

EVELINE TEIXEIRA CAIXETA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À MANCHA-ANGULAR
E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA
REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENOMA DO FEIJOEIRO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

EVELINE TEIXEIRA CAIXETA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À MANCHA-ANGULAR
E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA
REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENOMA DO FEIJOEIRO**

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

APROVADA: 8 de abril de 2002.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin

Prof. Geraldo Antônio de Andrade Araújo

Prof. Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)

À minha mãe Glória Zélia.
Ao meu pai Tarciso (*in memoriam*).
Aos meus irmãos Eliane, Aline, Guilherme e Gustavo.
Ao meu noivo Guilherme.

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me concedido força e vitória nas dificuldades enfrentadas, possibilitando alcançar mais este importante objetivo.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À minha mãe, pelas incansáveis e pacientes horas de incentivo, participando com muito amor nessa importante fase da minha vida.

Ao meu noivo, Guilherme, pela paciência, pelo apoio e por estar sempre presente nas ocasiões difíceis. Valeu pela força em mais esta conquista.

Ao Professor Aluizio Borém, pela competente orientação, pelo apoio e incentivo, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela amizade e confiança.

Ao Professor James D. Kelly, pela oportunidade, pelo agradável convívio, pelas sugestões e pela confiança depositada no meu trabalho.

Aos Professores Conselheiros Maurílio Alves Moreira e Everaldo Gonçalves de Barros, pelas sugestões, pelo zelo incansável com as condições de pesquisa e pela eficiência no planejamento da pesquisa.

À Dra. Ana Lilia Alzate-Marin, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela atenção dispensada e pelas valiosas sugestões dadas ao trabalho e à minha formação.

Ao Professor Geraldo Andrade, pela atenção e pelas importantes contribuições dadas ao trabalho.

À minha amiga Silvia Nietzsche, pelos primeiros ensinamentos com técnicas de Biologia Molecular e pelo companheirismo durante a execução deste trabalho.

Aos meus colegas Samir, Marcelo e Renato, pela amizade, pelo agradável convívio, pela ajuda técnica e pela dedicação a este trabalho.

As amigas Valéria, Elisanilda, Verônica, Cláudia, Alejandra, pela presença marcante cercada de incentivos e longas conversas e pelo firme propósito de verem os amigos vencerem.

Aos colegas de trabalho Eder, Lucianne, Newton, Ivan, Ronan, Abelmon, Fábio, Vilmar, Marta, Marcio, Márcia, Vagner, Rita, Antônio, Cristyano, Clever e aos colegas de curso, que tomaram mais agradável e interessante essa fase da minha vida.

Ao Pintinho, pela colaboração constante nas atividades na casa-de-vegetação.

A todos os professores que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

EVELINE TEIXEIRA CAIXETA, filha de Tarciso José Caixeta e Glória Zélia Teixeira Caixeta, nasceu em Viçosa, MG, no dia 18 de julho de 1972.

Concluiu seus estudos de primeiro e segundo grau nesta cidade.

Em 1990, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em Agronomia em julho de 1995.

No ano de 1991, foi bolsista de iniciação científica, trabalhando com monitoramento de insetos-praga, no Departamento de Biologia Geral, Setor de Entomologia, da UFV.

No período de 1992 a 1995, foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Biologia Geral da UFV, no qual desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em agosto de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em dezembro de 1997, sob a orientação do Prof. Carlos Roberto de Carvalho.

Em março de 1998, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, desenvolvendo, no período de janeiro a dezembro de 2001, parte dos trabalhos de pesquisa na Michigan State University, East Lansing, MI, EUA, sob a orientação do Dr. James D. Kelly.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância econômica da cultura do feijão	1
1.2. Aspectos gerais da mancha-angular	3
1.3. Características do fungo <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	4
1.4. Controle e manejo da mancha-angular	6
1.5. Piramidação como estratégia de melhoramento	8
1.6. Herança da resistência	11
1.7. Testes de alelismo	12
1.8. Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas	13
1.9. Marcadores microsatélites	18
2. OBJETIVOS	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
HERANÇA DA RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA PRESENTES NO CULTIVAR DE FEIJÃO BAT 332	
RESUMO	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37

2.1. Materiais genéticos e cruzamentos	37
2.2. Isolados e preparo do inóculo	37
2.3. Inoculação e avaliação da doença	38
2.4. Identificação de marcadores RAPD	38
2.4.1. Extração e amplificação do DNA	38
2.4.2. Construção e avaliação dos <i>bulks</i>	39
2.5. Análise estatística	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Herança da resistência de BAT 332	40
3.2. Identificação de marcadores RAPD	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

TESTE DE ALELISMO PARA GENES DO FEIJOEIRO QUE CONFEREM
RESISTÊNCIA AO FUNGO *Phaeoisariopsis griseola*.

RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Materiais genéticos e cruzamentos	53
2.2. Isolados e preparo do inóculo	55
2.3. Inoculação e avaliação fenotípica da doença	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES A PARTIR DE
CLONES BAC DE FEIJOEIRO

RESUMO	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. Materiais genéticos e extração de DNA	75
2.2. Sub-clonagem	75
2.3. Hibridização com sondas de microssatélites	76
2.4. Seleção dos <i>primers</i> e análise de PCR	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	88

RESUMO

CAIXETA, Eveline Teixeira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Caracterização da Resistência Genética à Mancha-angular e Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Everaldo Gonçalves de Barros.

A alta incidência de doenças tem sido considerada um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro no Brasil. Dentre as doenças que ocorrem em Minas Gerais, a mancha-angular, tem sido apontada como a mais importante da parte aérea. A grande variabilidade genética do patógeno que causa a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*), motiva o constante desenvolvimento de novos cultivares resistentes. Visando dar subsídios a programas de melhoramento, foram identificadas cinco fontes de resistência à mancha-angular: México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e BAT 332. Em trabalhos anteriores, foram conduzidos estudos independentes de caracterização genética das quatro primeiras variedades. No presente trabalho, foi estudada a herança da resistência de BAT 332, tendo sido encontrado um gene dominante responsável por essa característica. Para auxiliar programas de melhoramento, foram identificados dois marcadores moleculares do tipo RAPD, OPAA07₉₅₀ e OPAO12₉₅₀, ligados em fase de acoplamento a esse gene a uma distância de 5,10 e 5,83 cM, respectivamente.

Posteriormente, foram conduzidos testes de alelismo entre as cinco fontes de resistência com o objetivo de entender a relação entre os genes de resistência presentes nessas fontes. Os dados obtidos sugeriram maior complexidade que a encontrada nos estudos de herança realizados anteriormente. Foi demonstrado que Cornell 49-242 possui apenas um gene dominante, denominado de *Phg-3*, e México 54 três genes distintos, *Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*. Em MAR-2 foram encontrados dois genes, um independente denominado de *Phg-4* e outro uma forma alélica de um dos genes de México 54, designado de *Phg-5*². BAT 332 possui um gene dominante, *Phg-6*², o qual é uma forma alélica de outro gene de México 54. AND 277 possui um alelo de México 54, *Phg-2*², um de Cornell 49-242, *Phg-3*², e um de MAR-2, *Phg-4*². Esses resultados são de especial importância para programas de melhoramento cujo objetivo é a piramidação de genes de resistência. Conhecendo os genes de resistência presentes nas fontes e entendendo a relação entre eles, o melhorista tem a oportunidade de escolher os genitores de seu programa de forma a obter variedade com o maior número e melhor combinação possível de genes de resistência. A maioria dos marcadores moleculares disponíveis para os programas de melhoramento do feijoeiro é do tipo RAPD. A incorporação de marcadores que revelem um maior nível de polimorfismo permite que genótipos relacionados possam ser distinguidos, cruzamentos entre indivíduos aparentados possam ser analisados e marcadores mais próximos do gene de interesse sejam identificados. Os marcadores microssatélites apresentam esse alto polimorfismo e a facilidade típica de marcadores baseados em PCR, no entanto, não têm sido utilizados em feijão pela inexistência de *primers* microssatélites desenvolvidos para essa espécie. Propôs-se, portanto, na terceira parte deste trabalho, o desenvolvimento desses marcadores para o feijoeiro. Foram obtidos 21 pares de *primers* que amplificaram bandas únicas e bem definidas, sendo que 15 apresentaram bandas polimórficas e 7 monomórficas. O número de alelos por loco variou de um a seis. A disponibilidade de marcadores moleculares co-dominantes, altamente informativos e de fácil obtenção como os microssatélites será de grande utilidade para os melhoristas e geneticistas que se dedicam ao feijoeiro.

ABSTRACT

CAIXETA, Eveline Teixeira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2002.
Characterization of the Genetic Resistance to Angular Leaf Spot and Development of Microsatellite Markers in Specific Region of Common Bean Genome. Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Committee Members: Maurílio Alves Moreira e Everaldo Gonçalves de Barros.

Diseases are among the major problems responsible for the low yield of common bean in Brazil. Angular leaf spot, caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola*, has been regarded as the most important disease in Brazil, especially in the State of Minas Gerais. The extensive pathogenic variability of this fungus requires the continuous development of new resistant cultivars. To assist breeding programs, five resistance sources for angular leaf spot were identified, México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 and BAT 332. Genetic characterization of four of these sources was previously done. In the present work, the resistance inheritance of the fifth source, BAT 332, was carried out. The results demonstrate that a single dominant gene is responsible for angular leaf spot resistance in this genotype. Two RAPD markers, OPAA07₉₅₀ and OPAO12₉₅₀, linked in coupling phase with this gene at 5.10 and 5.83 cM of distance, respectively, were identified. Allelism studies among the five resistance sources were conducted aiming to understand the relationship among these genes involved. Our data suggested a higher complexity than previously found by other authors. It was demonstrated that Cornell 49-242 has

just one dominant gene, *Phg-3*, and Mexico 54 possesses three distinct genes, *Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*. For MAR-2, two genes were found, one was independent, *Phg-4*, and the other was allelic to one of the genes present in México 54, *Phg-5*². The allele of the Mexico 54 gene was found in BAT 332, *Phg-6*². AND 277 has one allele of México 54, *Phg-2*², one of Cornell 49-242, *Phg-3*², and another of MAR-2, *Phg-4*². These results are especially important for breeding programs aiming at pyramiding resistance genes. With the knowledge of the resistance genes present in the resistance sources and the understanding of the relationship among these genes, the breeder has opportunity to choose the parent for programs aiming to develop varieties with the largest number and the best combination of resistance genes. Most molecular markers developed to be used in bean breeding programs are RAPD markers. The incorporation of maker that shows a higher polymorphisms allows the distinction of closely related genotypes, the analysis of related plants crosses and the identification of molecular marker closer to the interested gene. Microsatellite markers have both high polymorphism and the easy to perform of PCR markers, however, they were not used in common beans due to the lack of primers for this species. In the third and last part of this study, it was to developed microsatellites for common beans. It was identify 21 primers that amplify single discrete band. From these primers, 15 amplified polymorphic bands and 7 monorphic bands. The number of alleles per locus varied from one to six. The existence of codominant, highly informative and easy to work molecular markers may facilitate the use of this tool for common bean breeders and geneticists.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância econômica da cultura do feijão

O feijão é um dos produtos agrícolas da mais alta expressão econômica e social, constituindo-se, juntamente com o arroz, a base da alimentação do povo brasileiro (MOURA et al., 1994). Este produto é reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e de ser rico em ferro. Além da sua importância na dieta do brasileiro, o feijão tem considerada relevância econômico-social em razão de ser cultivado em grandes áreas e pela mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura (BORÉM e CARNEIRO, 1998).

A produção mundial média de feijão, no período de 1997/2002, ficou em torno de 17,7 milhões de toneladas ao ano, em uma área colhida de, aproximadamente, 25,4 milhões de hectares. Cinco países apresentam expressivo destaque como produtores dessa leguminosa: Brasil, Índia, China, Estados Unidos e México. Em conjunto, esses países são responsáveis por mais de 60% do total produzido mundialmente. Nesse período, o Brasil se configurou como o maior país produtor, com 2,7 milhões de toneladas, cerca de 15,3% do total produzido mundialmente (BORÉM e CARNEIRO, 1998; FAOSTAT – banco de dados da FAO, 2002). Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais destaca-se como um dos principais produtores nacionais de

feijão, com uma produção média, no período de 1996/1998, em torno de 375 mil toneladas em um a área colhida de 460 mil hectares (AGRIANUAL, 1999).

O consumo *per capita* brasileiro dessa leguminosa, que é o maior do mundo, situa-se no patamar de 20,3 kg/ano, equivalente a 56 g/dia (BORÉM e CARNEIRO, 1998). A produção brasileira de três milhões de toneladas por ano, embora seja a maior do mundo e voltada para o consumo interno, não é suficiente para o pleno abastecimento do mercado nacional. Este mercado pode, portanto, ser considerado como não saturado (AGRIANUAL, 1997).

Apesar dessa importância do feijoeiro e da grande produção brasileira, o rendimento médio do feijão nacional é considerado muito baixo, 705 kg/ha, sendo inferior à produtividade média mundial (MOURA et al., 1994; SANTOS e BRAGA, 1998; IBGE, 2002). Alguns países, como os E.U.A e Canadá, têm rendimento médio superior a 1800 kg/ha (FAOSTAT – banco de dados da FAO, 2002). Tem-se observado, ainda, uma redução paulatina do rendimento do feijão com o decorrer das safras, em razão dos seguintes fatores: (a) predominância de cultivos associados com outras culturas; (b) ataque de pragas (VIEIRA, 1988); (c) rotação inadequada de culturas, com o conseqüente aumento da incidência e da severidade de doenças; (d) aparecimento de novas doenças; (e) compactação do solo; e (f) desequilíbrio nutricional (VIEIRA e PAULA-JR, 1998).

Dentre os vários fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro no Brasil, a alta incidência de doenças tem sido considerada um dos principais fatores. Segundo BORÉM e CARNEIRO (1998), mais de 45 diferentes doenças podem ocorrer na cultura do feijão no Brasil, embora apenas cerca de dez sejam realmente importantes. Algumas doenças apresentam importância estritamente regional, enquanto outras são de distribuição generalizada. De acordo com PAULA-JR e ZAMBOLIM (1998), muitas doenças do feijoeiro podem causar, dependendo das condições de ambiente, perdas totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Dentre as principais doenças do feijoeiro que ocorre em Minas Gerais, a mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, tem sido apontada como a mais importante da parte aérea, causando sérios prejuízos, especialmente

durante os meses de abril a julho, quando são observadas temperaturas amenas e ocorrência de orvalho.

1.2. Aspectos gerais da mancha-angular

Os primeiros registros de ocorrência da mancha-angular foram relatados por Saccardo em 1878 no norte da Itália e sul da Áustria. Posteriormente, essa doença foi comprovada em vários outros países tropicais e subtropicais (OLAVE, 1958; CORREA-VICTORIA et al., 1989). No Brasil, até o final da década de 80, a mancha-angular era considerada doença de pequena importância econômica. Segundo VIEIRA (1994), a doença não causava danos apreciáveis porque só aparecia no final do ciclo da cultura, quando a produção já estava praticamente garantida. No entanto, alguns fatores fizeram com que a mancha-angular se tornasse uma séria ameaça à cultura do feijão, sendo considerada hoje um grande problema para quase todas as regiões produtoras do país. PAULA-JR e ZAMBOLIM (1998), enumeraram alguns desses fatores: (a) o plantio da cultura em novas épocas (especialmente outono-inverno-primavera, quando as temperaturas são favoráveis à doença), fazendo com que haja feijão plantado ou restos de cultura contaminados no campo durante todo o ano; (b) o plantio irrigado com pivôs-centrais, que propicia condição de alta umidade, favorável à doença; (c) a utilização de sementes contaminadas, introduzindo o patógeno em novas regiões; (d) o plantio de novas variedades, quase sempre apresentando uma base genética de resistência à doença bastante restrita; (e) as possíveis alterações das raças do patógeno ao longo dos anos.

Quando as condições ambientais são favoráveis e o patógeno da mancha-angular está presente, podem haver perdas de até 80% na produção (SCHWARTZ et al., 1981). Além disso, a qualidade, o valor de mercado e a adequação das sementes para transporte e uso nas regiões produtoras de feijão podem ser severamente afetadas (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

1.3. Características do fungo *Phaeoisariopsis griseola*

Phaeoisariopsis griseola é um fungo pertencente à classe dos Deuteromicetos (fungo imperfeito) responsável pela mancha-angular do feijoeiro. Além da espécie *Phaseolus vulgaris*, este patógeno ataca também *P. lunatus* (feijão-fava) e *Vigna unguiculata* (caupi) (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956; VIEIRA, 1988). A doença é favorecida pelas condições intermitentes de frio e calor e de seca e umidade (PASTOR-CORRALES et al., 1998). Temperaturas entre 16 e 28°C, com um ótimo em 24°C, e alta umidade são condições favoráveis à infecção (VIEIRA, 1994). A produção de sinêmios e de conídios do fungo é intensa durante períodos prolongados de alta umidade (PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998). Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece-lhes a disseminação. Verificou-se que os esporos são liberados na atmosfera seca e prontamente disseminados pelo vento (VIEIRA, 1994). PAULA-JR e ZAMBOLIM (1998), ressaltam que os conídios podem ser disseminados a grandes distâncias por correntes de ar e por respingos de chuva. Sementes contaminadas podem transmitir o patógeno, que também pode sobreviver, de uma safra para outra, em restos de cultura deixados no campo.

