

CARLOS LÁSARO PEREIRA DE MELO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
LINHAGENS DE FEIJÃO DO CRUZAMENTO OURO
NEGRO x PÉROLA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

T

M528c
2004

Melo, Carlos Lásaro Pereira de, 1979-
Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de
feijão do cruzamento Ouro Negro x Pérola / Carlos Lásaro
Pereira de Melo. – Viçosa : UFV, 2004.
x, 70f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão - Resistên-
cia a *Colletotrichum lindemuthianum*. 3. Feijão - Resistên-
cia a *Uromyces appendiculatus*. 4. Feijão - Marcadores
genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 635.6523

CARLOS LÁSARO PEREIRA DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE LINHAGENS DE
FEIJÃO DO CRUZAMENTO OURO NEGRO x PÉROLA**

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

APROVADA: 20 de Agosto de 2004.

Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Moacil Alves de Souza

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Orientador)

Aos meus maravilhosos e incansáveis pais, Carlos Pereira e Sinfrônia,
pelo amor, compreensão e confiança.

Aos meus tios-irmãos, Lásaro, Fátima, Carlos Airton e Ederlúcio,
pelo apoio, incentivo e presença marcante em minha vida.

DEDICO

À minha afilhada Laura Caroline e seus pais,
pelo carinho e confiança.

À querida Dani e seu filho Vinícius,
pelo carinho, amor e amizade.

Aos meus amigos Ernandes e Hugo,
pela sincera amizade.

OFEREÇO

In memoriam aos meus avós,
Manoel Pereira de Moraes e
Orozina Tavares de Melo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelos meus pais, familiares e amigos.

Aos meus pais, pelo maior tesouro que eles puderam me oferecer - a educação, sempre me apoiando e presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus tios-irmãos pelos conselhos, incentivo e compreensão em todas as etapas desta jornada.

A minha querida afilhada, Laura Caroline, que apesar de ainda não saber foi um dos meus maiores incentivos, durante o desenvolvimento deste trabalho.

À querida Daniele, pelo carinho, incentivo, conselhos, amizade e companheirismo, por estar sempre presente, principalmente nas etapas finais deste trabalho.

Ao professor José Eustáquio de Souza Carneiro, pela orientação, por sua amizade e de sua família, por sua colaboração e confiança em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelas valiosas sugestões, principalmente na área de Genética Molecular, pelo apoio e amizade.

Ao professor Pedro Crescêncio Souza Carneiro, pelos valiosos conselhos, apoio, incentivo e amizade.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela amizade desde a graduação, pelas sugestões e apoio.

Ao prof. Maurílio Alves Moreira, pela oportunidade de estágio e bolsa concedida na área de Biologia Molecular de Plantas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Programa de Genética e Melhoramento, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos amigos de república, Hugo, Héder, Leo e Patrícia pelo convívio democrático e familiar e pela grande amizade.

Aos amigos Éder Jorge e Lucianne Vilarinho, pelos conselhos e pelos primeiros ensinamentos sobre técnicas em Biologia Molecular.

Aos amigos dos laboratórios do BIOAGRO e do Programa Feijão da UFV: Klever, Márcia Regina, Márcia Flores, Thiago, Rita, Vagner, Demerson, Newton, LÍlian, Francisco, Taís, Polliana, Angélica, Cassiana, Alex, José ângelo, Lelisângela, Aline e Glauco pelo apoio e agradável convivência.

Ao Dr. Vilmar A. Ragagnin, pela grande contribuição ao desenvolvimento deste trabalho, principalmente em Genética Molecular, por sua paciência, esforço e amizade.

A todos os funcionários da UFV, principalmente ao Sr. Gilberto, do Programa Feijão da UFV, pela constante ajuda nos trabalhos de campo e amizade. Ao Sr. José Pinto Rosa, pela valiosa ajuda na condução dos trabalhos em casa de vegetação. Também aos funcionários Gláucia, Fausto e Aloísio, pelo apoio durante a execução dos trabalhos de laboratório.

Às secretárias do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Maria da Conceição L. Vieira e Rita de Cássia Rosado Cruz, pelo apoio sempre que necessário.

A todos os amigos e colegas do Curso de Genética e Melhoramento que, direta ou indiretamente, contribuíram para a condução deste trabalho.

Enfim, a todo povo brasileiro que, por meio do pagamento de seus impostos, sempre custearam e ainda custeiam minha formação escolar e profissional.

BIOGRAFIA

CARLOS LÁSARO PEREIRA DE MELO, filho de Luzia Pereira de Melo, nasceu em 17 de outubro de 1979, em Brasília-DF.

Cursou o primário nas Escolas Estaduais Domingos Pinto Brochado e Padre Lambert, nas cidades de Unaí-MG, e Cabeceira de Goiás-GO, respectivamente.

Concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Virgílio de Melo Franco, em Unaí-MG. Em Dezembro de 1997, concluiu o 3º ano científico no Centro de Ensino Objetivo, em Taguatinga-DF.

Em março de 1998, iniciou o Curso Superior de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa-UFV, colando grau em março de 2003.

Em março de 2003, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, área de Genética Molecular e Melhoramento Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 20 de agosto de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Melhoramento genético do feijoeiro no Brasil.....	5
3.2. Principais doenças do feijoeiro-comum.....	6
3.3. Melhoramento visando resistência aos patógenos.....	9
3.4. Marcadores moleculares de DNA	11
3.4.1. Aspectos gerais	11
3.4.2. Marcadores RAPD	13
3.4.3. Marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1.....	25
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS DE FEIJÃO DO CRUZAMENTO OURO NEGRO X PÉROLA	
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Material genético.....	27
2.2. Locais de realização dos experimentos.....	27

2.3. Caracterização fenotípica das linhagens.....	28
2.3.1. Inoculação de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	29
2.3.2. Inoculação de <i>Uromyces appendiculatus</i>	30
2.4. Avaliação em campo das linhagens resistentes à antracnose.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1. Reação das linhagens aos patógenos da antracnose e ferrugem.....	34
3.2. Avaliação em campo das linhagens resistentes à antracnose.....	35
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 2.....	50
VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES VISANDO SELEÇÃO ASSISTIDA PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO	
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. Material genético.....	53
2.2. Caracterização fenotípica.....	53
2.3. Caracterização molecular.....	54
2.3.1. Extração de DNA.....	54
2.3.2. Análise de RAPD.....	54
2.3.3. Análise de SCAR.....	55
2.4. Eficiência da seleção por meio dos marcadores moleculares.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1. Caracterização fenotípica e molecular dos genitores e das linhagens.....	56
3.2. Eficiência de seleção utilizando marcadores moleculares identificados e mapeados na população Ouro Negro x Rudá.....	61
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONCLUSÕES GERAIS.....	70

RESUMO

MELO, Carlos Lásaro, P., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004.
Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de feijão do cruzamento Ouro Negro x Pérola. Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro.
Conselheiros: Cosme Damião Cruz, Everaldo Gonçalves de Barros e Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar, fenotipicamente, linhagens de feijão do cruzamento Ouro Negro x Pérola, quanto à reação a *Colletotrichum lindemuthianum* (raças 73, 81 e 89) e *Uromyces appendiculatus* (mistura das raças 15, 35, 45, 49, 50 e 59) e avaliar, em campo, o desempenho das linhagens que mostraram-se resistentes. Paralelamente, objetivou-se também avaliar a eficiência dos marcadores moleculares SCARF10₁₀₅₀ (relacionado à resistência à antracnose e à ferrugem) e OPX11₅₅₀ (relacionado à resistência à ferrugem), identificados e mapeados em outras populações, com vistas à seleção assistida na população Ouro Negro x Pérola. Inicialmente, 400 linhagens (progênies F_{7:8}) do cruzamento Ouro Negro x Pérola foram inoculadas com a raça 89 de *C. lindemuthianum*. Dentre as linhagens resistentes, 68 com grãos de boa aceitação comercial foram inoculadas com as raças 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e com a referida mistura de raças de *U. appendiculatus*. No experimento de campo, foram avaliadas 75 linhagens, que, sob inoculação artificial, mostraram-se resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*. As testemunhas, constituídas pelos genitores (Pérola e Ouro Negro), o cultivar Talismã e as linhagens Vi 4899, VC4, e Rudá-Piramidado foram, também, avaliadas em campo. utilizou-se um látice quadrado triplo, com parcelas constituídas de duas linhas com 2m de comprimento cada uma. Na

avaliação da eficiência dos marcadores moleculares, foram caracterizadas 150 linhagens do cruzamento Ouro Negro x Pérola, fenotipicamente, por meio de inoculação artificial de *C. lindemuthianum* (raça 89). Paralelamente, uma planta de cada linhagem foi genotipada, utilizando-se os marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀. A partir da inoculação artificial, foram identificadas 42 linhagens resistentes às raças de *C. lindemuthianum* e de *U. appendiculatus*, utilizadas no estudo. Considerando os resultados da caracterização fenotípica e da avaliação de campo, foram identificadas 10 linhagens que apresentaram grãos de bom aspecto comercial, iguais ou superiores àqueles do cultivar Pérola quanto à produtividade de grãos. Estas linhagens mostraram-se resistentes à antracnose e ferrugem, além de, moderadamente resistentes à mancha-angular. Das 150 linhagens avaliadas por meio de inoculação artificial, 61 mostraram-se resistentes às raças 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum*, sendo que, 42 destas foram resistentes a uma mistura de raças de *U. appendiculatus*. Vinte e cinco linhagens apresentaram as bandas correspondentes aos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀. A eficiência de seleção para resistência à antracnose, com base na genotipagem de 150 linhagens utilizando o marcador SCARF10₁₀₅₀ foi de 78%. Considerando que este marcador encontra-se a uma distância de 19,6 cM do gene de resistência, esperava-se uma eficiência de 72%, portanto, próxima àquela obtida no presente estudo. Para o marcador OPX11₅₅₀, verificou-se uma eficiência de 85%. Esta maior eficiência era esperada, em razão de este marcador localizar-se mais próximo (11,6 cM) dos genes ou do bloco gênico, os quais conferem resistência à antracnose e ferrugem, presentes no cultivar Ouro Negro. Além disso, foi observado que o marcador OPX11₅₅₀ também pode ser utilizado no monitoramento do gene de resistência à antracnose. Embora estivessem a uma distância relativamente grande dos genes de resistência, esses marcadores proporcionaram boa eficiência de seleção.

ABSTRACT

MELO, Carlos Lásaro, P. de, Universidade Federal de Viçosa, August de 2004.
Phenotypic and molecular characterization of common bean lineages from the crossing Ouro Negro x Pérola. Adviser: José Eustáquio de Souza Carneiro. Committee Members: Cosme Damião Cruz, Everaldo Gonçalves de Barros, and Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

The main objective of this study was to phenotypically characterize the common bean lines from the crossing Ouro Negro x Pérola for the reaction to *Colletotrichum lindemuthianum* (races 73, 81 and 89) and *Uromyces appendiculatus* (a mixture of races 15, 35, 45, 49, 50 and 59), as well as to evaluate the performance of the lines showing to be resistant ones. Another target was to evaluate the efficiency of the molecular markers SCARF10₁₀₅₀ (related to the resistance against anthracnose and rust) and OPX11₅₅₀ (associated to the resistance against rust), which were identified and mapped in other populations and targeted to the assisted selection in the population Ouro Negro x Pérola. Initially, all 400 lines (progenies F_{7:8}) from the Ouro Negro x Pérola crossing were inoculated with the race 89 of *C. lindemuthianum*. Sixty eight lines of the resistant ones, from which the common beans are commercially well accepted, were inoculated with the races 73 and 81 from *C. lindemuthianum* and with the mixture of races from *U. appendiculatus*. In the field experiment, the evaluations were performed for 75 lines, which under artificial inoculation showed to be resistant to the race 89 of *C. lindemuthianum*. The controls constituted by genitors (Pérola and Ouro Negro), the Talisman cv. and the lines Vi 4899, VC4, and Rudá-Piramidado were also inoculated. The triple square lattice design was used with the plots consisting into two rows with

2m each one. When evaluating the efficiency of the molecular markers, 150 lines from the crossing Ouro Negro x Pérola were phenotypically characterized, by artificial inoculation of *C. lindemuthianum* (race 89). At the same time, one plant of each line was genotyped, by using the markers SCARF10₁₀₅₀ and OPX11₅₅₀. From the artificial inoculation, 42 lines which were resistant to either races of *C. lindemuthianum* and *U. appendiculatus* were identified. Taking into account the results of both the phenotypic characterization and field evaluation, ten 10 lines were identified which were provided with commercially good beans, that were equal or superior to the Pérola cv. for bean productivity. These lines showed to be resistant to either anthracnose and rust, and moderately resistant to the angular leaf spot. From those 150 lines evaluated by artificial inoculation, 61 were resistant to the races 73, 81 and 89 of *C. lindemuthianum*, and 42 lines from these ones showed to be resistant to the mixture of the *U. appendiculatus* races. Twenty-five lines exhibited the bands corresponding to the markers SCARF10₁₀₅₀ and OPX11₅₅₀. The selection efficiency for the resistance to anthracnose, based upon genotyping of 150 lines, using the marker SCARF10₁₀₅₀ was 78%. By considering this marker is at 19.6 cM distance from the resistance gene, an efficiency of 72% was expected, therefore the obtained value was close to the expected one. An efficiency of 85% was found for the marker OPX11₅₅₀. This higher efficiency was expected because this marker is located near (11.6 cM) the genes or the gene block that confers resistance to both anthracnose and rust in Ouro Negro cv. Moreover, it was shown what this marker can be made useful, in the targeted of the resistance gene to anthracnose. These markers provided good selection efficiency, although they were at a relatively long distance from the resistance genes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura muito importante para a população brasileira, constituindo-se em uma fonte protéica básica, complementar e barata na dieta de milhares de pessoas. O Brasil destaca-se como o maior produtor e consumidor mundial de feijão, com consumo anual de aproximadamente 16 kg/hab/ano (Embrapa Arroz e Feijão, 2004). Na safra 2002/2003, a produção brasileira de feijão atingiu, aproximadamente, três milhões de toneladas em uma área plantada de 4,3 milhões de hectares (CONAB, 2004). Contudo, o Brasil apresenta uma produtividade média em torno de 776 kg/ha, considerada baixa, em comparação com o potencial produtivo da cultura (Embrapa Arroz e Feijão, 2004).

Dentre os vários fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro no Brasil, as enfermidades destacam-se como um dos principais. Segundo Vieira (1983), mais de 45 diferentes doenças, causadas por fungos, bactérias e vírus, podem ocorrer na cultura do feijão, embora cerca de oito realmente constituem problemas para a cultura no País. Dentre as doenças fúngicas que atacam a parte aérea da planta, merecem destaque: a antracnose, incitada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn.) Scrib.; a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus* e a mancha-angular causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.). Entre as medidas de controle dessas doenças, encontram-se a utilização de sementes saudáveis, o controle químico por meio de tratamento de sementes e pulverizações foliares, assim como cultivares resistentes e rotação de culturas.

O uso de cultivares resistentes é considerado um método eficiente, seguro, barato e acessível aos produtores. Entretanto, a grande variabilidade dos patógenos reduz a estabilidade ou a vida útil dos cultivares recomendados, porque a resistência genética comumente utilizada nos programas de melhoramento é de natureza vertical, controlada monogenicamente, facilitando, assim, o aparecimento de novas raças, que suplantam a resistência dos cultivares.

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de feijão refere-se à obtenção de linhagens com resistência aos principais patógenos. Atualmente, muitos cultivares de feijão, utilizados pelos produtores, apresentam suscetibilidade a um ou outro patógeno ou a raças específicas de um determinado patógeno. No entanto, continuam sendo extensamente plantados, enquanto outros cultivares, por não apresentarem boas qualidades comerciais, acabam por não atrair a atenção dos produtores. Como exemplo, cita-se o caso do cultivar Pérola, que, apesar de ser suscetível a praticamente todas as raças de *C. lindemuthianum*, é o mais cultivado no Estado de Minas Gerais e no Brasil.

A principal estratégia no melhoramento, visando resistência às doenças, é a hibridação seguida de seleção por meio de inoculação dos patógenos em condições controladas, ou a exposição das populações segregantes em ambientes favoráveis à ocorrência natural da doença, ou seja, sob alta pressão do patógeno. Como alternativa, nos últimos anos, tem sido apregoado o uso da seleção assistida por marcadores moleculares de DNA (SAM).

Vários trabalhos têm sido realizados no BIOAGRO/UFV (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) com o intuito de identificar marcadores moleculares de DNA ligados a alelos, que conferem resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular. Como exemplo, cita-se os marcadores OPF10₁₀₅₀, OPBA08₅₆₀ (marcadores SCAR – “*Sequence Characterized Amplified Region*”) e o OPX11₅₅₀ (RAPD – “*Random Amplified Polymorphic DNA*”), os quais marcam, respectivamente, genes intimamente ligados, que conferem resistência aos patógenos da antracnose e da ferrugem, presentes no cultivar Ouro Negro, indicando a existência de um bloco gênico (Corrêa, et al., 2000; Faleiro et al., 2000). Desde seu lançamento, em 1992, esse cultivar tem-se mostrado resistente à antracnose e ferrugem (Paula Jr. et al., 2004).

