*. Desta inoculação foram identificadas 60 plantas resistentes. As plantas que apresentaram suscetibilidade ao agente causal da mancha angular foram descartadas, por serem resultantes de produtos de autofecundação.

3.1. Seleção por inoculações

A autofecundação das plantas F₁ gerou um total de 705 sementes F₂ que, quando semeadas, possibilitaram a obtenção de 675 plantas F₂. A inoculação desta população com o patótipo 2047 de *C. lindemuthianum* possibilitou a identificação de 177 plantas suscetíveis, as quais foram descartadas. Com a inoculação sequencial com o patótipo 31.17 de *P. griseola* nas plantas que apresentaram resistência à antracnose, foi possível a identificação de 170 plantas suscetíveis, que também foram descartadas.

Os resultados obtidos pela inoculação da população segregante com os agentes causais da antracnose e da mancha angular permitiram a seleção das plantas F₂ que apresentavam pelo menos uma forma alélica dominante dos genes *Phg-1* e *Co-4*². Vale salientar que o gene *Co-4*² é o único, entre os relacionados neste trabalho, capaz de conferir resistência ao patótipo 2047.

As inoculações possibilitaram uma economia significativa de tempo e de recursos nas análises moleculares das plantas F₂, em função da redução do número de plantas F₂ a ser analisado com os marcadores moleculares.

3.2. Seleção assistida por marcadores moleculares

Em relação a validação dos *primers*, nenhum dos marcadores utilizados na piramidação dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Phg-1* geraram marcas inespecíficas na linhagem Rudá-R2. O marcador SI19_{460a} também não gerou marca inespecífica na linhagem Rudá-R1. Este marcador foi identificado por HALEY *et al.* (1993) como ligado, em fase de acoplamento e sem apresentar recombinantes, ao gene *Ur-5* da cultivar B-190 (derivada de Mexico 309). Posteriormente, o marcador SI19_{460a} foi convertido em SCAR por MELOTTO e KELLY (1998), sendo assim denominado de SI19₄₆₀. Recentemente, em um trabalho desenvolvido por SOUZA *et al.* (2007b), o *primer* SI19_{460a} mostrou-se ligado a 3,3 cM do gene *Ur-5* em uma população segregante derivada do cruzamento Rudá x Mexico 309.

O marcador SAE19 também foi validado na linhagem Rudá-R1, ou seja, gerou a banda de 890 pares de base, previamente reportada como ligada em repulsão ao gene *Ur-11*. Embora este marcador tenha sido analisado na população segregante F₂, seu resultado não pôde ser considerado, uma vez que a população F₂ não segregou para a marca. Todos os indivíduos F₂ avaliados apresentaram a marca, quando o esperado era de que apenas 2/3 da população a apresentasse, por se tratar de um marcador em repulsão. Diante disso, o DNA de todas as plantas Rudá-R2 utilizadas nos cruzamentos com a linhagem Rudá-R1 e o DNA de uma isolinha da cultivar Rudá contendo apenas o gene *Ur-11* (Rudá *Ur-11*) foram amplificados com o *primer* SAE19. Como resultado, apenas o DNA da isolinha Rudá *Ur-11* não teve a marca gerada. Este resultado justificou a falta de segregação observada na F₂. Posteriores testes de variação da temperatura de anelamento do *primer* SAE19 não permitiram chegar ao padrão de amplificação desejado, que é de presença de marca na linhagem Rudá-R1 e de ausência em Rudá-R2.

O marcador OPAE19₈₉₀ foi identificado por JOHNSON *et al.* (1995) como ligado em fase de repulsão a 6,2 cM do gene *Ur-11*, presente em PI 181996. Posteriormente, este marcador foi avaliado por SOUZA *et al.* (2002) em uma população F_{2:3} derivada do cruzamento Rudá x Belmidak RR-3 (derivado de PI 181996), mostrando, neste caso, estar ligado a uma distância de 1,0 cM do referido gene de resistência. Recentemente, este marcador foi convertido em SCAR por QUEIROZ *et al.* (2004c) e, quando testado na mesma população utilizada por SOUZA *et al.* (2002), confirmou sua ligação em fase de repulsão a 1,0 cM do gene *Ur-11*. O fato de o *primer* SAE19₈₉₀ ser utilizado como um marcador em repulsão eleva as chances de que genótipos *Ur-11/ur-11* e *ur-11/ur-11* sejam selecionados devido a falhas nas reações de amplificação ou mesmo devido a uma eventual má qualidade do DNA. No entanto, neste trabalho foram genotipadas oito linhagens Rudá-R2 e todas apresentaram a marca SAE19₈₉₀, sendo, portanto, pouco provável que falhas nas amplificações realizadas durante o processo de obtenção das linhagens Rudá-R2 justifiquem os resultados obtidos.

Outros dois marcadores, OPAC20₄₉₀ e OPF10₉₇₀, previamente reportados como relacionados aos genes *Ur-11* e *Ur-5*, respectivamente, não poderiam ser utilizados na seleção dos respectivos genes de resistência à ferrugem, visto que as isolinhas da cultivar Rudá que possuem separadamente os genes *Ur-ON*, *Ur-11* e *Ur-5* não apresentam polimorfismo, quando analisadas com estes marcadores (SOUZA, 2005).

Diante disso, os marcadores SCAR que se mostraram úteis para monitorar a presença dos genes de resistência no processo de seleção desta nova etapa da piramidação foram os marcadores SY20_{830a} (*Co-4*²), SAB3_{400a} (*Co-5*), SAZ20_{845a} (*Co-6*), SH13_{520a} (*Phg-1*) e SI19_{460a} (*Ur-5*). Não houve a possibilidade de monitorar a presença do gene de resistência à ferrugem *Ur-11*, uma vez que o programa também não dispõe de patótipos do agente causal que possibilitem a distinção dos diferentes genes de resistência à ferrugem (*Ur-ON*, *Ur-11* e *Ur-5*).

Marcadores moleculares relacionados ao gene *Ur-ON* não foram analisados na população F₂, dado que ambas linhagens genitoras possuem esse gene já fixado. Segundo SOUZA (2005), dos três marcadores previamente reportados como ligados ao gene *Ur-ON*, apenas o marcador OPX11_{550a} mostrou-se viável no processo de piramidação dos genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON*, em função dos marcadores SF10_{1072a} e SBA08_{560a} terem mostrado inespecificidade em relação às duas outras fontes utilizadas (México 309 e Belmidak RR-3). Isso implica, que em futura tentativa de transferência dos genes que estão sendo piramidados no presente trabalho para outro genótipo, apenas o marcador RAPD OPX11_{630a} poderá vir a ser útil para a seleção do gene *Ur-ON*.

O marcador OPX11₅₅₀ foi identificado por FALEIRO *et al.* (2000b) como ligado em fase de acoplamento a 5,8 cM do gene *Ur-ON* em uma população F₂ derivada do cruzamento US Pinto 111 x Ouro Negro. Posteriormente, quando avaliado em uma população de RIL derivada do cruzamento Rudá x Ouro Negro, mostrou-se ligado a 8,9 cM de distância do loco *Ur-ON* (FALEIRO *et al.*, 2003). Apesar de os constantes esforços do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, ainda não foi possível obter sucesso na conversão do RAPD OPX11₆₃₀ em um marcador do tipo SCAR. Consequentemente, a marca gerada por este *primer* é pouco reprodutível, o que vem dificultando o seu uso pelo programa.

A genotipagem da população segregante F₂ iniciou com um total de 376 plantas. A cada marcador analisado, as amostras que não apresentavam a marca relacionada ao gene de interesse eram novamente analisadas com o mesmo marcador, a fim de certificar-se de que a falta de amplificação não teve origem em falhas nesta etapa. A partir da confirmação dos resultados, as amostras que não apresentaram a marca foram descartadas e as amostras restantes analisadas com um novo marcador. Este procedimento foi repetido até que todos os cinco marcadores moleculares SCAR (SY20_{830a}, SAB3_{400a}, SAZ20_{845a}, SH13_{520a} e SI19_{460a}) relacionados aos genes de resistência considerados no estudo fossem analisados.

Quando 198 amostras de DNA foram avaliadas com o marcador SH13, sendo 189 provenientes de plantas resistentes e nove de plantas suscetíveis ao patótipo 31.17 de *P. griseola*, não foi observado nenhum indivíduo recombinante. Em relação ao marcador SY20_{830a}, foram avaliadas 104 amostras de DNA, todas provenientes de plantas resistentes ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, sendo que novamente não foram observados recombinantes. Estes resultados ressaltam a alta especificidade dos marcadores SH13 e SY20_{830a} para os genes *Phg-1* e *Co-4*², respectivamente.

O marcador OPY20_{830a} foi identificado em uma população segregante derivada do cruzamento Rudá x TO como ligado sem recombinantes ao gene de resistência à antracnose *Co-4* (ARRUDA *et al.*, 2000). Ao ser convertido em SCAR e avaliado nesta mesma população, o marcador mostrou-se ligado a 1,2 cM do gene *Co-4* (QUEIROZ *et al.*, 2004a).

Diante da falta de segregação observada entre o marcador SY20 e a reação ao patótipo 2047, julgou-se desnecessário avaliar a população segregante F₂ com marcador SAS13, que também marca o gene *Co-4*².

Das 376 plantas F₂ inicialmente genotipadas, foram obtidas pouco mais de 100 plantas que apresentaram marcas moleculares associadas aos genes *Phg-1*, *Ur-5*, *Co-4*², *Co-5* e *Co-6*.

Devido à dificuldade encontrada em monitorar o gene *Ur-11*, parte das sementes produzidas pelas plantas F₂ selecionadas com os marcadores moleculares foram acondicionadas em câmara fria, na expectativa de que futuramente uma solução seja encontrada. A outra parte das sementes foram multiplicadas em campo, no intuito de obter sementes F₄ suficientes para montar um ensaio de competição. A partir da análise visual das sementes F₄ obtidas desta multiplicação, foram selecionadas dezesseis famílias com aspecto de grão mais próximo do padrão apresentado pelas variedades do grupo comercial carioca, atualmente recomendadas.

Os genótipos que serão obtidos deste trabalho, quando todos os alelos de resistência estiverem fixados, irão constituir um material de grande valor para uso em programas de melhoramento do feijoeiro. No entato, há que se considerar que de todos alelos de resistência piramidados, apenas o *Co-4*² tem a possibilidade de ser monitorado por mais de uma marca molecular, em uma eventual transferência para cultivares elite. Isso demonstra a necessidade de identificação de um maior número de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência que possam ser incorporados ao programa de melhoramento.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi introgreir dois novos genes de resistência à ferrugem (*Ur-11* e *Ur-5*) em uma isolinha da cultivar de feijão tipo carioca Rudá que já possui piramidados genes de resistência à antracnose (*Co-4²*, *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*), à mancha angular (*Phg-1*) e à ferrugem (*Ur-ON*), denominada de Rudá-R1. Para isso, cruzamentos foram realizados entre Rudá-R1 e outra isolinha da cultivar Rudá que possui piramidados os genes de resistência à ferrugem *Ur-ON*, *Ur-11* e *Ur-5* (Rudá-R2). Os cruzamentos foram confirmados pela inoculação das plantas *F₁* com o isolado 97-2 de *P. griseola* e as plantas *F₁* resistentes foram autofecundadas para obter a população segregante *F₂*. Folhas de 376 plantas *F₂* foram coletadas e tiveram seu DNA extraído e analisado com marcadores moleculares do tipo SCAR estreitamente ligados aos genes de resistência *Co-4²* (SY20₈₃₀), *Co-5* (SAB03₄₅₀), *Co-6* (SAZ20₈₄₅), *Phg-1* (SH13₅₂₀) e *Ur-5* (SI19₄₆₀). O marcador SCAR AE19, tido como estreitamente relacionado ao gene *Ur-11*, não gerou polimorfismo entre as isolinhas genitoras e por isso não pôde ser usado no processo seletivo do gene *Ur-11*.

Pouco mais de 100 plantas *F₂* apresentaram marcas moleculares relacionadas aos genes *Co-4²*, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-5*. Estas foram selecionadas e autofecundadas, obtendo-se assim, sementes *F₃* que serão usadas em teste de progênie para a identificação de famílias que apresentem todos os locos de resistência em homozigose.

A incorporação dos genes de resistência à ferrugem *Ur-5* e *Ur-11* na linhagem Rudá-R1 irá ampliar a base da sua pirâmide de genes R, consequentemente, espera-se que o seu espectro de resistência à ferrugem também seja aumentado.

Como as duas linhagens utilizadas como genitoras já apresentavam fixado o gene *Ur-ON* e provavelmente o gene *Co-10*, por estes serem genes ligados, concluiu-se que:

Foram obtidos genótipos de feijão de grãos do tipo carioca que possuem marcas moleculares estreitamente relacionadas aos genes de resistência *Phg-1*, *Co-6*, *Co-5*, *Co-4²* e *Ur-5*, e que, além disso, já possuem os genes de resistência *Ur-ON* e *Co-10* em homozigose.

O marcador SCAR AE19₈₉₀ não possibilitou monitorar a transferência do gene *Ur-11* para a linhagem Rudá-R1, tornando-se necessário, portanto, que novos marcadores relacionados a este gene sejam incorporados ao programa de melhoramento.

CAPÍTULO 3

INTROGRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, À FERRUGEM E À MANCHA ANGULAR EM LINHAGENS ELITE DE FEIJOEIRO

1. INTRODUÇÃO

Apesar do constante esforço que os melhoristas têm em lançar cultivares mais produtivas, mais resistentes e que atendam melhor às exigências do mercado consumidor, a vida útil das cultivares é limitada. Nesse sentido, os programas de melhoramento precisam contemplar o maior número de características possíveis para que os genótipos desenvolvidos sejam competitivos e consigam ter sua vida útil prolongada ao máximo possível.

A cultivar Rudá, utilizada como genitor recorrente pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro, conduzido no BIOAGRO/UFV, é um exemplo de cultivar anteriormente recomendada, mas que hoje tem aceitação limitada, por não atender às exigências de mercado. Apesar de a Rudá apresentar bom potencial produtivo, seus grãos são pequenos e com tonalidade do fundo creme e rajas mais escuras que o padrão comercial atualmente exigido. Além disso, esta cultivar é suscetível à maioria dos patótipos dos agentes causais de antracnose, de ferrugem e de mancha angular.

Após um longo e laborioso trabalho voltado à piramidação de genes de resistência a doenças fúngicas que acometem a cultura do feijoeiro, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV piramidou em um mesmo genótipo, genes de resistência a três das principais doenças dessa cultura. Esta pirâmide de genes é constituída por quatro genes de resistência à antracnose (*Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*), um gene resistência à ferrugem (*Ur-ON*) e outro para resistência à mancha angular (*Phg-1*).

Com a introgressão dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* no *background* genético da cultivar Rudá, conseguiu-se obter um material de grande valor para os programas de melhoramento do feijoeiro. Isso se deve não só por este material acumular diferentes genes de resistência a distintas doenças de grande importância para a cultura, como também por estes genes estarem disponíveis em uma fonte adaptada. No

entanto, estas linhagens apresentam limitações para uso como cultivares, pois apresentaram aspecto do grão que não atende as exigências do mercado, uma vez que são praticamente linhas isogênicas da cultivar Rudá.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi transferir genes de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular para as cultivares Pérola, BRSMG e Talismã e as linhagens VC 9 e VC 3 que têm se destacado, tanto pela capacidade produtiva quanto pelo bom padrão do grão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Os genitores utilizados como fonte de genes de resistência às doenças foram linhagens de *background* carioca Rudá, piramidadas com os genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10*, as quais, aqui, serão denominadas de Rudá-R1. Estes genótipos, apesar de apresentarem boa capacidade produtiva, possuem grãos com fundo muito escuro e/ou são muito pequenos para os padrões atualmente exigidos para o grupo comercial carioca.

Os genitores recorrentes utilizados foram as cultivares Pérola, BRSMG Talismã e as linhagens VC 9 e VC 3.

A cultivar Pérola resultou da seleção de linha pura na cultivar Aporé (Carioca/México 168 // Carioca/BAT 76), pela Embrapa Arroz e Feijão. Após avaliações realizadas em MG, BA, GO, DF e MT, a referida linhagem foi recomendada para cultivo, nesses estados, em 1994 (EMBRAPA, 2008c). Segundo LANA *et al.* (2004), no ano de 2003, a cultivar Pérola respondeu por 43% de toda a área plantada com feijão do grupo comercial carioca, considerando-se os estados para os quais foi recomendada: GO, DF, MG, BA, MS, PR, RN, RO, AC, ES, SC, RR e RS. Quando comparada às demais cultivares do grupo carioca, essa cultivar produz grãos de tamanho médio (23 a 25 g/100 grãos), o que lhe confere excelente aspecto visual. Além disso, apresenta cor do grão bege clara com rajas claras, característica que lhe proporciona maior tempo de armazenamento. Apesar dessas vantagens em relação às demais cultivares do grupo carioca, a cultivar Pérola apresenta suscetibilidade a um grande número de patótipos da antracnose, da ferrugem e da mancha angular.

A cultivar BRSMG Talismã é resultado de um programa de seleção recorrente conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA). A população base foi obtida pelo intercruzamento de dez linhagens (BAT 477, IAPAR 14, FT 84-29, Jalo EEP 558, A 252, A 77, Ojo de Liebre, ESAL 645, Pintado e Carioca), fontes de caracteres de interesse. Esta cultivar foi registrada para o estado de Minas Gerais em 2002 e associa aos grãos do padrão comercial carioca, resistência a algumas patótipos de *C. lindemuthianum*, boa produtividade e precocidade de, aproximadamente, dez dias em relação às demais cultivares recomendadas no estado (RAMALHO *et al.*, 2004). Além disso, BRSMG Talismã apresenta boas propriedades culinárias e nutricionais, como tempo médio de cocção de 28,5 minutos, 9,8% de sólidos solúveis e 23,8% de proteína (ABREU *et al.*, 2004). No entanto, BRSMG Talismã tem mostrado-se bastante

suscetível a populações de ferrugem que ocorrem em lavouras da Zona da Mata Mineira.

VC 9 (OP 165) é uma linhagem oriunda do cruzamento Pérola x Ouro Negro, selecionada para resistência, em casa de vegetação, aos patótipos 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum* e a uma mistura dos patótipos 15, 35, 45, 49, 59 e 59 de *U. appendiculatus*, coletados no estado de Minas Gerais (MELO *et al.*, 2006). A maior limitação da linhagem VC 9 é apresentar suscetibilidade ao patótipo 65 de *C. lindemuthianum*, uma vez que este patótipo ocorre em alta frequência e é amplamente distribuído por todo país (CARBONELL *et al.* 1999; SOMAVILLA e PRESTES, 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008).

A linhagem VC 3 (AN512666-0 x AN730031), além de apresentar amplo espectro de resistência à antracnose, possui um aspecto de grão muito apreciado, com fundo creme bastante claro, cuja tonalidade persiste por longo período, não sofrendo o escurecimento típico apresentado pelos grãos de padrão carioca. Entretanto, VC 3 tem mostrado-se altamente suscetível à ferrugem, tanto em avaliações em casa de vegetação, quanto em avaliações em campo.

Tanto a linhagem VC 9 quanto a VC 3 são oriundas do Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV e, além de apresentarem ótimo padrão de grão, têm se destacado nos ensaios de valor de cultivo e uso (VCU) pelo bom potencial produtivo.

2.2. Local de condução dos experimentos

Os cruzamentos e a obtenção das populações segregantes F₂ foram feitos em casa de vegetação, pertencentes ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG.

A caracterização molecular dos genitores, a multiplicação dos fungos e o preparo dos inóculos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Plantas, situado no BIOAGRO/UFV.

Etapas relacionadas às inoculações e às avaliações da resistência à antracnose, à mancha angular e à ferrugem foram realizadas em câmaras de nevoeiro e em casa de vegetação, pertencentes ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

O experimento de campo foi conduzido na Estação Experimental de Coimbra, Coimbra-MG (690 m de altitude, 20° 45' S de latitude e 42° 51' W de longitude) pertencente ao Departamento de Fitotecnia/UFV.

2.3. Caracterização molecular dos genitores

No intuito de determinar a possibilidade dos genes provenientes da linhagem Rudá-R1 poderem ser monitorados via marcadores genéticos, dez plantas de cada um dos genótipos utilizados como genitores foram genotipadas com os marcadores moleculares SCAR SY20₈₃₀ (*Co-4*²), SAS13₉₅₀ (*Co-4*²), SAB03₄₅₀ (*Co-5*), SAZ20₈₄₅ (*Co-6*), SH13₅₂₀ (*Phg-1*), SF10₁₀₇₂ (*Ur-ON/Co-10*) e SBA08₅₃₀ (*Ur-ON/Co-10*).

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de SCAR e os produtos da amplificação foram separados por eletroforese e fotodocumentados, conforme descrito no item 2.3.2 do CAPÍTULO 1.