O fungo pode atacar caule, folhas e vagem (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956). Os sintomas da mancha-angular são bastante característicos nas folhas trifolioladas, as quais apresentam manchas que se originam na face inferior dos folíolos, a princípio cinzentas e que se tornam pardas, sem bordas coloridas. Nessas lesões, na face inferior da folha, aparecem pontos negros muito pequenos que são as estruturas reprodutivas do patógeno (sinêmios). Estas estruturas são formadas por colunas de filamentos do fungo causador da doença, que carregam, na extremidade, os esporos (conídios). As manchas pardas também aparecem na superfície superior das folhas. Delimitadas pelas nervuras, as lesões têm conformação nitidamente angular, motivando o nome comum da doença. Em determinadas combinações patótipo x hospedeiro, as lesões não apresentam a forma angular típica da doença, dando origem a manchas irregulares que, ao serem observadas, têm aspecto arredondado. É comum a união de várias lesões numa mesma folha, o que causa necrose parcial, amarelecimento das folhas e por fim, sua queda prematura. Nas folhas

primárias, as lesões, de coloração castanho-acinzentada com halos concêntricos, não possuem formato bem característico, porém na maioria das vezes possuem conformação mais ou menos circular. Nas vagens, as manchas têm tamanho e conformação variáveis, mas são geralmente circulares ou ovais, pardo-avermelhadas, e podem apresentar bordas com coloração mais escura. Quando numerosas, coalescem, cobrindo boa porção da vagem. Vagens infectadas apresentam sementes pouco desenvolvidas. Pontos negros, que são as estruturas reprodutivas do patógeno, também surgem nas lesões das vagens. No caule e nos pecíolos as lesões são pardo-avermelhadas e alongadas, e nelas também aparecem as estruturas reprodutivas (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956, VIEIRA, 1988, 1994; SARTORATO e RAVA, 1994; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998). Se sementes infectadas são semeadas, o sintoma da doença deve aparecer nas folhas primárias. Nas plantas adultas, normalmente as folhas mais velhas mostram sintomas mais severos, espalhando-se para outras partes, incluindo vagens e sementes. A mancha-angular causa severa desfolha. Não foi encontrada nenhuma correlação entre severidade da doença em vagens e percentagem de sementes infectadas com o patógeno (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

MONDA et al. (2001) investigaram a infecção e o estabelecimento de *P. griseola* nas folhas do feijoeiro. Segundo estes autores, sob alta umidade, os conídios do fungo germinam na superfície da folha três dias após a inoculação, por meio de emissão de tubo germinativo em uma ou nas duas extremidades. A penetração ocorre através dos estômatos, com ou sem formação de apressório. Após a penetração, as hifas crescem intercelularmente. As hifas não penetram nas células hospedeiras, porém as células são destruídas à medida que o fungo se prolifera, possivelmente por toxinas liberadas pelo patógeno. O desenvolvimento dessas hifas é limitado pelas nervuras das folhas, por isso as lesões têm aspecto angular. Essa incapacidade de penetração nas nervuras pode ser resultado da falta de espaço intercelular dessas regiões da folha. Após a destruição da célula hospedeira, são formados os estromas, que permitem que o fungo se mantenha dormente até que as condições sejam favoráveis à esporulação.

1.4. Controle e manejo da mancha-angular

O patógeno que causa a mancha-angular pode ser controlado quimicamente. Como ele sobrevive em restos culturais, outras medidas auxiliares de controle podem ser realizadas, como, rotação de culturas, em que o feijão fica pelo menos dois anos sem voltar ao terreno; eliminação dos restos de cultura contaminados, enterrando-os; queima da palhada resultante da colheita, em casos de ataque forte (VIEIRA, 1994; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998). Apesar de existirem várias alternativas de controle, a principal medida, sobretudo pela eficiência, pela economicidade e pelo menor prejuízo ao meio ambiente, é o uso de variedades resistentes (GEFFROY et al., 1998; PASTOR-CORRALES et al., 1998; RAMALHO e ABREU, 1998). Um problema enfrentado pelo produtor no uso de variedades resistentes, é que quase todas as variedades plantadas no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular (VIEIRA, 1994). FALEIRO et al. (2001) avaliaram a resistência das principais variedades de feijão recomendadas para o Estado de Minas Gerais e concluíram que estas não apresentam níveis satisfatórios de resistência.

Fontes de resistência, entretanto, têm sido identificadas. BROCK (1951) encontrou, na Austrália, algumas variedades de feijão consideradas altamente resistentes: Alabama nº1, Café, Califórnia Small White, Case Knife (variedade de *P. coccineus*), Epicure, Mexican Black, McCaslan, Navy, Negro Costa Rica, Scotia e Rojo Chico. OLAVE (1958), na Colômbia, verificou que as variedades México 11, México 12 e Cauca 27a eram altamente resistentes. O CIAT apresentou algumas fontes de resistência: A21, BAT 67, Mexicano (G1805), G2335, San Martin 8 (G4721) e Ecuador 299 (G5653). Foram encontradas, ainda na Colômbia, outras 57 variedades resistentes, incluindo: Morado (G2392), Col. Nº161 (G2614), Col. Nº 38 (G2704), G2922, Puebla 152 (G3353), Guanajuato 115-A (G 3449), Guatemala 669 (G9586) e outras (VIEIRA, 1988). Na Índia, de 173 variedades/linhagens estudadas, foram identificadas duas linhagens altamente resistentes, EC 44758 e EC 97830 (GUPTA et al., 2000).

No Brasil, VIEIRA (1964) citou a variedade Manteigão Preto-20 como resistente à mancha-angular. Em Goiás, as variedades Jalo EEP 558 e Caraota 260 mostraram-se resistentes e a Ricopardo 896, moderadamente resistente

(RAVA et al., 1985). Mais recentemente, PASTOR-CORRALES e PAULA-JÚNIOR (1996) demonstraram que a variedade diferenciadora G5686 foi a que apresentou maior resistência a isolados brasileiros de *P. griseola*. Além da variedade G5686, APARÍCIO (1998) detectou a diferenciadora México 54 como importante fonte de resistência. Essa variedade, México 54, tem sido apontada como a principal fonte de resistência à mancha-angular no Brasil (APARÍCIO, 1998; NIETSCHE et al., 1998). Outras variedades resistentes têm sido relatadas na literatura, as quais mostram diferentes níveis de resistência à doença: México 167, ICA Guali, Diacol Nima, IPA 86, Aiguille Vert, Cubano, Jalo, Vermelho, Diacol Calima, Tupi, Cornell 49-242, RG 1342CH60, México 279, México 74, AN512722, AN721070, PF721245 (PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998).

Em Minas Gerais, SANTOS-FILHO et al. (1976) demonstraram que o feijão Caraota 260 possui um gene recessivo de resistência a isolados do fungo. PAULA-JR et al. (1997) verificaram que as variedades Millionário 1732 e Ouro foram os mais resistentes. Observou-se também que as variedades de grão grande (origem andina), como o Jalo, são mais resistentes à doença, provavelmente por causa da predominância de raças do patógeno de origem mesoamericana nesse estado (PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998). NIETSCHE et al. (1998) inocularam alguns genótipos de feijoeiro com 30 isolados de *P. griseola* (13 raças) e encontraram quatro fontes de resistência, México 54, AND 277, MAR-2 e Cornell 49-242. Além dessas variedades, NIETSCHE et al. (2000b) detectaram outra importante fonte, BAT 332, que apesar de não ser resistente a muitas raças desse patógeno, apresenta resistência a alguns isolados, os quais são virulentos para Cornell 49-242. Estes dados sugerem, uma complementaridade de resistência entres essas duas variedades.

A existência de variabilidade genética no germoplasma do feijoeiro quanto à resistência à mancha-angular, permite o desenvolvimento de programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes a essa doença (RAMALHO e ABREU, 1998). No entanto, a extensa variabilidade de *P. griseola* no Brasil, particularmente em Minas Gerais, tem sido um desafio aos programas de melhoramento (PASTOR-CORRALES e PAULA-JR, 1996; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998, APARÍCIO, 1998; NIETSCHE et al., 2001). NIETSCHE (2000), utilizando a série diferenciadora internacional, identificou

uma raça diferente de *P. griseola* a cada três isolados analisados, demonstrando a alta variabilidade deste patógeno. Esta série diferenciadora foi proposta pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) com o objetivo de padronizar a metodologia de identificação de patótipos (SARTORATO et al., 1999). A série diferenciadora é constituída por 12 genótipos, sendo seis do grupo andino e seis do grupo mesoamericano.

A alta variabilidade de *P. griseola* explica o alto potencial adaptativo desse patógeno, responsável pela “quebra” da resistência das variedades. Isso implica que a resistência obtida nem sempre é duradoura ou eficiente em todas as regiões de cultivo (RAMALHO e ABREU, 1998). Uma estratégia para aumentar a durabilidade da resistência a um patógeno, seria combinar ou introduzir diferentes genes de resistência em uma única variedade (McDONALD et al., 1988; HUANG et al., 1997, KELLY e MIKLAS, 1998), estratégia esta denominada de piramidação.

1.5. Piramidação como estratégia de melhoramento

Pode-se definir piramidação como o acúmulo de genes em uma linhagem ou variedade (MILACH e CRUZ, 1997), ou ainda, como a introgressão de vários genes de resistência em uma única variedade (BORÉM, 2001). A piramidação, segundo PEDERSEN e LEATH (1988), pode ser realizada com genes maiores, menores, anulados, efetivos (patógeno avirulento) ou não (patógeno virulento), raça-específico ou raça-não-específico, ou qualquer outro tipo de gene que confere resistência ao patógeno.

A piramidação de genes tem sido sugerida como uma estratégia potencial para manter a resistência a doenças por um longo período, ou seja, para aumentar a durabilidade da resistência. A base para estabilização da resistência reside na redução da adaptação do patógeno, quando um número de genes de virulência é necessário para “quebrar” a resistência do hospedeiro (VAN DER PLANK, 1984). Além disso, a probabilidade de um patógeno conter todos os genes de virulência correspondentes aos genes de resistência da planta e, portanto, superar a resistência de uma pirâmide, é muito baixa. Para isto, mutantes virulentos que surgem independentemente devem ser

combinados, ou eles devem surgir simultaneamente ou seqüencialmente no mesmo isolado (SCHAFFER e ROELFS, 1985; MILACH e CRUZ, 1997).

Alguns exemplos citados na literatura têm demonstrado a eficiência da piramidação, como uma estratégia de melhoramento visando resistência a doenças. Em trigo, não tem sido observada epidemia significativa de ferrugem do colmo desde 1955 na América do Norte, pois as variedades plantadas possuem cerca de seis genes de resistência (SCHAFFER e ROELFS, 1985). HUANG et al. (1997) piramidaram quatro genes de resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* em variedades de arroz. Linhagens melhoradas com dois, três e quatro genes foram desenvolvidas e testadas para a resistência a este patógeno. Observou-se que as linhagens piramidadas apresentaram níveis mais altos de resistência e/ou maior espectro de resistência que os genitores com apenas um gene. Em feijão, a piramidação de três genes de resistência à ferrugem, *UP-2*, *B-190* e *Ur-3*, conferiu resistência a 63 das 65 raças de ferrugem do feijoeiro caracterizadas na coleção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA. Apenas as raças 58 e 67 superaram os genes dessa pirâmide (KELLY et al., 1994). A variedade de feijão G2333 constitui um outro exemplo de eficiência da piramidação de genes. Ela apresenta mais de um gene maior para resistência a antracnose. Uma coleção de 380 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* proveniente de diferentes partes do mundo são avirulentos a esta variedade (PASTOR-CORRALES et al., 1994).

Apesar da considerada importância em programas de melhoramento visando resistência a doenças, a estratégia de piramidação não tem sido muito aplicada, devido a algumas dificuldades que ela apresenta. Segundo PEDERSEN e LEATH (1988), combinar três ou quatro genes em uma única variedade e manter outras características superiores não é um trabalho simples. Como o processo de piramidação requer a combinação de múltiplos genes de resistência, é muito difícil, por métodos convencionais de avaliação, diferenciar cada gene num só indivíduo (MICHELMORE, 1995). Se vários genes estão sendo incorporados e todos eles conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (KELLY et al., 1995; MILACH e CRUZ, 1997). Uma série de cruzamentos-teste e inoculações múltiplas podem ser necessárias para

determinar a presença dos genes, o que torna o processo muito trabalhoso. (FEHR, 1987; BROWN et al., 1996; HUANG et al., 1997; GEFFROY et al., 1998).

Estas limitações dificultaram, no passado, o uso da piramidação como uma alternativa ao melhoramento para resistência durável. Entretanto, a possibilidade de usar marcadores moleculares para monitorar a presença de gene de resistência em um genótipo, levantou novamente a questão do uso desta estratégia no melhoramento a doenças. A utilização de marcadores de DNA fortemente ligados a genes de resistência, permite que as progênies que contêm os genes desejáveis sejam identificadas. Uma vez que os genes que conferem resistência ao mesmo patógeno são identificados por meio desta técnica, eles poderiam ser facilmente acumulados num genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares. Dessa forma os marcadores moleculares eliminariam a necessidade da realização de cruzamentos-teste e avaliação da segregação. Além disso, estes marcadores podem aumentar a velocidade de recuperação do fenótipo do genitor recorrente no processo de retrocruzamento (KELLY, 1995; MILACH e CRUZ, 1997). Por estes motivos, a seleção assistida por marcadores moleculares apresenta grande potencial de utilização para a piramidação de genes de resistência (BORÉM, 2001; HUANG et al., 1997; MILACH e CRUZ, 1997). A medida que o uso destes marcadores se tornar rotineira nos programas de melhoramento, a estratégia de piramidação poderá ser mais amplamente aplicada (MILACH e CRUZ, 1997).

Para programas de melhoramento visando resistência a mancha-angular, PASTOR-CORRALES et al. (1998) sugerem, ainda, uma piramidação acumulando genes de resistência de feijão do grupo Andino e do grupo Mesoamericano. Segundo estes autores, a grande variabilidade patogênica encontrada nos isolados de *P. griseola* e as evidências de co-evolução patógeno/hospedeiro observadas no feijoeiro fazem com que o acúmulo de genes dos dois grupos seja a estratégia de melhoramento mais eficiente. Devido à co-evolução, genes de resistência mesoamericanos são mais efetivos contra patógenos andinos e vice-versa (GUZMÁN et al., 1995). Sendo assim, os melhoristas de feijão têm uma oportunidade única de piramidar genes de resistência dos dois grupos para desenvolver resistência complementar a um grande número de raças (KELLY e MIKLAS, 1998).

Para viabilizar e facilitar essa estratégia de piramidação de genes de resistência no feijoeiro deve-se determinar previamente a herança da resistência nos acessos mais promissores e nas linhagens melhoradas e identificar marcadores moleculares ligados aos genes caracterizados (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

1.6. Herança da resistência

A determinação do número de genes de resistência e a caracterização de sua herança são essenciais para o desenvolvimento de novas variedades dentro de um programa de melhoramento visando resistência a doenças. Estudos realizados em feijão têm demonstrado que a resistência das variedades à mancha-angular é atribuída a poucos genes dominantes ou recessivos. BARROS et al. (1957) observaram que na maioria dos cruzamentos estudados, a resistência era controlada por dois ou três genes recessivos independentes. Na linhagem colombiana 0258, a resistência é controlada por um único gene dominante (CARDONA-ALVAREZ, 1962), enquanto a resistência da variedade brasileira Caraota 260 é controlada por um gene recessivo (SANTOS-FILHO et al., 1976). SINGH e SAINI (1980), estudando a variedade PLB 257 (*P. coccineus*), verificaram que sua resistência à mancha-angular também é governada por um gene recessivo. SARTORATO et al. (1993) observaram que a resistência de Cornell 49-242, quando cruzada com as variedades suscetíveis Rosinha G-2 e Caraota 260, é monogênica e dominante. Herança monogênica e dominante também foi encontrada nas variedades AND 277 (CARVALHO et al., 1998), MAR-2 (FERREIRA et al., 2000), Cornell 49-242 (NIETSCHKE et al., 2000a) e México-54 (SARTORATO et al., 2000). Mais recentemente, CORRÊA et al. (2001), estudando a herança da resistência das variedades Ouro Negro e US Pinto 111, encontraram resistência monogênica dominante em Ouro Negro e monogênica recessiva em US Pinto 111.

1.7. Testes de alelismo

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

Segundo RAMALHO et al. (1995), o teste de alelismo é comumente usado para determinar se diversos fenótipos de um dado caráter, observados numa população de indivíduos, resultam da participação de uma série de alelos ou da interação gênica. Este teste consiste em cruzar os indivíduos portadores dos vários fenótipos, dois a dois, em todas as combinações possíveis e estudar as segregações fenotípicas nas descendências. Se for constatada uma herança diferente da monogênica, tem-se um caso de interação gênica e não de alelismo múltiplo.

Em estudos de genes de resistência de plantas a patógenos, tem-se utilizado o teste de alelismo com metodologia e objetivos diferentes do proposto por RAMALHO et al. (1995). Neste caso, são feitos cruzamentos entre dois genótipos resistentes e as plantas F_2 destes cruzamentos são analisadas. O aparecimento de plantas suscetíveis indica que os pais têm genes de resistência localizados em locos distintos. A observação de apenas plantas resistentes indica que os dois genitores são portadores de gene(s) de resistência em um mesmo loco, podendo ser alélicos ou ligados em bloco (EHDAIE e BAKER, 1999). Testes de alelismo utilizando essa metodologia têm sido extensivamente utilizados. Na análise genética da resistência ao vírus do mosaico da soja (SMV-G1), realizada por WANG et al. (1998), verificou-se que três das quatro variedades estudadas possuíam um único gene dominante, que confere a resistência, que correspondiam a locos diferentes do gene *Rsv1* previamente caracterizado. Em trigo, o teste de alelismo demonstrou que genes de resistência ao oídio, presentes em três linhagens, são formas alélicas ou formam um bloco gênico com o loco *Pm1*, sendo, portanto, designados como *Pm1a*, *Pm1b*, *Pm1c* e *Pm1d* (HSAM et al., 1998).

YOUNG e KELLY (1996a) utilizaram a estratégia de alelismo para estudar a relação dos genes de resistência à antracnose presentes em duas variedades de feijão, Catrachita e Sel 1306, com outros genes previamente caracterizados. Esta análise permitiu verificar se os genes presentes nessas fontes de resistência segregam independentemente dos outros, e, portanto, estão localizados em locos diferentes. Os estudos de herança, realizados previamente naquele trabalho, demonstraram a existência de um gene dominante nas variedades Catrachita e Sel 1306, responsáveis pela resistência à antracnose. Foi observado, por meio da análise de alelismo, que o gene de efeito maior presente em Catrachita é independente dos outros genes já caracterizados: genes A (Co-1), Are (Co-2), Mexique1 (Co-3), Mexique2 (Co-4) e Mexique3 (Co-5). Foi proposta a denominação de Co-6 para este gene de resistência. O teste realizado com a linhagem SEL 1360 demonstrou que o gene dominante presente nessa variedade está localizado no mesmo loco de Mexique3 (Co-5).

1.8. Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas

O uso limitado da seleção indireta no melhoramento se deve principalmente a falta de marcadores morfológicos apropriados ou a efeitos pleiotrópicos indesejáveis desses marcadores. Recentemente, a seleção assistida por marcadores moleculares tem sido utilizada como um método útil no melhoramento de plantas (KELLY, 1995). CREGAN et al. (1999) ressaltam a importância dos marcadores de DNA não só para a seleção assistida, mas também para análise genômica e estudo de evolução e clonagem de genes. Assim, marcadores moleculares são importantes para melhoristas de plantas como uma fonte de informação genética e para uso na seleção indireta de características ligadas ao marcador.