Uma das limitações do uso de marcadores moleculares, em programas de melhoramento, é a dificuldade em utilizar um marcador, previamente identificado em

uma determinada população, para selecionar em outras populações, em que apenas um dos genitores esteja presente. No caso do melhoramento visando resistência a patógenos, isso é muito freqüente, pois, determinada fonte de resistência participa de vários cruzamentos, tornando inviável procurar marcadores moleculares específicos para cada população.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral proposto no presente trabalho foi explorar a população Ouro Negro x Pérola, visando obter linhagens de feijão, tipo carioca, resistentes à antracnose e ferrugem e com alto potencial produtivo.

Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar, fenotípicamente e molecularmente, os genitores e as linhagens oriundas do cruzamento Pérola x Ouro Negro, quanto à reação a *C. lindemuthianum* (raças 73, 81, 89) e *U. appendiculatus* (mistura das raças 15, 35, 45, 49, 50 e 59);
- b) Avaliar o comportamento, em campo, das linhagens provenientes do cruzamento Ouro Negro x Pérola, previamente selecionadas para resistência à raça 89 de *C. lindemuthianum*;
- c) Avaliar a eficiência dos marcadores moleculares, SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, visando seleção assistida para resistência à antracnose na população Ouro Negro x Pérola.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Melhoramento genético do feijoeiro no Brasil

No Brasil, os programas de melhoramento do feijoeiro têm, como principais objetivos, a qualidade comercial e culinária dos grãos, a resistência aos patógenos, o porte ereto das plantas e o elevado potencial de produtividade (Vieira et al., 1999).

De modo geral esses objetivos são almejados utilizando-se a hibridação de dois ou mais genitores, visando reunir fenótipos de interesse em uma única linhagem. Considerando a hibridação como um método de melhoramento, um aspecto relevante a ser considerado, na condução deste método, é a escolha dos genitores. Para solucionar problemas específicos da cultura, os genitores são selecionados com base em características, como a resistência às doenças, boa arquitetura e tipo de grãos (Ramalho et al., 1988). Quando se trata de caracteres de alta herdabilidade como, por exemplo, resistência às doenças, a escolha dos genitores é facilitada. Para isto, basta utilizar um genitor fonte do alelo de interesse e uma linhagem, ou cultivar comercial, portadora de uma série de características agronômicas importantes.

Em programa de melhoramento, visando ao aumento da produtividade, é necessário considerar as grandes diferenças de capacidade produtiva entre os cultivares dos distintos conjuntos gênicos. Todavia, em muitos casos, os resultados desses programas, são fracassados, o que é atribuído, entre outras razões, à baixa herdabilidade da característica rendimento de grãos, às interações genótipo x ambiente e à baixa capacidade geral de combinação dos genitores (Singh, 1991). Em geral, no Brasil, os

melhoristas de feijão têm empregado, em suas hibridações, materiais do mesmo conjunto gênico, buscando não perder de vista a adaptação às nossas condições.

O programa de melhoramento do feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV) vem realizando, anualmente uma série de cruzamentos. Um desses cruzamentos foi realizado entre os cultivares Pérola e Ouro Negro, ambos recomendados para cultivo em Minas Gerais. O cultivar Ouro Negro, com grãos pretos, é originário de Honduras e, por meio do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), foi introduzido no Brasil pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), com o nome de Honduras 35. Este cultivar sobressaiu-se em ensaios, realizados em Minas Gerais e Rio de Janeiro, apresentando elevado potencial de produção. Destaca-se pela resistência a várias raças de patógenos causadores de ferrugem e antracnose. Entretanto, este cultivar é suscetível ao mosaico comum e crestamento bacteriano comum. Trabalhos realizados no BIOAGRO/UFV comprovam o potencial do Ouro Negro, como fonte de resistência aos principais patógenos do feijoeiro. Em estudo realizado por Faleiro (1997), este cultivar apresentou resistência a 14 raças de *U. appendiculatus* e a várias raças de *C. lindemuthianum*. Segundo Corrêa (1999) o cultivar Ouro Negro apresenta resistência a, pelo menos, uma raça de *P. griseola*, sendo excelente fonte doadora de genes de resistência aos referidos patógenos.

O cultivar Pérola (linhagem LR 720982CPL53), com grãos do tipo carioca, é proveniente de seleção no cultivar Aporé, realizada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP-Embrapa). Após avaliações em 57 diferentes ambientes, realizadas no Estado da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais, esta linhagem foi indicada para lançamento, devido ao elevado potencial de produção, com o nome de Pérola. Apresenta moderada resistência à mancha-angular e à murcha de fusarium, mas tem se mostrado suscetível à antracnose e ferrugem (Embrapa Arroz e Feijão, 2004). É fácil perceber que esses genitores apresentam características que se complementam e, portanto, passíveis de serem reunidas em um único cultivar.

3.2. Principais doenças do feijoeiro-comum

A produtividade do feijão, no Brasil, é extremamente afetada por diversos fatores, destacando-se a ocorrência de diversas doenças. Vieira (1983) cita mais de 45 doenças, que podem incitar a cultura do feijão, dentre as quais destacam-se oito como mais

relevantes. No Brasil, as doenças fúngicas de maior importância, considerando a parte aérea da planta, são a antracnose, ferrugem e mancha-angular.

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn.) Scrib., agente etiológico da antracnose, pode causar perdas substanciais à cultura do feijoeiro. Este patógeno apresenta distribuição geográfica cosmopolita, preferindo regiões com temperaturas moderadas e alta umidade relativa. (Pastor-Corrales, 1992; Schwartz et al., 1996; Tu, 1988, Sartorato, 2002).

As perdas causadas por *C. lindemuthianum* podem chegar a 100%, quando empregadas sementes contaminadas em regiões, onde prevalecem condições ideais para o desenvolvimento da doença (Peloso, 1992). A sobrevivência de *C. lindemuthianum* entre um plantio e outro acontece em sementes infectadas ou em restos de cultura contaminados.

O patógeno apresenta grande variabilidade no Brasil, onde 35 raças de *C. lindemuthianum* foram identificadas entre os anos de 1994 a 2000 (Rava et al., 1994; Andrade et al., 1999; Thomazella et al., 2000).

Kelly & Young (1996), citados por Costa (2004), propuseram uma nomenclatura para designar os genes de resistência à antracnose, com o símbolo *Co* (de *Colletotrichum*). O gene *Co-2* (gene *Are*, na antiga nomenclatura), por exemplo, proveniente do cultivar ‘Cornell 49-242’, tem sido usado para conseguir resistência a diversas raças. Entretanto, não fornece proteção contra todas as raças encontradas no Brasil (Menezes & Dianese, 1988), inclusive a raça 89, encontrada em várias regiões de Minas Gerais. Os alelos *Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴, *Co-1*⁵, *Co-3*², *Co-4*² e *Co-4*³ foram identificados nos cultivares Kaboon, Perry Marrow, AND 277, Widusa, Mexico 227, SEL 1308 e PI 207.262, respectivamente (Melloto & Kelly, 2000; Young & Kelly, 1996, Alzate-Marin et al., 2003; Gonçalves-Vidigal et al., 2003). Essas fontes de resistência têm sido utilizadas em diversos programas de melhoramento. O cultivar Ouro Negro possui genes de resistência à ferrugem e antracnose, os quais estão localizados em um mesmo grupo de ligação. Este cultivar contém o gene *Co-10*, conferindo resistência a 14 das 15 principais raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, encontradas no Brasil (Alzate-Marin et al., 2003).

Todavia, a variabilidade exibida pelo patógeno dificulta os trabalhos de melhoramento para obtenção de cultivares resistentes. Trabalhos indicam que esta

diversidade é resultado, em grande parte, de uma co-evolução patógeno-hospedeiro (Pastor-Corrales et al., 1994; Pastor-Corrales, 1996).

Em Minas Gerais, as raças 65, 73, 81 e 89 são observadas com maior frequência no campo, sendo que a raça 65 é considerada como mais virulenta (Rava et al., 1994). Os cultivares plantados no Estado, como Carioca, Pérola e Rudá são suscetíveis a estas raças (Lanza et al., 1996).

A ferrugem, causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*, é uma doença muito disseminada no Brasil, podendo aparecer em qualquer época de plantio. Na safra de inverno, a doença manifesta-se com maior intensidade, sendo esta a época mais propícia para avaliar a reação dos cultivares à ferrugem (Sartorato et al., 1996).

O fungo causador da ferrugem, apresenta grande número de raças, não sendo possível saber, com certeza, quantas ocorrem no território nacional e sua distribuição geográfica. Mora (1986) identificou 53 raças de *U. appendiculatus* a partir de 80 isolados monopustulares, coletados em oito estados brasileiros (SC, PR, SP, RJ, MG, ES, GO e PE), sendo que apenas quatro dessas raças foram encontradas em mais de um Estado. Faleiro et al. (1999) identificaram 13 raças a partir de 15 isolados, coletados em diferentes municípios de Minas Gerais e demonstraram a existência de raças diferentes, em uma mesma folha, confirmando a ampla variabilidade genética do patógeno. Dessa forma, um cultivar pode comportar-se como suscetível, ou resistente, dependendo das raças predominantes em certa região.

Vários trabalhos evidenciam que a resistência à ferrugem é controlada por um gene dominante único (ou bloco gênico) e que existem muitos genes com efeito menor também atuando na determinação da resistência. Estudos sobre herança de resistência do cultivar Ouro Negro têm mostrado que, além dos genes com efeito maior, há o envolvimento de genes com efeito menor no controle genético da resistência à ferrugem (Faleiro, 1997).

O cultivar Ouro Negro tem sido o mais utilizado em Minas Gerais, como fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro, apresentando resistência a 14 raças identificadas neste Estado (Faleiro, 1997). Este cultivar também apresenta resistência a 22 dentre as 24 raças de *U. appendiculatus* testadas em Beltsville (USDA) (J.R. Stavely, dados não publicados), a 19 raças de *C. lindemuthianum* (Alzate-Marin et al., 2003) e à raça 63.39 de *P. griseola* (Corrêa et al., 2001).

O gene de resistência (ou bloco gênico) à ferrugem do cultivar Ouro Negro, ainda, não foi totalmente caracterizado. No entanto, testes de alelismo demonstraram a independência entre o gene de Ouro Negro e os genes *Ur-5* e *Ur-11* dos cultivares México 309 e Belmidak RR-3, respectivamente (Alzate-Marin et al., 2004). Trabalhos conduzidos por Corrêa (1999) e Faleiro et al. (2000) comprovaram que a resistência à ferrugem e antracnose, presente em Ouro Negro, é conferida por genes ligados a 12,3 cM na população Ouro Negro x Rudá.

Mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, no passado era considerada uma doença de importância secundária, em razão de sua maior ocorrência no final do ciclo da cultura. Recentemente, vem sendo classificada como muito importante, pois, surge logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou safrinha, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (Sartorato, 2001), podendo causar redução de até 70% na produtividade. A partir de isolados, coletados no Estado de Minas Gerais, foram identificados 13 raças de *P. griseola* (Nietsche, 1997). Trabalho realizado por Melo et al. (2004), mostrou que a maioria das linhagens elites, desenvolvidas em programas de melhoramento do Brasil são suscetíveis às principais raças de *P. griseola* incidentes no País, indicando a ampla variabilidade patogênica do fungo.

3.3. Melhoramento visando resistência aos patógenos

A resistência a doenças constitui um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do feijoeiro, pois, é uma área em que os melhoristas têm obtido os melhores resultados. Entretanto, os patógenos podem apresentar ampla variabilidade (raças fisiológicas), o que constitui um obstáculo aos programas de melhoramento (Ragagnin, 2001). O surgimento de novas raças pode limitar a vida útil dos cultivares lançados, tornando necessária a incorporação de novos genes de resistência.

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível (susceptibilidade) e a incompatível (resistência). Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca doença na planta. Por outro lado, na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta.

A diferença básica entre as interações compatível e incompatível está relacionada à presença ou ausência de um gene de resistência (R) na planta e de um gene de

avirulência (*Avr*) no patógeno. Na interação incompatível, é fundamental uma interação gene a gene entre a planta e o patógeno (Flor, 1955), para ocorrer ativação rápida do mecanismo de defesa e resistência da planta. Este mecanismo é específico, ou seja, um mesmo cultivar pode reconhecer uma determinada raça A de um patógeno X e não reconhecer a raça B do mesmo patógeno X. Desse modo, os genes R, que conferem resistência raça-específica, atuam diferencialmente conforme o genótipo do patógeno e enquadram-se dentro da teoria gene-a-gene (Cordeiro & Sá, 1999).

Os patógenos podem ser classificados em dois tipos: virulento e avirulento. Os patógenos virulentos possuem a forma alélica recessiva do gene *Avr*, impedindo o reconhecimento por uma proteína de resistência da planta. Assim, o patógeno “escapa” da ativação rápida do mecanismo de defesa, podendo se multiplicar e produzir os sintomas da doença. Os patógenos avirulentos, entretanto, possuem o gene *Avr*, cujo produto é reconhecido por uma proteína de resistência da planta, permitindo a ativação rápida do processo de defesa e conferir fenótipo de resistência na planta.

Muitos trabalhos, visando o entendimento sobre a relação planta-patógeno, são relatados na literatura. Exemplos de estudos sobre co-evolução entre patógeno e hospedeiro têm sido mostrados em trabalhos com antracnose (Balardin et al., 1997), mancha-angular (Guzman et al., 1995) e ferrugem do feijoeiro (Maclean et al., 1995).

A incorporação de genes de resistência tem efeito estabilizador sobre os cultivares, evitando oscilação de rendimento entre as safras, provocada por maior ou menor ataque dos patógenos. Não atingidos por moléstias, os cultivares podem exibir todo seu potencial de produção (Vieira et al., 1999).

Atualmente, a principal estratégia para utilização da resistência vertical é a piramidação de genes, termo este empregado para caracterizar a introgressão de vários genes de resistência em um único cultivar. Esta estratégia pode ser estabelecida com a incorporação de genes de efeitos principais e secundários, conferindo resistência ao patógeno (Pedersen & Leath, 1988, citados por Borém, 2001). Entretanto, combinar três ou quatro genes, por exemplo, em um único cultivar e manter outras características superiores, como a produtividade, é um trabalho complexo e demorado. Neste contexto, a seleção assistida por marcadores moleculares apresenta grande potencial de uso.

O ideal seria reunir, em um cultivar, a resistência presente em determinado cultivar ou linhagem com outras características agronômicas favoráveis de outro cultivar. Neste aspecto, os métodos convencionais de melhoramento de plantas

autógamas, que usam a hibridação, são os mais recomendados na incorporação de resistência (Russel, 1979; citado por Ragagnin, 2001).

3.4. Marcadores moleculares de DNA

3.4.1. Aspectos gerais

São considerados atributos ideais de marcadores genéticos: alto grau de polimorfismo; herança mendeliana e ausência de epistasia; ausência de efeitos ambientais; ausência de efeitos do estágio de desenvolvimento da planta, ou seja, o marcador deve ser neutro; facilidade na expressão e simplicidade na identificação e análise; herança co-dominante; e possibilidade de detecção nas primeiras fases do desenvolvimento da planta (Junghans, 2003).

Morgan foi o primeiro a demonstrar, claramente, que nem todos os genes têm segregação independente, o que é fundamental para a utilização de marcadores no melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Assim, caso um determinado marcador de fácil identificação fenotípica esteja fisicamente ligado a um gene, que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta do gene de interesse. A eficiência deste método de seleção indireta, baseada na segregação conjunta do marcador e do gene, é função da distância entre o marcador e o gene, expressa em probabilidade de recombinação genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Dessa forma, quanto mais próximo o marcador estiver do gene de interesse, maior será sua eficiência em selecionar indivíduos desejáveis e, conseqüentemente, mais úteis serão os marcadores no processo de melhoramento.

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados na construção de mapas genéticos e na seleção de germoplasma, em programas de melhoramento, permitindo à caracterização de diferentes genótipos (fingerprint), o estabelecimento de filogenias, a determinação de similaridades entre indivíduos, usando análises de agrupamento, a escolha de genitores em programas de cruzamentos, a identificação de grupos heteróticos e estudos de caracteres quantitativos (Milack, 2001).

Outra importante aplicação dos marcadores moleculares é a possibilidade de seleção indireta para genes de resistência a doenças, sem a necessidade de inoculações múltiplas com diferentes patógenos. A identificação de marcadores moleculares fortemente ligados aos genes de resistência tem auxiliado o processo de piramidação

desses genes (Miklas et al., 1993; Kelly et al., 1994; Faleiro et al., 2003). Com o aprimoramento das técnicas de marcação de DNA, vislumbra-se, cada vez mais, a incorporação de tais ferramentas às diferentes etapas dos programas de melhoramento.