2.4. Cruzamentos e obtenção das populações segregantes F₂

Os cruzamentos foram realizados de forma direcionada, de maneira que as linhagens Rudá-R1 atuassem como doadoras de pólen em todas as hibridações.

Sementes F₁ obtidas dos quatro cruzamentos foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 l contendo uma mistura de solo, esterco curtido e adubo formulado 8-28-16. As plantas F₁ provenientes dos quatro cruzamentos foram avaliadas em relação à resistência ao patótipo 2047 da antracnose, com o objetivo de confirmar se elas eram realmente híbridas. Plantas F₁ resistentes à antracnose foram selecionadas e autofecundadas para produzir as populações segregantes F₂.

2.5. Inoculações

Além da identificação de híbridos, as inoculações foram utilizadas com mais dois outros propósitos, na caracterização fenotípica dos genitores e para eliminar plantas F₂ que não apresentavam as formas alélicas *Co-4*², *Ur-ON* e *Phg-1*.

2.5.1. Inoculação dos genitores

Para avaliar o padrão de resistência/suscetibilidade dos genitores quanto à reação a vários patótipos de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* (Tabela 1), foram semeadas quinze sementes de cada um dos genitores e das cultivares AND 277 (*Phg-1*), Ouro Negro (*Ur-ON/Co-10*) e Rudá. No caso da caracterização frente aos

patótipos de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, as sementes foram pré-germinadas em papel germitext, em câmara de germinação a 30°C; após a emissão da radícula, transferidas para bandejas plásticas (60 x 40 x 12 cm) contendo uma mistura de solo e substrato agrícola Plant Max[®], na proporção 2:1, adubada com o formulado NPK 8-28-16. No caso da mancha angular, a semeadura foi feita diretamente em vasos plásticos de 2,5 l, contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada com o formulado NPK 8-28-16.

Os procedimentos de multiplicação do fungo, preparo do inoculo, inoculação e avaliação dos sintomas da antracnose, da ferrugem e da mancha angular foram feitos como descrito nos itens 2.4.1, 2.4.2 e 2.4.3 do CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Patótipos de *C. lindemuthianum* (CL), *U. appendiculatus* (UA) e *P. griseola* (PG), utilizados na caracterização fenotípica dos genitores

Patógeno	Patótipo	Isolado	Patógeno	Patótipo	Isolado
CL	8	LV101 ^(a)	UA	29-15	1.1.1.1 ^(b)
CL	9	UFV01 ^(b)	UA	53-3	2.1.3.1 ^(b)
CL	55	264 ^(c)	UA	53-7	4.1.4.1 ^(b)
CL	65	400 ^(c)	UA	63-19	2 ^(b)
CL	71	LV96 ^(a)	PG	31.7	Coimbra 21 ^(b)
CL	73	497 ^(c)	PG	31.17	97-2 ^(b)
CL	81	538 ^(c)	PG	47.39	B ₄ 4 ^(b)
CL	89	1A ₂ ^(b)	PG	63.7	Coimbra 20 ^(b)
CL	453	457 ^(c)	PG	63.19	48-1 ^(b)
CL	2047 ^(d)		PG	63.23	158-1 ^(b)
UA	21-3	2.2.3.1 ^(b)	PG	63.47	B ₃ 8 ^(b)
UA	29-3	10 ^(b)	PG	63.55	29-3 ^(b)

^(a) isolados identificados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFLA; ^(b) isolados identificados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV; ^(c) isolados caracterizados por RAVA *et al.* (1994); ^(d) patótipo caracterizado por BALARDIN *et al.* (1997).

2.5.2. Inoculação das populações segregantes F₂

Em relação à inoculação das populações segregantes F₂, as sementes, após serem pré-germinadas, foram transferidas para bandejas plásticas (60 x 40 x 12 cm) contendo uma mistura de solo e substrato agrícola Plant Max[®], na proporção 2:1. Cinco dias após a emergência das plântulas foi feita a inoculação com o agente causal da antracnose (patótipo 2047), utilizando-se uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/ml, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n^o 15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por cinco dias em câmara de nevoeiro (20 ± 2°C e umidade relativa >95%), sob fotoperíodo de doze horas. Transcorrido este período, as plantas que apresentaram algum sintoma da doença foram descartadas. As

plantas que apresentaram resistência à antracnose foram imediatamente inoculadas com o agente causal da ferrugem (patótipo 63-19), após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram novamente transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $>95\%$), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de doze horas. Depois desse período, foram transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas. A avaliação dos sintomas da ferrugem foi feita quinze dias após a inoculação. Todas as plantas que apresentaram pústulas esporulando foram descartadas. As plantas que apresentaram resistência à ferrugem foram transplantadas para vasos plásticos de 2,5 l, contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada com o formulado NPK 8-28-16. Depois do aparecimento da segunda folha trifoliolada, uma suspensão do patótipo 31.17 de *P. griseola*, ajustada para concentração de 2×10^4 conídios/ml, foi aspergida em ambas as superfícies do primeiro par de folhas trifolioladas. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $>95\%$), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram transferidas para a casa de vegetação ($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas. A doença foi avaliada visualmente aos dezoito e aos 25 dias após a inoculação, eliminando-se todas as plantas que apresentavam sintomas da mancha angular.

2.6. Avaliações de campo

Famílias $F_{2:3}$, proveniente das plantas F_2 resistentes aos três patótipos, foram multiplicadas em campo e tiveram os grãos avaliados visualmente quanto ao aspecto comercial. As famílias $F_{2:4}$ que apresentaram padrão de grão igual ou superior aos dos genitores Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 e VC 3 foram selecionadas para serem avaliadas em um ensaio de rendimento.

Para determinar o potencial de rendimento das famílias $F_{2:4}$, foi montado um ensaio de competição com plantio em março/2008 (plantio da “seca”). Neste experimento, o sistema de plantio adotado foi o convencional, sendo o solo previamente arado e gradeado.

Os tratamentos constituíram-se de famílias $F_{2:4}$ das seguintes populações: 40 famílias VC 3 x Rudá-R1, 30 famílias VC 9 x Rudá-R1, 30 famílias BRSMG Talismã x Rudá-R1, 24 famílias Pérola x Rudá-R1. Foram avaliadas ainda, dezessete famílias

Rudá-R2 x Rudá-R1, cujas plantas F₂ apresentaram marcas moleculares relacionadas aos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-5* (CAPÍTULO 2).

Como testemunhas foram utilizados as fontes de resistência componentes da genealogia das linhagens Rudá-R1 e Rudá-R2 e as cultivares/linhagens do grupo comercial carioca: Pérola, BRSMG Talismã, Majestoso, Rudá, VC 3, VC 6 e VC 9.

O delineamento experimental utilizado foi o látice quadrado triplo, com parcelas de duas linhas de 1,5 metros de comprimento, espaçadas em 50 centímetros, com densidade de quinze sementes por metro. O suprimento de água nos períodos de déficit hídrico foi mantido por meio de irrigações suplementares.

No plantio, foram aplicados 350 kg/ha do formulado 8-28-16 de N-P-K; aos 25 dias após a emergência das plantas foram aplicados 150 kg/ha de sulfato de amônio, em cobertura. O controle de plantas daninhas e de pragas foi realizado de acordo com o recomendado para a cultura. Foram realizadas duas aplicações de fungicida para controle do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Estas aplicações foram feitas preventivamente em função das condições ambientais favoráveis e de um histórico de ocorrência de grande incidência de mofo-branco na área utilizada para implantação do experimento.

Além do rendimento, foi avaliado também o aspecto dos grãos. Para avaliação desta característica foram atribuídas notas à cultivar Rudá (nota 4,0) e a quatro testemunhas com padrão comercial de grãos: BRSMG Talismã (nota 2,5), Pérola (nota 2,0), VC 9 (nota 2,0), e VC-3 (nota 1,5). A menor nota atribuída (nota 1,0) referiu-se ao grão tipicamente carioca, de cor creme com estrias marrom-claras, fundo claro, halo creme, peso médio de 100 sementes de 22 a 24 g e não achatado; a maior nota (nota 5,0) referiu-se ao grão de cor creme com estrias marrom-escuras, fundo escuro, com halo não creme, peso médio de 100 sementes menor que 22 g e grão achatado (RAMALHO *et al.*, 1998). A nota 5,0 também foi atribuída aos grãos pertencentes a outros grupos comerciais.

A nota referente ao tipo dos grãos de cada tratamento foi atribuída comparativamente às notas atribuídas às testemunhas (Figura 1). Para tanto, uma amostra de cada repetição foi examinada por três avaliadores, ficando atribuída a nota prevalecente entre os três.

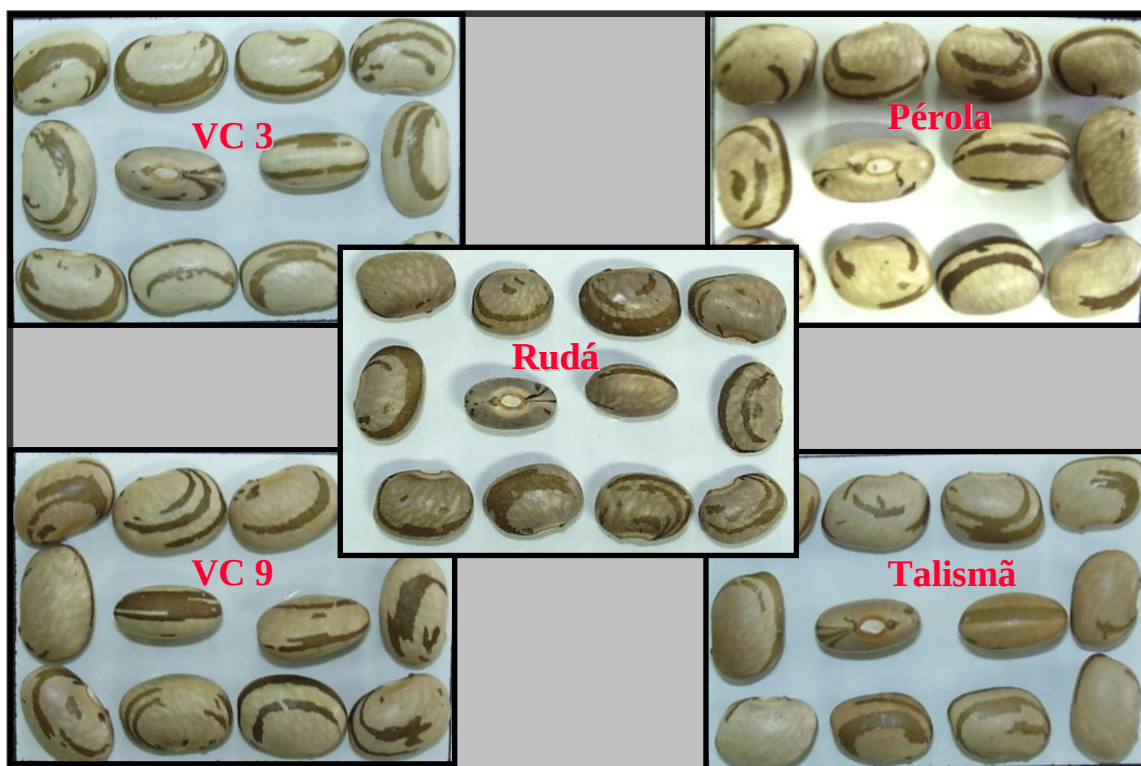


Figura 1. Aspecto de grão dos genótipos envolvidos nos cruzamentos.

2.6.1. Análise dos dados obtidos no ensaio de campo

Os dados referentes à produtividade de grãos foram submetidos à análise de variância. Os efeitos de tratamentos e a média foram considerados como fixos, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + r_j + b_{k(j)} + e_{ijk}; \text{ em que:}$$

Y_{ijk} : observação referente ao tratamento i , no bloco k , dentro da repetição j ;

μ : média geral do experimento;

t_i : efeito do tratamento $i = 1, 2, \dots, 169$;

r_j : efeito da repetição j ($j = 1, 2, 3$);

$b_{k(j)}$: efeito do bloco k dentro da repetição j ($k = 1, 2, \dots, 13$);

e_{ijk} : erro experimental associado à observação Y_{ijk} , assumindo $e_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Considerou-se que a heterogeneidade do solo dentro de cada bloco não é capaz de influenciar o caráter aspecto dos grãos, sendo adotado, portanto, para a análise de variância o modelo estatístico de blocos ao acaso.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}; \tag{2}$$

em que:

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

μ = média geral do experimento;

t_i = efeito tratamento i ($i = 1, 2, \dots, 169$);

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

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

Assim como para a característica produtividade de grãos, a característica aspecto dos grãos teve os efeitos de tratamentos e a média considerados como fixos. Nas análises estatísticas foram utilizados os programas computacionais GENES (CRUZ, 2006) e MSTAT-C (MSU, 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização molecular dos genitores

A caracterização molecular dos genitores revelou que praticamente todos os genes de resistência provenientes da linhagem piramidada Rudá-R1 podem ser monitorados, via marcadores moleculares, nas populações segregantes (Tabela 2). A única exceção foi observada para o genitor VC 3, em relação ao marcador SH13 (*Phg-1*). Neste genitor, o *primer* SH13 gerou uma marca de mesmo tamanho (520 pb) que a previamente reportada como ligada ao gene *Phg-1*, proveniente da linhagem AND 277 (CARVALHO *et al.*, 1998), e também presente em Rudá-R1. Resultados obtidos por MELO *et al.* (2006) na genotipagem de várias linhagens, do grupo comercial carioca com os marcadores SY20, SH13, SF10, SAZ20 e OPX11 são similares aos obtidos no presente trabalho, com exceção do resultado obtido para o genótipo VC 3 com o *primer* SH13.

O *primer* SY20, que marca o gene *Co-4* (ARRUDA *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2004b) e sua forma alélica *Co-4*² gerou uma banda 830 pb no genitor VC 9. Este é também um caso de falso positivo (banda inespecífica), uma vez que a linhagem VC 9 é proveniente do cruzamento Pérola x Ouro Negro e o gene de resistência à antracnose presente em Ouro Negro é o *Co-10* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003a). No entanto, como o *primer* SAS13 não amplificou o DNA do genótipo VC 9, ele poderá ser usado na seleção assistida do gene *Co-4*².

Tabela 2. Padrão de presença/ausência das marcas moleculares nos genótipos utilizados como genitores

Genótipos	Marcadores Moleculares						
	SH13 ₅₂₀ (<i>Phg-1</i>)	SF10 ₁₀₇₂ (<i>Ur-ON/Co-10</i>)	SBA08 ₅₃₀ (<i>Ur-ON/Co-10</i>)	SAB3 ₄₀₀ (<i>Co-5</i>)	SY20 ₈₃₀ (<i>Co-4</i> ²)	SAS13 ₉₅₀ (<i>Co-4</i> ²)	SAZ20 ₈₄₅ (<i>Co-6</i>)
Rudá-R1	+	+	+	+	+	+	+
Pérola	-	-	+/-	-	-	-	-
BRSMG Talismã	-	-	-	-	-	-	-
VC 9	-	-	+/-	-	+	-	-
VC 3	+	-	-	-	-	-	-

+ = presença da marca, - = ausência da marca, +/- = algumas plantas com presença da marca e outras sem a marca.

Ainda em relação à linhagem VC 9, foi observado que o *primer* SF10 não amplificou o DNA deste genótipo e que o *primer* BA08 amplificou apenas algumas das amostras. Porém, como um dos critérios considerados para a seleção da família que deu origem à linhagem VC 9 foi a resistência à antracnose e à ferrugem (MELO *et al.*, 2006), espera-se que VC 9 possua o bloco gênico *Ur-ON/Co-10*, e que

consequentemente estes genes já estejam fixados na população derivada do cruzamento VC 9 x Rudá-R1.

3.2. Caracterização fenotípica dos genitores

Os resultados obtidos nas avaliações com o patógeno *C. lindemuthianum* revelaram que a cultivar Pérola é altamente suscetível à antracnose, mostrando reação de compatibilidade com todos os dez patótipos avaliados (Tabela 3). Bons níveis de resistência ao agente causal da antracnose foram observados para a cultivar BRSMG Talismã e a linhagem VC 9, mas a suscetibilidade observada frente a patótipos como o 65 (VC 9) e o 453 (BRSMG Talismã) merece atenção. Em estudo realizado por MELO *et al.* (2008), BRSMG Talismã também apresentou suscetibilidade aos patótipos 85 e 87.

Os patótipos 65, 73, 81, 87 e 89 são as raças fisiológicas do *C. lindemuthianum* com maior distribuição e frequência nas regiões produtoras de feijão do Brasil (CARBONELL *et al.* 1999; SOMAVILLA e PRESTES, 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008). O patótipo 453 apesar de não ser muito frequente, já foi identificado no estado do Paraná, um dos locais para o qual a cultivar BRSMG Talismã é recomendada (FARIA *et al.*, 2004).

Tabela 3. Severidade da antracnose em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum*

Genótipos	Patótipos de <i>C. lindemuthianum</i>									
	8	9	55	71	65	73	81	89	453	2047
	Severidade*									
Rudá-R1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
Ouro Negro	1,0	2,1	1,0	1,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0
Pérola	7,0	9,0	4,0	7,0	9,0	4,0	9,9	9,0	7,0	7,5
BRSMG Talismã	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	9,0
VC 9	1,0	1,3	1,0	1,0	9,0	1,0	1,6	1,0	1,0	8,5
VC 3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9. Genótipos com notas médias superiores a 3,4 foram considerados suscetíveis.

A linhagem VC 3 apresentou amplo espectro de resistência à antracnose, mostrando-se suscetível apenas ao patótipo 2047, que ainda não teve sua ocorrência registrada no território brasileiro. O alto nível de resistência da linhagem VC 3 à antracnose também foi constatado por MELO *et al.* (2008), que observaram resistência

do genótipo a doze patótipos identificados no Brasil, entre eles o 67, 83, 85, 87, 95, 117 e 593.

Em relação à mancha angular, as cultivares Pérola e BRSMG Talismã mostraram-se altamente suscetíveis, apresentando compatibilidade com todos os patótipos avaliados, já as linhagens VC 9 e VC 3 apresentaram resistência, respectivamente, a sete e seis patótipos (Tabela 4).

O espectro de resistência da linhagem VC 3 foi idêntico ao apresentado pela linhagem Rudá-R1 e pela fonte de resistência AND 277. Esta similaridade de espectro de resistência à mancha angular e o fato de VC 3 ter apresentado a marca molecular gerada pelo *primer* H13 nos leva a crer que assim como a AND 277 e a Rudá-R1, ela também possui o gene *Phg-1*. Outra similaridade de espectro de resistência foi observada para a linhagem VC 9 e a cultivar Ouro Negro. Como VC 9 é derivada do cruzamento Pérola x Ouro Negro, pode-se afirmar que o gene de resistência à mancha angular presente em VC 9 é o mesmo que confere resistência em Ouro Negro. É importante considerar que no processo de obtenção da linhagem VC 9 a resistência à mancha angular foi um dos critérios contemplados, mas que essa avaliação apenas foi feita em nível de campo (MELO *et al.*, 2006).

Ao estudar a herança da resistência aos patótipos 63.39 e 31.23 de *P. griseola* em populações derivadas de Ouro Negro e US Pinto 111, CORRÊA *et al.* (2001) concluíram que a resistência à mancha angular proveniente de Ouro Negro é conferida por um único gene dominante. Consequentemente, esta resistência pode ser facilmente transferida para outros genótipos.

Tabela 4. Severidade da mancha angular em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *P. griseola*

Genótipos	Patótipos de <i>P. griseola</i>									
	31.7	31.17	47.39	63.7	63.19	63.23	63.31	63.47	63.55	63.63
	Severidade*									
Rudá-R1	1,0	1,0	8,1	1,0	1,0	1,0	1,0	6,4	9,0	7,3
AND 277	1,9	1,6	4,3	1,0	1,0	2,0	1,8	8,0	7,9	6,3
Ouro Negro	1,0	9,0	1,6	1,0	8,0	1,0	9,0	1,0	1,6	1,0
Pérola	9,0	9,0	9,0	8,0	5,0	7,0	7,4	9,0	9,0	8,3
BRSMG Talismã	4,3	6,0	7,7	5,5	4,0	9,0	4,9	9,0	5,1	6,2
VC 9	1,0	9,0	1,0	1,0	5,3	1,0	9,0	1,0	1,2	1,0
VC 3	1,0	1,0	8,5	1,0	1,0	1,0	1,6	9,0	9,0	6,4

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9. Genótipos com notas médias superiores a 3,4 foram considerados suscetíveis.

Merece destaque o fato de a linhagem VC 9 ter apresentado resistência ao patótipo 63.63. SARTORATO (2006) estudou a reação de 28 genótipos de feijoeiro

quanto à reação a oito patótipos de *P. griseola*. Nesse estudo, a cultivar Ouro Negro se enquadrhou entre as de maior grau de resistência, sendo a única a apresentar resistência ao patótipo 63.63. Este patótipo de *P. griseola* é o que ocorre com maior frequência no território nacional (SARTORATO e ALZATE-MARIN, 2004; GARCIA *et al.*, 2006; VITAL, 2006; BALBI, 2007; SILVA *et al.* 2008).