O uso de marcadores visando resistência a doenças oferece uma vantagem adicional de permitir seleção para resistência na ausência do patógeno ou de uma raça do patógeno (KELLY, 1995). Segundo KELLY e MIKLAS (1998), a identificação de genes de resistência pode ser limitada pelas técnicas de inoculação tradicionais. A presença de certas combinações de

genes não pode ser detectada porque discriminações de raças do patógeno podem não estar disponíveis aos melhoristas. Quando combinados em um único genótipo, esses genes de resistência desconhecidos podem ser distinguidos um do outro usando marcadores ligados a um dos genes. Marcadores RAPD e SCAR ligados ao gene *Co-4*², o qual confere resistência à antracnose do feijoeiro, foram usados para identificar um terceiro gene (*Co-7*) presente na variedade G2333 (YOUNG et al. 1998). Mesmo quando os patótipos estão disponíveis aos melhoristas, a identificação de linhagens que apresentam diferentes genes de resistência é limitada pela dificuldade de realização de testes de inoculação com diferentes patógenos em um mesmo indivíduo e pelo efeito epistático desses genes. Os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência possibilitam a identificação dessas linhagens, bem como facilitam a piramidação desses genes em variedades de interesse (ALZATE-MARIN et al., 2001). Dessa forma, as técnicas moleculares oferecem novas oportunidades para a manipulação, por meio da seleção assistida por marcadores, e entendimento dos genes de resistência (GEFFROY et al., 1998).

Além do uso na seleção assistida, as associações entre genes de resistência e marcadores moleculares têm sido utilizadas no mapeamento destes genes em grupos de ligação específicos. Isto é importante porque, o conhecimento da localização dos genes de resistência no genoma da planta, permite que mais marcadores possam ser detectados em associação com o gene de interesse, aumentando a precisão na seleção assistida (MILACH e CRUZ, 1997).

A eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares pode ser grandemente afetada pela distância entre o marcador e o gene de resistência. Um outro fator que afeta a eficiência desta seleção indireta, é a utilização de marcadores ligados em repulsão ou acoplamento com o gene de resistência (KELLY e MIKLAS, 1998). Marcador em fase de repulsão é aquele ligado ao alelo que confere suscetibilidade e o marcador em acoplamento é aquele ligado ao alelo de resistência (KELLY, 1995). HALEY et al. (1994a) demonstraram que a seleção utilizando marcador RAPD em fase de repulsão identifica uma maior proporção de genótipos homocigotos resistentes e menor proporção de indivíduos segregantes e homocigotos suscetíveis, quando comparado com o uso de marcadores em fase de acoplamento. Com base nessas observações,

KELLY (1995) concluiu que seleções de indivíduos baseadas no fenótipo da combinação de marcadores RAPD em fase de acoplamento e repulsão equivalem à seleção baseada no marcador co-dominante RFLP, e também é idêntica à seleção baseada apenas no marcador em repulsão. ALZATE-MARIN et al. (1999), concordam que a proporção de indivíduos resistentes e homocigotos é maior quando se utiliza seleção com marcador ligado em repulsão ao gene de resistência. No entanto, estes autores demonstraram que a eficiência de seleção para indivíduos resistentes, incluindo homocigotos e heterocigotos, é maior quando a seleção é realizada com marcadores em acoplamento. Além disso, marcadores em fase de acoplamento são mais úteis em retrocruzamentos, pois permitem a introgressão mais rápida de características provenientes de fontes exóticas. Todos os possíveis RC_nF_1 utilizados como genitores para o novo ciclo de retrocruzamento carregará o marcador em repulsão, enquanto aqueles com alelo para resistência poderão ser detectados pelo marcador em fase de acoplamento (KELLY, 1995).

Dois tipos de marcadores moleculares foram desenvolvidos inicialmente: (a) marcadores baseados em variantes alélicas de enzimas específicas - isoenzimas; e (b) marcadores baseados na variação do tamanho de fragmentos de DNA obtidos por digestão com endonucleases de restrição - RFLP. Os marcadores RFLP possuem vantagens em relação aos isoenzimáticos. Eles são fenotipicamente neutros e podem ser detectados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Devido às suas vantagens, o RFLP foi o marcador escolhido para a expansão dos mapas de ligação genética em várias espécies. No entanto, sua utilização pelos melhoristas ficou restrita devido ao seu custo e uso de sondas radioativas. O desenvolvimento de marcadores RFLP envolve um processo caro e com muitas etapas, que requer considerável investimento em pessoal, equipamentos, químicos e cuidados especiais, quando sondas radioativas são utilizadas (KELLY, 1995; KELLY e MIKLAS, 1998).

Posteriormente, foi desenvolvido um tipo de marcador molecular baseado na reação da polimerase em cadeia (PCR), para minimizar as limitações dos RFLPs. O PCR foi modificado para desenvolver um novo tipo de marcador: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - RAPD. Este marcador apresenta algumas vantagens sobre outros métodos: (a) envolve um processo

mais simples e mais rápido; (b) um conjunto único universal de *primers* arbitrários pode ser utilizado e rapidamente rastreado, no lugar das sondas; (c) uma menor quantidade de DNA é utilizada; (d) mais sensível na detecção de polimorfismo ao nível de DNA; (e) menor custo da técnica (KELLY, 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Portanto, a tecnologia de RAPD é bastante acessível, e pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento, para laboratórios avançados de pesquisa e ser utilizada rotineiramente pelos geneticistas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Para facilitar a identificação de marcadores RFLP ou RAPD ligados a genes de resistência a doenças, MICHELMORE et al. (1991) propuseram uma estratégia, denominada de análise de *bulk* segregante (BSA). Este método permite uma rápida detecção de marcadores ligados a um gene ou região genômica específica, usando populações segregantes provenientes de um único cruzamento. Dois *bulks* de amostras de DNA são gerados. Cada *bulk* contém indivíduos que são idênticos para uma particular característica ou região genômica, como resistência e suscetibilidade, e arbitrário para as demais regiões do genoma. Estes *bulks* contrastantes para a característica de interesse são analisados. Marcadores que são polimórficos para as duas amostras, provavelmente, estarão geneticamente ligados ao loco determinante da característica usada para construir o *bulk*. Com este método, esses autores, identificaram três marcadores ligados a genes de resistência de efeito maior em alface.

Em feijão, vários marcadores moleculares associados aos genes que conferem resistência a doenças têm sido identificados. Para ferrugem, já foram identificados marcadores para os genes de resistência *Ur-3*, *Ur-3*², *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-7* e *Ur-9*. O primeiro marcador RAPD identificado foi OA14₁₁₀₀ ligado ao gene *UP-2* (*Ur-4*) (MIKLAS et al., 1993). HALEY et al. (1993) identificaram os marcadores OF10₉₇₀ e OI19₄₆₀ ligados ao bloco gênico da linhagem B-190 (gene *Ur-5*) e HALEY et al. (1994b) o marcador OK14₆₂₀ ligado ao gene *Ur-3*. Posteriormente, JOHNSON et al. (1995) identificaram dois marcadores RAPD: OAC20₄₉₀, ligado em acoplamento, e OAE19₈₉₀, ligado em repulsão ao gene da variedade PI 181996 (gene *Ur-3*²). Foram identificados sete marcadores RAPD ligados ao gene *Ur-9* (JUNG et al., 1996; PARK et al. 1999a) e cinco ligados ao

gene *Ur-7*(PARK et al. 1999b). FALEIRO et al. (2001) encontraram dois marcadores OX11₆₃₀ e OF10₁₀₅₀ flanqueando o bloco gênico de resistência à ferrugem presente na variedade Ouro Negro. Dois marcadores do tipo SCAR, SCARBA08 e SCARF10, ligados ao bloco gênico de resistência da variedade Ouro Negro foi encontrado por CORRÊA et al. (2000).

Para antracnose, inicialmente foram identificados marcadores RAPD para cinco genes dominantes, *Co-1*, *Co-2*, *Co-4*², *Co-5* e *Co-6* (YOUNG e KELLY, 1994; ADAM-BLONDON et al., 1994; YOUNG e KELLY, 1996b; YOUNG e KELLY, 1997; YOUNG et al., 1998). ALZATE-MARIN et al. (1999) encontraram outros dois marcadores, OPZ04₅₆₀ ligado em fase de acoplamento e OPZ09₉₅₀ ligado em repulsão ao gene *Co-6* presente na variedade AB 136. Sete marcadores RAPD ligados ao gene *Co-4* presente na variedade TO foram identificados por ARRUDA et al. (2000) e ALZATE-MARIN et al. (2000), sendo cinco ligados em fase de acoplamento: OPAZ20_{940C}, OPY20_{830C}, OPC08_{900C}, OPI16_{850C} e OPJ01_{1380C}; e dois em repulsão: OPB03_{1800T} e OPA18_{830T}. O marcador OPH18_{1200C} ligado em fase de acoplamento ao gene *Co-4*² foi identificado por ALZATE-MARIN et al. (2001). MENDOZA et al. (2001) identificaram três marcadores AFLP (ECAG/MACC-1, EACAMAGA-2 e EAGG/MAAC-8) ligados ao gene *Co-1* presentes na linhagem A193.

Para mancha-angular, apesar da grande importância dessa doença para o feijoeiro, poucos estudos com marcadores moleculares têm sido realizados. Dentro do programa de melhoramento visando resistência à mancha-angular do feijoeiro desenvolvido pelo BIOAGRO-UFV, foram identificados cinco marcadores RAPD ligados em fase de acoplamento aos genes de resistência de quatro fontes de resistência estudadas, AND-277, MAR-2, Cornell 49-242 e México 54. Para o gene presente na linhagem AND-277 foi identificado o marcador OPH13₄₉₀, ligado a uma distância de 5,5 cM (CARVALHO et al., 1998). O marcador OPE04₅₀₀ foi mapeado a uma distância de 5,8 cM do gene de MAR-2 (FERREIRA et al., 2000). Na variedade México 54 foram identificados três marcadores RAPD, OPN02₈₉₀, OPAC14₂₄₀₀ e OPE04₆₅₀ ligados, respectivamente, a 5,9, 6,6 e 11,8 cM de distancia do seu gene de resistência (SARTORATO et al., 2000). Para aumentar a reprodutibilidade do marcador OPN02₈₉₀, os autores converteram esse marcador RAPD em SCAR, denominando-o SCAR N02. NIETSCHKE et al. (2000a), estudando a variedade

Cornell 49-242, identificaram dois dos mesmos marcadores encontrados em México 54, OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀. Estes marcadores estão ligados, respectivamente, a uma distância de 3,2 e 12,5 cM do gene de resistência. CORRÊA et al. (2001) identificaram outros dois marcadores RAPD, OPM02₄₆₀ e OPAA19₆₀₀, ligados ao gene de resistência da variedade Ouro Negro, sugerindo a inclusão dessa fonte no programa de melhoramento.

A maioria dos marcadores identificados para feijão até o momento é do tipo RAPD, no entanto, novos marcadores como microssatélites, comumente usados em genética humana, tem ganhado popularidade entre os melhoristas e geneticistas de plantas (KELLY e MIKLAS, 1998).

1.9. Marcadores microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem em 1 a 5 nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões repetidas têm sido denominadas de microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementares a seqüências únicas que os flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é uma conseqüência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do SSR (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; AKKAYA et al., 1992, 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; McCOUCH et al., 1997; CREGAN et al., 1999). Segundo LEVINSON e GUTMAN (1987), essa variação no número de repetições pode ter originado de *crossing-over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*). Variações no número das repetições em tandem acumulam mais rapidamente na população que mutação de ponto e que os eventos de inserções/deleções responsáveis pelo

polimorfismo de outros marcadores moleculares (BROWN et al., 1996). Dessa forma, cada microssatélite, independente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (AKKAYA et al., 1992).

Os marcadores microssatélites foram primeiramente desenvolvidos em humanos (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989; TAUTZ, 1989) e, mais recentemente, têm recebido grande atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas. Vários estudos têm demonstrado que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores (BRUNEL, 1994). MORGANTE e OLIVIERI (1993) analisaram os dados do EMBL e do *GenBank* e estimaram uma freqüência de 1 microssatélite, considerando di- e trinucleotídeos, a cada 50 kb. Como os microssatélites são mais comumente encontrados fora de seqüências codificadoras e a proporção de clones de cDNA nos bancos de dados de plantas é alta, eles ressaltam a possibilidade de uma freqüência real muito maior que a encontrada. CARDLE et al. (2000) comprovaram esta possibilidade, mostrando que no genoma das plantas são encontrados 1 SSR a cada 6-7 kb.

A classe de SSR contendo dinucleotídeo mais encontrada no genoma de plantas é AT/TA, seguida por AG/TC e trinucleotídeos é TAT seguida por TCT (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Esses dados observados demonstram que a freqüência das classes de SSRs em plantas difere das espécies animais, onde as repetições de AC/TG são as mais abundantes e AT/TA as mais raras (LAGERCRANTZ et al., 1993; MORGANTE e OLIVIERI, 1993; McCOUCH et al., 1997). McCOUCH et al. (1997) ressaltam ainda que a freqüência das diferentes classes de SSR diminui a medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva, ou seja, quanto maior o número de nucleotídeos na unidade repetitiva do SSR menor é a sua freqüência dentro do genoma.

Marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas. Estes marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido a sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de seu uso, rapidez,

grande poder de resolução e altos níveis de polimorfismo (CREGAN et al., 1994; CHEN et al., 1997; GIANFRANCESCHI, et al., 1998; RALLO et al., 2000). Segundo FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1996), os microssatélites constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível hoje. PANAUD et al. (1996) demonstraram que marcadores SSR em arroz são quase duas vezes mais informativos que RFLP. Relatos recentes em soja têm descrito locos microssatélites com até 26 alelos. Esse alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados (AKKAYA, et al., 1995), além de distinguir germoplasmas intimamente relacionados (PANAUD et al., 1996). Segundo MORGANTE e OLIVIERI (1993), essa hipervariabilidade dos SSRs e conseqüentemente a possibilidade de utilizá-los em qualquer população segregante, os tornam marcadores ideais para estudo de ligação e de genética de população, bem como para mapeamento genético. A escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética, mas sim visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Os microssatélites também apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados em PCR, como o RAPD, porque são co-dominantes e facilmente reprodutíveis (MUDGE et al., 1997). A co-dominância torna esses marcadores mais informativos para análise de ligação (YU et al., 1999). Além dessas características, os SSRs parecem ter uma distribuição freqüente e aleatória, permitindo uma cobertura completa do genoma (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; YU et al., 1993; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; RALLO et al., 2000).

Essas características fazem desses marcadores ferramentas eficientes para mapeamento genômico, estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTL), análise de pedigree, seleção assistida por marcadores e análise de bibliotecas para clonagem de genes (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; RONGWEN et al., 1995; PANAUD et al., 1996; CHEN et al., 1997; McCOUCH et al., 1997).

Apesar das vantagens apresentadas, relativamente poucos marcadores microssatélites estão disponíveis para plantas (CHEN et al., 1997; McCOUCH et al., 1997). Segundo McCOUCH et al. (1997), a grande limitação da tecnologia está no desenvolvimento desses marcadores, pois envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo. No entanto, essa desvantagem é compensada pela facilidade e eficiência do uso desses marcadores pela comunidade. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com a facilidade e a rapidez típica da técnica de PCR.

A estratégia de desenvolvimento de microssatélite envolve construção de biblioteca genômica, hibridização com sondas contendo SSR e seqüenciamento dos clones hibridizados positivamente (BROWN et al., 1996). Devido ao alto custo e do trabalho empregado por essa técnica, tem sido sugeridas outras metodologias alternativas. Uma delas é a análise de seqüências dos bancos de dados, utilizando recursos computacionais (McCOUCH et al., 1997). A grande limitação desta metodologia reside na falta de seqüências disponíveis nos bancos (CARDLE et al., 2000). Uma outra possibilidade é o uso de *primers* desenhados para outras culturas, ou seja, *primers* heterólogos (BROWN et al., 1996). Segundo CREGAN et al. (1999), marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos também a partir de bibliotecas de cromossomos específicos, com o objetivo de obter marcadores em regiões específicas do genoma. Clones BAC (*bacterial artificial chromosomes*) e clones YAC (*yeast artificial chromosomes*) também têm sido utilizados como fonte de DNA com a mesma finalidade. CHEN et al. (1997) e McCOUCH et al. (1997) mencionaram que a construção de mapas saturados com microssatélites será mais eficiente se esses marcadores forem desenvolvidos complementarmente pela análise de bancos de dados e análise de diferentes tipos de bibliotecas, incluindo bibliotecas de pequenos ou grandes insertos, biblioteca com insertos digeridos com enzimas de restrição ou com corte mecânico, biblioteca genômica ou de cDNA, e biblioteca enriquecida.

Apesar do valor e da utilização dos marcadores microssatélites em diferentes espécies de plantas, em feijão, poucos marcadores foram identificados e disponibilizados para os pesquisadores. Nessa espécie, apenas 49 microssatélites potenciais foram identificados a partir de dados do *GenBank* (YU et al., 1998; 1999). Nesses trabalhos, microssatélites com repetições

AT/TA foram os mais freqüentes seguidos por aqueles com a repetição CT/AG. A distribuição de repetições com di-, tri- e tetranucleotídeos encontrada neste estudo foi semelhante ao já encontrado previamente, onde: (1) todas as repetições com dinucleotídeos foram encontradas apenas em regiões não codificadoras 5' e 3' e introns; (2) os trinucleotídeos foram identificados principalmente nas regiões codificadoras; e (3) a maioria dos tetranucleotídeos foi observada em regiões não codificadoras.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de gerar informações úteis a programas de melhoramento que visam a obtenção de variedades com características agronômicas e tipo de grão desejáveis e que sejam resistentes aos principais isolados de mancha-angular encontrados no Estado de Minas Gerais. Devido à necessidade de se incorporar, nos programas de melhoramento, marcadores com características de co-dominância e com maior informação genética, esse trabalho teve ainda o objetivo de desenvolver marcadores microssatélites para o feijão.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Definir o padrão de herança do(s) gene(s) de resistência presente(s) na linhagem BAT 332, em populações segregantes derivadas de cruzamentos feitos com a variedade Rudá, suscetível a várias raças do patógeno.
- 2) Identificar marcadores RAPD ligados ao(s) gene(s) de resistência presente(s) na linhagem BAT 332.
- 3) Identificar, por meio de testes de alelismo, a relação dos genes presentes nas variedades AND 277, MAR-2, México-54, Cornell 49242 e BAT 332, utilizadas como fontes de resistência do programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV.
- 4) Desenvolver microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro a partir de clones BAC.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F., SÉVIGNAC, M., BANNEROT, H., DRON, M. SCAR, RAPD, and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.865-870, 1994.
- AGRIANUAL 97. **Anuário da Agricultura Brasileira** São Paulo: Argos Comunicação, 1997. 435p.
- AGRIANUAL 99. **Anuário da Agricultura Brasileira** São Paulo: Argos Comunicação, 1999. 521p.
- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.133, p.1131-1139, 1992.
- AKKAYA, M.S., SHOEMAKER, R.C., SPECHT, J.E., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, v. 35, p.1439-1445, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p.125-133, 2001.
- ALZATE-MARIM, A.L., MENARIN, H., BAIA, G.S. PAULA-JR, T.J., SOUZA, K.A., COSTA, M.R., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the Co-4² gene. **Journal of Phytopathology**, v.149, p.259-264, 2001.

- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIN, H., CARVALHO, G.A., PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.89, n.4, p.281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIN, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a RAPD marker linked to the Co-6 anthracnose resistant gene in common bean cultivar AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.3, p.633-637, 2000.
- APARÍCIO, B.H.E. **Caracterizacion de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Universidad Del Valle, Facultad de Ciencias, 1998. 120p. (Trabajo de Grado) - Universidad Del Valle, 1998.
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the Co-4 resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.90, 2000.
- BARROS, O., CARDEÑOSA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p.3, 1957.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2001. 500p.
- BORÉM, A., CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**: Viçosa: Editora UFV, 1998. p.13-17.
- BROCK, R.D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.17, n.1, p.25-30, 1951.
- BROWN, A. H.D., GARVIN, D.F., BURDON, J.J. ABBOTT, D.C., READ, B.J. The effect of combining scald resistance genes on disease levels, yield and quality traits in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.3, p.361-366, 1996.
- BROWN, S.M., HOPKINS, M.S., MITCHELL, S.E. SENIOR, M.L., WANG, T.Y., DUNCAN, R.R., GONZALEZ-CANDELAS, F., KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.190-198, 1996.
- BRUNEL, D. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. **Plant Molecular Biology**, v.24, p.397-400, 1994.

- CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D. MACAULAY, M., MARSHALL, D., WAUGH, R. Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, v.156, p.847-854, 2000.
- CARDONA-ALVAREZ, C. Herencia de la resistencia a la mancha angular en frijol. **Agronomia Tropical**, v.18, p.330-331, 1962.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J.C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v.46, p.610-615, 1956.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L. NIETSCHÉ, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.
- CHEN, X., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, Y.G., McCOUCH, S.R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.553-567, 1997.
- 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 common bean. **Crop Science**, v.40, p.804-807, 2000.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHÉ, 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, n.1, p.27-32, 2001.
- CORREA-VICTORIA, F.J., PASTOR-CORRALES, M.A., SAETTLER, A.W. Angular leaf spot. In: SCHWARTZ, H.F. e PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds). **Bean production problems in the tropics**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 1989. p.59-75.
- CREGAN, P.B., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., RONGWEN, J. Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In: GRESSHOFF, P.M. **Plant genome analysis**. CRC Press, 1994. p.43-49.
- CREGAN, P.B., MUDGE, J., FICKUS, E.W., MAREK, L.F., DANESH, D., DENNY, R., SHOEMAKER, R.C. MATTHEWS, B.F., JARVIK, T., YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.919-928, 1999.
- EHDIAIE, B., BAKER, C.A. Inheritance and allelism for resistance to Russian wheat aphid in an Iranian spring wheat. **Euphytica**, v.107, p.71-78, 1999.

FALEIRO, F.G., NIETSCHE, 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, n.1, p.86-89, 2001.

FAOSTAT. Agriculture data. <http://www.fao.org>. 2002.

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

FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. NIETSCHE, S., PAULA-JR, T.J., A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2^a ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1996. 220p.

GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., SÉVIGNAC, M., ADAM-BLONDON, A.F., BANNEROT, H., GEPTS, P., DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.3/4, p.494-502, 1998.

GIANFRANCESCHI, L., SEGLIAS, N., TARCHINI, R. KOMJANC, M., GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.

GUPTA, S.K., MATHEW, K.A., SHYAM, K.R. SHARMA, A.K. Evaluation of Frenchbean germplasm against angular leaf spot. **Indian Phytopathology**, v.53, n.4, p.488-489, 2000.

GUZMÁN, P., GILBERTSON, R.L., NODARI, R. JOHNSON, W.C., TEMPLE, S.R., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v.85, n.5, p.600-607, 1995.

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

HALEY, S.D., AFANADOR, L.K., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.337-342, 1994b.

- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.505-512, 1993.
- HSAM, S.L.K., HUANG, X.Q., ERNST, F., HARTL, L., ZELLER, F.J. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 5. alleles at the *Pm1* locus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.8, p.1129-1134, 1998.
- HUANG, N., ANGELES, E.R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIVEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, n.3, p.313-320, 1997.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. <http://www.ibge.gov.br>. 2002.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion- phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.659-664, 1995.
- JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARIYARATHNE, H.M., STEADMAN, J.R., BEAVER, J.S., KAEPLER, S.M. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight and rust in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.794-803, 1996.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, v.30, n.3, p.461-465, 1995.
- 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.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, n.1, p.1-11, 1998.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., AFANADOR, L., HALEY, S.D. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v.37, p.15-16, 1994.
- LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H., ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.5, p.1111-1115, 1993.

- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v.4, p.203-221, 1987.
- LITT, M., LUTY, L.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- McCOUCH, S.R., CHEN, X., PANAUD, O., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, Y.G., HUANG, N., ISHII, T., BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.89-99, 1997.
- McDONALD, B.A., ALLARD, R.W., WEBSTER, R.K. Responses of two- three- and four-component barley mixtures to a variable pathogen population. **Crop Science**, v.28, p.447-452, 1988.
- MENDOZA, A., HERNÁNDEZ, F., HERNÁNDEZ, S., RUÍZ, D., VEGA, O.M., MORA, G., ACOSTA, J., SIMPSON, J. Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. **Plant Disease**, v.85, n.3, p.252-255, 2001.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review Phytopathology**, v.15, p.393-427, 1995.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy Science**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- 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.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v.27, n.4, p.685-689, 1997.
- MONDA, E.O., SANDERS, F.E., HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, v.50, p.103-110, 2001.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.
- MOURA, P.A.M., PAIVA, B.M., RESENDE, L.M.A. Aspectos econômicos da cultura do feijão. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.67-72, 1994.
- MUDGE, J., CREGAN, P.B., KENWORTHY, J.P., KENWORTHY, W.J., ORF, J.H., YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, v.37, p.1611-1615, 1997.

- NIETSCHKE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares para resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 74p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n.262, p.567-571, 1998.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000a.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA-JR, T.J., FERREIRA, C.F., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, v.117, p.77-84, 2001.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.273, p.567-572, 2000b.
- OLAVE, C.A. Resistencia de algunas variedades y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al *Isariopsis griseola* Sacc. **Acta Agronômica**, v. 8, p.197-219, 1958.
- PANAUD, O., CHEN, X., McCOUCH, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, v.252, p.597-607, 1996.
- PARK, S.O., COYNE, D.P., BOKOSI, J.M., STEADMAN, J.R. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. **Euphytica**, v.105, n.2, p.133-141, 1999a.
- PARK, S.O., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. Molecular markers linked to the Ur-7 gene. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.31-32, 1999b.
- PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O.A., ESTRADA, E.I., SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v.78, p.959-962, 1994.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C., SINGH, S.P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.

- PASTOR-CORRALES, M.A., PAULA-JR, T.J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: **Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 5,1996, Goiânia. Anais, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP-APA, v.1, p.23-41, 1996.
- PAULA-JR, T.J., NIETSCHE, S., CARVALHO, G.A., FERREIRA, C.F., BORÉM, A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à mancha-angular de cultivares de feijão recomendados para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.294, 1997.
- PAULA-JR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- PEDERSEN, W.L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**. v.26, p.369-378, 1988.
- RALLO, P., DORADO, G., MARTÍN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.984-989, 2000.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.435-449.
- RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B., PINTO, C.A.B.P. Alelismo múltiplo. In: **Genética na agropecuária**, São Paulo: Globo, 1995. p.131-146.
- RAVA, C.A., SARTORATO, A., CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, p.5-6, 1985.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.
- SANTOS, M.L., BRAGA, M.J. Aspectos econômicos. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**: Viçosa, Editora UFV, 1998. p.10-53.
- SANTOS-FILHO, H.P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.23, n.127, p.226-230, 1976.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.637-642, 2000.

- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Contribution to increase the usefulness of the present differential series for common bean angular leaf spot. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.19-20, 1999.
- SARTORATO, A., RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 300p.
- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.30, 1993. (Supplement).
- SCHAFER, J.F., ROELFS, A.P. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence. **Phytopathology**, v.75, n.7, p.749-750, 1985.
- SCHWARTZ, H.F., CORREA-VICTORIA, F., PINEDA, P.A., OTOYA, M. KATHERMAN, M.J. Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, v.65, n.6, p.494-496, 1981.
- SINGH, A.K., SAINI, S.S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v.29, n.175-176, 1980.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p.6463-6471, 1989.
- VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1984. 194p.
- VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais. **Experientiae**, v.4, p.1-68, 1964.
- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do feijoeiro**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1988. 231p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- VIEIRA, R.F., PAULA-JR, T.J. Sementes: veículo de disseminação de patógenos. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**: Viçosa: Editora UFV, 1998. p.451-505.
- WANG, Y., NELSON, R.L., HU, Y. Genetic analysis of resistance to soybean mosaic virus in four soybean cultivars from China. **Crop Science**, v.38, p.922-925, 1998.

- WEBER, J.L., MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p.388-396, 1989.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. A RAPD marker for the ARE anthracnose resistance gene in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.37, p.77-78, 1994.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v.80, n.6, p.650-654, 1996a.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers flanking the Are gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.37-41, 1996b.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three mayor anthracnose resistance gene in common bean. **Crop Science**, v.37, p.940-946, 1997.
- YOUNG, R.A., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.87-94, 1998.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.41, p.45-46, 1998.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v.42, p.27-34, 1999.
- YU, Y.G., SAGHAI MAROOF, M.A., BUSS, G.R., MAUGHAN, P.J., TOLIN, S.A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, v.84, n.1, p.60-64, 1993.

HERANÇA DA RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA PRESENTES NO CULTIVAR DE FEIJÃO BAT 332

RESUMO

A existência de variabilidade genética no germoplasma do feijoeiro quanto à resistência à mancha-angular permite o desenvolvimento de programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes a essa doença. A linhagem BAT 332 tem sido considerada como importante fonte de resistência. Com o objetivo de viabilizar e facilitar a incorporação de genes desta linhagem nos programas, determinou-se o padrão de herança da sua resistência e identificaram-se marcadores RAPD ligados a genes de resistência. Foram utilizadas populações F₁, F₂, RCs e RCr derivadas de cruzamentos entre BAT 332 e Rudá. Esta última é uma variedade comercial com grãos tipo carioca, suscetível à mancha-angular. A resistência de BAT 332 à raça 61.41 do patógeno foi comprovada. A análise da segregação das plantas indicou que um único gene dominante é responsável pela resistência nessa linhagem. Para a identificação de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência de BAT 332, utilizou-se a análise de *bulks* segregantes (BSA). Foram identificados dois marcadores ligados em acoplamento, OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀, os quais foram mapeados, respectivamente, a 5,83 e 5,10 cM de distância do gene de resistência. Estes marcadores moleculares são importantes para melhoristas e geneticistas de feijão como fonte de informação genética e para uso de seleção assistida em programas de melhoramento.

Palavras-Chave: Herança da resistência; melhoramento do feijoeiro; marcadores moleculares; *Phaeoisariopsis griseola*.

1. INTRODUÇÃO

A alta incidência de doenças no feijoeiro tem sido considerada um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade dessa cultura no Brasil. Dentre as doenças mais importantes do feijão, a mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, tem sido apontada como a mais importante da parte aérea, causando sérios prejuízos, especialmente durante os meses de abril a julho, quando são observadas temperaturas amenas e ocorrência de orvalho (PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998). O fungo ataca hastes, folhas e vagens (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956). Os sintomas da mancha-angular são bastante característicos nas folhas trifolioladas, as quais apresentam manchas que se originam na face inferior dos folíolos, a princípio cinzentas e que se tornam pardas, sem bordas coloridas. Nessas lesões, na face inferior da folha, aparecem pontos negros muito pequenos que são as estruturas reprodutivas do patógeno (sinêmios). Delimitadas pelas nervuras, as lesões têm conformação nitidamente angular, motivando o nome comum da doença. É comum a união de várias lesões numa mesma folha, o que causa necrose parcial, amarelecimento das folhas e por fim, sua queda prematura. Nas vagens, as manchas têm tamanhos e conformações variáveis, mas são geralmente circulares ou ovais, pardo-avermelhadas, e podem apresentar bordas mais escuras. Quando numerosas, coalescem, cobrindo boa porção da vagem. Vagens infectadas apresentam sementes pouco desenvolvidas. No caule e nos pecíolos as lesões são pardo-avermelhadas e alongadas (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956; VIEIRA, 1994; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998).

Até o final da década de 80, a mancha-angular no Brasil era considerada doença de pequena importância econômica. A doença não causava danos apreciáveis porque só aparecia no final do ciclo da cultura, quando a produção já estava praticamente garantida (VIEIRA, 1994). Atualmente, a mancha-angular tem causado danos significativos na cultura. Segundo LACERDA et al. (1994), têm sido estimadas perdas de até 70% na produção, quando variedades suscetíveis são cultivadas em condições ambientais favoráveis ao patógeno. Além disso, a qualidade, o valor de mercado e a adequação das

sementes para transporte e uso nas regiões produtoras de feijão podem ser severamente afetadas (PASTOR-CORRALES et al., 1998).

O uso de variedades resistentes tem sido apontado como a principal alternativa para combater essa doença. No entanto, quase todas as variedades plantadas no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular (VIEIRA, 1994; FALEIRO et al., 2001). Diferentes fontes de resistência à mancha-angular vêm sendo identificadas a mais de 45 anos. A existência de variabilidade genética no germoplasma do feijoeiro quanto à resistência à mancha-angular, permite o desenvolvimento de programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes a essa doença (RAMALHO e ABREU, 1998).

A linhagem BAT 332 tem sido identificada como uma fonte potencial de resistência para mancha-angular não apenas para o estado de Minas Gerais, mas também para outros estados (NIETSCHE et al., 2000b). A caracterização genética dessa linhagem é de interesse para programas de melhoramento do feijoeiro que objetiva transferir essa resistência para variedades comerciais. As estratégias de melhoramento para resistência à mancha-angular, segundo PASTOR-CORRALES et al. (1998), são viabilizadas e facilitadas pela determinação da herança da resistência nos acessos mais promissores e nas linhagens melhoradas e, posterior, marcação do gene ou identificação de marcadores moleculares.

Visando dar subsídios aos programas de melhoramento, no presente trabalho, estudou-se o padrão de herança do(s) gene(s) de resistência presente(s) na linhagem BAT 332, em população segregante derivada de cruzamentos feitos com a variedade Rudá, suscetível a raça 61.41 do patógeno. Marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a esta resistência foram identificados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais genéticos e cruzamentos

Os materiais genéticos utilizados foram fornecidos pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) e pelo programa de melhoramento do feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa. A linhagem BAT 332 (genitor masculino) foi cruzada com a variedade comercial Rudá, suscetível à mancha-angular. Parte das sementes F_1 foi plantada e as plantas F_1 retrocruzadas com BAT 332 (RCr) e com Rudá (RCs). As sementes F_1 remanescentes foram plantadas e autofecundadas para obtenção de sementes F_2 . As sementes utilizadas foram plantadas em vasos contendo 3 kg de solo. Em cada vaso foram semeadas duas sementes e as plantas irrigadas diariamente. Todos os cruzamentos e retrocruzamentos foram conduzidos em casa-de-vegetação.

2.2. Isolados e preparo do inóculo

A raça de *Phaeoisariopsis griseola* usada no estudo de herança do gene de resistência de BAT 332 foi selecionada com base em um teste preliminar, optando-se pelo patótipo 61.41. Para assegurar a pureza genética, o isolado foi obtido de cultura monospórica, mantido em placa de petri ou tubo de ensaio contendo meio V8. Para a manutenção do fungo, foi obtido, de cada tubo contendo a cultura monospórica do patógeno, uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de 2 mL de água estéril. Foi espalhado 0,5 mL dessa suspensão em placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, no escuro, a 24 °C. Em geral, 10 a 15 dias foram suficientes para obter abundante esporulação em meio V8 e ausência de luz (APARÍCIO, 1998). Segundo KARANJA et al. (1994), na ausência de luz ocorre maior produção de esporos.

A suspensão de conídios para inoculação foi preparada adicionando-se água destilada e raspando-se suavemente a superfície do meio com o auxílio de uma espátula. A suspensão de esporos resultante foi filtrada em gaze e ajustada para a concentração final de 2×10^4 conídios/mL.

2.3. Inoculação e avaliação da doença

Foram plantadas 30 sementes de cada genitor, 30 sementes F₁, 190 sementes F₂ e 60 sementes de cada retrocruzamento (RCr e RCs), em casa-de-vegetação. Quinze dias após o plantio (estádio V3), as plantas foram inoculadas com a suspensão de 2 x 10⁴ conídios/mL de *P. griseola*. Aplicou-se a suspensão em ambas as faces, abaxial e adaxial, das folhas, com auxílio de um atomizador De Vilbiss, acionado por um compressor elétrico, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram então incubadas por um período de 48 horas numa câmara úmida (RIBEIRO et al., 1993; LACERDA et al., 1994), mantida a 20-22°C e 100% de umidade relativa. Após as 48 horas, as plantas foram aclimatadas à temperatura ambiente durante a noite e então transferidas para casa-de-vegetação.

A avaliação da doença foi realizada visualmente aos 18 e 23 dias após inoculação, usando-se uma escala de severidade de nove graus (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987). Nesta escala, 1 representa ausência de sintomas visíveis (imunidade); 3, presença de poucas e pequenas lesões sem esporulação; 5, presença de várias lesões, geralmente pequenas, com esporulação limitada; 7, lesões abundantes, geralmente grandes com esporulação, que podem se juntar formando tecido clorótico; 9, tecidos cloróticos que ocasiona desfolha (extrema suscetibilidade).