Ainda que a seleção indireta de caracteres qualitativos parece mais promissora, a eficiência comparativa da seleção direta versus seleção indireta para caracteres qualitativos é sempre questionada. O principal argumento é que características qualitativas não necessitam de marcadores para seleção indireta. Geralmente, a seleção direta para caracteres qualitativos é mais fácil, mais rápida e mais barata do que a seleção indireta por meio de marcadores moleculares. Embora este argumento seja válido para várias situações, o uso de marcadores moleculares pode trazer vantagens, tais como a seleção de características qualitativas de difícil avaliação fenotípica, a seleção de genes de resistência, reduzindo o número de inoculações das plantas com o patógeno, bem como a seleção simultânea de diferentes genes de interesse (Faleiro, 2003).

A seleção para a resistência a patógenos apresenta uma série de desafios diferentes daqueles envolvidos na seleção de outros caracteres agronômicos. Um deles é que, no melhoramento visando resistência a patógenos, o melhorista necessita manusear, pelo menos, dois sistemas biológicos e entender profundamente a respeito dos mesmos. Além disso, normalmente, são utilizados vários patógenos e diferentes raças, o que requer múltiplas inoculações (Borém, 2001).

Piramidação é a reunião de genes em uma mesma linhagem ou cultivar. Esta é uma técnica sugerida para proporcionar resistência mais duradoura a raças virulentas e avirulentas de um patógeno. Segundo Johnson (1992), resistência durável a doenças é aquela que permanece efetiva durante o prolongado uso de um cultivar, em ambiente favorável ao desenvolvimento da moléstia. Fehr (1987) enumera algumas limitações na incorporação de muitos genes, que confirmam resistência ao mesmo patógeno em um genótipo, por processos convencionais de melhoramento, sendo a principal delas a necessidade de se realizar inoculações múltiplas. Grande parte dessas limitações, no entanto, podem ser contornadas por meio de marcadores de DNA ligados a genes de resistência, os quais permitem a identificação das progênes com os genes de resistência desejados. Uma vez identificados, os genes que conferem resistência ao mesmo patógeno por meio desta técnica, podem ser, facilmente, acumulados em um genótipo via SAM (seleção assistida por marcadores moleculares) (Milack & Cruz, 1997).

Uma das grandes dificuldades na seleção assistida por marcadores moleculares refere-se à possibilidade de utilizar um mesmo marcador, previamente identificado para uma determinada população, para selecionar em outras populações em que apenas um dos genitores esteja presente. No caso da resistência a patógenos, isso é muito freqüente, pois, normalmente uma mesma fonte de resistência é utilizada em vários cruzamentos. A procura de marcadores moleculares específicos, para cada população, tornaria ineficiente o uso da SAM.

Normalmente, a identificação de marcadores moleculares e o desenvolvimento de cultivares melhorados têm envolvido diferentes populações e diferentes genitores, o que tem limitado bastante o impacto esperado da SAM (Tanksley & Nelson, 1996).

3.4.2. Marcadores RAPD

Na técnica do RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), descrita por Welsh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990), independentemente, ao invés de utilizar um par de *primers*, como no PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a reação de amplificação é dirigida por apenas um primer, sendo que este possui uma seqüência de bases arbitrária. O polimorfismo é identificado como um fragmento de DNA amplificado, a partir de um indivíduo e não amplificado a partir do outro. Geralmente, o homozigoto dominante não é distinguido do heterozigoto, portanto, o RAPD apresenta herança dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica do RAPD viabilizou o estudo genético por meio de marcadores moleculares, devido ao seu baixo custo e simplicidade, possibilitando sua utilização em programas de melhoramento. O uso desses marcadores apresenta muitas vantagens sobre as outras técnicas, como: (1) um conjunto universal de primers pode ser utilizado e selecionado em curto prazo; (2) requer pequenas quantidades de DNA, permitindo o uso de métodos simples e rápidos de purificação de DNA, com baixos custos (Williams et al., 1990; Edwards et al., 1991; Kesseli et al., 1992; Afanador et al., 1993).

Contudo, algumas desvantagens limitam sua aplicação, como o baixo conteúdo de informação genética por loco, ou seja, somente um alelo é normalmente determinado; o desconhecimento prévio da base genética das bandas, isto é, uma banda RAPD observada no gel, somente pode ser considerada um marcador de comportamento mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para descendentes; e, por

ser um marcador dominante, geralmente não permite a distinção entre locos homozigotos e heterozigotos.

Marcadores RAPD em repulsão estarão presentes nos indivíduos recessivos ou heterozigotos, enquanto os marcadores em acoplamento estarão presentes nos indivíduos homozigotos dominantes ou heterozigotos (Haley et al., 1994; Young & Kelly, 1997).

Atualmente, é possível aumentar a utilidade e reprodutibilidade de um marcador RAPD de interesse, convertendo-o em um marcador mais específico e reprodutível, denominado SCAR “*Sequence Characterized Amplified Regions*” (Meloto et al., 1996). Marcadores SCAR têm sido utilizados para aumentar a especificidade de marcadores RAPD. As diferenças na sequência de DNA são observadas pela presença, ou ausência, de uma única banda (Paran & Michelmore, 1993). Na técnica de SCAR, o sequenciamento do marcador permite o desenho de primers mais longos do que aqueles usados no RAPD e, conseqüentemente, o uso de uma temperatura de anelamento mais elevada, o que torna a amplificação mais específica e menos sujeita a variações em função das condições de amplificação.

Os marcadores RAPD vêm sendo amplamente utilizados na identificação dos polimorfismos, ligados a genes de resistência a doenças em feijoeiro (Young & Kelly, 1997; Young et al., 1998). Conforme relatos de vários autores, dezenas de marcadores RAPD ligados a alelos de resistência a patógenos do feijoeiro, envolvendo principalmente antracnose, mancha-angular, ferrugem e mosaico comum, foram identificados (Kelly & Miklas, 1998; Alzate-Marin et al., 2001a; Alzate-Marin et al., 2001b).

A utilidade de marcadores moleculares RAPD em populações diferentes daquelas nas quais foram identificados dependerá, entre outros fatores, do grau de ligação entre o marcador e o gene de interesse e da similaridade genética entre os genitores utilizados nas diferentes populações.

3.4.3. Marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro

Vários marcadores RAPD ligados a genes, que conferem resistência à antracnose (*Co-1*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-4*², *Co-5*, *Co-6* e *Co-10*), foram identificados, e marcadores SCAR para cinco desses genes (*Co-2* ou *Are*, *Co-4*, *Co-4*², *Co-5* e *Co-10*) foram desenvolvidos (Adam-Blondon et al., 1994; Young & Kelly, 1996; Young et al., 1998;

Vallejo & Kelly, 2001; Awale & Kelly, 2001; Alzate-Marin et al., 2001b). Marcadores ligados a genes de resistência à ferrugem foram identificados por vários grupos de pesquisadores. Kelly e Miklas (1998) catalogaram 23 marcadores RAPD ligados à resistência a esta enfermidade. Além do gene *Ur-4*, os quatro genes de resistência *Ur-3*, *Ur-3²*, *Ur-5* e *Ur-9* foram identificados com marcadores RAPD estreitamente ligados a estes genes (Haley et al., 1994; Jung et al., 1996). Os genes *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-6* e *Ur-11* têm sido utilizados para piramidação em germoplasma de feijão norte-americano (Stavelly, 2000). Alzate-Marin et al. (2004), em estudos de alelismo entre os cultivares México 309 (*Ur-5*), Belmidak RR-3 (*Ur-11*) e Ouro Negro, mostraram que o gene de resistência (ou bloco gênico) presente no Ouro Negro é distinto dos genes *Ur-5* e *Ur-11*.

Muitos exemplos de identificação de marcadores para resistência à antracnose, à ferrugem e à mancha-angular podem ser encontrados na literatura. Ragagnin et al. (1998) encontraram o marcador OPX11_{550C} ligado ao gene de resistência à ferrugem, a uma distância de 5,8 cM do gene na população resultante do cruzamento Ouro Negro x US Pinto 111. Menarim et al. (1998) identificaram um marcador RAPD ligado ao gene de resistência para antracnose do feijoeiro, em população F₂ do cruzamento envolvendo os cultivares AB 136 e Rudá. Eles relataram que o marcador OAZ-20₉₄₀ está ligado ao gene *Co-6* a uma distância de 7,4 cM. Arruda et al. (2000), trabalhando com populações F₂ do cruzamento TO x Rudá, verificaram que o marcador OY-20₈₃₀ encontrava-se, fortemente, ligado ao gene *Co-4* a 0,0 cM de distância do gene. Recentemente, o gene de resistência à antracnose do cultivar Ouro Negro foi identificado como um novo gene de resistência, denominado *Co-10*, após um amplo estudo de alelismo (Alzate-Marin et al., 2003).

O cultivar Ouro Negro tem apresentado resistência a diferentes raças de *U. appendiculatus* (Faleiro et al., 1999), *C. lindemuthianum* (Lanza et al., 1997) e *P. griseola* (Faleiro et al., 2001), avaliadas em casa de vegetação, bem como no campo (Vieira et al., 1992). Faleiro et al. (2003) demonstraram que a resistência a diferentes raças de *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*, presente em Ouro Negro, é conferida por um bloco gênico, com genes organizados em um mesmo grupo de ligação.

A organização de genes de resistência em blocos gênicos tem sido relatada para diversas espécies de plantas. Um exemplo típico é o loco *M* de resistência à ferrugem do linho (*Linum usitatissimum* L.) causada pelo fungo *Melampsora lini* (Ehrenb.) Desmag.

Neste loco, arranjos em tandem de genes R relacionados a diferentes especificidades são encontrados no genoma da planta (Ellis et al., 1988, citados por Faleiro et al., 2003).

Na literatura, são relatados vários trabalhos sobre herança monogênica de resistência à maioria das raças de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* e dos marcadores moleculares ligados a esses genes (Sartorato et al., 1999; Alzate-Marin et al., 2003; Corrêa et al., 2000).

Faleiro et al. (2003), utilizando uma população de RIL's (*Recombinant Inbred Lines*) do cruzamento Ouro Negro x Rudá, demonstraram, por meio de análises de ligação genética, que os genes de resistência às raças 32, 47, 49, 52 e 56 de ferrugem estão proximamente ligados, assim como os genes de resistência às raças 73, 81 e 89 de antracnose e às raças 31.55 e 63.31 de mancha-angular. Além disso, os autores verificaram que os genes de resistência à ferrugem encontram-se no mesmo grupo de ligação, que contém os genes de resistência à antracnose, confirmando os resultados de Corrêa (1999).

Os resultados de Faleiro et al. (2003), comparados com os obtidos por Corrêa (1999), mostram que os marcadores SCARF10₁₀₅₀, SCARBA08₅₆₀, OPX11₅₅₀ e OPM2₄₂₅ ficaram mais próximos dos genes de resistência na população Ouro Negro x US Pinto 111 do que na população Ouro Negro x Rudá, além da mudança de posição de alguns dos marcadores. Isto indica que, para alguns marcadores, a mudança do genitor suscetível pode comprometer sua aplicabilidade em outra população.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *ARE*, a simple gene conferring resistance to *C. lindemuthianum*, the causal agent of antracnose in French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 865-870, 1994.

AFANADOR, L.K.; HALEY, S.D.; KELLY, J.D. Adoption of a “mini-prep” DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 36, p. 10-11, 1993.

ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, M.C.C.; CORREA, R.X.; NIETSCH, S.; CARVALHO, G.A.; FALEIRO, F.G.; SARTORATO, A.; FERREIRA, C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência identificados no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, Goiânia. **CD-Rom...**, Goiânia: SBMP, 2001a.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of previously identified RAPD molecular markers as a tool to verify presence of resistance genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 44, p. 123-124, 2001b.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v.133, p. 165-169, 2003.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p.60-64, 2004.

ANDRADE, E.M.; COSTA, J.G.C. & RAVA, C.A. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões brasileiras. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. 9, 1999, Salvador. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, p. 242-244, 1999.

ARRUDA, M.C.; ALZATE-MARIN, A.L.; CHAGAS, J.M.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v. 90, p. 758-761, 2000.

AWALE, H.E.; KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to *Co-4*² gene in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, New York, v.44 p. 119-120, 2001.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, v. 87, p. 1184-1191, 1997.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 500p. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**, <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em 25 de março 2004.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G. Interação planta-patógeno e o uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 2, p. 34-39, 1999.

CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Dissertação - Doutorado em Genética e Melhoramento) – 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**, v. 40, p. 804-807, 2000.

CORRÊA, R.X.; GOODGOD, 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**, v. 26, p. 27-32, 2001.

COSTA, M.R. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão Diamante Negro**. Viçosa, MG: UFV, 2004,

78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2004.

EDWARDS, K.C.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C.A. Simple and rapid method for preparation of plants genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349, 1991.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO-CNPAF. **Sistemas de produção do feijoeiro**. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br>. Acessado em 31 de maio de 2004.

FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1997, 65p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 1997.

FALEIRO, F.G. Seleção Assistida por Marcadores - Diferentes Aplicações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **CD-Rom...**, Porto Seguro: SBMP, 2003.

FALEIRO, F.G.; NIETSCH, S.; RAGAGNIN, V.A.; BORÉM, A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 86-89, 2001.

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**, v. 28, p. 59-66, 2003.

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**, v. 23, p. 399-402, 2000.

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**, v. 24, p. 166-169, 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa/CENARGEN, 3ª ed., 220p, 1998.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: McGraw-Hill, Inc., v. 1, 536p., 1987.

FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.

GONÇALVES-VIDIGAL, C.; VALLEJO, V.; KELLY, J.D. Characterization of the anthracnose resistance in the differential cultivar Widusa. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 46, p. 175-176, 2003.

GUZMAN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, R.S., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 600-607, 1995.

HALEY, S.D.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v. 34, p. 1061-1066, 1994.

JOHNSON, R. Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. **Euphytica**, v. 63, p. 3-22, 1992.

JUNG, G.; COYNE, D.P.; SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J.; ARNAUD-SANTANA, E.; BOKOSI, J.; ARIYARATHNE, H.; STEADMAN, J.R.; BEAVER, J.; KAEPLER, S. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common bean. **Journal American Society Horticulture Science**, 106: 601-604, 1996.

JUNGHANS, D.T. Seleção Assistida por Marcadores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **CD-Rom...**, Porto Seguro: SBMP, 2003.

KELLY, J.D.; HALEY, S.D.; AFANADOR, L.; MIKLAS, P.N. & STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 15-16, 1994.

KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 1-11, 1998.

KESSELI, R.V., PARAN, I., MICHELMORE, R.W. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING,

1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Joint Plant Breeding Symposia Series 1, p. 31-36, 1992.

LANZA, M.A.; PAULA JR., T.J.; MENARIM, H.; QUEIROZ, T.F.N.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Comportamento de variedades de feijão recomendadas para Minas Gerais quanto à resistência à antracnose. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, 1996, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA-CNPAF-APA, 1996. v. 1, p. 313-315. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 69).

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

MACLEAN, D.J.; BRAITHWAITE, K.S.; IRVINE, J.A.G.; MANNERS, J.M.; GROTH, J.V.; MEINERS, J.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, v. 85, p. 757-765, 1995.

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

MELOTO, M.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the gene in common bean. **Genome**, v. 39, n. 6, p. 1216-1219, 1996.

MELOTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, v. 116, p. 143-149, 2000.

MENARIM, H.; ALZATE-MARIN, A.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcador molecular RAPD ligado ao gene Co-6 de resistência para antracnose do feijoeiro. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 184, 1998.

MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 78, p. 650-655, 1988.

MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R. & KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 745-749, 1993.

MILACK, S.C.K.; CRUZ, R.P.; Piramidação de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v. 27, n°. 4, p. 685-689, 1997.

MILACK, S.C.K. Seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético vegetal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, Goiânia. **CD-Rom...**, Goiânia: SBMP, 2001.

MORA, N.O.A. **Variabilidade patogênica de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. no Brasil e o problema da identificação de raças fisiológicas.** Viçosa, MG: UFV, 1986, 68p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 1986.

NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris*.** Viçosa, MG: UFV, 1997, 65p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 1997.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 985-993, 1993.

PASTOR-CORRALES, M. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**, Cali: CIAT. p. 86-108, (Doc. de trabajo, 113), 1992.

PASTOR-CORRALES, M.A. Traditional and molecular confirmation of the co evolution of beans and pathogens in Latin America. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 46, 1996.

PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v. 78, p. 959-962, 1994.

PAULA JR., T.J.; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado de Doenças do Feijoeiro em Plantio Direto.** In: ZAMBOLIM, L.; SILVA, A. A.; AGNES, E.L. (Eds.). **Manejo Integrado: Integração Agricultura-Pecuária**, 2004, p. 11-44, Viçosa-MG, 2004.

PELOSO, M.J. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali: CIAT. p. 86-108, (Doc. de trabajo, 113), 1992.

RAGAGNIN, V.A. **Seleção, Caracterização e Comportamento de Isolinhas de Feijoeiro-Comum Resistentes à Ferrugem, Antracnose e Mancha-angular.** Viçosa, MG: UFV, 2001, 113p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

RAGAGNIN, V.A.; VINHADELLI, W.S.; FALEIRO, F.G.; CORRÊA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência do feijoeiro à ferrugem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 389, 1998.