No entanto, não é de se esperar que o gene de resistência à mancha angular, presente na linhagem VC 9 e na cultivar Ouro Negro seja efetivo contra todos os patótipos classificados como 63.63. Isto se deve ao fato de o sistema binário (HABGOOD, 1970) e da série internacional de cultivares diferenciadoras para a mancha angular, atualmente adotada (PASTOR CORRALES e JARA; 1995), classificar como patótipo 63.63, os isolados que apresentam reação de compatibilidade com todas as doze cultivares da série diferenciadora. Diante disso, é esperado que haja variabilidade dentro deste patótipo, variabilidade esta que a série diferenciadora atualmente empregada não é capaz de detectar. Assim, seria interessante a incorporação da cultivar Ouro Negro à série diferenciadora da mancha angular, como uma possibilidade de obter maior discriminação dos genótipos em estudos de diversidade do fungo *P. Griseola*.

Assim como observado no presente estudo, ao analisar resultados obtidos por MELO *et al.* (2008) e SANGLARD *et al.* (2008), foi possível observar que para todos os patótipos de *P. griseola* avaliados, quando a linhagem Rudá-R (*Phg-1*) apresentou suscetibilidade, a cultivar Ouro negro (*Phg-ON*) apresentou resistência. Logo, a combinação do gene *Phg-1*, proveniente da cultivar AND 277 com o gene de resistência à mancha angular *Phg-ON* pode vir a ser uma boa estratégia no melhoramento visando resistência à mancha angular.

Como a linhagem VC 9 apresentou resistência a todos os patótipos de *P. griseola* aos quais a linhagem Rudá-R1 mostrou-se suscetível, há a possibilidade de se extrair linhagens com amplo espectro de resistência à mancha angular na população obtida do cruzamento desses genótipos.

Na avaliação da resistência à ferrugem, a cultivar BRSMG Talismã apresentou suscetibilidade apenas ao patótipo 63-19, o único, dentre os seis patótipos, com origem na Zona da Mata Mineira. A linhagem VC 9, embora originária da cultivar Ouro Negro, não apresentou o mesmo nível de resistência do genitor Ouro Negro e da linhagem Rudá-R1, mostrando-se suscetível a três dos seis patótipos avaliados (Tabela 5). O menor espectro de resistência à ferrugem entre os genótipos avaliados foi observado para a linhagem VC 3, que mostrou suscetibilidade a todos os patótipos *U*.

appendiculatus avaliados. A suscetibilidade dessa linhagem à ferrugem também tem sido observada em ensaios de rendimento conduzidos na região da Zona da Mata Mineira.

Tabela 5. Severidade da ferrugem em genótipos de feijão, em relação a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*

Genótipos	Patótipos de <i>U. appendiculatus</i>					
	21-3	29-15	29-3	53-3	53-7	63-19
	Severidade*					
Rudá-R1	1,0	3,0	2,0	2,0	3,0	2,8
Ouro Negro	1,5	3,0	2,3	2,0	3,0	3,0
BRSMG Talismã	2,0	2,0	1,2	2,7	2,0	5,0
VC 9	3,0	5,9	3,3	3,0	6,0	6,0
VC 3	4,0	5,8	3,9	4,0	5,3	5,0

*Severidade média da doença, com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 6. Genótipos com notas médias superiores a 3,4 foram considerados suscetíveis.

Os resultados obtidos na caracterização da resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, dos genótipos Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 e VC 3, justificam que se utilize a linhagem Rudá-R1 como fonte doadora de genes de resistência em todos os cruzamentos.

3.3. Condução das populações segregantes

Aproximadamente 400 plantas F_2 , obtidas de cada cruzamento (BRSMG Talismã x Rudá-R1, Pérola x Rudá-R1, VC 3 x Rudá-R1 e VC 9 x Rudá-R1), foram avaliadas quanto à resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular. Os patótipos 2047 (*C. lindemuthianum*), 63-19 (*U. appendiculatus*) e 31.17 (*P. griseola*) empregados nas inoculações das populações F_2 foram escolhidos com base nos resultados obtidos na caracterização fenotípica dos genitores (Tabelas 3, 4 e 5). Esses resultados mostram que, dos cinco genitores, a linhagem Rudá-R1 comporta-se como resistente aos três patótipos, enquanto os demais genitores são suscetíveis aos três, com exceção da linhagem VC 3, que mostrou-se resistente ao patótipo 31.17 de *P. griseola*, não tendo, portanto, sua população F_2 inoculada com esse patógeno.

Plantas F_2 com resistência aos três patótipos foram avançadas, por autofecundação para produzir as progênes $F_{2:3}$. As famílias $F_{2:3}$ foram avaliadas quanto ao aspecto dos grãos e as 50 melhores de cada cruzamento foram multiplicadas em campo. Os grãos obtidos em casa de vegetação, normalmente, apresentam aspecto inferior aos obtidos em campo. Por isso, apenas características indesejáveis presentes nos grãos, bastante nítidas, foram consideradas no momento de descartar as famílias

F_{2:3}. Após a multiplicação em campo, novamente os grãos foram avaliados quanto ao aspecto, sendo selecionadas 40 famílias VC 3 x Rudá-R1, 30 famílias VC 9 x Rudá-R1, 30 famílias BRSMG Talismã x Rudá-R1 e 24 famílias Pérola x Rudá-R1.

A seleção para o aspecto do grão em gerações precoces como a F₃ e F₄ tem-se mostrado bastante eficiente, devido à alta herdabilidade que a característica possui (MARQUES JR. *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2001). Além disso, esta estratégia se justifica por possibilitar que, em gerações futuras, os programas de melhoramento concentrem maiores esforços em outras características.

3.4. Análise dos dados obtidos no ensaio de campo

O resumo das análises de variância relativo às avaliações feitas na safra da “seca” de 2008 está apresentado na Tabela 6. Os coeficientes de variação apresentados pelos caracteres produtividade e aspecto de grão situaram-se abaixo de 12%, indicando boa precisão experimental, conforme MARQUES JR. (1997). A média de produtividade foi bastante elevada (3691,07 Kg/ha), mas dentro do esperado para as cultivares modernas, quando cultivadas sem restrições hídricas, nutricionais e de sanidade.

A eficiência do delineamento em látice, em relação ao delineamento em blocos ao acaso, foi de 42,20%. Essa boa eficiência provavelmente ocorreu devido a problemas de encharcamento observados em três blocos, na fase de estabelecimento da cultura, o que visivelmente comprometeu o desempenho das plantas cultivadas nestas áreas.

Considerando-se o caráter aspecto de grão, foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre os tratamentos e todos os seus desdobramentos, indicando a existência de variabilidade genética em todas as populações (Tabela 6).

Em relação à produtividade de grãos, foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre a fonte de variação famílias (Tabela 6). Porém, o desdobramento dos tratamentos não revelou diferenças significativas dentro dos cruzamentos. O fato de as hibridações terem sido feitas entre genótipos com alta capacidade produtiva e pertencentes ao mesmo grupo comercial, cuja base genética normalmente é estreita, pode ser uma provável explicação para a baixa variabilidade observada entre as progêies. No entanto, o pequeno número de famílias avaliadas dentro de cada cruzamento também há de ser considerado como um fator limitante para a detecção de variabilidade. Diferenças significativas em relação ao rendimento de grãos foram observadas, entre famílias, para a maioria das populações segregantes obtidas a partir de cruzamentos da linhagem Rudá-R com linhagens do grupo comercial carioca (MELO,

2006; ROCHA, 2008). Isso implica que há possibilidade de explorar variabilidade para produtividade, mesmo em cruzamentos entre linhagens do grupo comercial carioca.

Tabela 6. Resumo das análises de variância dos caracteres produtividade (Kg/ha) e aspecto de grão, de famílias de feijoeiro, Coimbra-MG, safra da “seca”/2008

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Produtividade	Aspecto de Grão
Tratamentos	168	277427,99**	1,4403**
Famílias (F)	152	254304,32**	0,9773**
F/ Rudá-R1	11	169099,98 ^{ns}	0,1987*
F/ Rudá-R2 x Rudá-R1	16	193915,65 ^{ns}	0,1821*
F/ VC 3 x Rudá-R1	39	170648,76 ^{ns}	0,6067**
F/ VC 9 x Rudá-R1	29	210317,59 ^{ns}	0,4616**
F/ Talismã x Rudá-R1	29	260734,02 ^{ns}	0,3656**
F/ Pérola x Rudá-R1	23	155838,08 ^{ns}	0,4133**
Entre Cruzamentos	5	1958286,31**	17,2649**
Testemunhas (T)	15	395025,95**	4,8548**
F x T	1	2028257,89**	20,5954**
Erro Efetivo	336 ^a ou 300 ^b	179890,98	0,0991
CV(%)		11,49	10,67
Média Geral (Kg/ha)		3691,07	2,94
Eficiência do Látice		42,20%	

^{ns}, ** e * não significativo, significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

^a Grau de liberdade do erro efetivo do caráter aspecto de grão, analisado em blocos.

^b Grau de liberdade do erro efetivo do caráter produtividade de grãos, analisado em látice.

Como o propósito do trabalho foi obter famílias de feijoeiro que apresentassem, além de resistência a doenças, aspecto de grão e produtividade similar a dos genitores VC 3, VC 9, Pérola e BRSMG Talismã, estabeleceu-se que seriam selecionadas apenas as famílias com nota menor ou igual 2,7, referente ao aspecto de grão. Atendendo a esse critério, foram selecionadas 60 famílias (Tabela 7).

Apesar de a população obtida do cruzamento das linhagens Rudá-R2 x Rudá-R1 ter apresentado famílias com aspecto de grão superior ao dos respectivos genitores, nenhuma destas famílias foi classificada entre as que apresentaram padrão de grão aceitável ($\leq 2,7$). Evidenciando-se, assim, a dificuldade de se obter genótipos superiores quanto a esse caráter, a partir cruzamentos feitos apenas entre as linhagens que possuem grande parte do *background* genético da cultivar Rudá.

A população obtida do cruzamento das linhagens VC 3 x Rudá-R1 foi a que mais se destacou em relação ao caráter aspecto de grão, classificando dezenove famílias entre as 22 melhores; mostrando grande potencial de extração de genótipos superiores para esse caráter.

Tabela 7. Médias, limites inferiores (LI) e superiores (LS) do aspecto de grão de 141 famílias F_{2,4} avaliadas na safra da “seca” de 2008; número de famílias (NF) por população (P) e número de famílias com notas iguais ou inferiores a 2,7 ($\leq 2,7$) e iguais ou inferiores a 2,2 ($\leq 2,2$)

Genótipos	Aspecto de Grão		Número de Famílias		
	Média	LI - LS	NF	$\leq 2,7$	$\leq 2,2$
Famílias	2,81	1,33 - 3,83	141	60	22
P1 (Rudá-R2 x Rudá-R1)	3,49	2,83 - 3,83	17	0	0
P2 (VC 3 x Rudá-R1)	2,32	1,33 - 3,33	40	32	19
P3 (VC 9 x Rudá-R1)	2,85	2,16 - 3,50	30	12	3
P4 (Talismã x Rudá-R1)	2,93	2,33 - 3,33	30	9	0
P5 (Pérola x Rudá-R1)	2,91	2,33 - 3,66	24	7	0
VC 3	1,50				
VC 9	2,16				
Pérola	2,33				
Talismã	2,50				
Rudá	4,00				

P = população

Vale destacar que, com exceção da população Rudá-R2 x Rudá-R1, todas as outras apresentaram famílias com notas que as equiparam às cultivares modernas do grupo comercial carioca, sendo, portanto, passíveis de serem utilizadas para extração de famílias visando a obtenção de linhagens com grãos de padrão de comercial.

O cruzamento VC 9 x Rudá-R1 gerou a população com maior número de famílias entre as de maior rendimento de grãos, sendo sete das dez famílias mais produtivas originadas deste cruzamento (Tabela 8).

Tabela 8. Médias, limites inferiores (LI) e superiores (LS) da produtividade de grãos de 141 famílias F_{2,4} avaliadas na safra da “seca” de 2008; número de famílias (NF) por população (P) e número de famílias entre as vinte (20+) e as dez mais produtivas (10+)

Genótipos	Produtividade (Kg/ha)		Número de Famílias		
	Média	LI - LS	NF	20 +	10 +
Famílias	3695,6	2956,6 - 4457,3	141		
P1 (Rudá-R2 x Rudá-R1)	3688,6	3199,1 - 4207,5	17	1	1
P2 (VC 3 x Rudá-R1)	3762,2	3330,2 - 4457,3	40	6	2
P3 (VC 9 x Rudá-R1)	3859,6	3334,5 - 4370,7	30	9	7
P4 (Talismã x Rudá-R1)	3591,2	2956,6 - 4081,7	30	4	0
P5 (Pérola x Rudá-R1)	3509,5	3156,6 - 3964,7	24	0	0
VC 3	3476,4				
VC 9	3913,3				
Pérola	4031,4				
Rudá	4113,7				
Talismã	4240,1				

P = população

O potencial produtivo de todas as populações obtidas foi bastante elevado, o que já era esperado, visto que todos os genitores são altamente produtivos. Entre as 60 famílias previamente selecionadas pelo aspecto de grão desejável, 56 apresentaram média de produtividade similar (Dunnett, $P < 0,01$) a apresentada pela cultivar BRSMG Talismã, que foi a testemunha do grupo comercial carioca com maior rendimento no experimento (Tabela 9).

Tabela 9. Médias da produtividade e do aspecto de grão das 60 famílias $F_{2:4}$ selecionadas após avaliação na safra da “seca” 2008, Coimbra-MG.

Família	Produtividade Kg/ha	Aspecto de Grão	Família	Produtividade Kg/ha	Aspecto de Grão
VC3-45	4457 abcd	1,83 abcd	VC3-51	3687 abcd	2,00 abcd
VC9-111	4370 abcd	2,50 bcd	Talismã-126	3674 abcd	2,50 bcd
VC3-76	4165 abcd	2,67 bcd	Talismã-119	3669 abcd	2,67 bcd
VC9-97	4160 abcd	2,50 bcd	VC3-72	3641 abcd	2,00 abcd
VC3-80	4126 abcd	2,33 bcd	VC3-64	3638 abcd	2,17 abcd
VC3-52	4066 abcd	2,17 abcd	Pérola-161	3637 abcd	2,50 bcd
VC3-44	4048 abcd	1,33 a	Pérola-158	3636 abcd	2,33 bcd
Talismã-142	4027 abcd	2,50 bcd	Talismã-125	3631 abcd	2,50 bcd
VC3-46	4016 abcd	2,17 abcd	VC 6	3595 abcd	2,17 abcd
VC3-60	3996 abcd	2,33 bcd	VC3-70	3587 abcd	2,33 bcd
VC3-48	3937 abcd	1,83 abcd	VC3-47	3581 abcd	2,00 abcd
VC9-86	3933 abcd	2,67 bcd	VC3-69	3561 abcd	2,33 bcd
VC3-49	3911 abcd	2,33 bcd	VC3-62	3558 abcd	2,17 abcd
VC9-99	3901 abcd	2,33 bcd	VC3-43	3554 abcd	2,17 abcd
VC9-100	3890 abcd	2,50 bcd	VC9-84	3551 abcd	2,67 bcd
VC3-63	3887 abcd	1,83 abcd	VC3-73	3541 abcd	1,83 abcd
VC3-71	3868 abcd	2,17 abcd	VC3-77	3513 abcd	1,50 ab
VC9-107	3856 abcd	2,17 abcd	VC3-56	3500 abcd	2,00 abcd
Talismã-130	3845 abcd	2,33 bcd	Talismã-131	3498 abcd	2,33 bcd
VC3-78	3803 abcd	2,33 bcd	VC9-106	3497 abcd	2,67 bcd
VC3-79	3777 abcd	2,67 bcd	VC3-75	3470 abcd	2,00 abcd
VC3-58	3773 abcd	2,50 bcd	Pérola-156	3454 abcd	2,33 bcd
VC3-54	3770 abcd	2,50 bcd	Talismã-141	3432 abcd	2,50 bcd
Majestoso	3746 abcd	2,17 abcd	Pérola-145	3408 abcd	2,50 bcd
VC3-66	3736 abcd	2,00 abcd	VC3-59	3369 abcd	2,67 bcd
VC3-74	3729 abcd	2,50 bcd	VC9-98	3334 abcd	2,67 bcd
VC9-112	3715 abcd	2,17 abcd	VC3-65	3330 abcd	2,67 bcd
VC9-94	3714 abcd	2,17 abcd	Pérola-152	3232 abc	2,67 bcd
VC9-91	3704 abcd	2,67 bcd	Talismã-140	3203 abc	2,50 bcd
VC3-81	3693 abcd	1,83 abcd	Pérola-143	3195 abc	2,67 bcd
Talismã-122	3687 abcd	2,33 bcd	Pérola-157	3156 abc	2,50 bcd
VC 3	3476 a	1,50 a	Pérola	4031 c	2,33 c
VC 9	3913 b	2,17 b	Talismã	4240 d	2,50 d

Médias seguidas por letras idênticas na mesma coluna, não diferem entre si (Dunnett, $P < 0,01$).

Obs.: as testemunhas estão em negrito.

A comparação entre as médias de produtividade revelou que todas as famílias selecionadas por apresentar aspecto de grão aceitável (nota $\leq 2,7$) equiparam-se

estatisticamente, pelo menos, aos genitores VC 3, VC 9 e Pérola. Diante disso, todas as 60 famílias que apresentaram nota média do aspecto de grão $\leq 2,7$ foram selecionadas. Ao considerar apenas estas famílias constata-se que a população que melhor concilia os caracteres aspecto de grão e produtividade é a obtida do cruzamento VC 3 x Rudá-R1. As dez famílias mais produtivas entre as 60 com melhor aspecto de grão foram originadas deste cruzamento. Entre as 60 famílias selecionadas, 32 são provenientes do cruzamento VC 3 x Rudá-R1, doze do cruzamento VC 9 x Rudá-R1, nove do cruzamento BRSMG Talismã x Rudá-R1 e sete do cruzamento Pérola x Rudá-R1.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Um dos propósitos deste trabalho foi determinar a possibilidade dos genes de resistência à antracnose (*Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*), à mancha angular (*Phg-1*) e à ferrugem (*Ur-ON*), provenientes da linhagem Rudá-R1, poderem ser monitorados em populações segregantes obtidas do cruzamento de Rudá-R1 com as cultivares Pérola e BRSMG Talismã e as linhagens elite VC 9 e VC 3. Para isso, os cinco genitores foram genotipados com os marcadores SCAR SY20₈₃₀ (*Co-4*²), SAS13₉₅₀ (*Co-4*²), SAB03₄₅₀ (*Co-5*), SAZ20₈₄₅ (*Co-6*), SH13₅₂₀ (*Phg-1*), SF10₁₀₇₂ (*Ur-ON/Co-10*) e SBA08₅₃₀ (*Ur-ON/Co-10*). Esta caracterização molecular revelou que praticamente todos os genes de resistência provenientes da linhagem piramidada Rudá-R1 podem ser monitorados nas populações segregantes. A única exceção foi observada para o genitor VC 3, em relação ao marcador SH13. Neste genitor, o *primer* SH13 gerou uma marca de mesmo tamanho (520 pb) que a reportada como ligada ao gene *Phg-1*, proveniente da linhagem Rudá-R1.

Outro propósito deste estudo foi obter famílias de feijão com amplo espectro de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, mas que também possuam grãos do tipo carioca com padrão comercial. Para isso, a linhagem Rudá-R1 piramidada com genes de resistência *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1* e *Ur-ON/Co-10* foi cruzada com as cultivares/linhagens elite Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 e VC 3. As progênie F₂ obtidas desses cruzamentos foram avaliadas, em casa de vegetação, quanto à resistência aos patótipos 2047 (*C. lindemuthianum*), 63-19 (*U. appendiculatus*) e 31.17 (*P. griseola*). Apenas as plantas F₂ com resistência aos três patógenos foram selecionadas e avançadas, em *bulk*, até a geração F_{2:4}. Nesta geração, famílias F_{2:4} foram avaliadas quanto à produtividade e o aspecto dos grãos em um ensaio de campo.

O cruzamento obtido a partir do genitor VC 3 foi o que gerou maior número de famílias com aspecto de grão superior. Em relação ao rendimento de grãos, o cruzamento VC 9 x Rudá-R1 foi o que apresentou maior número de famílias, entre as mais produtivas. No entanto, em todos os quatro cruzamentos, foi possível selecionar famílias com aspecto de grãos e produtividade comparáveis às dos genitores Pérola, BRSMG Talismã, VC 9 e VC 3.