Plantas F_{2:3} foram inoculadas para identificar plantas F₂ homozigotas e para esclarecer a resposta de resistência ou suscetibilidade nas plantas F₂ que apresentaram notas intermediárias.

2.4. Identificação de marcadores RAPD

2.4.1. Extração e amplificação do DNA

Dois folíolos de cada planta F₂ derivada do cruzamento de BAT 332 e Rudá foram coletados. Estes foram embalados em papel alumínio, devidamente identificados e armazenados a -80 °C para posterior extração de DNA. A extração foi efetuada com base na metodologia de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações. O DNA extraído foi amplificado, sendo que cada reação de amplificação de 25 µL continha 25 ng de DNA; 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,0 mM de MgCl₂;

10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 μ M de *primer*, e uma unidade de Taq polimerase. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador, de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde a 35 °C, por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72 °C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, foi realizada uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo 10 mg/mL de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

2.4.2. Construção e avaliação dos *bulks*

Foram plantadas 20 sementes F_3 , derivadas de cada uma das plantas F_2 resistentes selecionadas, com o objetivo de identificar plantas F_2 homozigotas resistentes para serem utilizadas nos *bulks*. As plantas $F_{2:3}$ foram inoculadas com o fungo, da maneira descrita no item 2.3. Após verificação da homozigose dos indivíduos resistentes, os *bulks* foram construídos e testados de acordo com a metodologia proposta por MICHELMORE et al. (1991). Cada *bulk* continha indivíduos selecionados por apresentarem genótipos idênticos para resistência ou suscetibilidade e aleatórios para outros genes não ligados. Foram usados oito indivíduos resistentes para o *bulk* resistente e oito indivíduos suscetíveis para o *bulk* suscetível.

2.5. Análise estatística

A análise estatística conduzida para a interpretação dos dados do estudo da herança da resistência de BAT 332 à mancha-angular foi o teste de qui-quadrado. O mesmo teste foi usado para confirmar a segregação mendeliana entre bandas heteromórficas e o fenótipo de resistência das plantas. As estimativas das frequências de recombinação e das distâncias genéticas entre as bandas RAPD heteromórficas foram realizadas com auxílio do programa GQMOL (CRUZ e SCHUSTER, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Herança da resistência de BAT 332

A escolha da raça de *P. griseola* a ser utilizada na caracterização de BAT 332 foi realizada inoculando-se plantas desta linhagem com um conjunto de patótipos (dados não mostrados). O isolado 116-1, previamente classificado como raça 61.41, foi escolhido por apresentar reações fenotípicas distintas entre BAT 332 e Rudá, os genitores da população em estudo. Além disso, esse isolado é bastante agressivo, infectando cinco das seis variedades diferenciadoras mesoamericanas e três das seis andinas.

A resistência da linhagem BAT 332 à raça 61.41 de *P. griseola* foi confirmada, em condições de casa-de-vegetação. A natureza dessa resistência foi determinada após a análise da segregação fenotípica das populações F_1 , F_2 , RCs e RCr provenientes do cruzamento de BAT 332 e a variedade Rudá, suscetível ao fungo. Plantas que apresentaram notas de 1 a 4 foram consideradas resistentes, de 5 e 6 intermediárias e de 7 a 9 suscetíveis. Progênies $F_{2:3}$ provenientes das plantas F_2 com notas intermediárias foram inoculadas e avaliadas. Os dados obtidos permitiram definir se essas plantas F_2 possuíam ou não o gene de resistência. Após análise da segregação da progênie $F_{2:3}$, todas as plantas F_2 foram classificadas como resistente ou suscetível.

Na população F_2 , das 175 plantas avaliadas, 128 se comportaram como resistentes e 47 como suscetíveis (Tabela 1). BAT 332 se manteve resistente, enquanto Rudá foi severamente infectada, apresentando lesões com abundante esporulação e folíolos secos ou apresentando alto grau de amarelecimento. As frequências observadas e esperadas para as reações de resistência e suscetibilidade a *P. griseola* nos genitores Rudá e BAT 332 e nas populações derivadas dos cruzamentos entre eles estão descritas na Tabela 1. As segregações obtidas sugerem que um único gene dominante é responsável pela resistência de BAT 332 à raça 61.41 de *P. griseola*.

TABELA 1. Segregação da resistência à raça 61.41 de *P. griseola* no cruzamento Rudá x BAT 332

População ^a	Nº de plantas		Proporção esperada ^b	χ^2	Probabilidade (%)
	R	S			
Rudá	0	27	0:1		
BAT 332	27	0	1:0		
F ₁	27	0	1:0		
F ₂	128	47	3:1	0,3219	57,0465
RCs	33	29	1:1	0,2580	61,1452
RCr	56	0	1:0		

^a População proveniente do cruzamento entre o genótipo resistente BAT 332 e o suscetível Rudá

^b Proporção Resistente : suscetível

Estudos de herança das principais fontes de resistência do feijoeiro a *P. griseola* tem demonstrado que esta característica é atribuída a um, dois ou três genes, em alguns casos dominantes e em outros recessivos. BARROS et al. (1957) observaram que, na maioria dos cruzamentos simples, a resistência à mancha-angular era recessiva e controlada por dois ou três genes independentes e que, em poucos cruzamentos, a resistência era dominante. Resistência monogênica e recessiva foi encontrada na variedade Caraota 260 (SANTOS-FILHO et al., 1976) e na linhagem de *Phaseolus coccineus* PLB 257 (SINGH e SAINI, 1980). SARTORATO et al. (1993) observaram que no cruzamento com as variedades suscetíveis Rosinha G-2 e Caraota 260, a resistência de Cornell 49-242 era controlada por um gene dominante. Herança monogênica e dominante também foi observada nos genótipos AND 277 (CARVALHO et al., 1998), MAR-2 (FERREIRA et al., 2000), Cornell 49-242 (NIETSCHKE et al., 2000a), México-54 (SARTORATO et al., 2000) e Ouro Negro (CORRÊA et al., 2001).

No presente trabalho, foi demonstrado que a linhagem BAT 332 também é uma fonte de resistência para mancha-angular com uma herança de resistência monogênica e dominante para a raça 61.41 de *P. griseola*. A existência de um único gene controlando a resistência de BAT 332 à mancha-angular facilitará grandemente a transferência desse gene para variedades elites em programas de retrocruzamentos e piramidação. Testes de alelismo devem ser realizados no futuro para verificar se esse gene de resistência dominante segrega

independentemente de outros já caracterizados, para que ele possa ser incorporado em programas de melhoramento.

3.2. Identificação de marcadores RAPD

Visando dar subsídios a programas de melhoramento com seleção assistida, foram identificados marcadores moleculares do tipo RAPD ligados ao gene de resistência presente em BAT 332. A população utilizada para esta análise foi a F₂ proveniente do cruzamento Rudá x BAT 332. Dos 739 *primers* analisados 374 apresentaram polimorfismo entre os genitores Rudá e BAT 332. O *primer* OPAO12 (TCCCGGTCTC) amplificou uma banda de DNA, que, quando testada nos indivíduos F₂ formadores dos *bulks*, estava presente em todos os indivíduos resistentes e ausente em todos os indivíduos suscetíveis (Figura 1). O marcador identificado corresponde a um fragmento de 950 pb ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência à mancha-angular. Um segundo marcador foi identificado, OPAA07 (CTACGCTCAC). Este *primer* gerou uma banda de 950 pb, presente nos indivíduos resistentes e ausente nos suscetíveis (Figura 2).

A análise da segregação do gene que confere resistência à mancha-angular presente na variedade BAT 332 e dos dois marcadores identificados, está apresentada na Tabela 2. Foi observada uma co-segregação entre o loco de resistência e os dois marcadores testados. Por meio da análise de recombinação, demonstrou-se que o marcador OPAO12₉₅₀ está ligado a 5,83 cM de distância do gene de resistência, com um *lod score* calculado de 28,20. O marcador OPAA07₉₅₀ foi mapeado a 5,10 cM do gene, com *lod score* de 29,16. O mapa mostrando a posição relativa dos marcadores e do gene de resistência está representado na Figura 3.

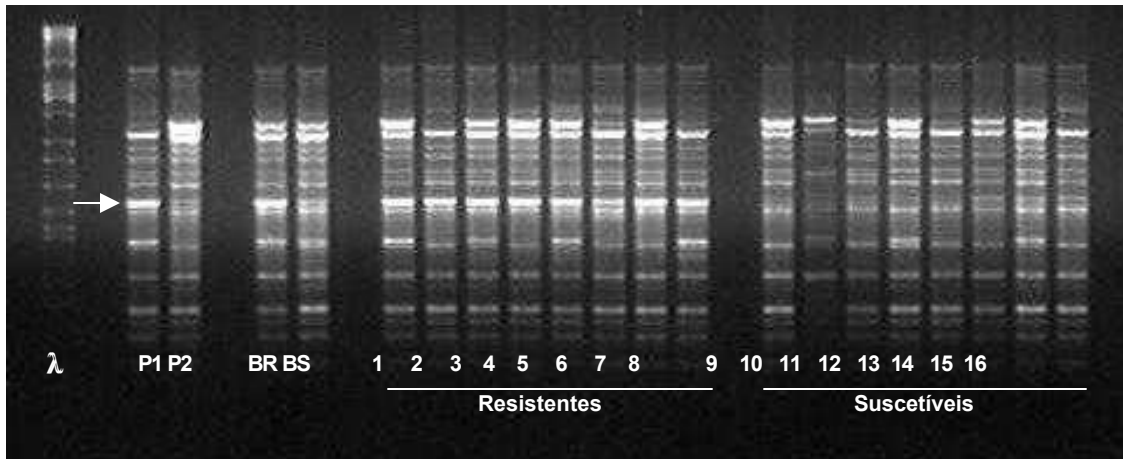


FIGURA 1. Análise eletroforética dos produtos amplificados com o *primer* RAPD OPAO12. P1 corresponde ao genitor resistente BAT 332; P2, ao genitor suscetível Rudá; BR, *bulk* resistente; BS, *bulk* suscetível; linhas de 1 a 8, plantas F₂ resistentes; linhas 9 a 16, plantas F₂ suscetíveis. A seta indica o marcador OPAO12₉₅₀. λ corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*.

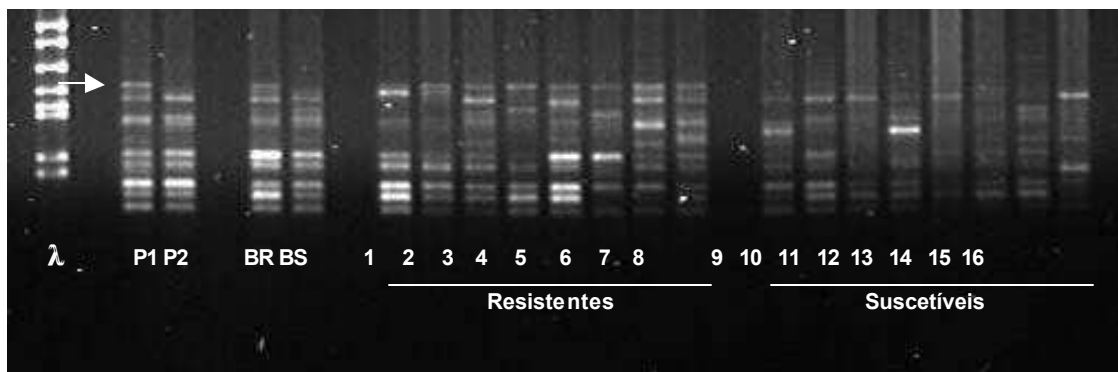


FIGURA 2. Análise eletroforética dos produtos amplificados com o *primer* RAPD OPAA07. P1 corresponde ao genitor resistente BAT 332; P2, ao genitor suscetível Rudá; BR, *bulk* resistente; BS, *bulk* suscetível; linhas de 1 a 8, plantas F₂ resistentes; linhas 9 a 16, plantas F₂ suscetíveis. A seta indica o marcador OPAA07₉₅₀. λ corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*.

TABELA 2. Análise da segregação do gene que confere resistência ao patótipo 61-41 de *P. griseola* e dos marcadores OPAO12 e OPAA07 nas plantas F₂ derivadas do cruzamento Rudá x BAT 332

Loco testado	Proporção esperada	Proporção observada	χ^2	Probabilidade (%)	cM ^c
R	3:1 ^a	128:47	0,322	57,0465	
OPAO12	3:1	128:47	0,322	57,0465	
OPAA07	3:1	129:46	0,154	69,4473	
R/OPAO12	9:3:3:1 ^b	123:5:5:42	141,4952	0	5,83
R/OPAA07	9:3:3:1	124:4:5:42	143,7301	0	5,10

^a Proporção esperada para herança monogênica e dominante na progênie F₂ (3 resistente, R₋, ou presença de banda : 1 suscetível, rr, ou ausência de banda).

^b Proporção esperada para a segregação de dois locos independentes na progênie F₂ (R₋/+:R₋/-:rr/+:rr/-).

^c Distância genética em centimorgans.

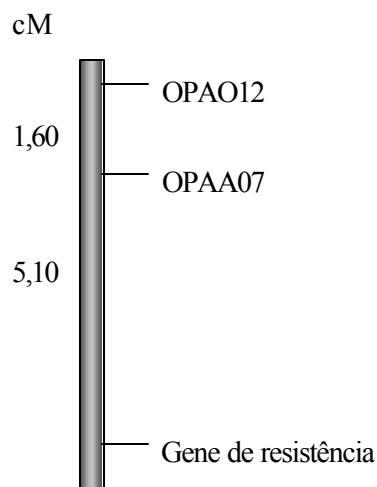


FIGURA 3. Posições relativas e distâncias genéticas entre os marcadores OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀ e o gene que confere resistência à mancha-angular presente em BAT 332.

Marcadores moleculares têm sido considerados importantes ferramentas para a seleção assistida em programas de melhoramento de plantas (KELLY, 1995). Além da importância na seleção indireta, os marcadores são de grande utilidade na análise genômica e estudo de evolução e clonagem de genes (CREGAN et al., 1999). Assim, marcadores moleculares são importantes para melhoristas como uma fonte de informação genética e para uso na seleção indireta de características ligadas ao marcador. O uso de marcadores visando resistência a doenças oferece uma vantagem adicional de permitir seleção para resistência na ausência do patógeno ou de um variante do patógeno (KELLY, 1995). Segundo KELLY e MIKLAS (1998), a identificação de genes de resistência pode ser limitada pelas técnicas de inoculação e avaliação tradicionais. A presença de certas combinações de genes não pode ser detectada porque discriminações de raças do patógeno não estão disponíveis aos melhoristas. Mesmo quando os patótipos estão disponíveis, a identificação de linhagens que apresentam diferentes genes de resistência é limitada pela dificuldade de realização de testes de inoculação com diferentes patógenos em um mesmo indivíduo e pelo efeito epistático desses genes. Os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência possibilitam a identificação dessas linhagens, bem como facilitam a pirâmidação desses genes em variedade de interesse (ALZATE-MARIN et al, 2001).

Em feijão, têm sido identificados vários marcadores moleculares associados aos genes que conferem resistência a doenças. Para mancha-angular, apesar da sua grande importância, poucos estudos de marcadores moleculares têm sido realizados. Dentro do programa de melhoramento visando resistência à mancha-angular do feijoeiro desenvolvido pelo BIOAGRO-UFV, foram identificados cinco marcadores RAPD. Estes marcadores estão ligados em fase de acoplamento aos genes de resistência de quatro fontes de resistência utilizadas nesse programa, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e México 54. Foi identificado o marcador OPH13₄₉₀ ligado a 5,5 cM do gene de resistência da linhagem AND 277 (CARVALHO et al., 1998) e o marcador OPE-04₅₀₀ ligado ao gene de resistência de MAR-2 a 5,8 cM (FERREIRA et al., 2000). SARTORATO et al. (2000), mapearam os marcadores RAPD OPN02₈₉₀, OPAC14₂₄₀₀ e OPE04₆₅₀ a uma distância de 5,9, 6,6 e 11,8 cM, respectivamente, do gene de México-54. NIETSCHE et al.

(2000a), estudando a variedade Cornell 49-242, identificaram dois dos mesmos marcadores encontrados em México 54, OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀. Estes marcadores estão ligados, respectivamente, a uma distância de 3,2 cM e 12,5 cM do gene de resistência. Mais recentemente, CORRÊA et al. (2001) identificaram outros dois marcadores RAPD, OPM02₄₆₀ e OPAA19₆₀₀, ligados ao gene de resistência de Ouro Negro e sugeriram a inclusão dessa fonte no programa de melhoramento.

Foi sugerida previamente a inclusão da variedade BAT 332 no programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV (NIETSCHE et al., 2000b). Essa fonte de resistência tem uma especial importância por apresentar uma resistência complementar as outras fontes do programa. Os marcadores OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀, identificados no presente trabalho, podem auxiliar a incorporação da resistência desse genótipo, em variedades de interesse. Esses marcadores foram testados nas cinco fontes de resistência e a banda só foi amplificada em BAT 332 (dados não mostrados). Este resultado demonstra a especificidade dos marcadores ao gene de BAT 332, facilitando a identificação desse gene quando as fontes forem cruzadas e os diferentes genes combinados. Os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à mancha-angular podem facilitar grandemente a incorporação de genes que conferem resistência a diferentes raças, permitindo a piramidação desses genes em um mesmo *background* genético. Isso é possível porque esses marcadores não são afetados pelo ambiente e pelas interações epistáticas típicas dos genes de resistência.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p.125-133, 2001.
- APARÍCIO, B.H.E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Universidad Del Valle, Facultad de Ciencias, 1998. 120p. (Trabajo de Grado) - Universidad Del Valle, 1998.
- BARROS, O., CARDEÑOSA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p.3, 1957.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J.C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v.46, p.610-615, 1956.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L. NIETSCHÉ, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHÉ, 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, n.1, p.27-32, 2001.
- CREGAN, P.B., MUDGE, J., FICKUS, E.W., MAREK, L.F., DANESH, D., DENNY, R., SHOEMAKER, R.C. MATTHEWS, B.F., JARVIK, T., YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.919-928, 1999.
- CRUZ, C.D, SCHUSTER, I. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHÉ, 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, n.1, p.86-89, 2001.

- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. NIETSCHÉ, S., PAULA-JR, T.J., A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.
- KARANJA, T.W., MWANG'OMBE, A.W., MIBEY, R.K. The effect of media and light regimes on cultural and morphological characteristics and sporulation of *Phaeoisariopsis griseola* deighton. **East African Agricultural Forestry Journal**, v.59, n.3, p.241-251, 1994.
- KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, v.30, n.3, p.461-465, 1995.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, n.1, p.1-11, 1998.
- LACERDA, J.T., COELHO, R.S.B., MARIANO, R.L.R., MENEZES, M. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n.2, p.93-96, 1994.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy Science**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000a.
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.273, p.567-572, 2000b.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C., SINGH, S.P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p. 161-171, 1998.
- PAULA-JR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.435-449.

- RIBEIRO, M.J., COELHO, R.S.B., MENEZES, M.A. Fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc). **Caderno Omega Universidade Federal de Pernambuco Série Agronomia**, n. 4, p. 243-246, 1993.
- SANTOS-FILHO, H.P., FERRAZ, S., VIEIRA, C. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v.23, n.127, p.226-230, 1976.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.637-642, 2000.
- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.30, 1993. (Supplement).
- SINGH, A.K., SAINI, S.S. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v.29, n.1, p.175-176, 1980.
- VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evaluación de Germoplasma de Frijol**. Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- WILLIAMS, J.G.K, KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

TESTE DE ALELISMO PARA GENES DO FEIJOEIRO QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO FUNGO *Phaeoisariopsis griseola*.

RESUMO

A mancha-angular causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* tem sido apontada como uma das principais doenças do feijoeiro. A extensa variabilidade genética desse patógeno implica na necessidade de desenvolvimento constante de novas variedades resistentes. Fontes de resistência têm sido identificadas e caracterizadas. Para Minas Gerais foram encontradas cinco principais fontes de resistência: México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e BAT 332. Foram realizados estudos independentes da caracterização dessas cinco variedades, encontrando-se herança monogênica dominante para todas elas. No entanto, nenhuma análise conjunta foi conduzida para entender a relação e a independência desses genes de resistência. Para elucidar essa questão, no presente trabalho, foram conduzidos testes de alelismo entre as cinco fontes de resistência. Os dados obtidos evidenciaram uma maior complexidade que a encontrada nos estudos de herança realizados anteriormente. Foi demonstrado que Cornell 49-242 possui apenas um gene dominante, propondo-se a denominação de *Phg-3*; México 54 possui três genes, denominados de *Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*. Em MAR-2 foram encontrados dois genes, um independente designado *Phg-4* e outro, uma forma alélica de *Phg-5*, denominado de *Phg-5²*. Formas alélicas também foram encontradas em BAT 332, *Phg-6²* e em AND 277, *Phg-2²*, *Phg-3²* e *Phg-4²*. Esses resultados são de especial importância para programas de melhoramento cujo objetivo é a piramidação de genes de resistência. Entendendo a relação entre os genes, o melhorista tem a oportunidade de escolher os genitores para seu programa de forma a obter variedade com o maior número e melhor combinação possível de genes de resistência.

Palavras-Chave: Feijão; mancha-angular; teste de alelismo; resistência a doenças; piramidação.

1. INTRODUÇÃO

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, tem sido considerada uma das principais doenças do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em regiões tropicais e sub-tropicais do mundo (CORREA, 1987). A doença é favorecida pelas condições intermitentes de frio e calor, e de seca e umidade (PASTOR-CORRALES et al., 1998). Temperaturas entre 16 e 28°C, com um ótimo em 24°C, e alta umidade são condições favoráveis à infecção. Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece sua disseminação. Verificou-se que os esporos são liberados na atmosfera seca e prontamente disseminados pelo vento (VIEIRA, 1994). Quando as condições são favoráveis, podem haver perdas consideráveis na produção. Tem sido citado na literatura perdas de até 80% (SCHWARTZ et al., 1981). Dentre os métodos de controle disponíveis para esta doença, o principal, sobretudo pela eficiência, pela economicidade e pelo menor prejuízo ao meio ambiente, é o uso de variedades resistentes (GEFFROY et al., 1998; PASTOR-CORRALES et al., 1998; RAMALHO e ABREU, 1998).

A extensa variabilidade de *P. griseola* no Brasil, particularmente em Minas Gerais, tem sido um desafio aos programas de melhoramento do feijoeiro para resistência à mancha-angular (PASTOR-CORRALES e PAULA-JR, 1996; PAULA-JR e ZAMBOLIM, 1998; APARÍCIO, 1998; NIETSCHKE et al., 2001). Esta alta variabilidade e o contínuo aparecimento de novas raças fazem com que a resistência genética do hospedeiro seja “quebrada”. Isso implica que a resistência obtida nem sempre é duradoura ou eficiente (YOUNG et al., 1998; RAMALHO e ABREU, 1998). Uma estratégia para aumentar a durabilidade da resistência de um patógeno, seria combinar ou introduzir diferentes genes de resistência em uma única variedade (McDONALD et al., 1988; HUANG et al., 1997; KELLY e MIKLAS, 1998), estratégia esta denominada de piramidação. Esta estratégia de melhoramento que visa resistência estável requer, portanto, contínua avaliação de germoplasma e eventual introgressão de diferentes e novos genes de resistência em cultivares comerciais (YOUNG e KELLY, 1996a).

Fontes de resistência têm sido identificadas em vários países, incluindo o Brasil (BROCK, 1951; OLAVE, 1958; RAVA et al., 1985; PASTOR-CORRALES e PAULA-JR, 1996; APARÍCIO, 1998; GUPTA et al., 2000). Em Minas Gerais, NIETSCHE et al. (1998) inocularam alguns genótipos de feijoeiro com 30 isolados de *P. griseola* (13 raças) e identificaram as variedades México 54, AND 277, MAR-2 e Cornell 49-242 como boas fontes de resistência. Além destas, NIETSCHE et al. (2000b) identificaram outra importante fonte, BAT 332, que apesar de não ser resistente a muitas raças, apresenta resistência a alguns isolados, os quais são virulentos para Cornell 49-242, sugerindo, uma complementaridade de resistência. Esta complementaridade, segundo os autores, faz com que a combinação dos genes dessas duas variedades resulte em um genótipo com resistência aos principais patótipos de *P. griseola*.

Estas potenciais fontes de resistência à mancha-angular, México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e BAT 332, foram escolhidas para serem estudadas no presente trabalho. Têm sido conduzidos estudos independentes da caracterização genética dessas variedades. Segundo CARVALHO et al. (1998), um fator dominante monogênico presente no genótipo AND 277 é responsável pela sua resistência à raça 63.23 de *P. griseola*. Herança dominante e monogênica também foi encontrada para MAR-2 à raça 63.39 (FERREIRA et al., 2000), para México 54 à raça 63.19 (SARTORATO et al., 2000), para Cornell 49-242 à raça 31.17 (NIETSCHE et al., 2000a) e para BAT 332 à raça 61.41 (primeiro capítulo deste trabalho). No entanto, nenhum estudo conjunto foi conduzido para entender a relação e a independência desses genes.

No presente trabalho, testes de alelismo foram realizados com o objetivo de estudar a relação existente entre fatores de resistência presente nas cinco fontes de resistência previamente caracterizadas. A utilização de diferentes cruzamentos e diferentes patótipos demonstrou uma complexidade muito maior que a reportada anteriormente na caracterização da herança da resistência desses genótipos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais genéticos e cruzamentos

Os materiais genéticos utilizados foram fornecidos pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) e pelo programa de melhoramento do feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa.

Algumas das características dos genótipos utilizados neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Principais características dos genótipos estudados no teste de alelismo

Variedades	Flor	Centro de Origem	Tipo de grão	Tamanho da semente
BAT 332	Roxa	Mesoamericano	Mulatinho	Pequena
México 54	Roxa	Mesoamericano	Mulatinho	Média
Cornell 49-242	Roxa	Mesoamericano	Preto	Pequena
MAR-2	Branca	Mesoamericano	Carioca	Média
AND 277	Rosa	Andino	Manteigão	Grande

As variedades, Cornell 49-242, México 54, AND 277, MAR-2, e BAT 332, foram cruzadas entre si. Sementes F_1 foram plantadas e autofecundadas para obtenção de sementes F_2 . As populações segregantes F_2 foram usadas para o teste de alelismo (Tabela 2). Para assegurar que as plantas F_1 de cada cruzamento foram realmente resultado de cruzamento e não de autofecundação, analisou-se a cor e o tamanho das sementes F_2 . A segregação destas características foi nítida, como observado na Figura 1.

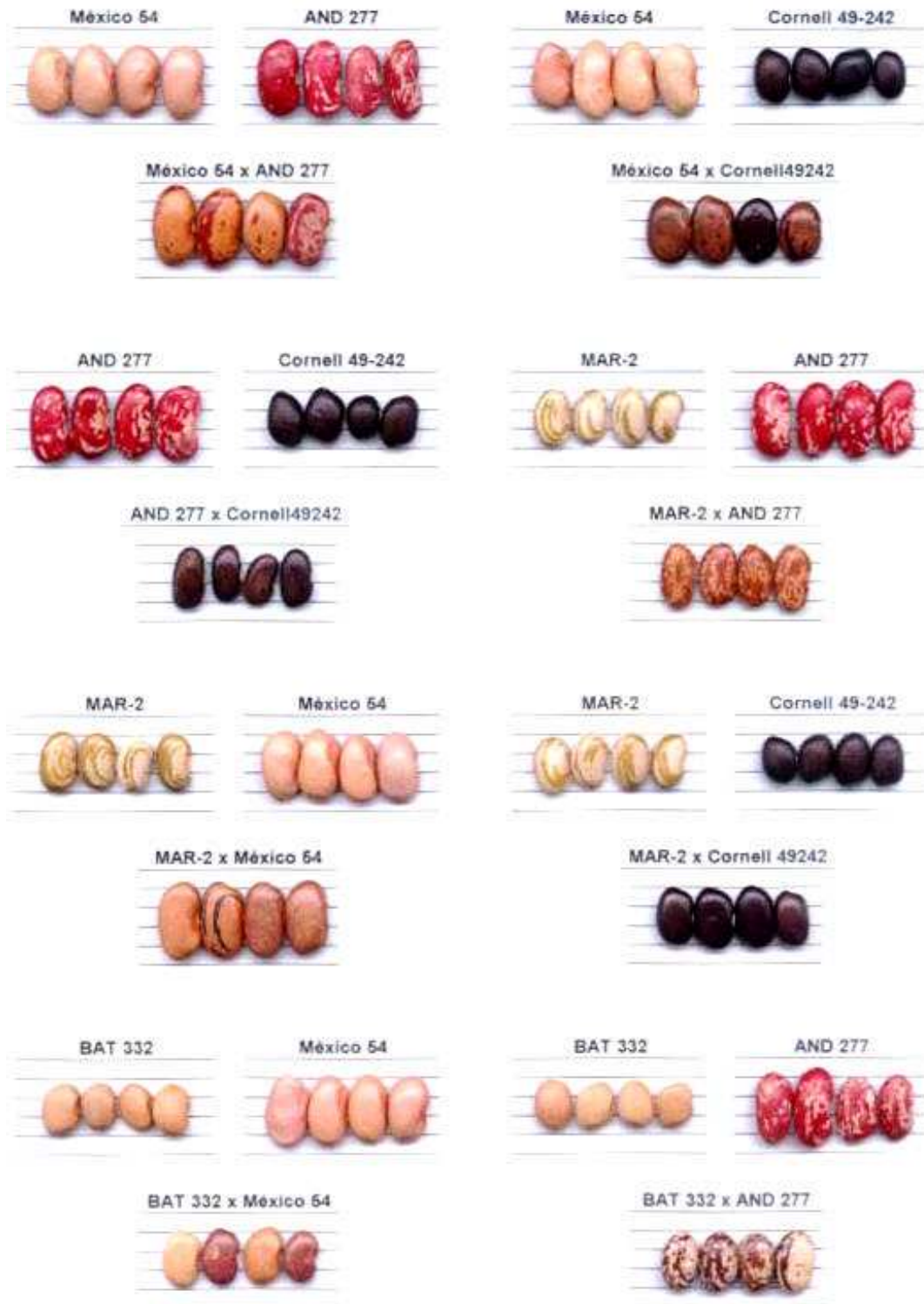


Figura 1. Sementes dos genitores e de indivíduos das populações F_2 correspondentes.

2.2. Isolados e preparo do inóculo

Os isolados utilizados no trabalho pertencem à micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro Comum do BIOAGRO/UFV. Foram usadas as raças 63.23, 63.39, 63.19, 31.17 e 61.41 de *P. griseola*, conforme a Tabela 2. As raças escolhidas foram as mesmas utilizadas para o estudo da herança de cada fonte de resistência (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA et al., 2000; NIETSCHE et al., 2000a; SARTORATO et al., 2000). As fontes de resistência foram inoculadas com as cinco raças de *P. griseola* e com base nas diferentes reações fenotípicas observadas nestes genótipos, foram escolhidas as raças para serem inoculadas nas populações F₂. Para cada cruzamento, foram usadas as raças que deram uma resposta de resistência para os dois parentais.

Os isolados foram obtidos de cultura monospórica, mantida em placa de petri ou tubo de ensaio contendo meio V8 (Campbell Soup Company, EUA). Para a manutenção desses fungos em laboratório, foram adicionados 2 mL de água estéril em cada tubo contendo a cultura do patógeno, obtendo-se uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio. Foram depositados 0,5 mL dessa suspensão no centro de placas contendo meio de suco de vegetais V8. Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, no escuro, a 24°C. Este procedimento permitiu altos níveis de esporulação. A classificação dos isolados em raças foi realizada em trabalhos anteriores, utilizando-se um conjunto de cultivares diferenciadoras (NIETSCHE, 2000; NIETSCHE et al., 2001).

A suspensão de conídios para inoculação foi preparada adicionando-se água destilada nas placas contendo o fungo e raspando-se suavemente a superfície do meio com o auxílio de uma espátula. Filtrou-se a solução em gaze e a suspensão obtida foi ajustada para a concentração final de 2×10^4 conídios/mL com auxílio de um hematocítmetro. Este procedimento foi realizado para todos os isolados mencionados anteriormente.

TABELA 2. Cruzamentos, raças e reações fenotípicas usados para a caracterização genética da resistência à mancha-angular do feijoeiro

Cruzamento	Raças de <i>P. griseola</i> (isolados)	Reação fenotípica ^a
Cornell 49-242 x Rudá ^b	31.17 (97-2)	R x S
Cornell 49-242 x México 54	63.23 (158-1)	R x R
Cornell 49-242 x México 54	63.19 (48-1)	R x R
Cornell 49-242 x México 54	31.17 (97-2)	R x R
Cornell 49-242 x AND 277	63.23 (158-1)	R x R
Cornell 49-242 x AND 277	63.19 (48-1)	R x R
Cornell 49-242 x AND 277	31.17 (97-2)	R x R
Cornell 49-242 x Mar-2	63.23 (158-1)	R x R
Cornell 49-242 x Mar-2	63.19 (48-1)	R x R
México 54 x Rudá ^b	63.19 (48-1)	R x S
México 54 x AND 277	63.23 (158-1)	R x R
México 54 x AND 277	63.19 (48-1)	R x R
México 54 x Mar-2	63.23 (158-1)	R x R
México 54 x Mar-2	63.39 (29-3)	R x R
México 54 x Mar-2	63.19 (48-1)	R x R
México 54 x BAT 332	61.41 (116-1)	R x R
AND 277 x Rudá ^b	63.23 (158-1)	R x S
AND 277 x Mar-2	63.23 (158-1)	R x R
AND 277 x Mar-2	63.19 (48-1)	R x R
AND 277 x BAT 332	61.41 (116-1)	R x R
Mar-2 x Rudá ^b	63.39 (29-3)	R x S
Mar-2 x BAT 332	61.41 (116-1)	R x R
BAT 332 x Rudá ^c	61.41 (116-1)	R x S

^a R = genótipo quando inoculado com a raça responde com uma reação de resistência; S = reação de suscetibilidade.

^b Estudos de herança realizados em trabalhos anteriores (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA et al., 2000; NIETSCHKE et al., 2000a; SARTORATO et al., 2000).

^c Estudo de herança realizado no primeiro capítulo da tese.

2.3. Inoculação e avaliação fenotípica da doença

Quinze dias após o plantio (estádio V3), as primeiras folhas trifolioladas das plantas F₂ foram inoculadas com a suspensão de conídios de *P. griseola*. As plantas foram incubadas por um período de 48 horas numa câmara úmida (RIBEIRO et al., 1993; LACERDA et al., 1994), a qual foi mantida a 20-22 °C e 100% de umidade relativa, e então, aclimatadas e transferidas para casa-de-vegetação.

A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 e 23 dias após inoculação, usando-se uma escala de severidade de nove graus (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987). Nesta escala, 1 representa imunidade e 9 extrema suscetibilidade. Plantas com notas acima de 4 foram consideradas suscetíveis (nota 4 foi dada às plantas com folhas apresentado poucas lesões com um início de esporulação do patógeno).

As freqüências das classes fenotípicas obtidas foram testadas pelo teste de qui-quadrado, utilizando o programa Genes (CRUZ, 2001). Foram analisadas nove proporções fenotípicas: 1:0 (genes presentes em um mesmo loco); 15:1 (dois genes dominantes independentes); 9:7 (dois genes dominantes complementares); 13:3 (dois genes epistáticos, um dominante e um recessivo); 63:1 (três genes dominantes independentes); 57:7 (um gene dominante e dois complementares); 27:37 (três genes dominantes complementares); 61:3 (dois genes dominantes e um recessivo); 49:15 (um gene dominante e dois recessivos). Foi considerada a proporção fenotípica que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu o menor valor de qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cinco fontes de resistência para mancha-angular, AND 277, MAR-2, México 54, Cornell 49-242 e BAT 332, foram inoculadas com um conjunto de raças de *P. griseola* (Tabela 3). Os resultados obtidos no presente trabalho e no trabalho de NIETSCHE et al. (2000b), onde essas fontes foram inoculadas com outras raças, demonstraram que elas apresentam diferentes espectros de resistência, indicando que esses genótipos são portadores de diferentes fatores de resistência.