RAMALHO, M. A., SANTOS, J.B.; PEREIRA FILHO, I.A. Choice of parents for dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, n. 2, p. 391-400, 1988.

RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 167-172, 1994.

SANTOS, M. L.; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos. In: VIEIRA, C.; PAULA JR. T. J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**: Viçosa, Editora UFV, p.10-53, 1998.

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. de (Coord.). **Cultura do feijoeiro-comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, p. 669-700, 1996.

SARTORATO, A.; NIETSCHE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 21-22, 1999.

SARTORATO, A. Resistência do feijoeiro comum à mancha-angular. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1, 2001, **Resumos**. Goiânia: GO, 2001. CD-Room, Resumo 25.

SARTORATO, A.; Determinação da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: VII CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO. **Resumos**. Viçosa: MG, p. 114-116, 2002.

SCHWARTZ, H.F., BRINK, M.A., NULAND, D.S., FRANC, G.D. (Ed.). **Dry Bean Production and Pest Management**. Fort Collins: Cooperative Extension Resources Center, 106p. 1996.

SINGH, S. Bean genetics. In: VAN SCHOONHEVEN, A.; VOYSEST, O. (eds.) **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB Internacional, p. 199 – 286. 1991.

STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 1-4, 2000.

TANKSLEY, S.D.; NELSON, J.C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTL's from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 191-203, 1996.

THOMAZELLA C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA, J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S. & RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 121-122, 2000.

TU, J.C. Control of bean anthracnose caused by the delta and lambda races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. **Plant Disease**, v. 72, p. 5-8, 1988.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D.; Development of a SCAR marker linked to Co-5 locus in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 44, p. 121-122, 2001.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, UFV. 231p. 1983.

VIEIRA, C.; ARAÚJO, G.A.A.; CRUZ, C.D. Comportamento de cultivares de feijão no plantio outono/inverno. In: **Projeto feijão-Relatório 88/92**, Viçosa. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG. p. 71-76, 1992.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do Feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: Editora UFV. p. 273-349, 1999.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

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

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

YOUNG, R.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance gene in common bean. **Crop Science**, v. 37, p. 940-946, 1997.

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

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS DE FEIJÃO DO CRUZAMENTO OURO NEGRO X PÉROLA

1. INTRODUÇÃO

O feijão é um alimento básico do brasileiro, especialmente nas classes média e baixa. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cuja área cultivada é de aproximadamente quatro milhões de hectares e a produção atinge cerca de três milhões de toneladas (FAO, 2004). Contudo, o rendimento médio do feijão, no Brasil, é baixo, cerca de 700 kg/ha (IBGE, 2004). A maior parte do feijão produzido, cerca de 90%, corresponde às safras das "águas" e da "seca", com baixo nível tecnológico, e é proveniente de lavouras de pequenos e médios agricultores. Além disso, o feijoeiro é atacado por um grande número de organismos fitopatogênicos, responsáveis por perdas significativas nas lavouras, chegando muitas vezes a inviabilizar a cultura em determinadas regiões e épocas de plantio.

A queda do rendimento de diversas culturas, devido à incidência de doenças, tem contribuído para o desequilíbrio da demanda e da oferta de alimentos em todo o mundo. Muitas vezes é difícil estimar as perdas decorrentes de doenças específicas porque as

culturas, geralmente, são atacadas por mais de um agente etiológico ao mesmo tempo (Borém, 2001).

Dentre as doenças da parte aérea do feijoeiro destacam-se a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* e a mancha-angular incitada por *Phaeoisariopsis griseola*. Estas doenças podem causar sérios danos nas lavouras, principalmente no caso de cultivares suscetíveis. Diversas medidas têm sido empregadas pelos agricultores no controle das doenças do feijoeiro. Entretanto, o uso de cultivares resistentes merece especial atenção, principalmente, por não onerar o custo de produção e reduzir os impactos negativos, causados ao homem e ao meio ambiente, pela utilização de agrotóxicos.

Entre os cultivares de feijão recomendados para cultivo no Brasil (MAPA, 2004), destacam-se os do tipo carioca (feijões com grãos de cor creme e rajas de cor marrom). Estima-se que, anualmente, mais de dois milhões de hectares sejam cultivados com feijões deste tipo (Embrapa Arroz e Feijão, 2004). Muitos desses cultivares possuem excelentes qualidades, mas deixam a desejar quanto à resistência aos patógenos, constituindo-se em alvo para os programas de melhoramento. É o caso do cultivar Pérola, que é um dos mais plantados no Estado de Minas Gerais e no Brasil. Este cultivar é referência quanto à produtividade e qualidade de grãos, porém é suscetível às principais raças de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus* predominantes nas regiões produtoras de Minas Gerais (Lanza et al., 1997; Faleiro et al., 1999a).

Trabalhos no sentido de incorporar resistência, à antracnose e ferrugem, principalmente, no cultivar Pérola, sem perder de vista suas excelentes qualidades agronômicas, têm sido realizados por vários melhoristas. Um destes é o trabalho conjunto UFV/UFLA, iniciado em 1999, que teve como objetivo incorporar genes de resistência a *C. lindemuthianum*, oriundos do cultivar Ouro Negro, no cultivar Pérola. Assim, o presente trabalho, que está inserido no Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV, teve por objetivo caracterizar, fenotipicamente, as linhagens provenientes do cruzamento entre o Ouro Negro e o Pérola, quanto à reação às principais raças de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus* incidentes no Estado de Minas Gerais. Paralelamente, procurou-se avaliar, em condições de campo, o comportamento das linhagens que se mostraram resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

O presente estudo teve início com o plantio, em campo, de 40 famílias elites $F_{3:7}$ provenientes da população Ouro Negro x Pérola, utilizada no trabalho realizado por Santos, em 2002. Essas famílias foram selecionadas, com base em experimentos conduzidos em Lavras e Viçosa, nos anos de 1999 e 2000, utilizando, como principal critério de seleção a produtividade de grãos (Figura 1). De cada família, foram tomadas 10 plantas com grãos do tipo carioca, originando progênies $F_{7:8}$. Parte das sementes de cada planta foi semeada em bandejas de plástico, para realizar as inoculações (antracnose e ferrugem), em condições controladas, sendo a outra parte multiplicada em campo, no inverno de 2003, visando obter sementes suficientes para avaliação das linhagens em experimentos com repetições.

2.2. Locais de realização dos experimentos

As etapas relacionadas à caracterização fenotípica das linhagens (inoculações com os patógenos) foram realizadas em casa de vegetação e em câmaras de nevoeiro, pertencentes ao BIOAGRO, no campus da UFV, Viçosa-MG.

As avaliações de campo foram realizadas na estação experimental do Departamento de Fitotecnia - UFV, em Viçosa, Minas Gerais, comunidade de São José

do Triunfo, localizada na Zona da Mata de Minas Gerais a 690m de altitude, 20°45'S de latitude e 42°51'W de longitude.

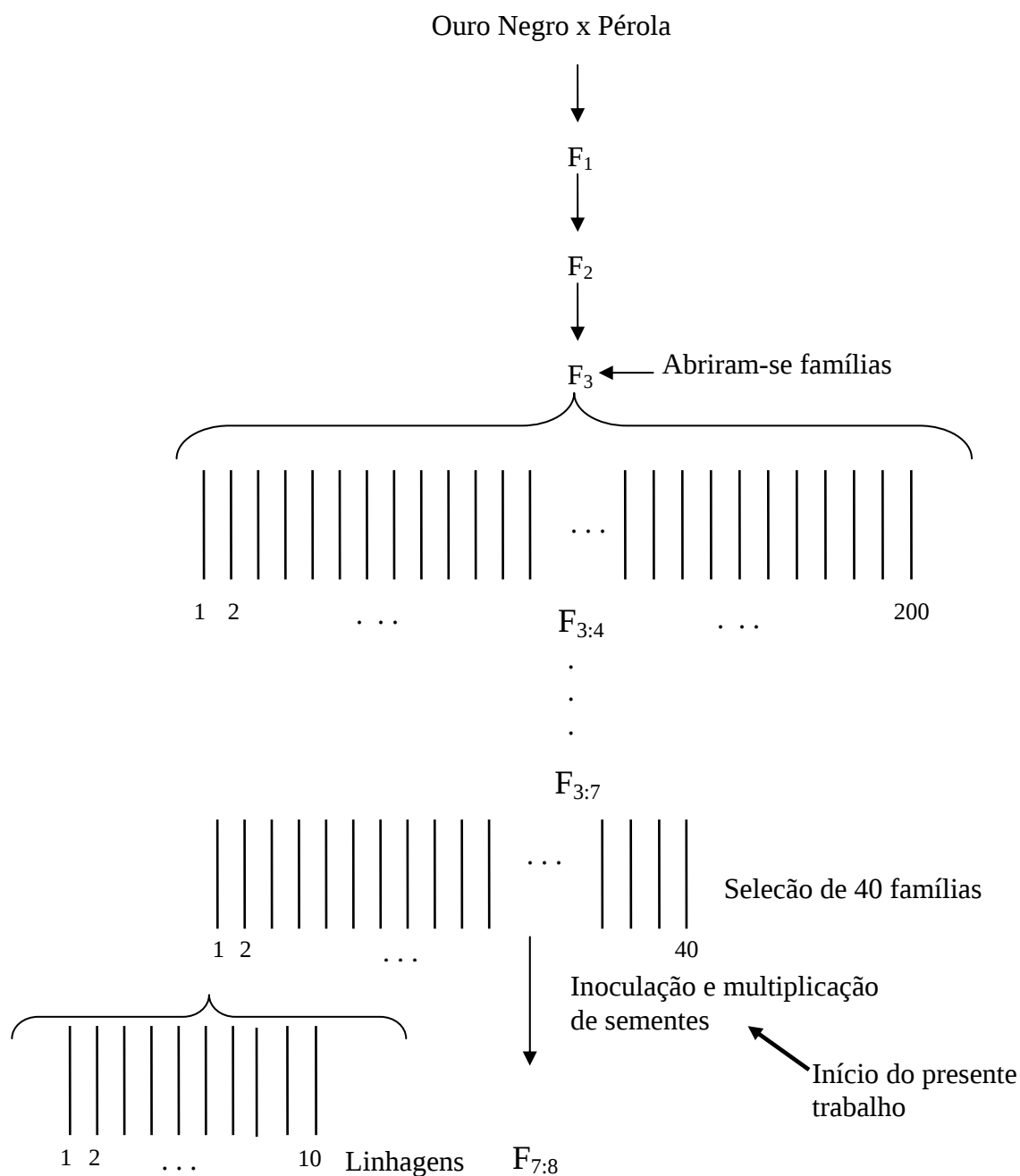


Figura 1. Esquema de condução da população Ouro Negro x Pérola (obtenção das linhagens).

2.3. Caracterização fenotípica das linhagens

As 400 progênes (F_{7:8}) foram avaliadas, inicialmente, quanto à resistência à antracnose (raça 89 de *C. lindemuthianum*), sendo que somente as resistentes foram

avaliadas quanto à resistência às raças 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e à ferrugem (mistura das raças 15, 35, 45, 49, 50 e 59).

Foram semeadas doze sementes de cada uma das 400 progênes e dos genitores a fim de avaliar a reação à raça 89 de *C. lindemuthianum*. A semeadura foi feita, diretamente, em bandejas plásticas contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada com 5 kg do formulado 4-14-8 por m³ de substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação. Posteriormente, para inoculação das demais raças de *C. lindemuthianum* e de *U. appendiculatus*, o preparo do solo, a adubação e a condução das plantas até o momento da inoculação foram semelhantes àqueles utilizados para a raça 89. Entretanto, apenas as linhagens resistentes à raça 89 foram utilizadas nas inoculações que se sucederam.

2.3.1. Inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum*

A caracterização fenotípica das progênes quanto à resistência à antracnose foi realizada, utilizando-se isolados das raças 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum*, pertencentes à micoteca do BIOAGRO/UFV. As culturas monospóricas originais das três raças utilizadas foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão. Essas raças foram escolhidas por serem as mais freqüentes em Minas Gerais, em condições de campo (Pio-Ribeiro & Chaves, 1975; Vieira, 1983).

Inicialmente, as 400 progênes F_{7:8} foram caracterizadas quanto à resistência à raça 89, enquanto aquelas que se mostraram resistentes foram avaliadas quanto à resistência às raças 73 e 81 (Tabela 1).

Tabela 1. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizadas na inoculação

Raça fisiológica (nomenclatura binária)	Grupo/patótipo (nomenclatura clássica)	Testemunha resistente	Testemunha suscetível
73	ALFA/Alfa BR (Wid.R ¹)	Ouro Negro	Pérola
81	ALFA/Eta	Ouro Negro	Pérola
89	ALFA/Alfa BR	Ouro Negro	Pérola

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

¹Widusa resistente

No preparo do inóculo e inoculação de *C. lindemuthianum*, adotou-se a metodologia adaptada de Pio-Ribeiro & Chaves (1975). O inóculo de cada raça foi produzido em tubos de ensaio, contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em

meio ágar-água. Os tubos contendo o inóculo foram incubados por 10 dias em temperatura entre 23 e 24°C, para produção dos conídios utilizados na inoculação. A inoculação foi feita entre 6 a 10 dias após a semeadura, utilizando-se uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ conídios/mL, a qual foi aspergida em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas, por um período de 6 a 7 dias, na câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 95%) sob fotoperíodo de 12 horas.

A seguir, foi feita a avaliação dos sintomas da antracnose, com base na escala de 1 a 9, descrita por Pastor-Corrales (1992), conforme o seguinte procedimento: a) ausência de sintomas; b) até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; c) maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; d) até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; e) maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; f) manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos e pecíolos; g) 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; h) manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas, além de lesões abundantes no caule, ramos e pecíolo; e i) maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 e com grau 4, ou maior, foram consideradas resistentes e suscetíveis, respectivamente.

2.3.2. Inoculação de *Uromyces appendiculatus*

Para avaliar a resistência a *U. appendiculatus*, no processo de caracterização fenotípica das linhagens, foi utilizada uma mistura das raças, 15, 35, 45, 49, 50 e 59 de *U. appendiculatus*, às quais Ouro Negro é resistente (Ragagnin et al., 2003). A avaliação foi realizada, somente, nas linhagens que se mostraram resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*. As raças, apresentadas na Tabela 2, foram utilizadas no presente estudo porque apresentam maior ocorrência no Estado de Minas Gerais (Faleiro et al., 1999b).

As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111, antes da inoculação. A inoculação foi realizada em plântulas cultivadas em bandejas de plástico, quando as folhas primárias apresentavam, aproximadamente, 2/3 do seu desenvolvimento completo.

Tabela 2. Raças de *Uromyces appendiculatus* utilizadas na inoculação

raças	Testemunha resistente	Testemunha suscetível
15 ¹	Ouro Negro	US Pinto 111
35	Ouro Negro	US Pinto 111
45	Ouro Negro	US Pinto 111
49	Ouro Negro	US Pinto 111
50	Ouro Negro	US Pinto 111
59	Ouro Negro	US Pinto 111

¹ - Designação das raças classificadas pelo sistema simplificado (Faleiro et al., 1999b)

Os uredósporos, na concentração de $2,0 \times 10^4$ esporos/mL, foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e pulverizados, em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, as plantas foram novamente transferidas para casa de vegetação ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), onde permaneceram até serem avaliadas, cerca de 15 dias após a inoculação.

Para avaliação dos sintomas, foram consideradas seis classes de reação, segundo a escala proposta no “The Bean Rust Workshop” (Stavelly et al., 1983): a) ausência de pústulas; b) manchas necróticas sem esporulação; c) pústulas esporulando com diâmetro $< 300 \mu\text{m}$; d) pústulas esporulando com diâmetro de 300 a $499 \mu\text{m}$; e) pústulas esporulando com diâmetro de 500 a $800 \mu\text{m}$ e f) pústulas esporulando com diâmetro $> 800 \mu\text{m}$. As plantas que apresentaram graus de severidade entre 1 e 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4, ou maior, suscetíveis. A nota foi determinada, mediante a observação visual das pústulas na face abaxial e adaxial das folhas primárias.

2.4. Avaliação em campo das linhagens resistentes à antracnose

As linhagens que se mostraram resistentes à antracnose, raça 89, na casa de vegetação, foram avaliadas em campo, na safra da “seca” de 2004, na estação experimental do Departamento de Fitotecnia - UFV, localizada em Viçosa, Minas Gerais. O preparo do solo, adubação e tratos culturais foram realizados, conforme recomendado para a cultura na região.

Um total de 81 tratamentos (75 linhagens e 6 testemunhas) foram avaliados, utilizando-se o delineamento experimental em látice quadrado triplo, sendo as parcelas constituídas de 2 linhas de 2m espaçadas de 0,5m. Como testemunhas, foram utilizados os dois genitores (Ouro Negro e Pérola) e os cultivares Talismã, VC4, Vi 4899 e Rudá-Piramidado (Rudá-P). No experimento, foram tomados dados de produtividade de grãos, severidade de mancha-angular e ferrugem e aspecto do grão.