Como todas estas famílias foram obtidas a partir de plantas F₂ resistentes aos patótipos 2047 (*C. lindemuthianum*), 63-19 (*U. appendiculatus*) e 31.17 (*P. griseola*), conclui-se que será possível extrair das famílias obtidas no presente trabalho, linhagens que além de apresentarem alta produtividade e grãos do tipo carioca com padrão comercial, contenham, pelo menos, os genes de resistência *Co-4*², *Ur-ON* e *Phg-1*.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DA CULTIVAR DE FEIJÃO COMUM WIDUSA

1. INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Lams-Scrib., é uma das principais doenças do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), no Brasil e em outras regiões de cultivo do mundo (PASTOR-CORRALES e TU, 1989; PASTOR-CORRALES, 1992). Tem-se observado que a alta diversidade genética deste fungo pode estar relacionada com a diversidade apresentada pelo hospedeiro (PASTOR-CORRALES *et al.* 1994b; BALARDIN e KELLY, 1998). Diferentes genes de resistência à antracnose, presentes nas cultivares diferenciadoras desse patógeno (PASTOR-CORRALES, 1992) e em outras cultivares têm sido identificados, e novos símbolos gênicos têm sido adotados (BIC, 2008).

Foram identificados, até o momento, doze genes de resistência independentes: *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-8*, *Co-10*, *Co-11*, *Co-12* e *Co-13*, os quais estão presentes, respectivamente, nas cultivares Michigan Dark Red Kidney (MDRK), Cornell 49-242, Mexico 222, TO, TU, AB 136, G 2333, AB 136, Ouro Negro, Michelite, Jalo Vermelho e Jalo Listras Pretas (MASTENBROEK, 1960; FOUILLOUX, 1976; SCHWARTZ *et al.*, 1982; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994; YOUNG *et al.*, 1998; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997, 2003a; GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2007, 2008a, 2009).

Os alelos *Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴, *Co-1*⁵, *Co-3*², *Co-3*³, *Co-4*² e *Co-4*³ foram identificados, respectivamente, nas cultivares Kaboon, Perry Marrow, AND 277, Widusa, Mexico 227, BAT 93, SEL 1308 (derivada da cultivar G 2333) e PI 207262 (MELOTTO e KELLY, 2000; YOUNG, *et al.*, 1998; ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b; GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006; GEFFROY *et al.* 1999; KELLY e VALLEJO, 2004; ALZATE-MARIN *et al.*, 2007). De acordo com a genealogia da cultivar BAT 93, sua fonte do gene *Co-3*³ é a cultivar PI 207262 (VOYSEST, 1983; VOYSEST, 2000). Este gene foi previamente nomeado como *Co-9*, mas subsequentemente mostrou-se alelo do *Co-3* (RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2004; MENDEZ-VIGO *et al.*, 2005), sendo renomeado como *Co-3*³ (BIC, 2008).

FERREIRA *et al.* (2003) estudaram a resistência de Widusa em relação ao patótipo 38 de *C. lindemuthianum* e observaram a segregação de treze plantas resistentes (R) para três plantas suscetíveis (S), em uma população F₂ derivada do cruzamento com a cultivar suscetível Xana, sugerindo que dois genes independentes, um dominante e um recessivo, estão envolvidos na resistência de Widusa ao patótipo 38. No entanto, em uma publicação posterior, estes autores retratam tal resultado, sugerindo que a resistência de Widusa ao patótipo 38 estaria determinada por um único gene dominante (RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2008). Ainda no estudo conduzido por FERREIRA *et al.* (2003), foi constatado que o(s) gene(s) de resistência presente(s) em Widusa são independentes dos genes presentes em PI 207262, México 222 e TU, mas que as cultivares Michelite, TO e AB 136 compartilham, pelo menos, um gene de resistência ao patótipo 38 com Widusa. Entretanto, GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY (2006), em estudos de herança conduzidos em populações F₂ derivadas do cruzamento da cultivar Widusa com as cultivares MDRK (patótipo 7), Cornell 49-242 (patótipo 73), TO (patótipo 453), Michelite, BAT 93 e Mexico 222 (patótipo 65) mostraram que a resistência à antracnose da cultivar Widusa é condicionada por um único gene dominante, o qual é independente dos genes presentes em Cornell 49-242 (*Co-2*), Mexico 222 (*Co-3*), TO (*Co-4*), TU (*Co-5*), AB 136 (*Co-6*), BAT 93 (*Co-3*³) e Ouro Negro (*Co-10*). Devido à falta de segregação nas populações F₂ obtidas do cruzamento de Widusa com as cultivares MDRK (*Co-1*) e Kaboon (*Co-1*²) quando inoculadas com o patótipo 65, foi sugerido que a Widusa possua um alelo do loco *Co-1*, e este alelo foi denominado de *Co-1*⁵ (GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006).

RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.* (2008) avaliaram a resistência de famílias F₃ provenientes do cruzamento Widusa x Mexico 222 frente a seis patótipos do agente causal da antracnose e genotiparam as plantas F₂ correspondentes com marcadores moleculares estreitamente ligados ao *cluster* gênico *Co-3/Co-9*. No referido trabalho, ficou constatado que a resistência de México 222 aos patótipos 19, 31 e 38 é conferida por genes raça-específicos dominantes e organizados em *cluster*, no loco *Co-3/Co-9* presente no grupo de ligação B4. Constataram também que a resistência de Widusa aos patótipos 65, 73, 102 e 449 é conferida por um gene dominante (ou genes), representando um distinto haplótipo do *cluster Co-3/Co-9*; que a resistência desta cultivar ao patótipo 38 é determinada por um gene localizado em uma posição independente do *cluster Co-3/Co-9*.

Esses variados resultados encontrados demonstram que a resistência à antracnose presente na cultivar diferenciadora Widusa necessita de uma caracterização mais completa em relação à herança, e de complementação nos estudos de alelismo, objetivando uma melhor compreensão e unificação dos resultados. Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivos: (1) Determinar o número de genes de resistência à antracnose presentes em Widusa, utilizando populações derivadas de cruzamentos com as cultivares suscetíveis Rudá, TO e Cornell 49-242; (2) Estabelecer as relações alélicas entre os genes presentes em Widusa e os genes *Co-1* (MDRK, Perry Marrow), *Co-3* (Mexico 222), *Co-4* (TO), *Co-4*² (SEL 1308), *Co-4*³ (PI 207262), *Co-5* (TU), *Co-6* (AB 136), *Co-7* (G 2333), *Co-3*³ (BAT 93), *Co-10* (Ouro Negro), *Co-11* (Michelite) e *Co-12* (Jalo Vermelho), com relação à resistência aos patótipos 9, 72, 73 e 453.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Genitores, cruzamentos e obtenção de sementes

Sementes das cultivares MDRK, Perry Marrow, Cornell 49-242, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB 136, BAT 93, Kaboon e Widusa foram fornecidas pelo CIAT e EMBRAPA. Dr. James Kelly da Michigan State University forneceu as sementes de SEL 1308. Sementes da cultivar Ouro Negro foram fornecidas pelo Dr. Clibas Vieira, da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) e as sementes das cultivares Jalo Vermelho foram fornecidas pela Dra. Maria Celeste Gonçalves Vidigal, da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil).

Os cruzamentos foram feitos em casa de vegetação de forma direcionada, de modo a aproveitar os marcadores fenotípicos (cor da flor, cor do hipocótilo e cor das sementes F₂) na identificação dos híbridos.

2.2. Patótipos de *C. lindemuthianum*

Os patótipos 73 e 453 utilizados neste trabalho são parte do grupo de 25 patótipos coletados em diferentes regiões do Brasil e identificados por RAVA *et al.* (1994). O inóculo original destes patótipos foi fornecido pelo Dr. Carlos A. Rava e pelo Dr. Aloísio Sartorato (EMBRAPA Arroz e Feijão, Goiânia, GO, Brasil). Os patótipo 9 e 72 foram coletados no estado Minas Gerais, Brasil, e identificados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV.

Os patótipos 9, 72, 73 e 453 foram utilizados em estudos de herança, nos cruzamentos entre a cultivar resistente Widusa e as cultivares suscetíveis Rudá (patótipos 9, 73 e 453), Cornell 49-242 (9 e 72) e TO (patótipo 453). Para os estudos de alelismo, os patótipos 9, 72, 73 e 453 foram escolhidos de modo que ambos os genitores de cada cruzamento apresentassem reação de incompatibilidade ao referido patótipo. A identificação dos patótipos de *C. lindemuthianum* foi confirmada pela inoculação das doze cultivares diferenciadoras da antracnose (PASTOR-CORRALES, 1992).

Na tabela 1 são apresentados as cultivares utilizadas nos estudos de herança e alelismo da cultivar Widusa, assim como a reação de resistência/suscetibilidade dessas cultivares em relação aos quatro patótipos de *C. lindemuthianum* empregados neste estudo.

Tabela 1. Genótipos e reação de resistência aos patótipos de *C. lindemuthianum*

Cultivar	Pool gênico	Patótipos de <i>C. lindemuthianum</i> ^b			
		9	72	73	453
Michelite	MA ^a	S	R	S	S
MDRK	A	R	R	R	R
Perry Marrow	A	R	R	R	S
Cornel 49-242	MA	S	S	S	R
Widusa	MA	R	R	R	R
Kaboon	A	R	R	R	R
Mexico 222	MA	R	S	S	S
PI 207262	MA	R	R	R	S
TO	MA	R	R	R	S
TU	MA	R	R	R	R
AB 136	MA	R	R	R	R
G 2333	MA	R	R	R	R
Ouro Negro	MA	R	R	R	R
BAT 93	MA	R	- ^c	R	S
SEL 1308	MA	R	R	R	R
Jalo Vermelho	A	R	- ^c	R	R
AND 277	A	R	R	R	R
Rudá	MA	S	S	S	S

^a MA= Mesoamericano, A= Andino; ^b S= Suscetível, R= Resistente; ^c Dado não disponível

2.3. Estudos de herança

Sementes F₁ provenientes dos cruzamentos da cultivar resistente Widusa com as cultivares suscetíveis Rudá, Cornell 49-242 e TO foram semeadas em casa de vegetação e as plantas foram autofecundadas para produzir sementes F₂. No cruzamento Rudá x Widusa também foram obtidas sementes F₃, que foram avaliadas quanto à resistência à antracnose na forma de famílias, com quinze plantas por família. As sementes F₂, F₃ e 20 sementes de cada um dos genitores foram pré-germinadas em papel germitext, em câmara de germinação a 30°C; após a emissão da radícula foram transferidas para casa de vegetação em bandejas plásticas (60 x 40 x 12 cm) contendo uma mistura de solo e substrato agrícola Plant Max[®], na proporção 2:1. Oito dias após o plantio, folhas primárias de cada uma das plantas foram inoculadas com esporos dos patótipos 9, 72, 73 e 453 de *C. lindemuthianum*, conforme apresentado na tabela 2. Os procedimentos de inoculação e avaliação dos sintomas da doença foram feitos conforme descrito no item 2.4.1 do CAPÍTULO 1.

2.4. Estudos de alelismo

A cultivar Widusa foi cruzada com as cultivares Michelite, MDRK, Perry Marrow, Kaboon, Mexico 222, TO, SEL 1308, TU, AB 136, G 2333, BAT 93, Ouro Negro e Jalo Vermelho. As sementes F₂, seus respectivos genitores e uma testemunha suscetível (cultivar Rudá) foram pré-germinadas e transplantadas para bandejas

plásticas, conforme o procedimento adotado nos estudos de herança. Oito dias após o plantio, folhas primárias de cada uma das plantas foram inoculadas com esporos de *C. lindemuthianum*, usando os patótipos selecionados de acordo com cada cruzamento (Tabela 4). Os procedimentos de inoculação e avaliação dos sintomas da doença foram feitos conforme descrito no item 2.4.1 do CAPÍTULO 1.

2.5. Análises de qui-quadrado

As proporções de plantas resistentes e suscetíveis encontradas foram comparadas com os valores esperados para cada hipótese de segregação Mendeliana possível pelo teste de qui-quadrado, usando o programa GENES (CRUZ, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudos de herança

A segregação observada para a população F₂ obtida do cruzamento de Widusa com a cultivar suscetível Cornell 49-242 teve um bom ajustamento com razão de segregação 3R:1S, indicando que a resistência de Widusa ao patótipo 72 de *C. lindemuthianum* parece ser determinada por um único gene dominante (Tabela 2). No entanto, quando plantas F₂ deste mesmo cruzamento foram inoculadas com a raça 9, observou-se uma relação de segregação de nove resistentes para sete suscetíveis, mostrando a ação complementar de dois genes independentes (Tabela 2).

Em relação às progênes F_{2:3} do cruzamento Rudá x Widusa, quando inoculadas com os patótipos 9 e 73, observou-se uma relação de segregação de nove resistentes para sete suscetíveis, mostrando a ação complementar de dois genes independentes, para ambos os patótipos (Tabela 2). A razão de segregação de 9R:7S também foi observada em populações F₂ derivadas dos cruzamentos Rudá x Widusa e TO x Widusa quando inoculadas com o patótipo 453 (Tabela 2). Estes resultados indicam que Widusa possui dois genes dominantes independentes para resistência a estes patótipos, os quais atuam em complementaridade [9R (AABB, AABb, AaBB, AaBb): 7S (AAbb, Aabb, aaBB, aaBb, aabb)].

Tabela 2. Cruzamentos, patótipos e razão de segregação de populações F₂ e F_{2:3} utilizadas em estudos de herança da cultivar Widusa

População	Patótipo	Razão	Segregação Esperada*		Segregação Observada*		χ^2	P %
			R	S	R	S		
F ₂ Widusa x Cornell 49242	72	3:1	124	42	125	41	0,008	93
F ₂ Widusa x Cornell 49242	9	9:7	43	34	40	37	0,579	45
F _{2:3} Rudá x Widusa	9	1:8:7	**5RR:44Rr	38rr	9RR:46Rr	32rr	3,443	18
F _{2:3} Rudá x Widusa	73	1:8:7	**5RR:43Rr	38rr	9RR:42Rr	35rr	2,651	27
F ₂ Rudá x Widusa	453	9:7	126	98	119	105	0,889	35
F ₂ TO x Widusa	453	9:7	47	37	54	30	2,204	14

*R = resistente, S = suscetível

**RR = Famílias com todas as plantas resistentes; Rr = Famílias com plantas resistente e plantas suscetíveis; rr = Famílias com todas as plantas suscetíveis.

A segregação de 3:1 observada na população F₂ obtida do cruzamento Widusa x Cornell 49242 quando inoculada com o patótipo 72 de *C. lindemuthianum* foi a mesma obtida por GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY (2006) em populações segregantes obtidas a partir dos cruzamentos Widusa x BAT 93, Widusa x Michelite e Widusa x

Mexico 222, utilizando o patótipo 65; Widusa x Cornell (patótipo 73) e Widusa x MDRK (patótipo 7).

Os resultados obtidos no presente trabalho, referente à resistência de Widusa ao patótipo 453, diferem daqueles obtidos por GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY (2006), uma vez que no referido trabalho os autores observaram um único gene conferindo resistência a este patótipo no mesmo cruzamento (Widusa x TO).

Os dados obtidos no presente estudo dão suporte aos resultados obtidos em estudos de herança prévios, que mostraram que Widusa possui mais de um gene dominante de resistência à antracnose. Em trabalhos conduzidos por BANNEROT (1965), Widusa mostrou apresentar um gene dominante conferindo resistência ao patótipo beta (D_{10}) e outro conferindo resistência aos patótipos beta e gamma ($D_{10} + E_{8b}$) de *C. lindemuthianum*. Resultados obtidos por RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.* (2008) indicaram que a resistência de Widusa aos patótipos 65, 73, 102 e 449 é conferida por um gene dominante (ou genes fortemente ligados) e que outro gene dominante e independente confere resistência ao patótipo 38.

3.2. Estudos de alelismo

Nos estudos de alelismo, o teste de qui-quadrado mostrou melhor ajustamento com a proporção esperada de 13:3 (resistentes: suscetíveis) para a população F_2 derivada do cruzamento entre Widusa e Michelite, quando inoculada com o patótipo 72 (Tabela 3). Uma vez que a resistência de Widusa ao patótipo 72 parece ser determinada por um único gene dominante, a segregação 13:3 pode ser justificada pela presença de um gene recessivo, independente do gene de Widusa na cultivar Michelite. A resistência genética da cultivar Michelite em relação ao patótipo 64 de *C. lindemuthianum* foi estudada por GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2007). No referido trabalho, uma população F_2 derivada do cruzamento entre Michelite e a cultivar suscetível México 222 segregou na proporção de 3R:1S, indicando que um único gene dominante determina a resistência de Michelite ao patótipo 64. Ainda neste estudo, testes de alelismo demonstraram que o gene presente em Michelite era independente de todos os genes até então caracterizados (*Co-1*, *Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴, *Co-1*⁵, *Co-2*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-9* e *Co-10*), com isso os autores propuseram o símbolo *Co-11* para o gene presente em Michelite. CÁRDENAS *et al.* (1964), porém, ao estudar a herança da resistência aos patótipos alfa, beta e gama em cruzamentos envolvendo nove cultivares de feijão, verificaram que a população F_2 do cruzamento Michelite (R) x MDRK (S), quando

inoculada com o patótipo beta, exibiu a segregação de 57R:143S, que se ajusta à razão de 1R:3S. Enquanto, em relação ao patótipo gama, a população F₂ do cruzamento Michelite (R) x MDRK (S) apresentou a segregação de 142R:58S, que se ajusta à razão de 3R:1S. A ocorrência do padrão de resistência recessiva em genótipos previamente identificados como sendo controlados por genes de resistência dominantes resulta da presença de séries multi-alélicas no loco onde uma ordem prévia de dominância tem sido estabelecida entre os alelos (MELOTTO e KELLY, 2000; MIKLAS *et al.*, 2000). Assim, a reversão de dominância seria observada em uma mesma cultivar resistente devido à relação de dominância que existe entre os alelos segregantes da população, após a inoculação com diferentes patótipos do mesmo patógeno.

A segregação 15:1 foi observada para as populações F₂ derivadas dos cruzamentos Widusa x TO (patótipo 73) e Widusa x AB 136 (patótipos 9, 73 e 453). Se considerarmos que a resistência de Widusa a estes três patótipos parece ser determinada por dois genes dominantes com modo de ação complementar, a segregação 15:1 só se justifica se admitirmos que as cultivares TO e AB 136 compartilham com Widusa um dos genes que age de forma complementar. Esse gene seria distinto dos genes *Co-4* e *Co-6* presentes, respectivamente, nas cultivares TO e AB 136, e não seria detectado em cruzamentos destas cultivares com genótipos que não contenham o outro gene complementar. A presença de um gene complementar em AB 136 foi detectada por GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (1997) ao avaliar o controle da resistência desta cultivar ao patótipo delta em cruzamentos com as cultivares suscetíveis Michelite, MDRK e Perry Marrow.

Estudos conduzidos por FERREIRA *et al.* (2003), utilizando o patótipo 38 de *C. lindemuthianum*, indicaram que a resistência de Widusa a este patótipo é determinada por dois genes independentes, sendo um dominante e outro recessivo, e que Widusa apresenta alelismo com as cultivares Michelite, TO e AB 136. Provavelmente, um dos genes de Widusa detectado no presente trabalho seja o gene recessivo que FERREIRA *et al.* (2003) detectaram ao utilizar o patótipo 38. Este gene seria uma forma alélica do mesmo gene que determina a resistência de Michelite e dos supostos genes complementares presentes nas cultivares TO e AB 136, os quais em relação ao patótipo 38 se comportariam como genes recessivos.

Segregações de razão 57:7 foram observadas para as populações F₂ derivadas dos cruzamentos entre Widusa e Mexico 222 (patótipo 9), Widusa e TO (patótipo 9), Widusa e SEL 1308 (patótipos 9, 73 e 453) e Widusa e Ouro Negro (patótipo 73). Esta

razão de segregação indica o envolvimento de três genes dominantes e independentes, onde dois com ação complementar seriam provenientes de Widusa, e o terceiro gene seria do outro genótipo envolvido no cruzamento.