TABELA 3. Reação dos genótipos de feijão Rudá, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242, México 54 e BAT 332 a diferentes raças de *P. griseola*

Genótipos	Raças de <i>P. griseola</i> e reações fenotípicas					
	63.23 ^a	63.39 ^a	63.19 ^a	31.17 ^a	61.41 ^a	61.31
Rudá	S	S	S	S	S	S
AND 277	R	S	R	R	R	R
MAR-2	R	R	R	R	R	R
Cornell49242	R	S	R	R	S	R
México 54	R	R	R	R	R	S
BAT 332	S	R	S	S	R	S

^a Raças usadas no teste de alelismo

Testes de alelismo foram realizados para verificar se esses diferentes fatores presentes nas cinco fontes de resistência estão presentes em um mesmo loco ou em locos distintos. Para um melhor entendimento do alelismo, a análise foi feita separadamente para cada uma das raças 63.23, 63.39, 69.19, 31.17 e 61.41 de *P. griseola*.

A escolha das populações usadas para cada raça foi realizada com base na reação dos genótipos à raça (Tabela 2 e 3). Segundo EHDAIE e BAKER (1999), em cruzamentos entre dois genótipos resistentes, o aparecimento de plantas suscetíveis na população F₂ indica que os pais possuem genes de resistência que estão localizados em locos diferentes. O não aparecimento de plantas suscetíveis nesse mesmo cruzamento indica que os dois genitores são portadores de gene(s) de resistência em um mesmo loco, ou seja, que são alélicos ou ligados em bloco.

Com base nesses critérios, a raça 63.23 de *P. griseola* foi inoculada em seis populações F₂, conforme mostra a Tabela 4. Para facilitar o entendimento do alelismo foram atribuídas letras para os locos, sendo letras diferentes para genes segregantes e iguais para genes em um mesmo loco. Na população proveniente do cruzamento Cornell 49-242 x México 54, o teste qui-quadrado indicou a existência de dois genes dominantes que segregam independentemente. Assim, Cornell 49-242 possui o loco A e México 54 o loco B. O gene dominante de MAR-2 segregou independentemente do loco A de Cornell 49-242 e do B de México 54. MAR-2 possui, portanto, um outro loco denominado de loco C. Na população Cornell 49-242 x AND 277 não foram observadas plantas suscetíveis indicando a existência de genes no mesmo loco, podendo ser alélicos ou ligados em bloco. AND 277 também não segregou com México 54 e MAR-2. Com base nestas observações pode-se concluir que: 1) Cornell 49-242 apresenta um único gene dominante que confere resistência à raça 63.23, presente no loco denominado de loco A; 2) México 54 também possui um gene dominante, independente do gene de Cornell 49-242, localizado no loco B; 3) MAR-2 possui um gene dominante independente do gene de Cornell 49-242 e do gene de México 54, presente no loco denominado de C; 4) AND 277, por não segregar com nenhuma das outras fontes, possui genes nos três locos, A, B e C.

TABELA 4. Teste de alelismo para caracterização genética da resistência à raça 63.23 de *P. griseola*

População F ₂ ^a	Número de plantas F ₂ ^b		Proporção esperada ^c		χ^2	P ^d	Símbolo do loco ^e	
	R	S	R	S			G1	G2
Cornell49-242 x México54	110	6	15	1	0,2298	63,1609	A	B
Cornell49-242 x AND277	200	0	1	0			A	A
Cornell49-242 x MAR-2	112	9	15	1	0,2914	58,9286	A	C
México 54 x AND 277	115	0	1	0			B	B
México 54 x MAR-2	107	7	15	1	0,0023	96,1425	B	C
AND 277 x MAR-2	95	0	1	0			C	C

^a Todos os cruzamentos são provenientes de genitores resistente x resistente. G1= Genitor 1 e G2= Genitor 2 do cruzamento.

^b R = resistente e S = suscetível

^c Foram testadas nove proporções esperadas, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados.

^d P = probabilidade do valor estimado.

^e G1= símbolos designados para o genitor 1 do cruzamento e G2= símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento.

A caracterização dos genes que conferem resistência à raça 63.19 de *P. griseola* esta apresentada na Tabela 5. A segregação fenotípica da população F₂ proveniente do cruzamento entre Cornell 49-242 e México 54 indicou a presença de três genes, sendo um dominante e dois complementares. Na análise feita com a raça, 63.23, já tinha sido designado o loco A para Cornell 49-242 e B para México 54 (Tabela 4), sendo que com a raça 63.19 um terceiro loco foi detectado neste cruzamento. Na população Cornell 49-242 x MAR-2, também foram encontrados três genes, mas que segregaram independentemente. Como no cruzamento entre México 54 e MAR-2 não houve segregação, concluiu-se que existe um loco comum entre esses dois genótipos, denominado de loco D. Estes dados sugerem que o terceiro gene observado nas populações F₂ do cruzamento de Cornell 49-242 x México 54 e de Cornell 49-242 x MAR-2 está presente nos genótipos México 54 e MAR-2 e não em Cornell 49-242. Ou seja, nessas populações as variedades México 54 e MAR-2 possuem dois genes e Cornell 49-242 apenas um gene. Assim, para a raça 63.19, Cornell 49-242 possui o loco A, México 54 os locos B e D e MAR-2 os locos C e D. AND 277 mais uma vez não segregou com nenhuma das outras variedades, confirmando a presença dos três locos A, B e C neste genótipo.

TABELA 5. Teste de alelismo para caracterização genética da resistência à raça 63.19 de *P.griseola*

População F ₂ ^a	Número de plantas F ₂ ^b		Proporção esperada ^c		χ^2	P ^d	Símbolo do loco ^e	
	R	S	R	S			G1	G2
Cornell49-242x México54	96	14	57	7	0,3617	54,7551	A	B/D
Cornell49-242 x AND277	121	0	1	0			A	A/B/C
Cornell49-242 x MAR-2	115	2	63	1	0,0164	89,8051	A	C/D
México 54 x AND 277	115	0	1	0			B/D	A/B/C
México 54 x MAR-2	173	0	1	0			B/D	C/D
AND 277 x MAR-2	203	0	1	0			A/B/C	C/D

^a Todos os cruzamentos são provenientes de parentais resistente x resistente.

^b R = resistente e S = suscetível

^c Foram testadas nove proporções esperadas, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados.

^d P = probabilidade do valor estimado.

^e G1= símbolos designados para o genitor 1 do cruzamento e G2= símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento.

Os estudos de alelismo realizados com as raças 31.17 e 63.39 confirmaram o obtido com as outras raças (Tabela 6 e 7). A não segregação da população F₂ do cruzamento Cornell 49-242 x AND 277 quando inoculada com a raça 31.17 (Tabela 6) pode ser explicada pela presença do loco A nas duas variedades. Também não foi observada nenhuma planta suscetível quando a população F₂ de México 54 x MAR-2 foi inoculada com a raça 63.39 (Tabela 7), comprovando a presença do loco D nestas duas cultivares. A segregação observada nas plantas F₂ do cruzamento Cornell 49-242 x México 54 inoculadas com a raça 31.17 (Tabela 6) sugere o envolvimento de dois genes independentes, um presente em Cornell 49-242 (loco A) e outro em México 54. O outro gene de México 54, previamente detectado com a raça 63.19 (Tabela 5), pode não ter sido detectado com a raça 31.17, por esse loco apresentar um alelo suscetível a esta raça. Este fato já foi observado anteriormente em genes que conferem resistência a antracnose na variedade de feijoeiro G2333. PASTOR-CORRALES et al. (1994), usando a raça 521 de *Colletotrichum lindemuthianum*, demonstraram que a resistência desta variedade era controlada por dois genes. Utilizando outras raças do patógeno, YOUNG e KELLY (1996a) e ALZATE-MARIN et al. (2001) detectaram um terceiro gene que não havia sido observado por PASTOR-CORRALES et al. (1994). Segundo estes autores, o terceiro gene não foi detectado inicialmente porque este não confere resistência à raça 521.

TABELA 6. Teste de alelismo para caracterização genética da resistência à raça 31.17 de *P.griseola*

População F ₂ ^a	Número de plantas F ₂ ^b		Proporção esperada ^c		χ^2	P ^d	Símbolo do loco ^e	
	R	S	R	S			G1	G2
Cornell49-242 x México54	99	8	15	1	0,2747	60,0152	A	B/D
Cornell49-242 x AND 277	109	0	1	0			A	A/B/C

^a Todos os cruzamentos são provenientes de parentais resistente x resistente.

^b R = resistente e S = suscetível

^c Foram testadas sete proporções esperadas, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu maior qui-quadrado.

^d P = probabilidade do valor estimado.

^e G1= símbolos designados para o genitor 1 do cruzamento e G2= símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento.

TABELA 7. Teste de alelismo para caracterização genética da resistência à raça 63.39 de *P.griseola*

População F ₂ ^a	Número de plantas F ₂ ^b		Proporção esperada ^c		χ^2	P ^d	Símbolo do loco ^e	
	R	S	R	S			G1	G2
México 54 x MAR-2	117	0	1	0			B/D	C/D

^a Todos os cruzamentos são provenientes de parentais resistente x resistente.

^b R = resistente e S = suscetível

^c Foram testadas sete proporções esperadas, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu maior qui-quadrado.

^d P = probabilidade do valor estimado.

^e G1= símbolos designados para o genitor 1 do cruzamento e G2= símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento.

A caracterização e o estudo de alelismo da linhagem BAT 332 foram realizados utilizando a raça 61.41 (Tabela 8). A segregação observada de 15:1 em duas populações F₂, indicaram que o gene dominante de efeito maior que confere resistência à mancha-angular em BAT 332 (detectado no capítulo 1 da tese) segrega independentemente dos genes de AND 277 e MAR-2. Dessa forma, o gene desta variedade está em um loco diferente dos locos A, B, C e D. A não observação de plantas suscetíveis na população México 54 x BAT 332 indica a existência de um terceiro gene em México 54, presente no mesmo loco do gene de BAT 332, aqui denominado como loco E.

TABELA 8. Teste de alelismo para caracterização genética da resistência à raça 61.41 de *P.griseola*

População F ₂ ^a	Número de plantas F ₂ ^b		Proporção esperada ^c		χ^2	P ^d	Símbolo do loco ^e	
	R	S	R	S			G1	G2
México 54 x BAT 332	104	0	1	0			B/D/E	E
AND 277 x BAT 332	119	7	15	1	0,1037	74,7429	A/B/C	E
MAR-2 x BAT 332	118	7	15	1	0,0901	76,4007	C/D	E

^a Todos os cruzamentos são provenientes de parentais resistente x resistente.

^b R = resistente e S = suscetível

^c Foram testadas sete proporções esperadas, a colocada na tabela foi a que melhor explicou os dados observados, ou seja, a que forneceu maior qui-quadrado.

^d P = probabilidade do valor estimado.

^e G1= símbolos designados para o genitor 1 do cruzamento e G2= símbolo designado para o genitor 2 do cruzamento.

A análise conjunta dos genes envolvidos com a resistência às cinco raças de *P. griseola*, realizada no presente trabalho, sugere que Cornell 49-242 apresenta um gene dominante no loco A. Propõe-se, neste trabalho, a designação de *Phg-3* para esse gene. A denominação de *Phg-1* e *Phg-2* já foram dadas em trabalhos anteriores para os genes identificados em AND 277 (CARVALHO et al., 1998) e em México 54 (SARTORATO et al., 1999), respectivamente. México 54 possui genes nos locos B, D e E, denominados de *Phg-2* (nome atribuído anteriormente por SARTORATO et al., 1999), *Phg-5* e *Phg-6*. O símbolo *Phg-4* foi dado ao gene do loco C de MAR-2. A não segregação da população F₂ proveniente do cruzamento dessa variedade com México 54 inoculada com as raças 63.19 (Tabela 5) e 69.39 (Tabela 7) demonstrou que MAR-2 possui um outro gene presente no mesmo loco D de México 54. A análise das reações fenotípicas dessas duas variedades a um conjunto de raças do patógeno, conforme observado na tabela 3 e nos dados do trabalho de NIETSCHE et al. (2000b), demonstrou que elas apresentam diferentes reações de resistência. Sendo assim, os fatores presentes no loco D destas duas variedades não são um mesmo alelo e sim alelos diferentes ou genes ligados em blocos. Propõe-se, portanto, a designação de *Phg-5*² à forma alélica desse gene presente em MAR-2. Da mesma maneira, o alelo do gene *Phg-6* de México presente em BAT 332 foi denominado *Phg-6*². AND 277 possui os genes alélicos *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*². O resumo da denominação dos genes presentes em genótipos de feijoeiro que conferem resistência à mancha-angular proposta no presente trabalho está descrito na Tabela 9.

TABELA 9. Fontes de resistência com os seus respectivos genes, determinados pelo teste de alelismo

Fonte de resistência	Locos	Genes (alelos)
Cornell 49-242	A	<i>Phg-3</i>
México 54	B, D, E	<i>Phg-2</i> , <i>Phg-5</i> , <i>Phg-6</i>
MAR-2	C, D	<i>Phg-4</i> , <i>Phg-5</i> ²
BAT 332	E	<i>Phg-6</i> ²
AND 277	A, B, C	<i>Phg-1</i> ^a , <i>Phg-2</i> ² , <i>Phg-3</i> ² , <i>Phg-4</i> ²

^a Gene detectado por CARVALHO et al., 1998

A caracterização genética realizada em trabalhos anteriores para as cinco fontes de resistência demonstrou que cada uma delas apresenta um único gene dominante que confere resistência à mancha-angular (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA et al., 2000; SARTORATO et al., 2000; NIETSCHE et al., 2000a). No entanto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem a existência de uma maior complexidade nessas variedades. O uso de diferentes raças e diferentes cruzamentos possibilitou detectar genes que não tinham sido observados nos estudos de herança. Esta complexidade da herança da resistência de genótipos à mancha-angular já foi mencionada anteriormente por BARROS et al. (1957). Estes autores observaram que, na maioria dos cruzamentos estudados, a resistência à mancha-angular era controlada por dois ou três genes independentes.

A primeira das cinco fontes estudada foi AND 277 (CARVALHO et al., 1998). O estudo de herança foi realizado em populações F_2 , RCs e RCr proveniente do cruzamento entre AND 277 e Rudá. Foi proposto o nome *Phg-1* para o gene dominante encontrado nessa variedade. Como AND 277 pertence ao grupo andino, considerou-se esse gene como andino. No entanto, o teste de alelismo realizado no presente trabalho demonstrou que esse genótipo possui três genes que, inesperadamente, não segregam com genes de variedades mesoamericanas. Estes dados sugerem a possibilidade da presença de genes mesoamericanos nessa variedade andina. Um outro indício da existência de genes mesoamericanos nessa linhagem é o fato dela cruzar facilmente com variedades mesoamericanas, sem apresentar a incompatibilidade típica de cruzamento entre plantas destes dois grupos. Trabalhos futuros de caracterização e estudo da genealogia dessa variedade devem ser realizados para entender e definir melhor a existência de genes mesoamericanos em AND 277. Uma outra dúvida que deve ser esclarecida futuramente é se o gene encontrado no estudo de herança realizado por CARVALHO et al. (1998) é um quarto gene, andino, ou se é um dos genes, *Phg-2*², *Phg-3*², *Phg-4*², detectados no teste de alelismo (Tabela 9). Outros estudos de herança e alelismo envolvendo diferentes raças do patógeno podem ajudar a entender melhor a complexidade da herança de AND 277. A utilização de linhagens derivadas de AND 277 e que contenham combinações diferentes dos seus genes também pode vir a auxiliar na sua caracterização genética.

A piramidação de genes de resistência andinos e mesoamericanos em um único genótipo de interesse tem sido sugerida como uma estratégia eficiente para obtenção de resistência ampla e durável (YOUNG e KELLY, 1996a, PASTOR-CORRALES et al., 1998). Devido à co-evolução patógeno/hospedeiro observada no feijoeiro, genes de resistência mesoamericanos são mais efetivos contra patógenos andinos e vice-versa (GUZMÁN et al., 1995). Sendo assim, os melhoristas de feijão têm uma oportunidade única de piramidar genes de resistência dos dois grupos para desenvolver resistência complementar a um grande número de raças (KELLY e MIKLAS, 1998). Dentro das fontes de resistência estudadas no presente trabalho, apenas AND 277 é do grupo andino. É, portanto, de grande importância investigar a existência de gene andino que confere resistência à mancha-angular nessa variedade. Se for concluído que AND 277 não é um doador de genes andinos, novas fontes deste grupo devem ser identificadas para serem incorporadas em programas de melhoramento.

A resistência de Cornell 49-242, segundo os dados do teste de alelismo, é atribuída a um único gene dominante, confirmando o observado na literatura. Esta herança monogênica foi detectada inicialmente por SARTORATO et al. (1993) ao estudar as populações provenientes do cruzamento de Cornell 49-242 com as variedades suscetíveis Rosinha G-2 e Caraota 260 e, mais recentemente, por NIETSCHKE et al. (2000a) na população Rudá x Cornell 49-242. Neste último trabalho, foram identificados dois marcadores RAPD ligados a esse gene de resistência, OPN02_{390C} e OPE04_{650C}. O fato de esses mesmos marcadores estarem ligados ao gene de resistência de México 54 e de essas duas variedades apresentarem a mesma reação de resistência para as duas raças usadas em seus estudos de herança, levaram os autores a sugerir que essas variedades possuem genes no mesmo loco *Phg-2*. No entanto, a avaliação das plantas F₂ provenientes do cruzamento entre essas duas variedades quando inoculadas com diferentes raças demonstrou que elas possuem genes que segregam independentemente e não formas alélicas como sugerido anteriormente. Propõe-se, portanto, que um dos genes de México 54 continue sendo denominado *Phg-2*, por ter sido o primeiro a ser designado (SARTORATO et al., 1999) e o gene de Cornell 49-242 de *Phg-3*. Neste trabalho, dois outros genes presentes em México 54, *Phg-5* e *Phg-6*, os quais

não haviam sido detectados anteriormente, foram identificados no teste de alelismo.

Visando auxiliar os estudos de alelismo entre as fontes de resistência, marcadores moleculares do tipo RAPD identificados em trabalhos anteriores (CARVALHO et al., 1998; FERREIRA et al., 2000; SARTORATO et al., 2000; NIETSCHE et al., 2000a; primeiro capítulo deste trabalho) foram testados nas cinco fontes de resistência. As características dos marcadores moleculares estudados estão apresentadas na Tabela 10.