A severidade de doenças (mancha-angular e ferrugem) foi avaliada de acordo com uma escala diagramática, com notas variando de 1 (plantas com ausência de sintoma da doença) a 9 (plantas totalmente infectadas pelo patógeno) (CIAT, 1987). Para avaliar o aspecto do grão (cor do grão), utilizou-se uma escala de notas de 1 a 5, sendo que a nota 1 foi atribuída a grãos do tipo “carioca” de boa aceitação comercial, ou seja, creme com estrias marrom-claras, fundo claro, sem halo, grãos de tamanho médio e não achatados. A nota 5 foi concedida aos materiais, que apresentaram grãos fora do padrão “carioca” (Marques Jr. et al., 1997).

Considerando o caráter produtividade de grãos, adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + r_j + b_{k(j)} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

em que

Y_{ijk} = observação referente ao i-ésimo tratamento na j-ésima repetição e k-ésimo bloco;

μ = média geral do experimento;

g_i = efeito do i-ésimo tratamento; ($i = 1, 2, \dots, g + t$), sendo g o número de linhagens (75) e t o número de testemunhas (6);

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

$b_{k(j)}$ = efeito do k-ésimo bloco dentro da j-ésima repetição ($k = 1, 2, \dots, 9$); e

ε_{ijk} = erro aleatório, $\varepsilon_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

As análises de variância para as outras características em questão (severidade de mancha-angular, ferrugem e aspecto do grão) foram realizadas, adotando o modelo estatístico de blocos ao acaso, porque esses caracteres não são influenciados pela heterogeneidade de solo dentro de cada bloco. Dessa forma, utilizou-se o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

em que

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

μ = média geral;

T_i = efeito do i-ésimo tratamento; ($i = 1, 2, \dots, g+t$), sendo g o número de linhagens (75) e t o número de testemunhas (6);

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

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

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa computacional GENES (Cruz, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Reação das linhagens aos patógenos da antracnose e ferrugem

Os resultados referentes à reação das progênes (F_{7:8}), advindas do cruzamento Ouro Negro x Pérola, às raças de *C. lindemuthianum* são apresentados na Tabela 4. Do total de 400 progênes inoculadas com a raça 89, 75 mostraram-se resistentes, sendo que 68 destas, com grãos de boa aceitação comercial, foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho de avaliação com inoculação das raças 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e da mistura de raças de *U. appendiculatus* (15, 35, 45, 49, 50 e 59). Estas 68 linhagens correspondem a 15 famílias F_{3:7} das 40, inicialmente, avaliadas.

Tabela 4. Reação das progênes do cruzamento Ouro Negro x Pérola à *C. lindemuthianum*

Patótipos	Nº de linhagens resistentes	Nº de linhagens suscetíveis	Nº de famílias resistentes homozigotas	Nº de famílias suscetíveis	Nº de famílias segregando
89	68	332	2	25	13
73	61 ¹	7			
81	66 ¹	2			

¹- inoculação somente das 68 linhagens resistentes à raça 89.

Na Tabela 4, observa-se que, para as 68 progênes resistentes à raça 89 e inoculadas com as raças 73 e 81, houve elevada coincidência dos dados de reação às três raças. Tal resultado era esperado, uma vez que os genes que conferem resistência a estas três raças de *C. lindemuthianum*, mapeadas na população Ouro Negro x Rudá,

pertencem a um mesmo grupo de ligação e, por estarem muito próximos entre si, considera-se como um bloco gênico (Faleiro et al., 2003).

Quando se considera o total de famílias avaliadas, a proporção de famílias resistentes para suscetíveis (2:25) (Tabela 4), não está de acordo com o esperado para gerações avançadas (1:1). Entretanto, vale salientar que durante o processo de obtenção e avaliação dessas famílias, houve seleção para produtividade e aspecto de grão, o que certamente contribuiu para esta discrepância.

Posteriormente, foi avaliada a reação, das 68 linhagens resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*, a uma mistura de raças de *U. appendiculatus*. A mistura de raças é recomendada, quando o principal objetivo é o melhoramento visando resistência a várias raças, como é o caso do presente estudo. Do total de 68 linhagens selecionadas para antracnose, 62% foram resistentes à ferrugem.

Segundo Faleiro et al. (2000), os genes de resistência à antracnose, *Co-10* (Alzate-Marín et al., 2003) e à ferrugem, *Ur-ON* (Alzate-Marín et al., 2004) presentes no cultivar Ouro Negro estão ligados, ou seja, localizados no mesmo grupo de ligação, a uma distância de aproximadamente 12,3 cM.

Considerando somente os resultados da caracterização fenotípica, obtidos em casa de vegetação, foram selecionadas 42 linhagens resistentes à antracnose e à ferrugem, que apresentaram bom aspecto de grão “carioca”.

3.2. Avaliação em campo das linhagens resistentes à antracnose

As 75 linhagens do cruzamento Pérola x Ouro Negro, que se mostraram resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*, juntamente com seis testemunhas, foram avaliadas quanto à produtividade de grãos, aspecto dos grãos, severidade de mancha-angular e ferrugem. Os resultados das análises de variância relativos à avaliação das linhagens são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

À exceção da severidade de ferrugem (CV de 24,6%), observou-se boa precisão experimental, com coeficientes de variação abaixo de 13%. Este valor está abaixo da média das estimativas dos coeficientes de variação, relatados em experimentos desta natureza com a cultura do feijão (Marques Jr. et al., 1999).

Outro aspecto importante em relação ao coeficiente de variação, como medida da precisão dos ensaios, é que ele pode ser influenciado pela média, ou seja, maiores

estimativas de CV's podem ser obtidos em experimentos com menores médias e não, necessariamente, com maior erro experimental (Garcia, 1989).

Tabela 5. Resumo dos resultados da análise de variância da produtividade de grãos (kg/ha) referentes à avaliação de linhagens do cruzamento Pérola x Ouro Negro. Viçosa, MG, safra da “seca” de 2004

Fonte de variação	GL	QM
Tratamentos	80	705442,07**
Linhagens (L)	74	698887,89**
Testemunhas (T)	5	327191,30 ^{ns}
L vs T	1	3081704,54**
Erro efetivo	136	142634,20
Média geral		3878,00
Média das testemunhas		3480,17
Média das linhagens		3909,50
CV (%)		9,74
Eficiência do látice		120,78

** Significativo pelo teste F, a 1% de probabilidade; ^{ns} - Não significativo.

Tabela 6. Resumo dos resultados das análises de variância das características aspecto do grão (AG), severidade de mancha-angular (MA) e ferrugem (FE) referentes à avaliação de linhagens do cruzamento Pérola x Ouro Negro. Viçosa, MG, safra da seca de 2004

Fonte de variação	GL	QM		
		AG	MA	FE
Tratamentos	80	0,89**	1,41**	2,41**
Linhagens (L)	74	0,62**	1,34**	2,31**
Testemunhas (T)	5	4,17**	2,59**	4,36**
L vs. T	1	3,90**	0,25 ^{ns}	0,03 ^{ns}
Erro	160	0,07	0,30	0,14
Média		2,22	4,28	1,54
Média das testemunhas		2,50	4,30	1,50
Média das linhagens		2,20	4,30	1,50
CV (%)		11,85	12,73	24,58

** - Significativo pelo teste F, a 1% de probabilidade; ^{ns} - Não significativo.

Neste experimento, a média de produtividade de grãos foi de 3878 kg/ha, superior à produtividade normalmente alcançada, mesmo em lavouras com alto nível tecnológico. Observa-se assim, o grande potencial dessas linhagens, o que era já esperado, pois, os cultivares Pérola e Ouro Negro, envolvidos no cruzamento, são os de maior potencial de produção nos seus respectivos grupos comerciais. Entretanto, vale ressaltar que as parcelas experimentais foram de apenas 2m², o que acaba superestimando o valor da produção por hectare.

No desdobramento da fonte de variação tratamentos (Tabelas 5 e 6), foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens ($P < 0,01$), para todas as características avaliadas, indicando comportamento diferenciado das mesmas quanto à esses caracteres. O mesmo foi observado com relação às testemunhas, exceto para produtividade de grãos. O contraste linhagens versus testemunhas foi significativo ($P < 0,01$) somente para produtividade e aspecto de grão.

As médias de produtividade de grãos, aspecto do grão e severidade de mancha-angular e ferrugem são apresentadas na Tabela 7. Observou-se ampla variabilidade das linhagens para os caracteres produtividade de grãos, aspecto dos grãos e reação à mancha-angular. O mesmo não foi observado com relação à ferrugem, em que a maioria das linhagens apresentaram notas de severidade menores que 2.

Quanto à produtividade de grãos, 72 linhagens foram estatisticamente iguais, duas superiores e três inferiores ao cultivar Pérola (3702 kg/ha). O cultivar Ouro Negro apresentou uma das menores produtividades (2891 kg/ha), igualando-se às 26 piores linhagens. Este fato não é comum nos ensaios em que o cultivar Ouro Negro participa. Contudo, nesta safra, este cultivar apresentou uma das maiores notas de severidade de mancha-angular, o que prejudicou sensivelmente sua produtividade.

A distribuição de frequência apresentada na Figura 2, também, ilustra a existência de variabilidade entre as linhagens avaliadas quanto à produtividade de grãos. Esta característica apresentou uma distribuição bem próxima à normal, evidenciando a natureza quantitativa deste caráter. A amplitude de variação foi de 2580 kg/ha. Conforme pode-se observar, a maioria das linhagens em estudo foram superiores ao cultivar Ouro Negro, sendo que mais da metade tiveram produtividade de grãos superior à do Pérola (Figura 2).

Quanto ao aspecto dos grãos, os genitores Pérola e Ouro Negro, apresentaram notas 1,5 e 5, respectivamente. As notas, obtidas pelas linhagens, variaram de 1,3 a 3,7, sendo a menor nota atribuída às linhagens com melhor aspecto de grão, principalmente no que se refere à coloração clara do tegumento. O cultivar Talismã também considerado como padrão, quanto a esta característica, obteve nota 1,8.

Tabela 7. Médias de produtividade de grãos (kg/ha), aspecto de grão (AG), severidade de mancha-angular (MA) e ferrugem (FE) de linhagens de feijoeiro. Viçosa-MG, safra da “seca” de 2004

Linhagens	Produtividade	AG	MA	FE
OP-196	^{1/} 5149	^{1/} 2,3	^{1/} 3,7 b	^{1/} 1,0 ab
OP-145	4616	1,3 a	4,0 b	1,3 ab
OP-143	4583 a	1,8 a	4,7 ab	1,7 ab
OP-195	4542 a	2,2	4,0 b	1,3 ab
OP-58	4504 a	1,5 a	2,7	1,0 ab
OP-188	4503 a	2,2	3,7 b	1,0 ab
OP-159	4456 a	2,5	4,0 b	1,3 ab
OP-166	4449 a	2,2	4,0 b	1,0 ab
OP-56	4438 a	1,8 a	3,7 b	1,0 ab
OP-60	4437 a	1,8 a	4,0 b	3,0
OP-161	4430 a	2,3	4,7 ab	1,3 ab
OP-54	4414 a	2,2	4,3 b	1,0 ab
OP-25	4376 a	2,3	4,0 b	1,0 ab
OP-260	4332 a	2,7	4,0 b	1,0 ab
OP-52	4290 a	2,1 a	5,7 a	1,0 ab
OP-241	4286 a	1,5 a	3,7 b	2,7
OP-184	4277 a	2,3	4,0 b	1,0 ab
OP-286	4243 a	1,7 a	3,7 b	1,0 ab
OP-197	4229 a	2,3	4,0 b	1,0 ab
OP-192	4178 a	2,0 a	4,0 b	1,0 ab
OP-29	4176 a	2,3	3,3	1,0 ab
OP-59	4176 a	1,8 a	3,3	1,0 ab
OP-311	4174 a	1,5 a	5,0 ab	1,0 ab
OP-156	4166 a	2,4	4,0 b	2,7
OP-57	4161 a	1,7 a	4,3 b	1,3 ab
OP-313	4158 a	1,5 a	4,0 b	1,0 ab
OP-194	4155 a	2,0 a	4,0 b	1,0 ab
OP-209	4125 a	2,2	5,3 ab	1,3 ab
OP-170	4106 a	2,3	4,0 b	2,0
OP-322	4080 a	1,9 a	4,3 b	1,0 ab
OP-183	4069 a	1,7 a	4,3 b	1,0 ab
OP-186	4061 a	2,3	3,0 b	1,7 ab
OP-179	4058 a	2,0 a	4,0 b	1,0 ab
OP-242	4035 a	2,7	4,3 b	1,3 ab
OP-315	4005 a	1,3 a	4,3 b	1,0 ab
OP-165	3963 a	2,0 a	3,3 b	1,0 ab
OP-71	3949 a	2,0 a	5,7 a	4,3
OP-23	3935 a	2,1 a	4,0 b	1,0 ab
OP-314	3931 a	1,8 a	3,0 b	1,0 ab
OP-243	3927 a	1,8 a	4,3 b	3,3
OP-254	3896 a	1,8 a	4,0 b	1,0 ab
OP-201	3881 a	2,7	4,7 ab	2,0
OP-162	3870 a	2,3	3,7 b	1,0 ab
OP-37	3850 a	2,3	4,0 b	1,0 ab
OP-171	3846 a	1,9 a	3,7 b	1,3 ab

Continua...

Tabela 7 . Continuação

Linhagens	Produtividade	AG	MA	FE
OP-73	3835 a	2,2	5,7 a	3,3
OP-36	3833 a	2,4	4,0 b	1,0 ab
OP-131	3814 a	1,9 a	5,7 a	3,7
OP-185	3799 a	2,5	4,0 b	1,0 ab
OP-72	3790 ab	1,9 a	5,0 ab	3,3
OP-163	3768 ab	2,0	4,3 b	1,0 ab
OP-139	3745 ab	1,8 a	5,7 a	1,7 ab
OP-206	3732 ab	2,5	5,0 ab	1,0 ab
OP-202	3726 ab	2,7	4,3 b	1,7 ab
OP-203	3691 ab	2,4	4,7 ab	3,7
OP-78	3687 ab	2,1 a	6,0 ab	3,3
OP-255	3654 ab	2,0 a	5,0 ab	1,3 ab
OP-35	3635 ab	2,5	4,3 b	1,0 ab
OP-205	3630 ab	2,3	4,7 ab	3,3
OP-74	3598 ab	2,0 a	4,7 ab	4,0
OP-22	3580 ab	2,0 a	4,3 b	1,3 ab
OP-169	3543 ab	2,2	5,0 ab	1,3 ab
OP-207	3537 ab	2,4	4,3 b	1,7 ab
OP-38	3518 ab	3,5	4,0 b	1,0 ab
OP-28	3490 ab	2,8	3,7 b	1,0 ab
OP-164	3380 ab	2,7	4,3 b	1,3 ab
OP-31	3297 ab	3,2	3,7 b	1,0 ab
OP-312	3258 ab	1,7 a	3,7 b	1,0 ab
OP-21	3252 ab	3,7	4,3 b	1,0 ab
OP-30	3162 ab	2,8	4,3 b	1,0 ab
OP-168	3062 ab	2,3	4,7 ab	1,3 ab
OP-253	2836 ab	2,5	4,0 b	2,3
OP-210	2671 b	3,0	5,3 ab	1,0 ab
OP-204	2635 b	2,7	5,0 ab	1,7 ab
OP-167	2569 b	2,7	4,0 b	1,3 ab
Pérola*	3702 a	1,5 a	4,0 b	1,0 a
Ouro Negro*	2891 b	5,0 b	5,7 a	1,0 b

^{1/}Médias seguidas por letras idênticas na mesma coluna, não diferem entre si (Dunnett, P<0,05).

* Testemunhas (genitores).

Trinta e três linhagens apresentaram notas, para o aspecto de grãos menores que 2,2, equiparando-se estatisticamente ao cultivar Pérola (Tabela 7), sendo, portanto promissoras do ponto de vista de aspecto comercial dos grãos. Estes dados são também apresentados na Figura 3. Nota-se uma maior concentração de linhagens com notas inferiores, ou seja, com bom aspecto de grãos.

Diante deste resultado, pode-se inferir que a seleção para aspecto de grãos (coloração clara do tegumento), realizada durante o avanço das gerações, isto é, na etapa anterior a este trabalho, foi eficiente para aumentar a frequência de genótipos favoráveis com relação a esta característica.