Tabela 3. Cruzamentos usados para a caracterização genética da resistência à antracnose da cultivar Widusa

População F ₂ ^a	Patótipo	Gene	Segregação Esperada	Segregação Observada ^b	χ^2	P %
Widusa x Michelite	72	Co-11	13:3	200:43	0,177	68
Widusa x MDRK	73	Co-1 e Co-3/Co-9		118:0		
Widusa x P. Marrow	73	Co-1		246:0		
PI 207262 x Widusa	73	Co-4 ³ e Co-3/Co-9		324:0		
TO x Widusa	73	Co-4	15:1	242:19	0,472	49
Widusa x TU	73	Co-5		284:0		
Widusa x AB 136	73	Co-6	15:1	315:16	1,133	29
Widusa x G 2333	73	Co-4 ² , Co-5	249:7	515:3	9,047	0,3
BAT 93 x Widusa	73	Co-3/Co-9		266:0		
Widusa x Ouro Negro	73	Co-10	57:7	342:39	0,192	66
Widusa x SEL1308	73	Co-4 ²	57:7	219:28	0,040	84
Widusa x J. Vermelho	73	Co-12		127:0		
Widusa x P. Marrow	9	Co-1	63:1	117:4	2,391	12
Mexico 222 x Widusa	9	Co-3	57:7	89:10	0,071	79
PI 207262 x Widusa	9	Co-4 ³ e Co-3/Co-9	63:1	272:1	2,540	11
TO x Widusa	9	Co-4	57:7	128:13	0,427	51
Widusa x TU	9	Co-5		183:0		
Widusa x AB136	9	Co-6	15:1	182:14	0,267	61
Widusa x G2333	9	Co-4 ² , Co-5	249:7	280:10	0,566	46
Widusa x SEL1308	9	Co-4 ²	57:7	219:22	0,809	37
BAT 93 x Widusa	9	Co-3/Co-9		355:0		
Widusa x Ouro Negro	9	Co-10		167:0		
Widusa x J. Vermelho	9	Co-12		115:0		
Widusa x MDRK	453	Co-1, Co-3/Co-9	63:1	199:1	1,468	23
Widusa x TU	453	Co-5	15:1	228:12	0,640	42
Widusa x AB136	453	Co-6	15:1	188:12	0,021	89
Widusa x G2333	453	Co-4 ² , Co-5	249:7	328:20	11,87	0,1
Widusa x SEL1308	453	Co-4 ²	57:7	282:26	11,00	0,1
Widusa x Ouro Negro	453	Co-10		246:0		

^a Os genitores de cada cruzamento são resistentes ao patótipo testado.

^b Avaliação dos sintomas da antracnose com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9, onde: 1 = plantas sem sintomas visíveis da doença e 9 = plantas com sintomas muito severos (RAVA *et al.* 1993); plantas com notas 1-3 = resistentes (R); 4-9 = suscetíveis (S).

A razão 63:1 foi observada para as populações F₂ derivadas dos cruzamentos entre Widusa e MDRK (patótipo 453), Widusa e Perry Marrow (patótipo 9) e Widusa e PI 207262 (patótipo 9). Uma forma de justificar esta razão de segregação seria considerar que um dos genes complementares da cultivar Widusa também se encontra presente em MDRK, Perry Marrow e PI 207262 e que, além disso, estas três cultivares possuam dois outros genes dominantes e independentes determinando resistência aos respectivos patótipos.

A razão de segregação 249:7 indica a participação de quatro genes dominantes e independentes, sendo dois com modo de ação complementar, governando a resistência na população segregante. Essa razão de segregação foi suportada pelo teste de qui-quadrado na população F₂ derivada do cruzamento entre Widusa e G 2333, mas apenas quando se utilizou o patótipo 9 (Tabela 4). Ao testar a razão de segregação 249:7 em populações F₂ deste mesmo cruzamento, pôde-se observar um excesso de plantas resistentes ao utilizar o patótipo 73; enquanto ao utilizar o patótipo 453 o excesso observado foi de plantas suscetíveis. Dado o grande número de genes de resistência envolvidos no cruzamento Widusa x G 2333 é natural esperar que ações de complementaridade entre os genes desviem a razão de segregação do valor esperado. O excesso de plantas suscetíveis observado ao utilizar o patótipo 453 no cruzamento Widusa x G 2333 também pôde ser observado na população obtida do cruzamento Widusa x SEL 1308. Isso nos leva a acreditar que o gene *Co-4*², presente nesta linhagem e em G 2333, tenha sua efetividade reduzida em relação a alguns patótipos, quando em associação com o *background* genético da cultivar Widusa.

ERNEST e KELLY (2004) utilizaram marcadores moleculares estreitamente relacionados ao gene *Co-4*² para monitorar a sua introgressão por retrocruzamentos a partir da linhagem SEL 1308 em quatro linhagens de características Andinas. Segundo os autores, após os ciclos de retrocruzamentos, apenas plantas provenientes de dois cruzamentos mostraram-se resistentes quando inoculadas; para os outros dois cruzamentos, a resistência observada foi apenas intermediária. Os autores atribuíram que possivelmente o gene *Co-4*² dependa da ação complementar de outro gene (ou genes), e que este estaria ausente em alguns genótipos com características Andinas. Os resultados obtidos em nosso trabalho podem dar suporte às observações feitas por ERNEST e KELLY (2004), pois no presente trabalho, nas populações provenientes do cruzamento de Widusa com G 2333 e SEL 1308, também foi constatado um grande número de plantas com reação intermediária, principalmente ao patótipo 453.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os genes de resistência *Co-3*, *Co-4*, *Co-6* e *Co-11*, pertencentes às cultivares Mexico 222, TO/SEL 1308, AB 136 e Michelite, respectivamente, são independentes dos dois genes presentes em Widusa. Nos cruzamentos Widusa x MDRK (patótipo 73), Widusa x Perry Marrow (patótipo 73), Widusa x PI 207262 (patótipo 73), Widusa x TU (patótipos 9 e 73), Widusa x BAT 93 (patótipos 9 e 73), Widusa x Ouro Negro (patótipos 9 e 453) e Widusa x Jalo Vermelho, não foi observada segregação, o que sugere que Widusa

possua um alelo de resistência no loco *Co-1* e outro no loco *Co-3/Co-9*. Adicionalmente, se considerarmos que a resistência de Widusa aos patótipos 9, 73 e 453 de *C. lindemuthianum* é determinada por dois genes dominantes que atuam de forma complementar, é razoável considerar que a ausência de segregação em populações derivadas de Widusa só será possível quando o outro genitor também apresentar alelos de resistência à antracnose nos *clusters Co-1* e *Co-3/Co-9*. Assim, as cultivares MDRK, Perry Marrow, PI 207262, TU, BAT 93, Ouro Negro e Jalo Vermelho teriam que apresentar alelos de resistência nos *clusters Co-1* e *Co-3/Co-9*. No entanto, como explicar as segregações observadas nos cruzamentos Widusa x MDRK (patótipo 453), Widusa x Perry Marrow (patótipo 9), Widusa x TU (patótipo 453), Widusa x PI 207262 (patótipo 9) e Widusa x Ouro Negro (patótipo 73)? É esperado que estas cultivares possuam diferentes genes conferindo resistência à antracnose, porém, dependendo do patótipo usado para a inoculação, alguns genes podem mostrar-se alélicos, ou não, aos genes presentes em Widusa. Este trabalho confirma resultados anteriores que detectaram, separadamente, alelismo entre os genes de Widusa e o gene *Co-1* (GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006) e o gene *Co-3/Co-9* (ALZATE-MARIN *et al.*, 2007).

Além de ser uma importante fonte de resistência à antracnose do feijoeiro, Widusa é uma das cultivares diferenciadoras usadas para caracterizar a diversidade fenotípica do fungo *C. lindemuthianum*. No Brasil, tem sido observado que a Widusa é resistente a 33 dos 59 patótipos de *C. lindemuthianum* caracterizados (CARBONELL *et al.* 1999; SOMAVILLA e PRESTES, 1999; TALAMINI *et al.*, 2004; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008).

Neste estudo, foram caracterizados dois genes de resistência presentes na cultivar Widusa. Em relação aos patótipos 9, 73 e 453 estes dois genes são dominantes e independentes; atuam em complementaridade, estando o alelo recessivo de cada gene em epistasia em relação ao alelo dominante do outro gene. Quanto ao patótipo 72, Widusa apresenta um único gene dominante. Em relação à resistência ao patótipo 73, GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY (2006) observaram uma segregação com a proporção de 63 resistentes: 1 suscetível, em uma população F₂ derivada do cruzamento Widusa x PI 207262, e uma segregação com a proporção 15 resistentes: 1 suscetível em uma população F₂ derivada do cruzamento Widusa x BAT 93. Usando o patótipo 65, ALZATE-MARIN *et al.* (2007) observaram alelismo entre os genes de Widusa, PI

207262 e BAT 93. No presente trabalho também não foi observada segregação ao utilizar o patótipo 73 nos cruzamentos de Widusa com BAT 93 e PI 207262. RODRÍGUEZ-SUÁRES *et al.* (2008) observaram que a resistência de Widusa aos patótipos 65, 73, 102 e 449 é conferida por um gene dominante (ou genes), representando um haplótipo do *cluster Co-3/Co-9*.

Em geral, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a resistência de Widusa a alguns patótipos de *C. lindemuthianum* deve-se à ação complementar de dois genes dominantes e independentes. Um destes genes seria o *Co-9*, possivelmente o mesmo *cluster Co-3/Co-9* detectado por RODRIGUEZ-SUAREZ *et al* (2008). Em relação ao outro gene, GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY (2006) usando o patótipo 65 não observaram segregação em populações F₂ derivadas dos cruzamentos Widusa x MDRK e Widusa x Kaboon, concluindo que a resistência ao patótipo 65, presente em Widusa, é conferida pelo loco *Co-1*. Além disso, a resistência de Widusa ao patótipo 38 também pode estar localizada neste loco (RODRIGUEZ-SUAREZ *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi observado alelismo entre Widusa x MDRK e Widusa x Perry Marrow apenas para o patótipo 73. Quando populações F₂ do mesmo cruzamento foram inoculadas com os patótipos 453 (Widusa x MDRK) e 9 (Widusa x Perry Marrow), genes independentes foram observados. Possivelmente, o outro gene de MDRK encontrado neste trabalho esteja de acordo com o gene encontrado por CAMPA *et al.* (2009), localizado no grupo de ligação B4. Este pode ser alélico do *Co-9* ou *Co-10* (ou outro novo gene de Ouro Negro não relatado), uma vez que neste trabalho foi observado alelismo com estes dois genes, quando populações F₂ foram inoculadas com os patótipos 9 (Widusa x BAT 93 e Widusa x Ouro Negro) e 453 (Widusa x Ouro Negro) (Tabela 3).

CAMPA *et al.* (2009) observaram que a cultivar TU possui pelo menos três genes de resistência à antracnose independentes, um deles correspondente ao loco *Co-5*, localizado no grupo de ligação B7 (FOUILLLOUX, 1976; CAMPA *et al.*, 2005), formado por um *cluster* de diferentes genes que conferem resistência específica aos patótipos 3, 6, 7, 31, 38, 39, 102 e 449. Ainda de acordo com os autores, o segundo loco presente em TU confere resistência específica aos patótipos 31 e 102 e o terceiro loco confere resistência ao patótipo 102, sendo a localização destes dois locos ainda desconhecida. No presente trabalho, foi observado alelismo entre Widusa e TU para os patótipos 9 e 73, e segregação de genes independentes para o patótipo 453 de *C. lindemuthianum*. Provavelmente Widusa e TU apresentam o gene *Co-3/Co-9* conferindo

resistência aos patótipos 9 e 73, e os genes *Co-1* e *Co-5*, respectivamente, conferindo resistência ao patótipo 453.

GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2008a) identificaram na cultivar Jalo Vermelho um novo gene de resistência Andino para os patótipos 23, 55, 64, 65 e 453. No entanto, no presente trabalho foi observado alelismo entre Widusa e Jalo Vermelho. Provavelmente estas duas cultivares possuem alelos do gene *Co-1*, que confere resistência aos patótipos 9 e 73.

MENDEZ-VIGO *et al.* (2005) observaram que o loco *Co-9* de PI 207262 e BAT 93 é alélico do loco *Co-3* da cultivar Mexico 222, quando inoculado com o patótipo 38 de *C. lindemuthianum*. O presente trabalho e o estudo feito por ALZATE-MARIN *et al.* (2007) mostram que o loco *Co-9* da cultivar Widusa é independente do loco que determina a resistência da cultivar Mexico 222 aos patótipos 9 e 23 de *C. lindemuthianum*. VALLEJO e KELLY (2005) observaram a segregação de 63R:1S ($p=0.98$) a partir da inoculação do patótipo 7 de *C. lindemuthianum* em uma população F_2 derivada do cruzamento dos genitores resistentes Mexico 222 e MSU-7. Segundo os autores do referido estudo, a linhagem MSU-7 tem sido caracterizada e possui apenas o gene de resistência *Co-7*, derivado da cultivar diferenciadora G 2333.

A razão de segregação 63R:1S também foi observada por GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2007) ao avaliar a resistência ao patótipo 8 em uma população F_2 derivada do cruzamento Michelite(R) x México 222(R). Estudos de herança e alelismo conduzido por GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2007) indicaram que a resistência de Michelite é determinada por um único gene de resistência dominante. Assim, diante da possibilidade de Mexico 222 possuir dois genes dominantes e independentes conferindo resistência aos patótipos 7 e 8 da antracnose, torna-se provável que o loco que determina a resistência dessa cultivar aos patótipos 9 e 23 não seja o *Co-3*. Daí a segregação observada entre Widusa e Mexico 222, no presente estudo, e a observada por ALZATE-MARIN *et al.* (2007) entre as cultivares Mexico 222 e PI 207262.

As cultivares utilizadas neste estudo podem apresentar genes específicos para os fatores de virulência Andino/Mesoamericanos. Assim, Widusa, MDRK, Perry Marrow, PI 207262, BAT 93 TU, Ouro Negro, Jalo Vermelho e Mexico 222 podem compartilhar alelos que conferem resistência a fatores de virulência de maior complexidade (como o Andino/Mesoamericano). Como MENDEZ-VIGO *et al.* (2005) discutiram em seu trabalho, é possível que estes genes e seus alelos sejam parte de um complexo *cluster* gênico, o qual pode ser detectado quando diferentes patótipos do patógeno são usados.

Este agrupamento de genes de resistência pode ocupar um segmento do genoma e conferir resistência a diferentes raças fisiológicas do mesmo agente patogênico.

No presente estudo não foi detectada independência entre os genes de resistência à antracnose presentes em Widusa, MDRK, Perry Marrow, PI 207262, BAT 93, TU, Jalo Vermelho e Ouro Negro. Um dos genes encontrados em Widusa pode ser um alelo do gene *Co-3/Co-9*, o qual está presente em PI 207262, BAT 93 e possivelmente em TU e Ouro Negro. O outro gene de Widusa pode ser alelo do gene *Co-1* presente em MDRK, Perry Marrow e possivelmente em Jalo Vermelho. Embora outros estudos de alelismo utilizando os patótipos de *C. lindemuthianum* 38, 7 e 73 tenham mostrado independência entre Widusa e PI 207262 (FERREIRA *et al.*, 2003; GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006) e entre Widusa e BAT 93 (GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006). Nestes mesmos estudos, alelismos entre Widusa e MDRK, Kaboon (GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006), Michelite, TO e AB 136 (FERREIRA *et al.*, 2003) foram observados.

Uma vez que Widusa é uma cultivar Mesoamericana com características Andinas (BALARDIN *et al.*, 1998), é provável que ela possua genes de resistência Mesoamericanos e Andinos. Neste caso, a presença do complexo gênico *Co-1* e *Co-9* de resistência à antracnose presente em Widusa está de acordo com estas observações. Todas as evidências mostram uma complexidade do loco *Co-3/Co-9*. Em termos gerais, o alelo *Co-9* original está presente tanto em BAT 93 quanto em PI 207262, além disso, ele é alélico do gene *Co-3* da cultivar México e é um dos genes de Widusa e, possivelmente, também esteja presente em TU e Ouro Negro.

As novas informações encontradas neste trabalho são extremamente importantes para o entendimento do espectro de resistência da cultivar Widusa e as implicações do uso do gene *Co-3/Co-9* como fonte de resistência em programas de melhoramento.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Widusa pertence à série diferenciadora internacional da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. A caracterização genética dos genes de resistência à antracnose desta cultivar tem apresentado resultados contrastantes (FERREIRA *et al.*, 2003; GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006; RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2008). No intuito de obter uma melhor compreensão dos complexos resultados encontrados pelos diferentes grupos de pesquisa, estudos genéticos contemplando um maior número de patótipos de *C. lindemuthianum* foram conduzidos com a cultivar Widusa e as fontes de resistência à antracnose já caracterizadas.

Estudos de herança utilizando cruzamentos provenientes de Widusa mostraram que um ou dois genes independentes podem conferir resistência à antracnose em Widusa, quando são inoculados os patótipos 72 ou 9, 73 e 453, respectivamente. Estudos de alelismo mostraram que os genes de Widusa estão localizados em locos distintos dos genes de resistência previamente identificados *Co-3*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-7* e *Co-11*.

Segregações foram observadas nos cruzamentos Widusa x MDRK (patótipo 453), Widusa x Perry Marrow (patótipo 9), Widusa x Kaboon (patótipo 9), Widusa x PI 207262 (patótipo 9), Widusa x TU (patótipo 453) e Widusa x Ouro Negro (patótipo 73). No entanto, não foi observada segregação em populações F₂ derivadas dos cruzamentos entre Widusa e MDRK (patótipo 73), Perry Marrow (patótipo 73), PI 207262 (patótipo 73), TU (patótipo 9 e 73), BAT 93 (patótipo 9 e 73), Ouro Negro (patótipo 9 e 453) e Jalo Vermelho (patótipo 9 e 73). Isso indica que Widusa possui alelos dos genes de resistência à antracnose presentes nessas cultivares, para esses patótipos de *C. lindemuthianum* em particular.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que Widusa possui genes de resistência à antracnose nos locos *Co-1* e *Co-9*.

CAPÍTULO 5

IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE *Co-1*⁴ E *Co-3*³ NA CULTIVAR DE FEIJÃO COMUM AND 277

1. INTRODUÇÃO

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams.-Scrib., é uma das doenças mais destrutivas que acomete o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em áreas tropicais e subtropicais da América Latina, da América Central e da África Oriental (PASTOR-CORRALES e TU, 1989; PASTOR-CORRALES, 1992). O uso de cultivares resistentes é considerado como a opção mais viável para o controle da antracnose, principalmente para os pequenos produtores (VIEIRA 1988; SINGH *et al.* 1992). Entretanto, a ocorrência de várias raças fisiológicas do patógeno em regiões como a do Brasil Central e Sul representa um obstáculo ao desenvolvimento de novas cultivares resistentes à antracnose. O conhecimento sobre a frequência e distribuição das raças fisiológicas do patógeno, combinado com o uso de diferentes genes de resistência são necessários para o desenvolvimento de cultivares com resistência mais estável.

Estudos de variação do padrão da faseolina do grão, aloenzimas e evidências morfológicas têm revelado a existência dos *pools* gênicos Andino e Mesoamericano na espécie *P. vulgaris* (GEPTS *et al.*, 1986; SINGH *et al.*, 1991a; SINGH *et al.*, 1991b). O agente causal da antracnose (*C. lindemuthianum*), da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e da ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro também podem ser divididos nos *pools* gênicos Andino e Mesoamericano. Estudos de coevolução têm demonstrado que as cultivares de feijoeiro são mais vulneráveis aos patótipos provenientes do seu *pool* gênico correspondente (GUZMÁN e GILBERSTON, 1995; PASTOR-CORRALES e JARÁ, 1995; PASTOR-CORRALES, 1996; BALARDIN e KELLY, 1998; SANDLIN *et al.*, 1999). A combinação de genes de resistência de ambos os *pools* gênicos em uma mesma cultivar pode oferecer uma resistência mais ampla e prolongada a estes patógenos (KELLY, 1995; MELOTTO e KELLY, 2000).

Até o momento, foram caracterizados os genes Mesoamericanos de resistência à antracnose *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-3*³/*Co-9*, *Co-10* e *Co-11* presentes,

respectivamente, nas cultivares Cornell 49-242, Mexico 222, TO, TU, AB 136, PI 207262, Ouro Negro e Michelite (MASTENBROEK, 1960; FOUILLOUX, 1976; SCHWARTZ *et al.*, 1982; PASTOR-CORRALES *et al.*, 1994; YOUNG *et al.*, 1998; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997, 2003a, 2007; GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2007). O gene *Co-9* previamente descrito por GEFFROY *et al.* (1999) como presente na cultivar BAT 93 (derivada de PI 207262) subsequentemente, mostrou-se alelo do gene *Co-3* (RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2004; MENDEZ-VIGO *et al.*, 2005), sendo renomeado como *Co-3*³. Em relação ao *pool* gênico Andino, apenas três genes de resistência à antracnose foram identificados, o *Co-1* na cultivar diferenciadora Michigan Dark Red Kidney (MDRK), e seus alelos *Co-1*² e *Co-1*³ nas cultivares Kaboon e Perry Marrow, respectivamente (MELOTTO e KELLY, 2000); recentemente, os genes *Co-12* e *Co-13* nas cultivares Jalo Vermelho e Jalo Listras Pretas, respectivamente (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2008a, 2009).

A caracterização sistemática e o uso de novas fontes de resistência pode ser uma importante estratégia para se conseguir uma resistência de amplo espectro à antracnose. AND 277 {[Cargabello x (Pompadour Checa x Linea 17)] x (Linea 17 x Red Kloud)}, uma cultivar de feijão comum de origem Andina, é uma importante fonte de resistência à mancha angular no Brasil (CARVALHO *et al.*, 1998; NIESTCHE, 2000a). Adicionalmente, tem sido observado que esta cultivar é resistente a vários patótipos de *C. lindemuthianum*. O enrugamento das folhas de AND 277, em campo, permite deduzir que esta cultivar possui genes de origem Andina e Mesoamericana, uma vez que esta anomalia é uma desordem genética que ocorre quando existe uma combinação particular destes genes (VOYSEST, 2000). No entanto, o(s) gene(s) de resistência à antracnose presentes nesta cultivar não havia sido caracterizado até o momento.

O propósito deste trabalho foi (1) determinar a herança da resistência à antracnose presente em AND 277, por análises de populações segregantes derivadas de cruzamentos com as cultivares suscetíveis Rudá, Cornell 49-242 e Perry Marrow; (2) caracterizar o loco de resistência presente em AND 277 pelo estudo de suas relações alélicas com os genes Andinos *Co-1* (MDRK), *Co-1*² (Kaboon), *Co-1*³ (Perry Marrow) e *Co-12* (Jalo Vermelho) e os genes Mesoamericanos *Co-3* (Mexico 222), *Co-4/Co-4*² (TO, SEL 1308), *Co-5* (TU), *Co-6* (AB 136), *Co-3*³/*Co-9* (PI 207262, BAT 93), *Co-10* (Ouro Negro) e *Co-11* (Michelite); (3) caracterizar o espectro de resistência conferido pelo(s) gene(s) de resistência presente(s) em AND 277 pela inoculação com 22 patótipos de *C. lindemuthianum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fontes dos isolados de *C. lindemuthianum* e preparo do inóculo

Ao todo, foram utilizadas 24 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* no presente trabalho. Os patótipos 7, 55, 64, 65, 67, 73, 75, 83, 87, 95, 117, 119 e 453 são parte dos 25 patótipos previamente caracterizados por RAVA *et al.* (1994), e suas culturas originais foram fornecidas pelo Dr. Carlos A. Rava e pelo Dr. Aloisio Sartorato (EMBRAPA Arroz e Feijão, Goiânia, GO, Brasil). Os patótipos 1033, 1545 (Honduras) e 1600 (México) foram caracterizados por BALARDIN *et al.* (1997), as culturas originais destes patótipos foram fornecidos pelo Dr. James Kelly, da Universidade do Estado de Michigan (EUA). Os patótipos 8, 71, 593 (Brasil) e 2047 (Costa Rica) foram fornecidos pelo programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG, Brasil). Enquanto, isolados dos patótipos 9, 72, 81 e 89 foram coletados no estado Minas Gerais, Brasil, e caracterizados pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil).

Os patótipos 9, 65, 73, 453 e 2047 foram empregados nos estudos de herança, devido os genitores Rudá, Cornell 49-242, TO e Perry Marrow apresentarem reação de resistência contrastante a do genitor AND 277 para estes patótipos (Tabela 1).

Tabela 1. Reação de cultivares de feijão comum a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*

Cultivar	Pool gênico ^a	Patótipos e reação fenotípica ^b						
		9 ^{cd}	65 ^{cd}	72 ^d	73 ^{cd}	81 ^c	453 ^{cd}	2047 ^c
Michelite	MA	S	S	R	S	S	S	S
MDRK	A	R	R	R	R	R	R	S
Perry Marrow	A	R	R	R	R	R	S	S
Cornell 49-242	MA	S	R	S	S	R	R	S
Widusa	MA	R	R	R	R	S	R	S
Kaboon	A	R	R	R	R	R	R	S
Mexico 222	MA	R	S	S	S	S	S	S
PI 207262	MA	R	R	R	R	R	S	S
TO	MA	R	R	R	R	R	S	S
TU	MA	R	R	R	R	R	R	S
AB 136	MA	R	R	R	R	R	R	S
G 2333	MA	R	R	R	R	R	R	R
Ouro Negro	MA	R	S	R	R	R	R	S
BAT 93	MA	R	R	- ^e	R	- ^e	S	- ^e
SEL 1308	MA	R	R	R	R	R	R	R
Jalo Vermelho	A	R	R	- ^e	R	R	R	S
AND 277	A	R	R	R	R	R	R	R
Rudá	MA	S	S	S	S	S	S	S

^a MA= Mesoamericano, A= Andino; ^b S= Suscetível, R= Resistente; ^c Patótipos utilizados nos estudos de herança; ^d Patótipos utilizados nos testes de alelismo; ^e Não avaliado.

Para os estudos de alelismo os patótipos 9, 65, 72, 73, 81 e 453 foram escolhidos em função da reação de imunidade dos genitores envolvidos em cada cruzamento (Tabela 1). O inóculo foi preparado pelo cultivo do fungo, por aproximadamente oito dias, em meio estéril contendo vagens jovens de feijão (PIO RIBEIRO e CHAVES, 1975). A identificação dos patótipos foi confirmada pela inoculação sobre as doze cultivares diferenciadoras internacionais da antracnose do feijoeiro comum (PASTOR-CORRALES, 1992).

2.2. Genitores, cruzamentos, análises genéticas e avaliação dos sintomas da doença

Sementes das cultivares Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49-242, Kaboon, Widusa, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB 136, G 2333, BAT 93 e Rudá foram fornecidas pelo CIAT (Centro de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia) e EMBRAPA (Goiânia, GO, Brasil). Dr. James Kelly da Michigan State University forneceu as sementes de SEL 1308. Sementes da cultivar Ouro Negro foram fornecidas pelo Dr. Clibas Vieira, da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) e as sementes das cultivares Jalo Vermelho foram fornecidas pela Dra. Maria Celeste Gonçalves Vidigal, da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil). Todos os cruzamentos foram feitos em casa de vegetação.

Para determinar o espectro de resistência de AND 277, doze plantas de cada uma das cultivares MDRK, Perry Marrow, Kaboon, Widusa, AND 277 e de um controle suscetível (cultivar Rudá) foram inoculadas separadamente com esporos dos patótipos de *C. lindemuthianum* 7, 8, 9, 55, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 81, 83, 87, 89, 95, 117, 119, 453, 593, 1033, 1545, 1600 e 2047. Os procedimentos de inoculação e avaliação dos sintomas da doença foram feitos conforme descrito no item 2.4.1 do CAPÍTULO 1.

Para os estudos de herança e alelismo, a cultivar AND 277 foi utilizada como genitor doador de pólen nos cruzamentos com Rudá, Widusa, México 222 e Perry Marrow, TO, PI 207262 e BAT 93. Em todos os outros cruzamentos AND 277 foi utilizada como genitor feminino.

Sementes das populações F₂ derivadas dos cruzamentos de AND 277 com as cultivares suscetíveis Perry Marrow, Rudá e Cornell 49-242 e dos seus respectivos genitores foram utilizadas para determinar o número de genes de resistência da cultivar AND 277 (Tabela 2). Com o propósito de confirmar os resultados obtidos nas gerações F₂ foram obtidas sementes F₃ dos cruzamentos Rudá x AND 277 e Michelite x AND 277.

Progênies F_2 provenientes do cruzamento Rudá x AND 277 foram avaliadas quanto à resistência ao patótipo 453 da antracnose na forma de famílias, com quinze plantas F_3 por família (Tabela 2). De uma maneira alternativa, as sementes F_3 obtidas dos cruzamentos Rudá x AND 277 e Michelite x AND 277 foram utilizadas na forma de *bulks* constituídos a partir de uma semente de cada planta F_2 para determinar o controle da resistência de AND 277 aos patótipos 9, 73, 453 e 2047 (Tabela 2).

Para os testes de alelismo, sementes F_2 (AND 277 vs. Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49-242, Kaboon, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB 136, G 2333, BAT 93 e Ouro Negro), seus respectivos genitores e uma testemunha suscetível (cv. Rudá) foram semeadas em casa de vegetação. Os patótipos de *C. lindemuthianum* 9, 65, 72, 73, 81 e 453 foram empregados de forma que os genitores de cada população apresentassem resposta imune ao patótipo (Tabela 3). Para evitar contaminações cruzadas, cada patótipo foi inoculado em câmaras separadas.

As condições de inoculação e avaliação dos sintomas foram as mesmas adotadas nos estudos de herança. A análise genético-estatística das segregações obtidas nas populações F_2 foi realizada utilizando-se os recursos computacionais do programa GENES (CRUZ, 2006), no qual a classe de frequências obtidas foi testada para o melhor ajustamento com as razões teóricas, através da aplicação do teste do qui-quadrado (χ^2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudos de herança

As populações F_2 derivadas do cruzamento de AND 277 com as cultivares suscetíveis Rudá e Perry Marrow segregaram na razão de 3R:1S quando inoculadas com o patótipo 453 de *C. lindemuthianum* (Tabela 2), indicando que um único gene dominante determina a resistência ao patótipo 453 nestes cruzamentos. A herança monogênica da resistência de AND 277 ao patótipo 453 foi confirmada pela razão de segregação 1:2:1 apresentada pela população F_2 Rudá x AND 277, quando avaliada na forma de famílias $F_{2:3}$ (Tabela 2). Ao utilizar os patótipos 9, 65 e 73, foi observada a razão de segregação 57:7 em populações F_2 derivadas do cruzamento de AND 277 com as cultivares Rudá (patótipos 9, 65 e 73) e Cornell 49-242 (patótipo 9 e 73). A razão de segregação 57:7 indica a atuação de três genes dominantes e independentes, sendo dois com modo de ação complementar. A primeira hipótese para esta razão de segregação é que AND 277 possua dois genes dominantes e independentes determinando sua resistência aos patótipos 9, 65 e 73, mas que um destes genes possa atuar de forma complementar com um terceiro gene de resistência independente presente nas cultivares Rudá e Cornell 49-242. Outra possibilidade é que os três genes dominantes e independentes que determinam resistência aos patótipos 9, 65 e 73 estejam presentes em AND 277. Diante da possibilidade de AND 277 possuir três genes de resistência à antracnose, ainda surge a dúvida de qual seria o gene que determina a resistência ao patótipo 453, um dos genes que atua de forma complementar para os patótipos 9, 65 e 73, ou o terceiro gene que não estabelece relação de complementaridade?

Embora a segregação de 235R: 20S observada na população F_2 Rudá x AND 277 inoculada com o patótipo 73 se ajuste a razão de segregação 57:7 ($p=11\%$), seu melhor ajuste é com a razão de segregação 15:1 ($p=29\%$). Para que se possa observar pelo menos um indivíduo suscetível (certeza de 95%) em uma família $F_{2:3}$ proveniente de uma planta F_2 duplo heterozigota que apresenta dois genes de resistência dominantes e independentes é necessário avaliar 47 plantas F_3 . Os cruzamentos avaliados nos estudos de herança da cultivar AND 277 mostraram-se pouco prolíferos, impossibilitando que a avaliação de famílias $F_{2:3}$ fosse empregada no intuito de discriminar a segregação 57:7 da 15:1.

Dessa forma, optou-se por complementar os resultados obtidos com as populações F_2 , através da avaliação de populações F_3 . Ao utilizar esse tipo de população segregante, a razão de segregação esperada para dois genes dominantes independentes é

de 55R: 9S, enquanto a razão de segregação esperada para três genes dominantes e independentes, sendo dois com modo de ação complementar, é de apenas 5R: 3S, que é a mesma esperada quando se tem um único gene dominante determinando a resistência. A razão de segregação 5:3 foi observada para as populações F₃ obtidas do cruzamento AND 277 x Rudá, quando estas foram inoculadas com os patótipos 9, 73 e 453, indicando que a resistência aos patótipos 9 e 73, neste cruzamento, realmente parece ser determinada por três genes dominantes e independentes, sendo dois com modo de ação complementar.

Quando populações F₃ obtidas do cruzamento Michelite x AND 277 foram inoculadas com os patótipos 9 e 73, a razão de segregação observada foi de 55R: 9S (Tabela 2). Apesar desta razão de segregação indicar que há dois genes dominantes e independentes determinando a resistência em AND 277, também há a possibilidade de que os três genes dominantes detectados nos cruzamento citados anteriormente sejam todos provenientes de AND 277, e que Michelite compartilhe um dos genes complementares presentes em AND 277. Assim, a população segregante obtida deste cruzamento segrega como se houvesse apenas dois genes dominantes determinando o caráter.

Tabela 2. Estudos de herança da resistência à antracnose na cultivar AND 277, em populações F₂, F_{2:3} e F₃ inoculadas com os patótipos 9, 65, 73, 453 e 2047 de *C. lindemuthianum*

População	Patótipo	Reação	Segregação Esperada ^a	Segregação Observada	χ^2	P %
F ₂ Rudá x AND 277	9	S x R	57R:7S	170:23	0,190	66
F ₂ Rudá x AND 277	73	S x R	57:7	235:20	2,506	11
F ₂ Rudá x AND 277	65	S x R	57:7	138:14	0,465	50
F ₂ Perry Marrow x AND 277	453	S x R	3:1	48:19	0,403	53
F ₂ Rudá x AND 277	453	S x R	3:1	79:24	0,158	69
F ₂ AND277 x Cornell 49242	9	R x S	57:7	118:14	0,015	90
F ₂ AND277 x Cornell 49242	73	R x S	57:7	149:25	2,102	15
F ₂ Rudá x AND 277	2047	S x R	9:7	98:91	1,485	22
F ₃ Rudá x AND 277	9	S x R	5R:3S	58:26	1,536	22
F ₃ Rudá x AND 277	73	S x R	5:3	162:92	0,177	67
F ₃ Rudá x AND 277	453	S x R	5:3	149:99	0,619	43
F ₃ Michelite x AND 277	9	S x R	55:9	73:16	1,129	29
F ₃ Michelite x AND 277	73	S x R	55:9	73:13	0,079	78
F ₃ Michelite x AND 277	453	S x R	5:3	54:27	0,600	44
F ₃ Michelite x AND 277	2047	S x R	25:39	28:49	0,237	63
F _{2:3} Rudá x AND 277	453	S x R	1RR:2Rr:1rr	21:39:19	0,114	94

^a Avaliação dos sintomas da antracnose com base no uso de uma escala de notas que varia de 1 a 9, onde: 1 = plantas sem sintomas visíveis da doença e 9 = plantas com sintomas muito severos (RAVA *et al.* 1993); plantas com notas 1–3 = resistentes (R); 4–9 = suscetíveis (S); RR = Famílias com todas as plantas resistentes; Rr = Famílias com plantas resistente e plantas suscetíveis; rr = Famílias com todas as plantas suscetíveis.

Em relação ao patótipo 2047, as razões de segregação 9R:7S e 25R:39S, foram observadas respectivamente em populações F₂ do cruzamento Rudá x AND 277 e F₃ Michelite x AND 277. Estas razões de segregação indicam que a resistência de AND 277 ao patótipo 2047 parece ser determinada por dois genes dominantes com ação complementar (Tabela 2). Porém, neste caso também há a possibilidade de que um gene de resistência de AND 277 atue de forma complementar com um segundo gene presente nos genitores Rudá e Michelite.

3.2. Estudos de alelismo

As análises apresentadas nos parágrafos seguintes contemplam duas possibilidades para o controle genético da resistência da cultivar AND 277, as quais serão denominadas de hipótese “A” e hipótese “B”. A hipótese “A” é que AND 277 possua dois genes dominantes e independentes, determinando sua resistência a alguns patótipos de *C. lindemuthianum*, mas que um destes genes possa atuar de forma complementar com um terceiro gene, proveniente do outro genitor da população segregante. A hipótese “B” é que os três genes dominantes e independentes sejam todos provenientes de AND 277.

Os estudos de alelismos mostraram a razão de segregação de 15:1 para os cruzamentos entre AND 277 e as cultivares TU, AB 136 (patótipo 453), Ouro Negro (patótipo 81) Mexico 222 e TO (patótipo 9), indicando que dois genes dominantes independentes determinam a resistência nestes cruzamentos, sendo eles, provavelmente, o *Co-5* (TU), *Co-6* (AB 136), *Co-10* (Ouro Negro), *Co-3* (Mexico 222), *Co-4* (TO) e outro gene da cultivar AND 277 (Tabela 3). A segregação de 15:1 observada ao usar o patótipo 9 nas populações F₂ obtidas do cruzamento de AND 277 com as cultivares Mexico 222 (p= 83%) e TO (p= 55%) se justifica apenas se admitirmos que, sob a hipótese “B”, para estes cruzamentos em particular a complementaridade dos genes de resistência de AND 277 não é efetiva. Uma segunda possibilidade que pode ser considerada, sob a hipótese “A”, é que para estes cruzamentos a resistência de AND 277 ao patótipo 9 seja determinada por dois genes, um recessivo e um dominante, independentes do terceiro gene presente em México 222 e TO, já que a razão 61:3 também apresenta bom ajuste com as segregações observadas nas populações F₂ obtidas com México 222 (p= 34%) e TO (p= 78%). A razão de segregação 61:3 também foi observada na população F₂ do cruzamento AND 277 x SEL 1308, quando inoculada com o patótipo 73. A ocorrência do padrão de resistência recessiva em genótipos previamente identificados como sendo controlados por genes de resistência dominantes

pode resultar da presença de séries multi-alélicas no loco onde uma ordem prévia de dominância tem sido estabelecida entre os alelos (MELOTTO e KELLY, 2000; MIKLAS *et al.*, 2000).

A razão de segregação 63:1 foi observada para os cruzamentos entre AND 277 e Michelite (patótipo 72), Perry Marrow (patótipo 65), TO, AB 136 (patótipo 73), TU, AB 136 (patótipo 9), indicando que três genes dominantes independentes determinam a resistência nestes cruzamentos (Tabela 3). Esta razão de segregação era esperada sob a hipótese “A” e até mesmo sob a hipótese “B”, se admitirmos que um dos genes complementares de AND 277 também se encontra nas cultivares Michelite, Perry Marrow, TO, TU e AB 136. Ainda sob a hipótese “B”, mesmo considerando-se que estas cultivares não contenham nenhum dos genes complementares de AND 277, as segregações observadas apresentam bons ajustes à razão de segregação esperada para quatro genes dominantes independentes, sendo dois com modo de ação complementar, razão 249:7 (Tabela 3).

No cruzamento entre AND 277 e G 2333 foi observada a razão de segregação 255:1 (razão esperada sob a hipótese “A”) quando se utilizou os patótipos 9 e 73; esta razão indica a participação de quatro genes dominantes independentes determinando a resistência aos patótipos 9 e 73. Adicionalmente, a razão de segregação de 1017:7 (razão esperada sob a hipótese “B”) também apresentou bons ajuste às segregações observadas nas populações F₂ obtidas do cruzamento AND 277 x G 2333 (patótipo 9 e 73), indicando que cinco genes dominantes independentes, dois com ação complementar, determinam a resistência neste cruzamento.

Apesar do grande número de genes envolvidos neste cruzamento, as segregações ocorreram dentro do esperado, pois segundo ALZATE-MARIN *et al.* (2001a) apenas dois genes dominantes independentes (*Co-5* e *Co-4*²) determinam a resistência de G 2333 ao patótipo 73. Pelo resultado obtido no presente estudo, aparentemente o gene *Co-7* da cultivar G 2333 também não é capaz de conferir resistência ao patótipo 9. Estudos recentes apontam que o gene *Co-7*, previamente identificado na cultivar G 2333, é na verdade uma forma alélica do gene *Co-3*. GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2008b), ao analisarem populações F₂ inoculadas com o patótipo 7, afirmaram que MSU 7-1 (linhagem derivada de G 2333 e que possui os genes *Co-5* e *Co-7*), Mexico 222, PI 207262 e BAT 93 possuem um mesmo loco de resistência ao patótipo 7 de *C. lindemuthianum*, o *Co-3/Co-9*.

Em relação ao patótipo 453, a população F_2 obtida do cruzamento AND 277 x G 2333 não segregou na razão esperada de, pelo menos, três genes dominantes independentes, *Co-5*, *Co-4*² e o gene de AND 277 que confere resistência ao patótipo 453. Porém, a razão de segregação 3:1, observada na população F_2 obtida do cruzamento de AND 277 (R) x SEL 1308 (R) quando inoculada com o patótipo 453, vem a corroborar com o resultado citado anteriormente. Pois este resultado indica que no cruzamento com o genótipo AND 277 o gene *Co-4*², presente em G 2333 e SEL 1308, não se mostra efetivo ao patótipo 453. A perda de efetividade do gene *Co-4*² também foi observada em cruzamentos das cultivares G 2333 e SEL 1308 com *Widusa* (Capítulo 4). A perda de efetividade do gene *Co-4*² em certos cruzamentos foi relatada pela primeira vez por ERNEST e KELLY (2004). No referido trabalho, os autores observaram que o gene *Co-4*², proveniente da cultivar SEL 1308, não se mostrou efetivo em determinados cruzamento com linhagens de características Andinas. Os autores atribuíram que, possivelmente, o gene *Co-4*² dependa da ação complementar de outro gene (ou genes) e que este gene estaria ausente em alguns genótipos com características Andinas.

Nos estudos de alelismo envolvendo os cruzamento AND 277 x MDRK (patótipos 9 e 65), AND 277 x Perry Marrow (patótipos 9 e 73) e AND 277 x Kaboon (patótipos 9, 65 e 73) não foi observada segregação, indicando que AND 277 possui um alelo do gene *Co-1* (Tabela 3). Além disso, não foram observadas segregações nos cruzamentos entre AND 277 e PI 207262, TU (patótipo 73), BAT 93 (patótipos 9 e 73), Ouro Negro (patótipos 73 e 453), indicando que AND 277, TU e Ouro Negro podem possuir um alelo do gene *Co-3*³/*Co-9*.