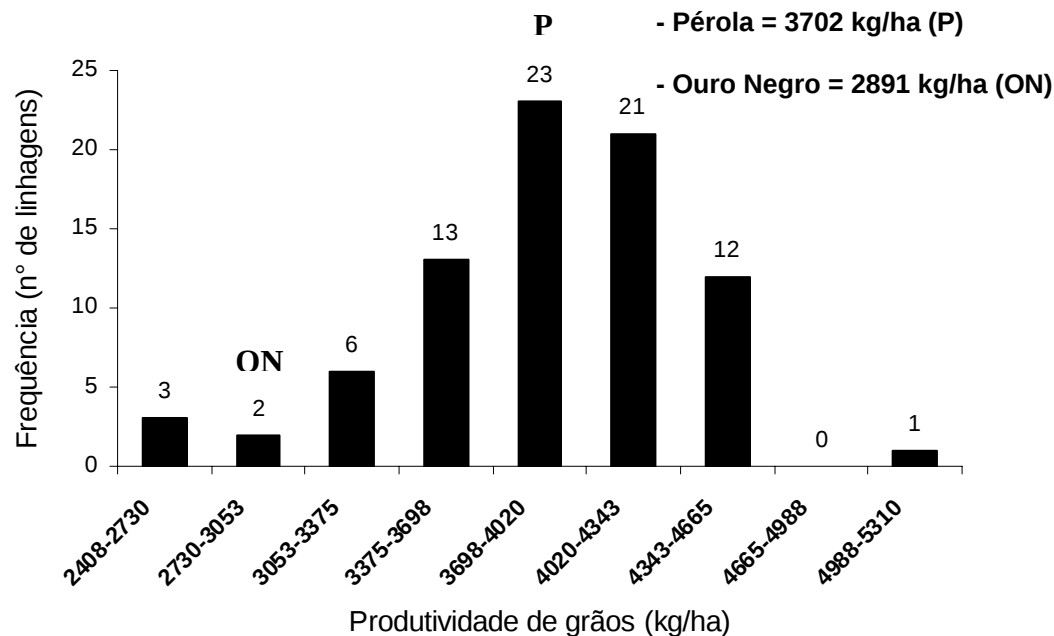


Figura 2. Distribuição de frequência da produtividade de grãos em kg/ha, obtida na avaliação de 75 linhagens de feijão “carioca” e 6 testemunhas, em Viçosa-MG, na safra da “seca” de 2004.

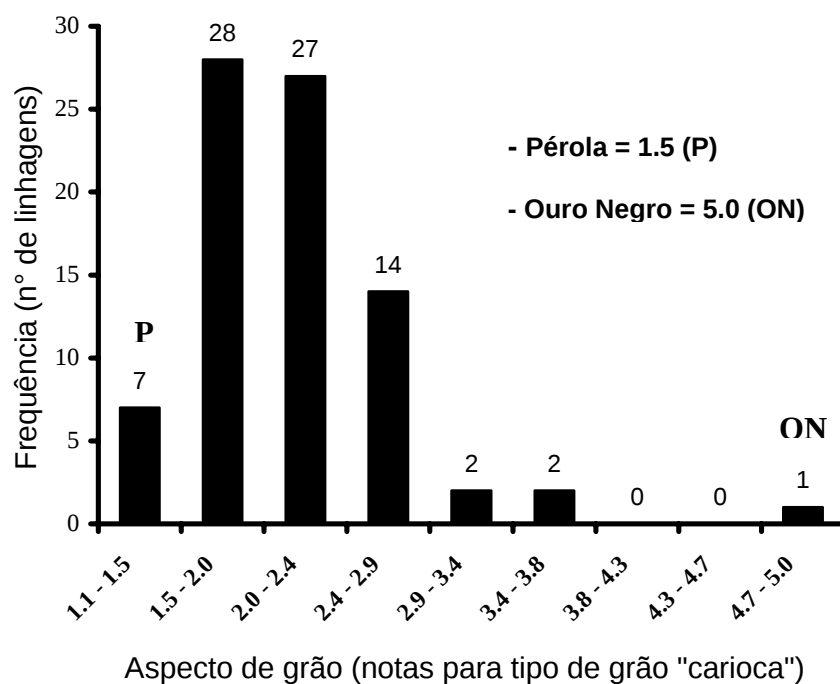


Figura 3. Distribuição de frequência do aspecto de grão, obtida na avaliação de 75 linhagens de feijão “carioca” e 6 testemunhas, em Viçosa-MG, na safra da “seca” de 2004.

Quanto às doenças, observou-se uma ocorrência generalizada de mancha-angular em toda a área experimental nessa época de plantio. Conforme já relatado por vários autores (Sartorato et al., 1996; Paula Jr. e Zambolim, 1998) o cultivo de feijão na safra da “seca” proporciona condições favoráveis à ocorrência dessa doença. A ferrugem, embora tenha incidido sobre alguns tratamentos, não causou maiores prejuízos na produtividade. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do experimento ter sido realizado na safra da “seca” sendo que esta doença se manifesta com maior intensidade na safra de “inverno” (Sartorato et al. 1996), por propiciar condições mais favoráveis para a multiplicação e reprodução do fungo.

As notas de severidade de mancha-angular variaram de 2,7 a 6,0 (Tabela 7). O cultivar Ouro Negro, com nota 5,7, foi um dos mais suscetíveis, enquanto os cultivares Pérola, Vi 4899 e Rudá-P comportaram-se como sendo moderadamente resistentes, com notas menor ou igual a 4. Sessenta e sete linhagens equipararam-se ao cultivar Pérola, quanto à resistência à mancha-angular, enquanto seis foram estatisticamente superiores, com notas variando de 2,7 a 3,3.

Em ensaios conduzidos em casa de vegetação, Faleiro et al. (2001) constataram que o cultivar Ouro Negro comportou-se como resistente à mancha-angular. Alguns trabalhos mostram que o Ouro Negro possui resistência a, pelo menos, duas raças de *P. griseola* (Corrêa, 1999). Entretanto, conforme relatado anteriormente, o Ouro Negro foi um dos mais suscetíveis à mancha-angular. Tal fato indica a presença de outras raças do patógeno no local de plantio, demonstrando ampla variabilidade patogênica do fungo *P. griseola* (Lacerda et al., 1994; Nietzsche, 1997).

A distribuição de frequência para a severidade à mancha-angular (Figura 4) evidencia a ocorrência de linhagens com graus de severidade abaixo daqueles dos genitores, mostrando o potencial dessas linhagens, também, no que se refere à resistência à mancha-angular.

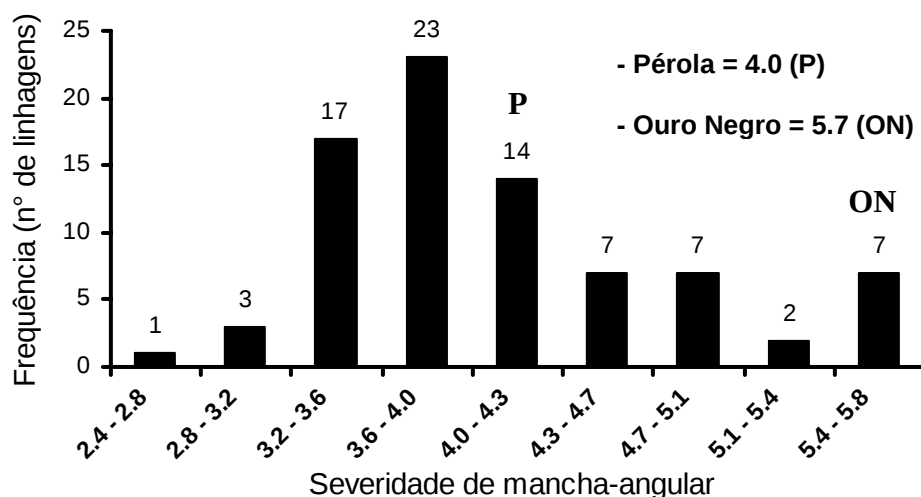


Figura 4. Distribuição de frequência para severidade de mancha-angular, obtida na avaliação de 75 linhagens de feijão “carioca” e 6 testemunhas, em Viçosa-MG, na safra da “seca” de 2004.

A ocorrência de ferrugem foi baixa, nessa época de plantio. Mesmo cultivares muito suscetíveis, como o Talismã, o qual apresentou nota 4 de severidade numa escala de 1 a 9. As notas de severidade de ferrugem variaram de 1,0 a 4,3 (Tabela 7). Sessenta linhagens equipararam-se, estatisticamente, ao cultivar Pérola. Quarenta linhagens foram imunes (nota 1) à ferrugem, juntamente com os cultivares Pérola e Ouro Negro. Quinze linhagens mostraram-se, estatisticamente, inferiores aos genitores Pérola e Ouro Negro quanto à severidade à ferrugem.

A distribuição de frequência para a severidade de ferrugem mostra um grande número de linhagens imunes a *U. appendiculatus*, sendo estas agrupadas na mesma classe dos genitores (Figura 5). Possivelmente, essas linhagens tenham herdado os genes de resistência do cultivar Ouro Negro, uma vez que o cultivar Pérola, apesar de ter obtido nota 1 nessa avaliação, tem-se mostrado suscetível a algumas raças de *U. appendiculatus*, sob inoculação artificial (Faleiro et al., 1999c).

Considerando os resultados obtidos, em casa de vegetação e em campo, foi possível selecionar 10 linhagens de grãos tipo “carioca”, com produtividade de grãos estatisticamente igual àquela do cultivar Pérola e resistentes à antracnose (raças 73, 81 e 89), ferrugem e mancha-angular (Tabela 8).

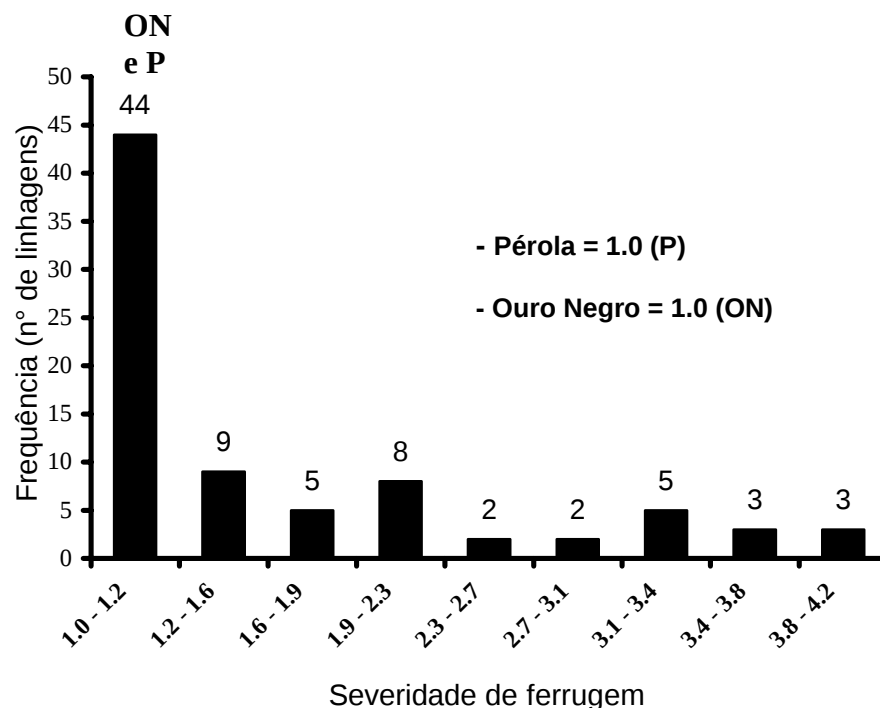


Figura 5. Distribuição de freqüência para severidade de ferrugem, obtida na avaliação de 75 linhagens de feijão “carioca” e 6 testemunhas, em Viçosa-MG, na safra da “seca” de 2004.

Tabela 8. Médias de produtividade de grãos (kg/ha), aspecto de grão (AG), severidade de mancha-angular (MA) e ferrugem (FE) das 10 melhores linhagens do cruzamento Ouro Negro x Pérola. Viçosa-MG, safra da “seca” de 2004

Linhagens	Produtividade	AG	MA	FE
OP-196	5149 a ^{1/}	2,3 ^{1/}	3,7 b ^{1/}	1,0 a b ^{1/}
OP-58	4504 a	1,5 a	2,7	1,0 a b
OP-188	4503 a	2,2	3,7 b	1,0 a b
OP-56	4438 a	1,8 a	3,7 b	1,0 a b
OP-241	4286 a	1,5 a	3,7 b	2,7
OP-286	4243 a	1,7 a	3,7 b	1,0 a b
OP-59	4176 a	2,3	3,3	1,0 a b
OP-29	4176 a	1,8 a	3,3	1,0 a b
OP-186	4061 a	2,3	3,0	1,7 a b
OP-165	3963 a	2,0 a	3,3	1,0 a b
Pérola*	3702 a	1,5 a	4,0 b	1,0 a
Ouro Negro*	2891 b	5,0 b	5,7 a	1,0 b

^{1/} Médias seguidas por letras idênticas na mesma coluna, não diferem entre si (Dunnett, P<0,05)

* Testemunhas (genitores).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar, fenotipicamente, linhagens de feijão do cruzamento Ouro Negro x Pérola quanto à reação às principais raças de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Uromyces appendiculatus*, que ocorrem no Estado de Minas Gerais e, paralelamente, avaliar o comportamento dessas linhagens em condições de campo. Para a caracterização fenotípica, foram realizadas inoculações artificiais, inicialmente para o patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, em 400 progênies F_{7:8}. Logo após, somente as linhagens selecionadas para o patótipo 89 foram inoculadas para as raças 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e a uma mistura de 6 patótipos de *U. appendiculatus*. A avaliação em nível de campo foi realizada na estação experimental do Departamento de Fitotecnia - UFV, em Viçosa-Minas Gerais, utilizando o delineamento experimental em látice quadrado triplo, com parcelas de duas linhas de 2m, espaçadas de 0,5m. Neste experimento foram avaliadas 75 linhagens que, sob inoculação artificial, mostraram-se resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*, além das testemunhas, constituídas pelos genitores (Pérola e Ouro Negro), o cultivar Talismã e as linhagens Vi 4899, VC4, e Rudá-P. Das 75 linhagens resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*, somente 68 com grãos de boa aceitação comercial foram caracterizadas, quanto à reação às demais raças de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*. A maioria dessas linhagens foram também resistentes às raças 73 e 81 de *C. lindemuthianum*, sendo que 42 apresentaram resistência à ferrugem. Assim, de acordo com a caracterização fenotípica, sob inoculação artificial, foram identificadas 42

linhagens resistentes aos patótipos de *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, utilizados no presente trabalho. Setenta e duas linhagens foram, estatisticamente, iguais ao cultivar Pérola, quanto à produtividade de grãos; trinta e três apresentaram notas de grãos menores que 2,2, sendo, portanto de boa aceitação comercial; sessenta e sete linhagens equipararam-se ao cultivar Pérola, quanto à resistência à mancha-angular, enquanto seis foram estatisticamente superiores; e quarenta foram imunes à ferrugem, assim como os cultivares Pérola e Ouro Negro. Foi possível, então, identificar 10 linhagens com bons níveis de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, com grãos de bom aspecto comercial e iguais ao Pérola quanto à produtividade de grãos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, p. 165-169, 2003.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present I common bean cultivar Ouro Negro and genes Ur-5 and Ur-11. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 60-64, 2004.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 500p. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

CIAT - CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol**. Cali: CIAT, 56p., 1987.

CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Dissertação - Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

CRUZ, C.D. **GENES** - versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.

EMBRAPA Arroz e Feijão. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijão. 2004>. Acessado em julho de 2004.

FALEIRO, F.G.; NIETSCH, S.; RAGAGNIN, V.A.; BORÉM, A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha

angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 86-89, 2001.

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**, v. 47, n. 272, p. 375-382, 2000.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 59-66, 2003.

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**, v. 24, p. 166-169, 1999a.

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

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

FAO. Agriculture data. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/faostat/2003>>. Acessado em julho de 2004.

GARCIA, C.H. **Tabelas para a classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: IPEF, 10p., 1989. (Circular Técnica, 171).

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/2004>>. Acessado em julho de 2004.

LACERDA, J.T.; COELHO, R.S.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* em feijoeiro no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 93-96, 1994.

LANZA, M.A.; PAULA JR., T.J.; VINHADELLI, W.S.; MORANDI, M.A.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-

comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 560-562, 1997.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br.2004>>. Acessado em julho de 2004.

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**, v. 44, n. 254, p. 411-420, 1997.

MARQUES Jr., O.G.; RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F. Emprego do látice no programa de melhoramento do feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 753-759, 1999.

NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997, 65p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 1997.

PASTOR-CORRALES, M.A. **Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina**. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Cali, Colômbia: CIAT. p. 240-250, 1992. (Doc. de trabajo nº 113).

PAULA JÚNIOR, T.J. e ZAMBOLIM, L. **Doenças**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. & BORÉM, A. (Eds.) Feijão: Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa. Editora UFV, p. 375-433, 1998.

PIO-RIBEIRO, G.; CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, v. 19, p. 95-118, 1975.

RAGAGNIN, V.A.; ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 591-596, 2003.

RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 167-172, 1994.

SANTOS, V. da S. **Implicações da seleção precoce para tipo de grão no melhoramento genético do feijoeiro comum**. Lavras, MG: UFLA, 2001, 57p.

(Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, 2001.

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. de (Coord.). **Cultura do feijoeiro-comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, p. 669-700, 1996.