Apesar de ter sido avaliado um número limitado de plantas, populações F_2 obtidas do cruzamento de AND 277 com Jalo Vermelho, também não apresentaram segregação quando inoculadas com os patótipos 9 e 73 de *C. lindemuthianum*. Isso pode ser um indicativo de que Jalo Vermelho possua uma forma alélica do gene *Co-1*, uma vez que o loco *Co-1* está presente na maioria das cultivares Andinas estudadas, até agora (KELLY e VALLEJO, 2004).

Dos alelismos detectados no presente estudo, o único observado ao utilizar o patótipo 453 deu-se no cruzamento AND 277 x Ouro Negro, indicando que se a AND 277 possuir apenas dois genes, e estes forem alélicos aos genes *Co-1* e *Co-3/Co-9*, provavelmente o gene de AND 277 que confere resistência ao patótipo 453 esteja localizado no loco *Co-3*. A razão de segregação 15:1 observada para a população F_2 AND 277 x MDRK inoculada com o patótipo 453 reforça esta hipótese. No entanto, há

a possibilidade de que o gene que determina a resistência de MDRK ao patótipo 453 não seja o *Co-1*, e sim um segundo gene dominante independente do gene que determina a resistência em AND 277. Segundo CAMPA *et al.* (2009), a cultivar MDRK possui além do gene *Co-1* um gene de resistência localizado no grupo de ligação B4, possivelmente alélico ao *Co-3/Co-9*. Caso o gene que determina a resistência de MDRK ao patótipo 453 seja uma forma alélica do *Co-3/Co-9* e se considerarmos que AND 277 possui alelos de resistência apenas nos locos *Co-1* e *Co-3/Co-9*, o gene que AND 277 compartilha com Ouro Negro pertence ao loco *Co-1*. Adicionalmente, conforme a hipótese de que AND 277 possui três genes independentes, há a possibilidade de que a resistência de AND 277 ao patótipo 453 seja determinada por um gene independente dos genes *Co-1* e *Co-3/Co-9*.

A segregação de 543 resistentes: 1 suscetível observada na população F₂ do cruzamento AND 277 x PI 207262, quando inoculada com o patótipo 9, apesar de se ajustar à razão de segregação 255:1 ($p = 44\%$), aparentemente não se trata de um caso segregação independente, já que resultados obtidos por ALZATE-MARIN *et al.* (2007) indicam que a resistência de PI 207262 é governada por dois genes independentes, localizados nos locos *Co-4* e *Co-3/Co-9*.

Embora os resultados obtidos no presente trabalho indiquem que AND 277 possui um alelo de resistência no loco *Co-3/Co-9*, a possibilidade de que existam múltiplos genes proximamente ligados em *clusters* não pode ser excluída pelos estudos de alelismo. Análises genéticas de segregação para resistência a diferentes patótipos da antracnose conduzidas por RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.* (2007, 2008) indicaram que o gene *Co-3/Co-9*, previamente descrito como gene simples de efeito maior capaz de conferir resistência a vários patótipos, é na verdade um *cluster* de genes individuais que conferem resistência raça-específica. As segregações observadas nas populações F₂ obtidas do cruzamento Widusa x AND 277 podem ser um indicativo de eventos de recombinação, pois como indicado no estudo de alelismo da cultivar Widusa (Capítulo 4) e no presente estudo de alelismo de AND 277, estas cultivares possuem genes de resistência a antracnose nos *clusters* *Co-1* e *Co-3*.

Tabela 3. Cruzamentos usados para a caracterização genética da resistência à antracnose da cultivar AND 277

População F ₂ ^a	Patótipo	Gene	Segregação Esperada	Segregação Observada	χ^2	P %
AND 277 x Michelite	72	Co-11	63:1*	184:4	0,390	53
AND 277 x Michelite	72	Co-11	249:7**	184:4	0,260	61
AND 277 x MDRK	453	Co-1, Co-?	15:1	146:9	0,052	82
AND 277 x MDRK	9	Co-1, Co-?		163:0		
AND 277 x MDRK	65	Co-1, Co-?		128:0		
AND 277 x Perry Marrow	9	Co-1 ³		91:0		
AND 277 x Perry Marrow	73	Co-1 ³		162:0		
Perry Marrow x AND 277	65	Co-1	63:1*	157:1	0,888	35
Perry Marrow x AND 277	65	Co-1	249:7**	157:1	2,623	11
AND 277 x Kaboon	73	Co-1 ²		206:0		
AND 277 x Kaboon	9	Co-1 ²		153:0		
AND 277 x Kaboon	65	Co-1 ²		169:0		
México 222 x AND 277	9	Co-3, Co-?	15:1**	82:6	0,048	83
México 222 x AND 277	9	Co-3, Co-?	61:3*	82:6	0,894	34
PI 207262 x AND 277	9	Co-4 ³ , Co-3 ³	255:1	543:1	0,598	44
PI 207262 x AND 277	73	Co-4 ³ , Co-3 ³		392:0		
BAT 93 x AND 277	9	Co-3 ³		270:0		
BAT 93 x AND 277	73	Co-3 ³		288:0		
TO x AND 277	9	Co-4	15:1	155:6	0,366	55
TO x AND 277	73	Co-4	63:1*	167:4	0,671	41
TO x AND 277	73	Co-4	249:7**	167:4	0,100	75
AND 277 x TU	9	Co-5	63:1*	89:1	0,119	73
AND 277 x TU	9	Co-5	249:7**	89:1	0,892	34
AND 277 x TU	73	Co-5		124:0		
AND 277 x TU	453	Co-5	15:1	82:9	2,058	15
AND 277 x AB 136	9	Co-6	63:1*	144:2	0,028	87
AND 277 x AB 136	9	Co-6	249:7**	144:2	0,980	32
AND 277 x AB 136	73	Co-6	63:1*	445:9	0,520	47
AND 277 x AB 136	73	Co-6	249:7**	445:9	0,965	33
AND 277 x AB 136	453	Co-6	15:1	225:10	1,596	21
AND 277 x G 2333	9	Co-4 ² , Co-5	255:1*	559:1	0,647	42
AND 277 x G 2333	9	Co-4 ² , Co-5	1017:7**	559:1	2,104	15
AND 277 x G 2333	73	Co-4 ² , Co-5	255:1*	211:2	1,646	20
AND 277 x G 2333	73	Co-4 ² , Co-5	1017:7**	211:2	0,205	65
AND 277 x G 2333	453	Co-4 ² , Co-5	63:1	205:5	0,914	34
AND 277 x SEL1308	9	Co-4 ²	255:1	339:1	0,341	55
AND 277 x SEL1308	73	Co-4 ²	61:3	322:13	0,488	48
AND 277 x SEL1308	453	Co-4 ²	15:1	193:18	1,873	17
Widusa x AND 277	73	Co-1, Co-3 ³	63:1	178:1	1,173	28
Widusa x AND 277	453	Co-1, Co-3 ³	63:1	129:3	0,433	51
AND 277 x Ouro Negro	73	Co-10		273:0		
AND 277 x Ouro Negro	453	Co-10		289:0		
AND 277 x Ouro Negro	81	Co-10	15:1	206:15	0,109	74
AND 277 x Jalo Vermelho	9	Co-12		43:0		
AND 277 x Jalo Vermelho	73	Co-12		30:0		

^a Os genitores de cada cruzamento são resistentes ao patótipo testado,

* Razão de segregação esperada sob a hipótese de que AND 277 possui dois genes dominantes,

** Razão de segregação esperada sob a hipótese de que AND 277 possui três genes dominantes, sendo dois com modo de ação complementar.

A inoculação de AND 277 com 24 patótipos de *C. lindemuthianum* demonstrou que os genes de resistência à antracnose presentes nesta cultivar conferem resistência aos patótipos 8, 9, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 81, 83, 89, 95, 117, 119, 453, 593, 1033,

1545, 1600 e 2047, mas não aos patótipos 7, 55 e 87 (Tabela 4). O controle suscetível (cv. Rudá) mostrou-se compatível com todos os patótipos testados, com exceção do patótipo 71 (dados não apresentados).

Tabela 4. Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação das cultivares AND 277, MDRK, Perry Marrow, Widusa e Kaboon

Patótipo	AND 277	MDRK	Perry Marrow	Widusa	Kaboon
7	S	S	S	R	R
8	R	R	R	R	R
9	R	R	R	R	R
55	S	S	S	S	S
64	R	R	R	R	R
65	R	R	R	R	R
67	R	S	R	R	R
71	R	S	S	R	R
72	R	R	R	R	R
73	R	R	R	R	R
75	R	S	R	R	R
81	R	R	R	S	R
83	R	S	R	S	R
87	S	S	S	S	R
89	R	R	R	S	R
95	R	S	S	S	R
117	R	R	S	S	S
119	R	S	S	S	S
453	R	R	S	R	R
593	R	R	R	S	R
1033	R	R	R	R	R
1545	R	R	R	R	R
1600	R	R	R	R	R
2047	R	S	S	S	S

Neste trabalho, uma nova fonte Andina de resistência à antracnose contendo um novo alelo do gene *Co-1* foi caracterizada. Comparações entre o espectro de resistência de AND 277 e as cultivares MDRK (*Co-1*), Kaboon (*Co-1*²) e Perry Marrow (*Co-1*³) indicam que AND 277 tem um alelo alternativo do gene *Co-1* (Tabela 4). Como os alelos *Co-1*² e *Co-1*³ foram caracterizados por MELOTTO e KELLY (2000), propõe-se que este novo alelo seja designado de *Co-1*⁴. Outros alelos do gene Andino *Co-1* foram recentemente relatados nas cultivares A193, Jalo EEP557 e Widusa (MENDOZA *et al.*, 2001; VALLEJO *et al.*, 2003; GONÇALVES-VIDIGAL e KELLY, 2006), indicando que a base genética dos feijões Andinos é estreita em relação à resistência à antracnose. Além do loco *Co-1* apenas os genes *Co-12* e *Co-13*, recentemente identificados (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2008a, 2009), têm origem no *pool* gênico Andino. O loco *Co-1* encontra-se localizado no grupo de ligação B1 do mapa integrado da espécie *Phaseolus vulgaris* (KELLY e VALLEJO, 2004). Em relação ao gene *Co-13*, já foi

identificado o marcador RAPD V20₆₈₀ ligado em fase de acoplamento a uma distância de apenas 1,8 centimorgans (LACANALLO *et al.*, 2008), mas o grupo de ligação a que pertence ainda não foi determinado.

No presente estudo, foi demonstrado que os genes de resistência à antracnose presentes em AND 277, similarmente aos alelos *Co-1*, *Co-1*² e *Co-1*³, são capazes de conferir resistência aos patótipos 65, 73, 81 e 89, que são os patótipos encontrados com maior frequência no Brasil (CARBONELL *et al.* 1999; SOMAVILLA e PRESTES, 1999; ALZATE-MARIN e SARTORATO, 2004; TALAMINI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANSIGOLO *et al.*, 2008). Além disso, outro gene, o *Co-3/Co-9*, foi identificado em AND 277 e aparentemente na cultivar Ouro Negro. O gene *Co-3/Co-9* está presente nas cultivares PI 207262 e BAT 93, no entanto, o espectro de resistência diferencial entre PI 207262, AND 277 e Ouro Negro sugere que estas cultivares possuem diferentes alelos no loco *Co-3/Co-9* condicionando resistência à antracnose.

Além do amplo espectro de resistência apresentado pela cultivar AND 277 (Tabela 4), merece destaque o fato desta cultivar ter apresentado incompatibilidade frente ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*, identificado na Costa Rica e tido como um dos patótipos de maior virulência já identificados (BALARDIN e KELLY, 1998). O gene *Co-4*², identificado na cultivar G 2333 (YOUNG *et al.*, 1998), era tido como o único gene de resistência à antracnose, entre os já caracterizados, capaz de conferir resistência ao patótipo 2047 de *C. lindemuthianum*.

No mapa integrado da espécie *P. vulgaris*, os genes de resistência à antracnose e à ferrugem provenientes da cultivar Ouro Negro foram mapeados no grupo de ligação B4 em uma região próxima a um *cluster* gênico. Nesta região se encontram diversos genes de resistência a doenças, inclusive de resistência à antracnose e à ferrugem, como o *Co-3*, *Co-9*, *Co-y*, *Co-z*, *Ur-5* e *Ur-Dorado* (MIKLAS *et al.*, 2006; GEFFROY *et al.*, 2008). ALZATE-MARIN *et al.* (2003a) definiram o gene de resistência à antracnose de Ouro Negro, como distinto dos previamente caracterizados, nomeando-o como *Co-10*. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a possibilidade de que o gene de resistência previamente nomeado como *Co-10* seja uma forma alélica do gene *Co-3/Co-9*. O *cluster* de genes R presente no grupo de ligação B4, no qual está incluso o gene *Co-3/Co-9* parece ser um dos mais complexos *clusters* de genes R descritos em *P. vulgaris*, tanto em nível molecular quanto em genético. Estudos conduzidos na população de mapeamento obtida dos genótipos BAT93 e Jalo EEP558 têm mostrado

que em ambos os genitores este *cluster* é composto por genes de resistência específicos altamente ligados (MIKLAS *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2008; GEFFROY *et al.*, 2008).

Como dito anteriormente, AND 277 apresenta resistência a outra importante doença do feijão comum, a mancha angular causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (CARVALHO *et al.* 1998; NIESTCHE, 2000a; BALBI *et al.*, 2008). O Programa de Melhoramento do Feijoeiro conduzido na Universidade Federal de Viçosa tem usado o marcador SCAR H13₅₂₀ (CARVALHO *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2004a), ligado a um dos genes de resistência à mancha angular presentes na cultivar AND 277 (gene *Phg-1*) para desenvolver linhagens superiores de feijão comum com resistência à mancha angular. É propósito desse programa de melhoramento identificar marcadores moleculares ligados ao alelo *Co-1*⁴ para possibilitar a seleção simultânea de plantas resistentes à antracnose e à mancha angular em populações segregantes derivadas desta fonte Andina. Existem poucos marcadores moleculares relatados como ligados ao gene *Co-1* (OF10₅₃₀ e SE_{ACT}/M_{CCA}) e *Co-3*³/*Co-9* (SB12) (revisado por KELLY e VALLEJO, 2004). A ação dos genes de resistência à mancha angular e à antracnose presentes em AND 277 podem oferecer um amplo espectro de resistência a ambas as doenças, no Brasil e em outras partes do mundo.

Os resultados e considerações apresentadas no presente trabalho certamente contribuem para o entendimento da resistência à antracnose apresentada pela cultivar Andina AND 277. Devido à necessidade de fontes Andinas de resistência à antracnose, no Brasil e em outras partes do mundo, novas informações a respeito da herança da resistência ao *C. lindemuthianum* e a identificação de um novo alelo do gene *Co-1* são extremamente relevantes. Apenas três genes Andinos de resistência à antracnose têm sido identificados até o momento, por isso é importante que diferentes programas de melhoramento do feijoeiro concentrem esforços para caracterizar novas fontes de resistência Andinas e para analisar as relações entre seus genes de resistência e os genes de resistência à antracnose previamente caracterizados.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

AND 277 é uma cultivar de feijão frequentemente utilizada como fonte de resistência à mancha angular, mas que também possui resistência à antracnose. Neste trabalho foram caracterizados os locos de resistência à antracnose presentes em AND 277 por meio de estudos de herança e testes de alelismo em relação aos alelos Andinos e Mesoamericanos de resistência à antracnose, já caracterizados. Além disso, foi determinado o espectro de resistência da cultivar AND 277 em relação a 24 patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Os estudos de herança indicaram que um, dois ou três locos podem determinar a resistência de AND 277 à antracnose, dependendo do cruzamento e do patótipo testado. Os testes de alelismo confirmaram que um dos genes presentes em AND 277 está localizado no mesmo loco dos alelos *Co-1*, *Co-1*², *Co-1*³ e *Co-1*⁵. O outro gene está localizado no mesmo loco do alelo previamente caracterizado como *Co-3*³/*Co-9*. Um suposto terceiro gene de AND 277 não pôde ser identificado.

Os genes de AND 277 são independentes dos locos *Co-4/Co-4*², *Co-5*, *Co-6* (para os patótipos 9, 73 e 453), *Co-10* (patótipo 81) e *Co-11* (patótipo 72). O alelo *Co-1* de AND 277 deve ser diferente dos alelos *Co-1*, *Co-1*², *Co-1*³ e *Co-1*⁵ e, por isso, foi proposto o símbolo genético *Co-1*⁴ para este alelo de resistência.

A inoculação de AND 277 com 24 patótipos de *C. lindemuthianum* demonstrou que os alelos *Co-1*⁴ e *Co-3/Co-9* conferem resistência aos patótipos 8, 9, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 81, 83, 89, 95, 117, 119, 453, 593, 1033, 1545, 1600 e 2047.

Conclui-se que o amplo espectro de resistência à antracnose apresentado pela cultivar AND 277 deve-se à ação de pelo menos dois genes de resistência, e que um destes genes é alélico ao gene *Co-3/Co-9*, enquanto outro é alélico do gene *Co-1*.

CONCLUSÕES GERAIS

O uso de marcadores moleculares possibilitou a piramidação dos genes *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Phg-1* e *Ur-ON* no *background* genético da cultivar de grão tipo carioca “Rudá”.

Foram obtidas linhagens com amplo espectro de resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular, com potencial produtivo equivalente ao das cultivares modernas, mas com limitações quanto ao aspecto dos grãos.

O cruzamento das linhagens piramidadas obtidas neste trabalho com cultivares e linhagens elites do grupo comercial carioca gerou populações com alto potencial para extração de famílias superiores, quanto ao aspecto dos grãos, ao potencial produtivo e à resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha angular.

Estudos genéticos das cultivares Widusa e AND 277 revelaram que as duas possuem formas alélicas dos genes *Co-1* e *Co-3/Co-9* determinando a resistência aos patótipos do agente causal da antracnose.

Os genótipos gerados e as informações obtidas no presente trabalho são de grande relevância para os programas de melhoramento do feijoeiro.

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.
- 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.
- ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; CARNEIRO, J. E. S.; DEL PELOSO, M. J.; PAULA JR., T. J. de; FARIA, L. C de; MELO, L. C.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARTINS, M.; RAVA, A. C.; COSTA, J. G. C. da. **BRSMG Majestoso: mais uma opção de cultivar de grão carioca para o Estado de Minas Gerais**. Comunicado Técnico da EMBRAPA Arroz e Feijão, 134: 1-2, 2006.
- ALMEIDA, L. D'A.; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. Características do feijão carioca, um novo cultivar. **Bragantia**, 30:33-38, 1971.
- ALMEIDA, L. D'A. de. **O feijão Carioca: reflexos de sua adoção**. Campinas: IAC, 2000. Não paginado.
- ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S.; PAULA JR., T. J.; CARVALHO, G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. **Plant Disease**, 81:996-998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G. A.; PAULA JR., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 89(4):281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; MENARIM, H.; CHAGAS, J. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, 23:633-637, 2000.
- 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-4*² gene. **Journal Phytopathology**, 149:259-264, 2001a.
- ALZATE-MARIN A. L.; ALMEIDA, K. S.; RAGAGNIN, V. A.; COSTA, M. R.; ARRUDA, K. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a recessive gene conferring resistance to anthracnose in common bean lines derived from differential cultivar AB 136. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:117-118, 2001b.
- ALZATE-MARIN A. L.; ARRUDA, K. M. A.; 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.; ARRUDA, K. M. A.; BARROS E. G.; MOREIRA, M. A. Validation of a RAPD marker linked to the anthracnose resistant gene *Co-5* in the common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2(4):591-594, 2002b.

- ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M. R.; ARRUDA, K. M. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, K. M. A.; 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. e SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:241-242, 2004.
- ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, K. M. A.; SOUZA, K. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Introgression of *Co-4*² and *Co-5* anthracnose resistance genes into “Carioca” Common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 4:446-451, 2004a.
- 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, 2004b.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30(4):333-342, 2005.
- ALZATE-MARIN, A. L.; SOUZA, K. A.; MORAIS, M. G.; OLIVEIRA, E. J.; MAURÍLIO, A. M.; BARROS, E. G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4*³ and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, 154:1-8, 2007.
- ARAÚJO, G. A. A., C. VIEIRA; B. F. SOUZA FILHO, 1991. ‘Ouro Negro’ Nova variedade de feijão-preto para os estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **EPAMIG (Boletim Técnico nº 1)**, Viçosa, MG.
- ARRUDA, K. M. A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 77 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- ARRUDA, M. C. C.; ALZATE-MARIN, A. L.; CHAGAS, J. M.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance 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.; 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.
- BALBI, B. P. **Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* obtidos em Minas Gerais e avaliação de fontes de resistência do feijoeiro**. Viçosa, MG, UFV, 2007. 40 p. (Monografia) - Universidade Federal de Viçosa, 2007.

- BALBI, B. P.; SANGLARD, D. A.; SANGLARD, N. A.; DAMASCENO, J. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Phenotypical evaluation of resistance sources to common bean angular leaf spot by using races occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:196-197, 2008.
- BALDONI, A. B.; SANTOS, J. B. dos; ABREU, A. de F. B. Melhoramento do feijoeiro comum visando a obtenção de cultivares precoces com grãos tipo “carioca” e “rosinha”. **Ciência e Agrotecnologia**, 30(1):67-71, 2006.
- BALLANTYNE, B. J. **The genetic bases of resistance to rust, caused by *Uromyces appendiculatus* in bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Sydney, Australia: New South Wales, 1978. 262 p. (Tese de Doutorado). University of Sydney, 1978.
- BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Annales de l'Amélioration des Plantes**, 15:201-222, 1965.
- BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Burundi. **Food Chemistry**, 47:159-167, 1993.
- BIC - Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. **List of genes - *Phaseolus vulgaris* L.**, elaborada por PORCH, T. G. (2008) e disponível em <<http://www.css.msu.edu/bic/PDF/BeanGenesList.pdf>>. Acessado em setembro de 2008.
- BLAIR, M. W.; FREGENE, M. A.; BEEBE, S.E.; CEBALLOS, H. Marker-assisted selection in common beans and cassava. In: GUIMARÃES, E. P.; RUANE, J.; SCHERF, B. D.; SONNINO, A.; DARGIE J. D. (Eds.). **Marker-assisted selection - Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007, 471p.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 600 p.
- BRAUN, U.; CROUS, P. W. Proposal to conserve the name *Pseudocercospora* against *Stigmina* and *Phaeoisariopsis*. **Taxon**, 55:803, 2006.
- BRODY, R. J.; KERN, E. S. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, 36:214-216, 2004.
- BROWN, J. K. M. Little else but parasites. **Science**, 299:1680-1681, 2003.
- CAIXETA, E. T.; BORÉM, A.; FAGUNDES, S. A.; NIESTCHE, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134:297-303, 2003.
- CAIXETA, E. T.; BORÉM, A.; FAGUNDES, S. A.; SILVA, M. G. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, 145:3:237-245, 2005.
- CAMPA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. The bean anthracnose resistance gene *Co-5* is located in linkage group B7. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 48:68-69, 2005.
- CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDRK and TU. **Theoretical and Applied Genetics**, 119:1-11, 2009.

- CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; POMPEU, A. S.; FRANCISCO, F.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A. L. L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 24(1):60-65, 1999.
- CÁRDENAS, F., ADAMS, M. W.; ANDERSEN, A. The genetic system for reaction of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to infection by three physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Euphytica**, 13:178-86, 1964.
- CARNEIRO, J. E. S. **Alternativas para obtenção e escolha de populações segregantes no feijoeiro**. Lavras, MG: UFLA, 2002. 134 p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 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.
- CASTAÑO, J. Manual standar para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol. Cali: CIAT. Cali, Colômbia, 1985.
- 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.
- 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. V.; 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.
- COSTA, M. R.; TANURE, J. P. M.; ARRUDA, K. M. A.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Pyramiding of anthracnose, angular leaf spot and rust resistance genes in black and red bean cultivars. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49:187-188, 2006.
- COSTA, M. R. **Melhoramento de feijões preto e vermelho visando a resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, com auxílio de marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 88 p. (Tese de doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: Estatística Experimental e Matrizes**. Viçosa: UFV, 2006. 285 p.
- DAVID, P.; SÉVIGNAC, M.; THAREAU, V.; CATILLON, Y.; KAMI, J.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. BAC end sequences corresponding to the B4 resistance gene cluster in common bean: a resource for markers and syntenic analyses. **Molecular Genetics and Genomics**, 280:521-533, 2008.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.

- EMBRAPA. **Sistemas de Produção Nº 2**, Versão eletrônica disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivadoFeijoeiro/index.htm>>. Acessado em setembro de 2008a.
- EMBRAPA. **Cultivar Rudá**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/ruda.htm>>. Acessado em setembro de 2008b.
- EMBRAPA. **Cultivar Pérola**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/perola.htm>>. Acessado em setembro de 2008c.
- ERNEST, E. G.; KELLY, J. D. The Mesoamerican anthracnose resistance gene *Co-4²* does not confer resistance in certain Andean backgrounds. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:245-246, 2004.
- FALEIRO, F. G., VINHADELLI, W. S., RAGAGNIN, V. A., ZAMBOLIM, L., PAULA JR, T. J., MOREIRA, M. A., BARROS, E. G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24:166-169, 1999a.
- 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, 1999b.
- FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; VINHADELLI, W. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. **Revista Ceres**, 47(272):375-382, 2000a.
- FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23:399-402, 2000b.
- FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; 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.
- FALEIRO, F. G., RAGAGNIN, V. A., MOREIRA, M. A., BARROS, E. G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, 138:213-218, 2004.
- FAO. 2008. BASE de dados **FAOSTAT**. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em setembro de 2008.
- FARIA, L. C. DIAZ, J. L. C.; DEL PELOSO, M. J.; ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S.; MELO, L. C.; GONÇALVES, F. M. A.; COSTA, J. G. C. da.; SANTOS, J. B. dos; RAVA, A. C.; **BRSMG Talismã: uma nova opção de cultivar de feijoeiro comum com grão carioca para o Estado do Paraná**. Comunicado Técnico da EMBRAPA Arroz e Feijão, 75: 1-3, 2004.
- FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e feijão, 2002. 47 p. (documentos/EMBRAPA Arroz e feijão, 135).
- FERREIRA, J. J.; RODRÍGUEZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R. Allelism test for resistance to race 38 of anthracnose in common bean differential cultivar "Widusa". **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:169-170, 2003.
- 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.

- FLOR, H. H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, 45:680-685, 1955.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:36-37, 1976.
- GARCIA, R. A. V.; CARNEIRO, M. S.; SARTORATO, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49:209-210, 2006.
- 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*. **Molecular Plant Microbe Interact**, 12:774-784, 1999.
- GEFFROY, V.; SEVIGNAC, M.; BILLANT, P.; DRON, M.; LANGIN, T. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:407-415, 2008.
- GEPTS, P.; OSBORN, T. C.; RASHKA, K.; BLISS, F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botanic*, 40:451-468, 1986.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; CARDOSO, A. A.; VIEIRA, C.; SARAIVA, L. S. Inheritance of anthracnose resistance in common bean genotypes PI 207262 and AB 136. **Brazilian Journal of Genetics**, 20(1):59-62, 1997.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, 151:411-419, 2006.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SILVA, C. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M. V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, *Co-11*. **Genetics and Molecular Biology**, 30:589-593, 2007.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL FILHO, P. S. A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Jalo Vermelho. **Plant Breeding**, 127, 592-596, 2008a.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; PERIOTO, P. S.; VIDIGAL FILHO, P. S.; ANDRADE, C. A. B.; KVITSCHAL, M. V. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean México 222. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:96-97, 2008b.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; MEDEIROS, A. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, 49:133-138, 2009.
- GRAFTON, K. F.; WEISER, G. C.; LITTLEFIELD, L. J.; STAVELY, J. R. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, 25:537-539, 1985.
- GEFFROY, V.; DELPHINE, S.; OLIVIRA, J. C. F.; SEVIGNA, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, 12:774-784, 1999.

- GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, 85:600-607, 1995.
- HABGOOD, R. M. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, 227(19):1268-1269, 1970.
- HALEY, S. D.; MIKLAS, P. N.; STAVELY, J. R.; BYRUM, J.; KELLY, J. D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.
- 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**, 95(3):313-320, 1997.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>> Acessado em março de 2009.
- ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A; SILVA; K. J. D.; FREIRE, C. N. S. Pathogenic variability of causal agent of common bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:184-185, 2008.
- JESUS JR, W.C.; DO VALE, F. X. R.; COELHO, R. R.; HAU, B.; ZAMBOLIN, L.; COSTA, L. C.; BERGAMIN FILHO, A. Effects of angular leaf spot and rust on yield losses of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 91:1045-1053, 2001.
- 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.
- JUNG, G.; COYNE, D. P.; BOKOSI, J. M.; STEADMAN, J. R.; NIENHUIS, J. Mapping genes for specific and adult plant resistance to rust and abaxial leaf pubescence and their genetic relationship using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:859-863, 1998.
- JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENRBERG, A.; BETT, K. E. An accelerated postharvest seed-coat darkening protocol for pinto beans grown across different environments. **Crop Science**, 47:694-700, 2007.
- 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 the Bean Improvement Cooperative**, 37:15-16, 1994.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, 30:461-465, 1995.
- KELLY, J. D.; AFANADOR, L.; HALEY, S. S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212, 1995.
- KELLY, J. D.; MIKLAS, P. N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, 4:1-11, 1998.

- KELLY, J. D., GEPTS, P., MIKLAS, P. N., COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 82:135-154, 2003.
- KELLY, J. D.; VALLEJO, V.A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, 39:1196-1207, 2004.
- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, 17:143-182, 1999.
- LACANALLO, G. F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene *Co-13* de resistência à antracnose do feijoeiro comum, In: CONAFE 9, CD-ROM (Documentos IAC, 85), Campinas, 2008.
- LANA, A. C.; FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. **Análise do impacto ambiental da cultivar de feijão BRS Pérola**. Comunicado Técnico da EMBRAPA Arroz e Feijão, 80:1-4, 2004.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário** (Belo Horizonte) 21:97-108, 2000.
- LEAKEY, C. L. A. Genotypic and phenotypic markers in common bean. In: Gepts, P. (Ed.). **Genetic resources in *Phaseolus* beans**, Boston: Kluwer Academic, p. 245-327, 1988.
- LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. Proposal for designation of a rust resistance gene in the large-seeded cultivar Kranskop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:255-256, 2004.
- 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.
- MARQUES JR., O. G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão**. Lavras, MG: UFLA, 1997. 80p. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 1997.
- MARQUES JR., O. G.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. Viabilidade do emprego de notas na avaliação de alguns caracteres do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, 44:411-420, 1997.
- MASTENBROEK, C. A. Breeding programmer for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, 9:177-184, 1960.
- McROSTIE, G. P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.
- MELO, C. L. P. **Melhoramento de feijão do tipo carioca: avaliação de populações segregantes e uso de marcadores moleculares visando resistência a patógenos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 107 p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- MELO, C. L. P.; CARNEIRO, J. E. S.; CARNEIRO, P. C. S.; CRUZ, C. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Linhagens de feijão do cruzamento “Ouro Negro” x “Pérola” com características agronômicas favoráveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(11):1593-1598, 2006.
- MELO, C. L. P.; RAGAGNIN, V. A.; ARRUDA, K. M. A.; BARROS, E. G.; CARNEIRO, P. C. S.; PAULA JR., T. J. de; MOREIRA, M. A.; CARNEIRO, J. E. S. Caracterização fenotípica e molecular de genitores de feijão tipo carioca quanto à resistência a patógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(4):495-504, 2008.

- MELOTTO, M.; KELLY, J. D. SCAR markers linked to major disease genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 1998.
- 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.
- MENDEZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C. A.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J. J.; GIRALDEZ, R. R. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, 141:237-245, 2005.
- MENDOZA, A.; HERNANDEZ, F.; HERNANDEZ, S.; RUÍZ, D.; MARTINEZ, O.; MORA, G.; ACOSTA, J.; SIMPSON, J. Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. **Plant Disease**, 85:252-255, 2001.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of diseases resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, 15:393-427, 1995.
- MIKLAS, P. N.; LARSEN, R. C.; RILEY, R.; KELLY, J. D. Potential marker selection for *bc-1²* resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. **Euphytica**, 116:211-219, 2000.
- MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, 147:105-131, 2006.
- MILACH, S. C. K.; CRUZ, R. P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, 27:685-689, 1997.
- MORA-NUÑES, O. A.; VIEIRA, C.; ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, 39:391-404, 1992.
- MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; CARNEIRO, J. E. S.; FALEIRO, F. G.; FARIA, L. C.; CARNEIRO, G. E. S.; DEL PELOSO, M. J.; PAULA JR., T. J. de; ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C.; RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C.; SARTORATO, A.; FARIA, J. C. de. **BRSMG Pioneiro: nova cultivar de feijoeiro comum de grãos tipo carioca com alelos de resistência à antracnose e ferrugem, indicada para o Sul do Brasil**. Comunicado Técnico, 113: 1-4, 2005. Santo Antônio de Goiás, GO.
- MSTAT-C. **A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments**. Michigan State University, 1991.
- MUTLU, N.; MIKLAS, P.; REISER, J.; COYNE, D. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, 124:282-287, 2005.
- NIETSCH, S.; CARVALHO, G. A.; BORÉM, A.; PAULA JR., T. J. de; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Variabilidade patogênica de *Phaeoiosariopsis griseola* em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 22:289-290, 1997.
- NIETSCH, 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(273):567-572, 2000a.
- NIETSCH, 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, 2000b.

- OLIVEIRA, E. J.; ALZATE-MARIN, A. L.; BORÉM, A.; AZEREDO, S. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Molecular marker-assisted selection for development of common bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding**, 124(6):572-575, 2005.
- PASTOR-CORRALES M. A.; TU, J. C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (eds) **Bean production problems in the tropics**, 2nd edn. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia, pp 77-104, 1989.
- 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**, pp. 212-239 (Doc de trabajo, 113). CIAT, Cali. 1992.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; OTOYA, M. M.; MAYA, M. M. Diversidad de la virulencia de *Colletotrichum lindemuthianum* em Mesoamérica y la region Andina. **Fitopatologia Colombiana**. 17:31-38, 1994a.
- 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, 1994b.
- 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.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Traditional and molecular confirmation of the coevolution of beans and pathogens in Latin America. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 39:46-47, 1996.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Sources, genes for resistance, and pedigrees of 52 rust and mosaic resistant dry bean germplasm lines released by the USDA Beltsville Bean Project in collaboration with the Michigan, Nebraska and North Dakota Agricultural Experiment Stations. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:235-241, 2003.
- PAULA JR. T. J. de; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J. de; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 359-414.
- 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).
- PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B. dos; ABREU, A. de F. B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. **Pesq. Agrop. Brás.**, 39(3):209-215, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba, 1990. 468 p.
- PIO-RIBEIRO, G.; CHAVES, G. M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, 19:95-118, 1975.
- 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.
- QUEIROZ, V. T.; SOUSA, C. S.; SOUZA, T. L. P. O.; SANGLARD, D. A.; RAGAGNIN, V. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271-272, 2004c.
- RAGAGNIN, V. A.; ALZATE-MARIN, A. L.; SOUZA, T. L. P. O.; ARRUDA, K. M. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28:591-596, 2003.
- 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.
- RAGAGNIN V. A.; SOUZA T. L. P. O.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; COSTA, M. R.; ALZATE-MARIN, A. L.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, 128(2):156-163, 2009.
- RAMALHO, M. A. P.; PIROLA, L. H.; ABREU, A. de F. B. Alternativas na seleção de plantas de feijoeiro com porte ereto e grão tipo carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33(12):1989-1994, 1998.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; CARNEIRO, J. E. S. Cultivares. **Informe Agropecuário**, EPAMIG, 25(223):21-32, 2004.
- RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2005. 322 p.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J. de; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 415-436.
- RAVA, C. J.; MOLINA, M. K.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, 18:388-391, 1993.
- RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia brasileira**, 19:167-172, 1994.
- RIOS, G. P., ANDRADE, E. M., COSTA, J. L. S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:128-133, 2001.
- ROCHA, G. S. da. **Desempenho produtivo e resistência a patógenos em populações de feijão do tipo carioca**. Viçosa, MG: UFV, 2008. 63 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PANEDA, A.; FERREIRA, J. J.; GIRALDEZ, R. Allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:145-146, 2004.
- RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A.; GIRADLES, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-

- specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. **Theoretical and Applied Genetics**, 2008.
- SANDLIN, C. M.; STEADMAN, J. R.; ARAYA, C. M. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. **Plant Disease**, 83:108-113, 1999.
- SANGLARD, D. A.; DAMASCENO, J. D.; BALBI, B. P.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Introgression of angular leaf spot resistance genes in common bean isolines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 50:101-102, 2007.
- SANGLARD, D. A.; RIBEIRO, C. A. G.; BALBI, B. P.; SANGLARD, N. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Avaliação de cultivares e linhagens elite de feijão comum frente a isolados de *Pseudocercospora griseola*. In: CONAFE 9, CD-ROM (Documentos IAC, 85), Campinas, 2008.
- SANSIGOLO, A. L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M. V.; SOUZA, L. L. New races of *colletotrichum lindemuthianum* in common bean (*phaseolus vulgaris* L.) In Paraná state, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:192-193, 2008.
- SANTOS, S. C.; RIOS, G. P. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* nos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 25:607-611, 2000.
- SANTOS, V. S.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S.; ABREU, A. F. B. Implications of early selection for grain type in common bean genetic breeding. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:13-14. 2001.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha-angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, 17:247-251, 1992.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafós, 1996. 786 p.
- SARTORATO, A.; NIETSCH, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:21-22, 1999.
- SARTORATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:235-236, 2004.
- SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. **Fitopatologia Brasileira**, 31:192-194, 2006.
- 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.
- SILVA, G. S. da. **Controle genético do escurecimento precoce de grãos de feijão tipo carioca**. Lavras, MG, UFLA, 2007. 52 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2007.

- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A. de; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, 155, 241-247, 2007.
- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A. de; SARTORATO, A.; FREIRE, C. N. de S. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, 156, 602-606, 2008.
- SILVA, M. B. **Progresso da ferrugem do feijoeiro em Viçosa, Minas Gerais**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 51 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botanic**, 45:379-396, 1991a.
- SINGH, S. P.; NODARI, R.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean I. Allozymes. **Crop Science**, 31:19-23, 1991b.
- SINGH, S. P.; PASTOR-CORRALES, M.; MOLINA, A.; OTOYA, M. Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**, pp. 198-211 (Doc. de trabajo 113). CIAT, Cali. 1992.
- SOMAVILLA, L.; PRESTES, A. M. Identificação de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, 24:416-421, 1999.
- SOUZA, T. L. P. O.; ALZATE-MARIN, A. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Use of Belmidak RR-3 as a source for rust resistance in central Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:140-141, 2002.
- SOUZA, T. L. P. O. **Classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo “carioca”**. Viçosa, MG, UFV, 2005. 96 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SOUZA, T. L. P. O.; ALZATE-MARIN, A. L.; DESSAUNE, S. N.; NUNES, E. S.; QUEIROZ, V. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Inheritance study and validation of SCAR molecular marker for rust resistance in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:11-15, 2007b.
- SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; SANGLARD, D. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Identification of races of selected isolates of *Uromyces appendiculatus* from Minas Gerais (Brazil) based on the new international classification system. **Fitopatologia Brasileira**, 32:104-109, 2007a.
- STAVELY, J. R., FREYTAG, G. F., STEADMAN, J. R., SCHWARTZ, H. F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:iv-vi, 1983.
- STAVELY, J. R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology**, 74:834, 1984. (Abstract).
- STAVELY, J. R. Genetics of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80:1056, 1990 (Abstract).
- STAVELY, J.R. Recombination of two major dominant rust resistance genes that are tightly linked in repulsion. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:17-18, 1998.

- 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.
- STEADMAN, J. R.; PASTOR-CORRALES, M. A.; BEAVER, J. S. An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common bacterial blight international workshops, march 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:120-125, 2002.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E. A. de; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.; ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. de. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, 30(3):371-375, 2004.
- THRALL, P. H.; BURDON, J. J. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. **Science**, 299:1735-1737, 2003.
- 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.
- VALLEJO, V., AWALE, H. E.; KELLY, J. D. Characterization of the anthracnose resistance in the Andean bean cultivar Jalo EEP558. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:179-180, 2003.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1988. 231 p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M. A. P., CARNEIRO, J. E. S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais, 2005. p. 301-391.
- VITAL, W. M. ***Phaeoisariopsis griseola*: Physiological characterization, resistance sources and reaction of dry bean**. Campinas, SP: IAC, 2006. 49 p. (Dissertação de Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, 2006.
- VOYSEST, O. **Variedades de frijol en América Latina y su origen**. CIAT, Cali, 1983, 87 p.
- VOYSEST, O. **Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Legado de variedades de América Latina 1930-1999**. CIAT, Cali, 2000, 195 p.
- WEBSTER, D. M. N.; AINSWORTH, P. M. Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap beans to *Uromyces appendiculatus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 113:938-940, 1988.
- 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.; KELLY, J. D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80: 650-654, 1996.
- YOUNG, R. A., KELLY, J. D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, 37:940-946, 1997.
- YOUNG, R.; MELOTTO, M.; NODARI, R. O.; KELLY, J. D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar "G2333". **Theoretical and Applied Genetics**, 96:87-94, 1998.