STAVELY, J.R.; FREYTAG, G.F.; STEADMAN, J.R. & SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 26, p. iv-vi. 1983.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES VISANDO SELEÇÃO ASSISTIDA PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui uma fonte básica de proteína, sendo, portanto, considerado alimento de grande importância na dieta da maioria da população brasileira. Logo, é fundamental que as instituições públicas e privadas invistam em pesquisas, que proporcionem ganhos em produtividade na cultura do feijoeiro, possibilitando que os produtores desta leguminosa possam atender a demanda do mercado nacional.

Algumas doenças causam severos danos à cultura do feijoeiro, reduzindo a produtividade e onerando o custo de produção. Entre as doenças que atacam a parte aérea da planta do feijoeiro, destacam-se as doenças fúngicas causadas por *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose), *Uromyces appendiculatus* (ferrugem) e *Phaeoisariopsis griseola* (mancha-angular).

A utilização de marcadores moleculares, visando resistência aos patógenos, oferece vantagem adicional ao melhoramento convencional, pois, permite seleção para

resistência na ausência do patógeno. Além do mais, marcadores ligados aos vários genes de resistência poderiam facilitar o melhoramento, visando resistência às múltiplas doenças (piramidação), desde que a seleção baseada em marcadores possa ser, facilmente, incorporada no programa de melhoramento (Kelly et al., 1995).

Uma das principais etapas no uso de marcadores moleculares é o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um loco de interesse. Devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que circunvizinham o loco de interesse podem ser distintas, mesmo entre materiais genéticos aparentados. Portanto, um marcador polimórfico entre os genitores X e Y pode não ser, por exemplo, polimórfico entre X e Z. Assim, para cada cruzamento, normalmente recomenda-se a identificação de marcadores específicos. Entretanto, isso pode tornar a aplicabilidade dos marcadores moleculares limitada, inviabilizando o uso efetivo desta técnica em programas de melhoramento.

Em alguns casos, contudo, um mesmo marcador pode ser útil em populações derivadas de diferentes cruzamentos. Yu et al. (2000) avaliaram a possibilidade de utilizar, para seleção em outras populações, marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) ligados à resistência ao cretamento bacteriano comum em feijão, previamente mapeado na população PC50 x XAN159. Os autores verificaram que dois marcadores, previamente identificados nesta população, foram polimórficos em outras populações envolvendo HR67, parental fonte de resistência ao cretamento bacteriano comum derivado de XAN159. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Faleiro (2000), com relação a marcadores RAPD ligados à resistência do cultivar Ouro Negro a *U. appendiculatus*.

Trabalho realizado por Alzate-Marin (dados não publicados), semelhante aos anteriores, teve como objetivo validar marcadores moleculares ligados a alelos de resistência a patógenos do feijoeiro, identificados no Brasil e no exterior, em linhagens elites dos Ensaios Regionais coordenados pela Embrapa Arroz e Feijão, em cujas genealogias encontram-se fontes de resistência a patógenos, para as quais já foram identificados marcadores RAPD. O autor observou que, na maioria dos casos, os marcadores previamente identificados por meio de uma determinada fonte de resistência, foram também detectados em algumas linhagens, que apresentavam, em suas genealogias, aquela determinada fonte de resistência.

Faleiro et al. (2003), utilizando os marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, identificados por Corrêa (1999) na população Ouro Negro x US Pinto 111, verificaram

que estes localizavam-se a uma maior distância dos genes de resistência, na população Ouro Negro x Rudá. Esses marcadores vêm sendo amplamente utilizados no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. O marcador SCARF10₁₀₅₀ é utilizado para monitorar os genes de resistência à antracnose (*Co-10*) e à ferrugem (*Ur-ON*), enquanto o OPX11₅₅₀ vem sendo usado, somente, como marcador do gene de resistência à ferrugem (*Ur-ON*), ambos presentes no Ouro Negro. Pelo fato de os genes de resistência à antracnose e ferrugem, presentes no cultivar Ouro Negro, estarem em um mesmo grupo de ligação, é possível que o marcador OPX11₅₅₀, além de marcar genes de resistência à ferrugem, também possa marcar os genes de resistência à antracnose.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a eficiência de seleção para resistência à antracnose na população Ouro Negro x Pérola, por meio da validação de marcadores moleculares, previamente, identificados e mapeados na população Ouro Negro x Rudá (Faleiro et al., 2003).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O material genético utilizado neste estudo constituiu-se de 150 linhagens de feijão, obtidas de 15 famílias F_{3:7}, oriundas do cruzamento Ouro Negro x Pérola. A caracterização molecular foi realizada por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), ligados aos genes de resistência à antracnose e à ferrugem (Tabela 1), previamente identificados em outras populações (Corrêa, 1999; Faleiro et al., 2000), oriundas de cruzamentos diferentes do cruzamento em estudo.

Tabela 1. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose e ferrugem identificados e mapeados na população Ouro Negro x Rudá

Marcador	Distância (cM) e orientação	Gene de Resistência	Doença	Fonte de resistência	Referência
SCARF10 ₁₀₅₀	19,6-acoplamento#	Co-10, Ur-ON	Antracnose e Ferrugem	Ouro Negro	Corrêa (1999) e Faleiro et al. (2000)
OPX11 ₅₅₀	11,6-acoplamento#	Ur-ON	Ferrugem	Ouro Negro	Faleiro (2000)

distâncias genéticas provenientes da população de RIL's (Linhagens Endogâmicas Recombinantes).
Fonte: Faleiro et al. (2003)

2.2. Caracterização fenotípica

Conforme apresentado no Capítulo 1, as 150 linhagens foram caracterizadas quanto à resistência à raça 89 de *C. lindemuthianum*, por meio de inoculações artificiais

em condições controladas. Detalhes concernentes às inoculações e avaliações são apresentados no referido Capítulo.

2.3. Caracterização molecular

2.3.1. Extração de DNA

Folhas de uma planta de cada genitor e de cada linhagem foram coletadas e armazenadas a -80°C para extração do DNA. A extração foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

2.3.2. Análise de RAPD

Amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD. Os *primers* foram adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

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

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada, durante um período de três horas, aproximadamente, a 110 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

2.3.3. Análise de SCAR

Amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de SCAR em mistura de reação de 25 µL, contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto para o *primer*, que foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* específico (*Reverse* e *Foward*). O termociclador foi programado para: um passo inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos; temperatura de anelamento específica para o *primer* OPF10₁₀₅₀ (SCAR) de 65°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos; finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

Após a amplificação, a cada amostra, foi adicionado o mesmo corante, mencionado no item 2.3.2. As etapas de aplicação em gel de agarose, separação eletroforética e fotografia dos géis também foram semelhantes ao comentado no item 2.3.2.

2.4. Eficiência da seleção por meio dos marcadores moleculares

A eficiência de seleção por meio dos marcadores moleculares RAPD, previamente, identificados e mapeados na população Ouro Negro x Rudá, ou seja, a validação destes marcadores, na população Ouro Negro x Pérola, foi realizada comparando os dados da caracterização fenotípica (reação das linhagens à raça 89 de *C. lindemuthianum*) e da caracterização molecular (presença/ausência dos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização fenotípica e molecular dos genitores e das linhagens

Os resultados da caracterização fenotípica e molecular das linhagens do cruzamento Ouro Negro x Pérola são apresentados na Tabela 2. Das 150 linhagens utilizadas neste estudo, as quais correspondem a 15 famílias F_{3:7}, 68 foram resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*. Destas, 42 também apresentaram resistência à mistura de raças de *U. appendiculatus* (15, 35, 45, 49, 50 e 59).

Das 42 linhagens resistentes à antracnose e à ferrugem, 25 apresentaram marcas moleculares correspondentes aos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀ (Tabela 3).

As Figuras 1A e 1B, que são negativos das figuras dos géis, exemplificam algumas linhagens amplificadas com os *primers* SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀. Observa-se a ausência dos marcadores, em linhagens consideradas resistentes sob inoculação artificial. Ragagnin (2001) verificou que marcadores ligados a genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, a uma distância inferior a 7,1 cM, estavam presentes em suas isolinhas oriundas dos cruzamentos, envolvendo o genitor recorrente Rudá e os genitores doadores Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277, ao passo que, utilizando marcadores com distância superior a 7,1 cM, como os utilizados no presente trabalho (Tabela 1), algumas dessas isolinhas, resistentes com a inoculação artificial, perderam suas marcas, fato este explicado pela maior frequência de recombinação.

Tabela 2. Caracterização molecular e fenotípica de 150 linhagens do cruzamento Ouro Negro x Pérola

Famílias	Linhagens	Caracterização molecular		Caracterização fenotípica
		OPF10 ₁₀₅₀	OPX11 ₅₅₀	(raça 89 de <i>C. lindemuthianum</i>)
OP-21 a OP-30	OP-21	1 ^a	1 ^a	R ^b
	OP-22	1	1	R
	OP-23	1	1	R
	OP-24	0	0	S
	OP-25	1	1	R
	OP-26	0	0	S
	OP-27	0	0	S
	OP-28	1	1	R
	OP-29	1	1	R
	OP-30	1	1	R
OP-31 a OP-40	OP-31	1	1	R
	OP-32	0	0	S
	OP-33	0	0	S
	OP-34	1	0	S
	OP-35	1	1	R
	OP-36	1	1	R
	OP-37	1	1	R
	OP-38	1	1	R
	OP-39	1	0	S
	OP-40	1	0	S
OP-51 a OP-60	OP-51	0	0	S
	OP-52	0	1	R
	OP-53	0	0	S
	OP-54	0	1	R
	OP-55	0	0	S
	OP-56	0	1	R
	OP-57	0	1	R
	OP-58	0	1	R
	OP-59	0	1	R
	OP-60	0	1	R
OP-141 a OP-150	OP-141	0	1	S
	OP-142	0	0	S
	OP-143	0	1	R
	OP-144	0	1	S
	OP-145	0	1	R
	OP-146	1	1	S
	OP-147	0	1	S
	OP-148	1	1	S
	OP-149	0	0	S
	OP-150	0	0	S
OP-151 a OP-160	OP-151	0	0	S
	OP-152	0	0	S
	OP-153	0	0	S
	OP-154	0	0	S
	OP-155	0	0	S
	OP-156	1	1	R
	OP-157	0	0	S
	OP-158	0	0	S
	OP-159	1	1	R
	OP-160	0	0	S
OP-161 a OP-170	OP-161	1	1	R
	OP-162	1	1	R
	OP-163	1	1	R

Continua...

Tabela 2. Continuação

Famílias	Linhagens	Caracterização molecular		Caracterização fenotípica
		OPF10 ₁₀₅₀	OPX11 ₅₅₀	(raça 89 de <i>C. lindemuthianum</i>)
	OP-164	0	1	R
	OP-165	1	1	R
	OP-166	1	1	R
	OP-167	1	1	R
	OP-168	0	1	R
	OP-169	1	1	R
	OP-170	1	1	R
OP-171 a OP-180	OP-171	0	0	R
	OP-172	0	0	S
	OP-173	0	1	S
	OP-174	0	0	S
	OP-175	0	0	S
	OP-176	0	0	S
	OP-177	0	0	S
	OP-178	0	0	S
	OP-179	0	0	R
	OP-180	0	0	S
OP-181 a OP-190	OP-181	0	0	S
	OP-182	0	0	S
	OP-183	0	0	R
	OP-184	0	1	R
	OP-185	0	1	R
	OP-186	0	1	R
	OP-187	0	0	S
	OP-188	0	1	R
	OP-189	0	0	S
	OP-190	0	0	S
OP-191 a OP-200	OP-191	0	0	S
	OP-192	0	1	R
	OP-193	0	0	S
	OP-194	0	1	R
	OP-195	0	1	R
	OP-196	0	1	R
	OP-197	0	1	R
	OP-198	0	0	S
	OP-199	0	0	S
	OP-200	0	0	S
OP-201 a OP-210	OP-201	0	1	R
	OP-202	1	1	R
	OP-203	1	1	R
	OP-204	1	1	R
	OP-205	1	1	R
	OP-206	1	1	R
	OP-207	1	1	R
	OP-208	0	0	S
	OP-209	0	1	R
	OP-210	1	1	R
OP-241 a OP-250	OP-241	0	1	R
	OP-242	0	1	R
	OP-243	0	1	R
	OP-244	1	1	S
	OP-245	0	0	S
	OP-246	0	0	S
	OP-247	0	0	S
	OP-248	0	0	S
	OP-249	0	0	S

Continua...

Tabela 2. Continuação

Famílias	Linhagens	Caracterização molecular		Caracterização fenotípica
		OPF10 ₁₀₅₀	OPX11 ₅₅₀	(raça 89 de <i>C. lindemuthianum</i>)
OP-251 a OP-260	OP-250	0	0	S
	OP-251	0	0	S
	OP-252	0	0	S
	OP-253	1	1	R
	OP-254	0	0	R
	OP-255	0	1	R
	OP-256	0	1	S
	OP-257	0	1	S
	OP-258	0	0	S
	OP-259	0	0	S
	OP-260	0	1	R
OP-281 a OP-290	OP-281	0	0	S
	OP-282	0	1	S
	OP-283	0	0	S
	OP-284	0	0	S
	OP-285	0	0	S
	OP-286	0	1	R
	OP-287	0	0	S
	OP-288	0	1	S
	OP-289	0	0	S
	OP-290	0	0	S
OP-311 a OP-320	OP-311	1	1	R
	OP-312	1	1	R
	OP-313	1	1	R
	OP-314	1	1	R
	OP-315	1	0	R
	OP-316	1	0	S
	OP-317	1	0	S
	OP-318	0	0	S
	OP-319	1	0	S
	OP-320	1	0	S
OP-321 a OP-330	OP-321	0	0	S
	OP-322	1	1	R
	OP-323	0	0	S
	OP-324	0	0	S
	OP-325	0	0	S
	OP-326	0	0	S
	OP-327	0	0	S
	OP-328	0	0	S
	OP-329	0	0	S
	OP-330	1	0	S

^a - 1 = presença da banda; 0 = ausência da banda.

^b - R = resistente; S = suscetível.

Tabela 3. Caracterização molecular das 42 linhagens que se mostraram resistentes à antracnose e à ferrugem

Linhagens	Marcadores moleculares		Linhagens	Marcadores moleculares	
	SCARF10 ₁₀₅₀	OPX11 ₅₅₀		SCARF10 ₁₀₅₀	OPX11 ₅₅₀
Ouro Negro ^a	1	1	OP-165*	1	1
Pérola ^a	0	0	OP-166*	1	1
OP-21*	1	1	OP-167*	1	1
OP-22*	1	1	OP-171	0	1
OP-23*	1	1	OP-179	0	1
OP-25*	1	1	OP-183	0	1
OP-28*	1	1	OP-188	0	1
OP-29*	1	1	OP-192	0	1
OP-30*	1	1	OP-194	0	1
OP-31*	1	1	OP-195	0	1
OP-35*	1	1	OP-196	0	1
OP-36*	1	1	OP-197	0	1
OP-37*	1	1	OP-204*	1	1
OP-38*	1	1	OP-206*	1	1
OP-54	0	1	OP-210*	1	1
OP-56	0	1	OP-286	0	1
OP-57	0	1	OP-311*	1	1
OP-58	0	1	OP-312*	1	1
OP-59	0	1	OP-313*	1	1
OP-60	0	1	OP-314*	1	1
OP-162*	1	1	OP-315	1	0
OP-163*	1	1	OP-322*	1	1

^a Testemunhas (genitores).

* Linhagens selecionadas com base nos marcadores moleculares.

1 = Presença do marcador molecular.

0 = Ausência do marcador molecular.

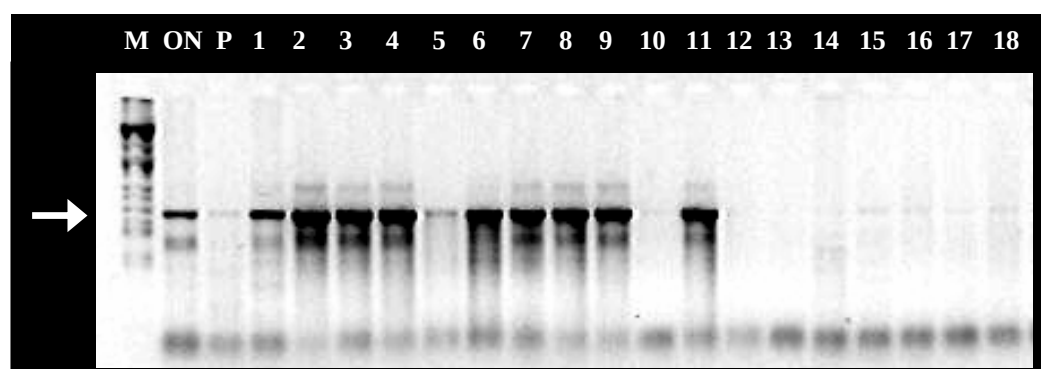


Figura 1A. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o OPF10₁₀₅₀. A primeira coluna corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *Eco*RI, *Bam*HI e *Hind*III (marcador de peso molecular). As colunas seguintes referem-se aos produtos de amplificação do DNA de : Ouro Negro (ON), Pérola (P) e das linhagens: OP-21 (1), OP-22 (2), OP-23 (3), OP-25 (4), OP-28 (5), OP-29 (6), OP-31 (7), OP-35 (8), OP-35 (9), OP-54 (10), OP-162 (11), OP-179 (12), OP-183 (13), OP-188 (14), OP-192 (15), OP-194 (16), OP-195 (17), OP-286 (18). A seta indica o produto de amplificação de 1050pb.

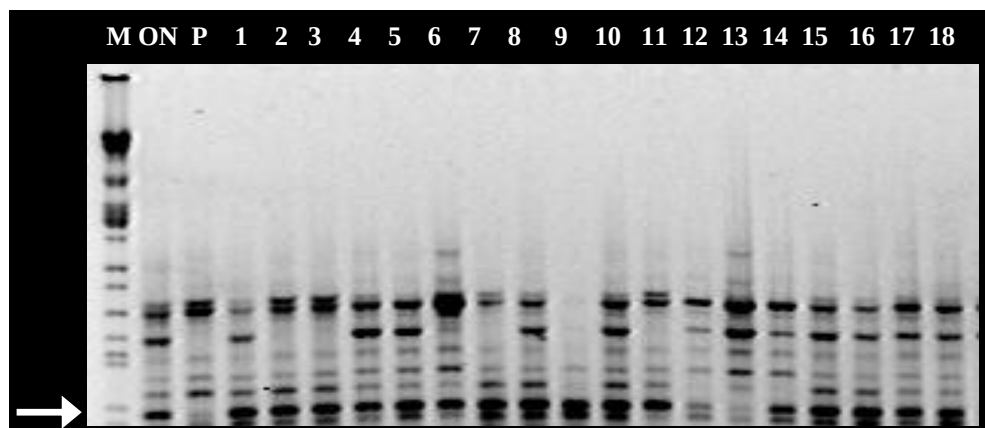


Figura 1B. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o SCAR F10₁₀₅₀. A primeira coluna corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *Eco*RI, *Bam*HI e *Hind*III (marcador de peso molecular). As colunas seguintes referem-se aos produtos de amplificação do DNA de : Ouro Negro (ON), Pérola (P) e das linhagens: OP-21 (1), OP-22 (2), OP-23 (3), OP-25 (4), OP-28 (5), OP-29 (6), OP-30 (7), OP-31 (8), OP-35 (9), OP-36 (10), OP-37 (11), OP-38 (12), OP-315 (13), OP-56 (14), OP-59 (15), OP-311 (16), OP-312(17), OP-313(18). A seta indica o produto de amplificação de 550pb.

Os resultados apresentados evidenciam o potencial de uso dos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀ em programas de melhoramento que, visam à obtenção de genótipos resistentes por meio da seleção assistida por marcadores.

3.2. Eficiência de seleção utilizando marcadores moleculares identificados e mapeados na população Ouro Negro x Rudá

Uma população proveniente de linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's) é caracterizada pela ausência de seleção de indivíduos, durante a condução da população até à homozigose completa, em que os genótipos homozigotos são normalmente fixados por autofecundação. Assim, considerando um caráter controlado por um gene dominante, como é o caso da resistência à antracnose, uma população de RIL's apresentará uma razão esperada de indivíduos resistentes para suscetíveis de 1:1.

Segundo Cruz (comunicação pessoal, 2004), uma fórmula para cálculo da eficiência de seleção baseada em marcadores moleculares dominantes, que se ajusta a uma população de RIL's (Tabela 4) é a seguinte:

$$ES = 1 - \frac{P(ss/M-)}{P(ss)} \quad (1)$$

Dessa fórmula geral, deduz-se que em RIL's:

$$P(ss) = 0,5 \quad \text{e} \quad P(ss/M-) = \frac{r/(1 + 2r)}{0,5}$$

De tal forma que:

$$ES = 1 - 4r/(1+2r) \text{ (fórmula deduzida na análise da Tabela 4)} \quad (2)$$

em que:

$P(ss/M-)$ = probabilidade do genótipo ser suscetível dado que ele tem a banda do marcador;

$P(ss)$ = probabilidade do genótipo ser suscetível;

r = frequência de recombinação entre o marcador e o gene de resistência.

Tabela 4. Frequências genotípicas esperadas em uma população de RIL's

Genótipos	Código	Frequência esperada
AABB	$R^a +$	$0,5/(1+2r)^c$
aabb	$s^b -$	$0,5/(1+2r)$
AAbb	$R -$	$r/(1+2r)$
aaBB	$s +$	$r/(1+2r)$

^a = indica resistência do genótipo.

^b = indica suscetibilidade do genótipo.

$+$ = presença da banda do marcador.

$-$ = ausência da banda do marcador.

^c = frequência de recombinação, expressa em distância, entre o marcador e o gene de resistência.

R = resistente.

s = suscetível.

Assim, a eficiência da seleção assistida será igual à unidade, quando a distância entre o marcador e o gene controlador da resistência for nula, mas será zero quando os locos forem independentes ($r = 0,5$).

Ao analisar a segregação nas 15 famílias utilizadas no estudo de eficiência dos marcadores, sendo que duas originaram somente linhagens resistentes e 13 originaram linhagens resistentes e também suscetíveis, verifica-se que, teoricamente, era esperada uma proporção de 0,57 linhagens resistentes para 0,43 linhagens suscetíveis, o que se aproxima da razão teórica esperada para uma população de RIL's. De acordo com os valores observados e com a caracterização fenotípica das linhagens para resistência à antracnose (Tabela 2), constata-se uma razão de 0,45 para 0,55 de linhagens resistentes e suscetíveis, respectivamente. Assim, para avaliar a eficiência dos marcadores na população Ouro Negro x Pérola, foi utilizada a fórmula (2) ajustada para uma população de RIL's.

Tratando-se de resistência aos patógenos, a ineficiência de uso de um marcador molecular ocorre quando o indivíduo selecionado é suscetível, apesar de apresentar a

marca molecular ligada ao gene de resistência. Assim, a eficiência de um marcador molecular pode ser expressa pela razão entre o número de indivíduos resistentes com a marca e o número total de indivíduos com a marca, independentemente de ser resistente ou suscetível.

Ao analisar as bandas referentes aos marcadores moleculares utilizados nas 150 linhagens (Tabela 2), observa-se que a eficiência de seleção para resistência à antracnose, baseada nos marcadores, aproximou-se do valor esperado (Tabela 5). A eficiência do marcador SCARF10₁₀₅₀ foi de 78%. Considerando que este marcador encontra-se a uma distância de 19,6 cM, esperava-se uma eficiência de 72%, portanto próximo ao resultado obtido. O marcador OPX11₅₅₀ apresentou maior eficiência, em comparação com o SCARF10₁₀₅₀, resultado já esperado devido ao fato de este marcador estar mais próximo do bloco gênico de resistência à antracnose e ferrugem, presente no Ouro Negro. Além disso, observa-se que o marcador OPX11₅₅₀ também pode ser utilizado para monitorar o gene de resistência à antracnose (*Co-10*).

A utilização simultânea dos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, para cálculo da eficiência de seleção, não foi considerada, pois, apesar de eles estarem localizados no mesmo grupo de ligação, estes não flanqueiam o gene de interesse (bloco gênico).

Tabela 5. Resultados da análise de eficiência dos marcadores moleculares OPF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, visando resistência à antracnose na população Ouro Negro x Pérola

Marcador	Distância (cM)	Número de bandas		Eficiência do marcador (%)	
		Genótipos com marca	Genótipos resistentes com a marca	Esperado	Observado
OPX11 ₅₅₀	11,6	74	63	81,1	85,1
SCARF10 ₁₀₅₀	19,6	46	36	71,8	78,2

As Figuras 2 e 3 exemplificam a amplificação de algumas das 150 linhagens para análise da eficiência dos marcadores. Estas figuras mostram o erro, que o marcador molecular proporciona, com a presença de bandas em linhagens suscetíveis, considerando as inoculações realizadas em casa de vegetação.

Faleiro et al. (2000), utilizando simultaneamente os marcadores OPX11₅₅₀ e SCARF10₁₀₅₀, na seleção de indivíduos resistentes à ferrugem, no cruzamento Ouro Negro x Pinto 111, encontraram eficiência de seleção de 100%. Entretanto, neste caso,

os marcadores estavam flanqueando os genes de resistência à antracnose e à ferrugem (bloco gênico) presentes no cultivar Ouro Negro.

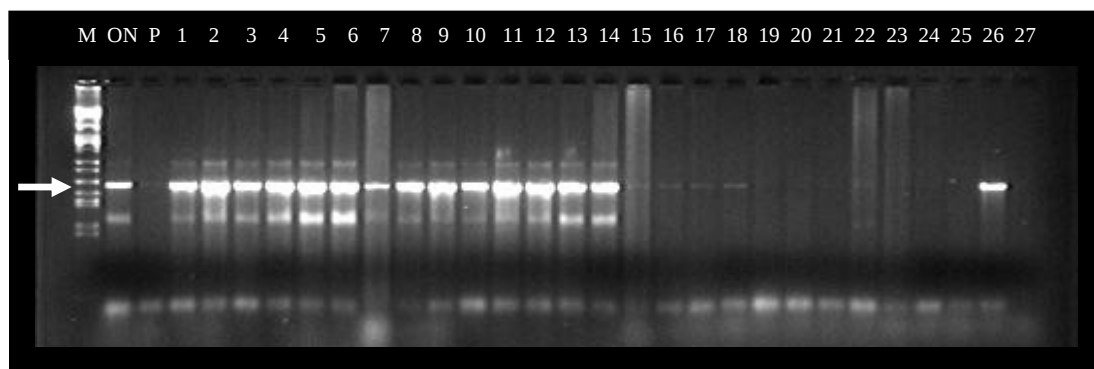


Figura 2. Produto de amplificação com o *primer* SCARF10. A primeira coluna contém DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de peso molecular). As colunas seguintes referem-se aos produtos de amplificação do DNA de: Ouro Negro (ON), Pérola (P), e de algumas linhagens: 1 a 14 correspondem às linhagens resistentes (R) à antracnose, sob inoculação, e de 15 a 27 às suscetíveis (S). A seta indica o marcador SCARF10₁₀₅₀.

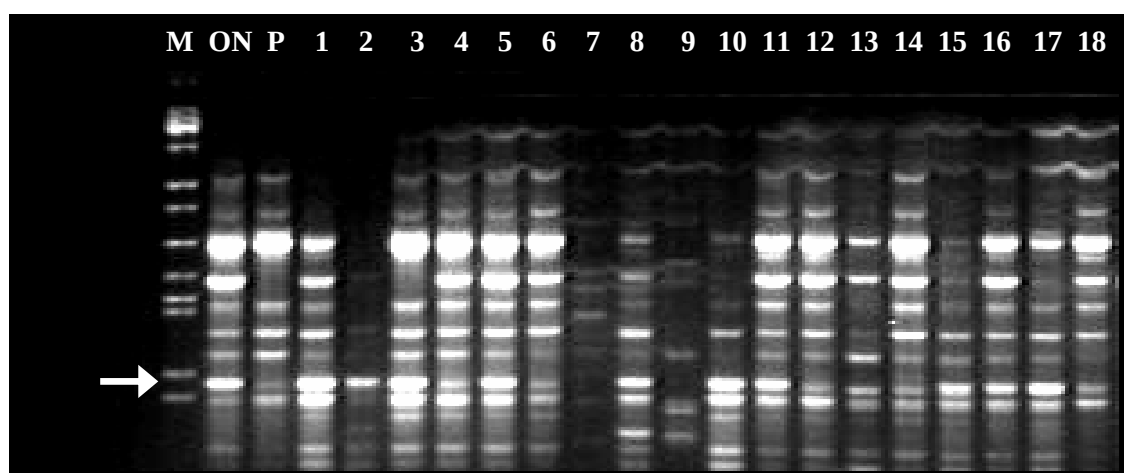


Figura 3. Produto de amplificação com o *primer* OPX11 (RAPD). A primeira coluna contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de peso molecular). As colunas seguintes referem-se aos produtos de amplificação do DNA de: Ouro Negro (ON), Pérola (P), e de algumas linhagens: 6, 7, 9, 12, 17 e 18 são linhagens suscetíveis (S), sob inoculação, e as restantes são resistentes (R). A seta indica o marcador OPX11₅₅₀ (RAPD).

Os resultados apresentados e discutidos evidenciam que a eficiência de um marcador molecular é, altamente, dependente da distância deste ao loco de interesse, ou seja, quanto mais próximo o marcador estiver do gene, maior será sua eficiência. Portanto, no processo de seleção assistida por marcadores moleculares, é fundamental a

identificação de marcadores mais próximos possível dos genes de interesse. Embora os marcadores moleculares, utilizados neste estudo, estivessem relativamente distantes dos genes de resistência, ainda assim estes proporcionaram uma boa eficiência de seleção.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos marcadores moleculares, SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, previamente identificados e mapeados em outras populações, visando seleção assistida para resistência à antracnose, na população Ouro Negro x Pérola. Inicialmente, 150 linhagens do cruzamento Ouro Negro x Pérola foram caracterizadas, fenotipicamente, por meio de inoculação artificial de *C. lindemuthianum* (raça 89) e *U. appendiculatus* (mistura das raças 15, 35, 45, 49, 50 e 59). Paralelamente, uma planta de cada linhagem foi genotipada, utilizando-se os marcadores SCARF10₁₀₅₀ (genes Co-10 e Ur-ON) e OPX11₅₅₀ (genes Ur-ON e Co-10?). Das 150 linhagens avaliadas por meio de inoculação artificial, 68 mostraram-se resistentes à raça 89 de *C. lindemuthianum*, sendo que, destas, 42 foram resistentes à mistura de raças de *U. appendiculatus*. Vinte e cinco linhagens apresentaram as bandas correspondentes aos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀, sendo, portanto, resistentes à antracnose e à ferrugem do ponto de vista molecular. Diante disso, há grande potencial de uso destes marcadores em programas de melhoramento, visando à obtenção de genótipos resistentes por meio da seleção indireta. Para cálculo da eficiência de seleção, utilizando os referidos marcadores moleculares na população Ouro Negro x Pérola, utilizou-se a fórmula (2) ajustada para população de RIL's ($ES = 1 - 4r/(1+2r)$), uma vez que com a inoculação observou-se a proporção de 0,45 linhagens resistentes para 0,55 linhagens suscetíveis, portanto semelhante à proporção esperada para RIL's, tratando-se de um caráter controlado por um gene dominante como no presente caso. A eficiência de

seleção com base no marcador SCARF10₁₀₅₀ foi de 78%. Considerando que este marcador encontra-se a uma distância de 19,6 cM, esperava-se uma eficiência de 72%, portanto próximo ao resultado obtido. Para o marcador OPX11₅₅₀, verificou-se uma maior eficiência (85%), o que era esperado pelo fato de este marcador localizar-se mais próximo (11,6 cM) do gene ou do bloco gênico, que confere resistência à antracnose e à ferrugem, presente no cultivar Ouro Negro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p. 265-273, 1995.

CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Dissertação - Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

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

FALEIRO, F.G. **Melhoramento e Mapeamento Genético do Feijoeiro-Comum: Análise de Características Quantitativas, Morfológicas, Moleculares e de Resistência a Doenças**. Viçosa, MG: UFV, 2000, 177p. (Dissertação - Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2000.

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**, v. 47, p. 375-382, 2000.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 59-66, 2003.

KELLY, J. D., AFANADOR, L., HALEY, S. D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, v. 83, n. 3, p. 207-212, 1995.

RAGAGNIN, V.A. **Seleção, Caracterização e Comportamento de Isolinhas de Feijoeiro-Comum Resistentes à Ferrugem, Antracnose e Mancha-angular**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 113p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. **Plant Breeding**, Cambridge, v. 119, p. 411-415, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

- Quarenta e duas linhagens de feijão do cruzamento Ouro Negro x Pérola, com grãos tipo carioca, apresentaram resistência a *C. lindemuthianum* (raças 73, 81 e 89) e a *U. appendiculatus* (mistura das raças 15, 35, 45, 49, 50 e 59).
- Das 42 linhagens resistentes à antracnose e ferrugem, foi possível identificar 10 com bons níveis de resistência à mancha-angular, com grãos de bom aspecto comercial, estatisticamente iguais ao Pérola em produtividade de grãos.
- Das 42 linhagens resistentes à antracnose e à ferrugem, 25 apresentaram bandas correspondentes aos marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀.
- Apesar de os marcadores SCARF10₁₀₅₀ e OPX11₅₅₀ estarem, relativamente, distantes dos genes de resistência à antracnose presentes no Ouro Negro (19,6 cM e 11,6 cM, respectivamente) eles proporcionaram uma boa eficiência de seleção.
- O marcador OPX11₅₅₀ também pode ser utilizado para monitorar o gene de resistência à antracnose (*Co-10*) presente no Ouro Negro.