TABELA 10. Marcadores RAPD ligados aos genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro

Genótipos	Marcador molecular previamente identificado	Distância do gene de resistência (cM)	
AND 277	OPH13 ₄₉₀	5,5	CARVALHO et al, 1998
MAR-2	OPE04 ₅₀₀	5,8	FERREIRA et al., 2000
México 54	OPN02 ₈₉₀	5,9	SARTORATO et al., 2000
	OPAC14 ₂₄₀₀	6,6	
	OPE04 ₆₅₀	11,8	
Cornell 49-242	OPN02 ₈₉₀	3,2	NIETSCHE et al., 2000a
	OPE04 ₆₅₀	12,5	
BAT 332	OPAO12 ₉₅₀	5,8	Primeiro capítulo deste trabalho

O marcador OPH13₄₉₀ quando testado nas fontes de resistência, só estava presente em AND 277. O marcador OPE04₅₀₀ só foi observado em MAR-2. A banda OPN02₈₉₀ foi observada em AND 277, MAR-2, México 54 e Cornell 49-242, não foi amplificada apenas em BAT 332. OPAC14₂₄₀₀, marcador ligado ao gene de México 54, foi também encontrado em MAR-2. O marcador OPE04₆₅₀ foi amplificado em México 54 e Cornell 49-242. O fragmento OPAO 12₉₅₀ só estava presente em BAT 332, onde foi previamente identificado. Estes dados não concordam com os dados obtido com o teste de alelismo. Os marcadores moleculares não puderam, portanto, ser usados para auxiliar o entendimento da complexidade das fontes de resistência à mancha-angular.

Os resultados aqui obtidos são de especial importância para programas de melhoramento cujo objetivo é a piramidação de diferentes genes que conferem resistência a diferentes raças de *P. griseola*. Segundo YOUNG e KELLY (1996a), a piramidação de genes tem sido sugerida como uma estratégia de obtenção de variedades com resistência durável. O acúmulo de genes de resistência com efeitos maiores em um genótipo retarda o aparecimento de novas raças do patógeno. A base para a estabilidade da resistência reside na redução da adaptação do patógeno quando um número de genes de virulência são necessários para “quebrar” a resistência do hospedeiro (VAN DER PLANK, 1984). Sendo assim, uma estratégia potencial para manter a resistência a doenças por um longo período seria a introgressão de vários genes de resistência em uma única variedade. Os dados obtidos no presente trabalho permitem que o melhorista escolha as fontes de resistência a serem usadas na piramidação, de forma que possa reunir em novas variedades, o maior número e a melhor combinação possível de genes. Estas variedades com resistência durável seriam, portanto, resistentes a um grande número de raças do patógeno.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIM, A.L., MENARIN, H., BAIA, G.S. PAULA-JR, T.J., SOUZA, K.A., COSTA, M.R., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the Co-4² gene. **Journal of Phytopathology**, v.149, p.259-264, 2001.
- APARÍCIO, B.H.E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Universidad Del Valle, Facultad de Ciencias,1998. 120p. (Trabajo de Grado) - Universidad Del Valle, 1998.
- BARROS, O., CARDEÑOSA, R., SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology**, v.47, n.1, p.3, 1957.
- BROCK, R.D. Resistance to Angular Leaf Spot among varieties of beans. **The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.17, n.1, p.25-30, 1951.
- CARVALHO, G.A., PAULA-JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L. NIETSCHÉ, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.
- CORREA, F.J., SAETTLER, A.W. Angular leaf spot of Red Kidney Beans in Michigan. **Plant Disease**, v.71, n.10, p.915-918, 1987.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES** – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- EHDAAIE, B., BAKER, C.A. Inheritance and allelism for resistance to Russian wheat aphid in an Iranian spring wheat. **Euphytica**, v.107, p.71-78, 1999.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. NIETSCHÉ, S., PAULA-JR, T.J., A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v.40, p.1130-1133, 2000.
- GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., SÉVIGNAC, M., ADAM-BLONDON, A.F., BANNEROT, H., GEPTS, P., DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.3/4, p.494-502, 1998.

- GUPTA, S.K., MATHEW, K.A., SHYAM, K.R. SHARMA, A.K. Evaluation of Frenchbean germplasm against angular leaf spot. **Indian Phytopathology**, v.53, n.4, p.488-489, 2000.
- GUZMÁN, P., GILBERTSON, R.L., NODARI, R. JOHNSON, W.C., TEMPLE, S.R., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v.85, n.5, p.600-607, 1995.
- HUANG, N., ANGELES, E.R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIVEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, n.3, p.313-320, 1997.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, n.1, p.1-11, 1998.
- LACERDA, J.T., COELHO, R.S.B., MARIANO, R.L.R., MENEZES, M. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n.2, p. 93-96, 1994.
- McDONALD, B.A., ALLARD, R.W., WEBSTER, R.K. Responses of two- three- and four-component barley mixtures to a variable pathogen population. **Crop Science**, v.28, p.447-452, 1988.
- NIETSCHKE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares para resistência**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 74p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000c.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A. PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.45, n.262, p.567-571, 1998.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA-JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000a.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., PAULA-JR, T.J., FERREIRA, C.F., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, v.117, p.77-84, 2001.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., ROCHA, R.C., CAIXETA, E.T., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Fontes de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum no Brasil. **Revista Ceres**, v.47, n.273, p.567-572, 2000b.

- OLAVE, C.A. Resistencia de algunas variedades y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al *Isariopsis griseola* Sacc. **Acta Agronômica**, v. 8, p.197-219, 1958.
- PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O.A., ESTRADA, E.I., SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v.78, p.959-962, 1994.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C., SINGH, S.P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.
- PASTOR-CORRALES, M.A., PAULA-JR, T.J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: **Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 5,1996, Goiânia. Anais, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP-APA, v.1, p.23-41, 1996.
- PAULA-JR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIERIA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: Editora UFV, 1998. p.435-449.
- RAVA, C.A., SARTORATO, A., CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.28, p.5-6, 1985.
- RIBEIRO, M.J., COELHO, R.S.B., MENEZES, M.A. Fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc). **Caderno Omega Universidade Federal de Pernambuco Série Agronomia**, n. 4, p. 243-246, 1993.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., e MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.21-22, 1999.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.637-642, 2000.
- SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M.J.O., RAVA, C.A., CARNEIRO, J.E.S. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.30, 1993. (Supplement).

- SCHWARTZ, H.F., CORREA-VICTORIA, F., PINEDA, P.A., OTOYA, M. KATHERMAN, M.J. Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, v.65, n.6, p.494-496, 1981.
- VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1984. 194p.
- VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evaluación de Germoplasma de Frijol**. Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v.80, n.6, p.650-654, 1996.
- YOUNG, R.A., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.87-94, 1998.

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES A PARTIR DE CLONES BAC DE FEIJOEIRO

RESUMO

O genoma eucarioto possui um grande número de seqüências simples repetidas, chamadas de microsatélites ou SSR, as quais consistem de 1 a 5 nucleotídeos repetidos em tandem. As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo que *primers* complementares a essas regiões sejam usados para amplificar, via PCR, fragmentos contendo os SSRs. Estas regiões repetitivas são, portanto, utilizadas como marcadores moleculares. A natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR fazem com que esses sejam os marcadores escolhidos para assistirem programas de melhoramento de várias espécies. A falta de *primers* disponíveis para o feijoeiro inviabiliza a utilização desse tipo de marcador nessa cultura. Foram, portanto, desenvolvidos no presente trabalho alguns marcadores microsatélites utilizando clones de cromossomos artificiais de bactérias (BAC) como fonte de DNA. Quatro clones BAC foram sub-clonados e hibridizados com três sondas (AT)₁₅, (CT)₁₅ e (ATT)₁₀. Após dois ciclos de hibridização, os clones positivos foram seqüenciados. *Primers* específicos foram desenhados e testados em diferentes genótipos de feijoeiro. Vinte e um pares de *primers* amplificaram bandas únicas e bem definidas. Foram gerados de um a seis alelos por loco, demonstrando o alto polimorfismo desses marcadores. Esse conjunto de marcadores microsatélites desenvolvidos combinados com os demais marcadores disponíveis são uma importante ferramenta para uso no melhoramento e no estudo genético do feijoeiro.

Palavras-Chave: Microsatélites; SSR; marcadores moleculares; feijão;
Phaseolus vulgaris.

1. INTRODUÇÃO

Uma grande proporção do genoma dos eucariontes consiste em diferentes tipos de DNA repetitivo. A subclasse que possui seqüências simples repetidas é denominada de microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*), e consiste em pequenas seqüências de DNA, de 1 a 5 nucleotídeos, repetidas em tandem. Estudos preliminares mostraram que os microssatélites são abundantes e amplamente distribuídos no genoma das plantas (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; BRUNEL, 1994; CARDLE et al., 2000). MORGANTE e OLIVIERI (1993) analisaram os dados do EMBL e do *GenBank* e estimaram uma freqüência de 1 microssatélite, considerando di- e trinucleotídeos, a cada 50 kb. Como os microssatélites são mais comumente encontrados fora de seqüências codificadoras e a proporção de clones de cDNA nos bancos de dados de plantas é alta, eles ressaltam a possibilidade de uma freqüência real muito maior que a encontrada. CARDLE et al. (2000) comprovaram esta possibilidade, estimando uma freqüência de 1 SSR a cada 6-7 kb.

As seqüências que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre genótipos de uma mesma espécie, permitindo que *primers* de PCR complementares a estas regiões sejam usados para amplificar fragmentos contendo os SSRs. Estas regiões repetitivas são, portanto, utilizadas como marcadores moleculares. O polimorfismo desses marcadores é resultante principalmente da variação no número de repetições nos SSRs (CREGAN et al., 1999). Regiões repetitivas em tandem, como os SSRs, facilitam o *crossing-over* desigual e o erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*), gerando variações no número de unidades repetitivas (LEVINSON e GUTMAN, 1987; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997).

Essa classe de marcadores moleculares co-dominantes detecta um alto nível de variação alélica, que, aliado ao econômico e simples procedimento de PCR, tem se tomado uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (AKKAYA et al., 1992; PANAUD et al., 1996). Além dessas características, o fato deles serem facilmente reprodutíveis, muito freqüentes e distribuídos ao acaso no genoma, fazem com que eles sejam os marcadores

preferidos para assistirem programas de melhoramento de várias culturas (RALLO et al., 2000). Os SSRs têm sido utilizados em *fingerprinting* e identificação de variedades, estudo da dinâmica de população e diagnóstico genético, mapeamento genômico e estudo de ligação (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; RONGWEN et al., 1995; PANAUD et al., 1996; CHEN et al., 1997; McCOUCH et al., 1997).

Em feijão, marcadores moleculares do tipo RAPD, SCAR e AFLP já vêm sendo utilizados nos estudos de sua genética e em programas de melhoramento (MIKLAS et al., 1993; HALEY et al., 1993, 1994; TOHME et al., 1996; YOUNG e KELLY, 1997; KELLY e MIKLAS, 1998; PARK et al. 1999; CAICEDO et al., 1999; YU et al., 2000a; ALZATE-MARIN et al., 2001). No entanto, existe necessidade de incorporar nesses trabalhos, marcadores que revelem um maior nível de polimorfismo de forma que germoplasmas relacionados possam ser distinguidos e cruzamentos entre genótipos aparentados possam ser analisados (PANAUD et al., 1996). Um maior nível de polimorfismo pode ainda aumentar a possibilidade de detecção de marcadores mais próximos do gene de interesse, e que, portanto sejam mais eficientes nos programas de melhoramento.

Os marcadores microssatélites, apesar de apresentarem essa característica de alto polimorfismo e a facilidade de marcadores baseados em PCR, não têm sido utilizados em feijão, devido ao limitado número de *primers* de SSR desenvolvidos para essa cultura. Segundo PANAUD et al. (1996), o desenvolvimento desses *primers* demanda tempo e recursos, mas uma vez disponíveis eles serão facilmente incorporados em programas de melhoramento devido à sua simplicidade e baixo custo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores SSR para feijão, utilizando clones BAC (cromossomos artificiais de bactéria) como fonte de DNA. Como os tamanhos dos insertos desses clones variam de 70 a 120 kb e a frequência dos SSRs em plantas é comprovadamente alta, a expectativa era identificar um ou mais marcadores desse tipo nessas regiões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais genéticos e extração de DNA

Dez variedades de feijão foram selecionadas para testar os *primers* de microssatélites identificados. Seis destas cultivares fazem parte do programa de melhoramento visando resistência à mancha-angular do BIOAGRO-UFV, a saber: Rudá, BAT 332, Cornell 49-242, México 54, MAR-2 e AND 277. As demais, Jalo EEP 558, BAT 93, Black Magic e Sel 1308 são linhagens elites do programa de melhoramento da Michigan State University.

O DNA de cada um desses genótipos foi isolado a partir de folhas jovens e a extração foi efetuada com base na metodologia de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações.

2.2. Sub-clonagem

Quatro clones de cromossomos artificiais de bactéria (clones BAC), fornecidos pela Dra. S. MacKenzie da Universidade de Nebraska, foram utilizados como fonte de DNA para a construção de uma biblioteca contendo pequenos insertos. Estes clones BAC, 78K17, 53Eg, 56P12 e gF11, foram selecionados de uma biblioteca produzida com a variedade de feijão Sprite, utilizando a sonda SAS13. Esta sonda está ligada ao loco *co-4* que confere resistência/suscetibilidade ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* causador da antracnose no feijoeiro (VANHOUTEN e MACKENZIE, 1999).

Igual quantidade de cada clone BAC (aproximadamente 5 µg de cada) foi colocada em um tubo de Eppendorf™ e tratada com a enzima de restrição *Not* I (BRL Gibco) por 2 horas a 37 °C, seguindo as recomendações do fabricante. A digestão possibilitou que os insertos se separassem dos vetores, o que foi comprovado em gel de agarose 1%. Os insertos foram tratados com a enzima Klenow (BRL Gibco), com o objetivo de obter extremidades abruptas, precipitados em acetato de sódio e etanol 100% e divididos em três alíquotas. Em cada alíquota adicionou-se 0,1 mM de BSA (albumina de soro bovino) e 20µl do tampão 10x NEBuffer 4 (New England Biolabs) que contém Tris-acetato 20mM, acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 50 mM. Uma alíquota foi digerida com as enzimas de restrição *Alu* I e *Hpa* I, a outra com *Rsa*

I e *Nae* I e a terceira com *Hinc* II e *Xmn* I. Em todas as alíquotas foram adicionadas 15 unidades de cada enzima (New England Biolabs) e as misturas foram submetidas à digestão por 18 horas a 37 °C. Foram utilizadas três combinações de enzimas para minimizar alguns problemas que comumente ocorrem no desenvolvimento de SSR, conforme mencionado por CREGAN et al. (1994, 1999). Segundo estes autores, a presença de SSRs muito próximos do sítio de clonagem impossibilita o desenho de *primer* de PCR, além disso, muitos SSRs não são detectados por não estarem presentes nos fragmentos de 500-700 pb, tipicamente utilizados para o desenvolvimento de marcadores microssatélites. Para tentar contornar esses problemas, utilizou-se três combinações diferentes de enzimas e os fragmentos foram clonados sem a seleção de tamanho.

Após a digestão com as enzimas de restrição, as alíquotas foram tratadas com 15 unidades de CIP (fosfatase alcalina de intestino bovino) (New England Biolabs) e incubadas por 15 minutos a 37 °C e, em seguida, a 56 °C por 15 minutos. Outras 15 unidades da enzima foram adicionadas e as mesmas duas incubações de 15 minutos a 37 °C e 56 °C foram realizadas. Esse tratamento evita que os insertos se liguem uns aos outros. As alíquotas foram então unidas e os fragmentos purificados com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitados com acetato de sódio e etanol 100%. O precipitado foi ressuspenso em 40 µl de água. Um total de 1,5 µl desta solução (±0,5 µg de DNA) foi usada na reação de ligação com 0,5 µg do vetor pBluescript + KS, previamente digerido com 10 unidades de *Sma* I (New England Biolabs). Foram utilizadas 5 unidades da enzima T4 ligase (BRL Gibco), 4,0 µl do tampão da enzima e 4,5 µl de água. A solução foi incubada a 16 °C por 18 horas, seguida pela desnaturação da ligase a 65 °C por 10 minutos. Células competentes de *Escherichia coli* TOP 10F' (Invitrogen Corp.) foram transformadas com os vetores ligados aos insertos, conforme recomendação do fabricante.

2.3. Hibridização com sondas de microssatélites

A biblioteca foi sondada por meio de hibridização de colônia. Células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB contendo 75 µg/ml de

ampicilina, 40 µl de X-gal (40mg/ml) e 40 µl de IPTG (100 mM) em cada placa. Colônias brancas, e, portanto contendo vetor e inserto, foram repicadas para outra placa de Petri. Foram feitas três replicas de cada placa. Após 12 horas de crescimento, as bactérias contendo os insertos foram transferidas para membrana de nylon carregada positivamente. A membrana foi tratada com SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% por 3 minutos para evitar a difusão do plasmídeo, resultando em um sinal de hibridização mais forte. Posteriormente, as células foram desnaturadas em solução de 1,5 M de NaCl e 0,5 M de NaOH por 15 minutos, neutralizadas em solução 1,5 M de NaCl e 0,5 M de Tris-HCl (pH 8,0) por 15 minutos e lavadas em solução de 0,2 M de Tris-HCl (pH 7,5) e tampão 2x SSC por 30 segundos. O DNA foi ligado à membrana utilizando-se Stratalinker UV (120 000 µJ de UV) por aproximadamente 30 segundos. As membranas contendo o DNA foram hibridizadas com três diferentes sondas, (AT)₁₅, (CT)₁₅, (ATT)₁₀, sendo uma para cada réplica. As sondas foram previamente marcadas com digoxigenina utilizando DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche). A membrana foi lavada duas vezes em solução de 2x SSC e 0,1% SDS por 5 minutos cada em temperatura ambiente. Em seguida, foi tratada com solução de 0,5 x SSC e 0,1% SDS por duas vezes, 15 minutos cada a temperatura de 62 °C. Por último foi lavada duas vezes em solução 0,2 SSC e 0,1% SDS, 15 minutos cada a 62 °C. Após esta lavagem, as membranas foram tratadas com 0,25 mM de CDP-STAR (Roche) e expostas ao filme de raios-X (Lumi Film) por um período apropriado, 5-10 minutos, de forma que apareceram sinais de hibridização pequenos, mas claramente definidos. Os clones positivos foram repicados e submetidos a uma segunda hibridização. As colônias selecionadas foram armazenadas em glicerol a uma temperatura de – 80 °C.

Os plasmídeos de todos os clones selecionados foram isolados utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps – Spin protocol (Promega). Para testar a presença e determinar o tamanho dos insertos, os plasmídeos foram tratados com 5 unidades da enzima de restrição *Pvu* II (New England Biolabs) e corridos em gel de agarose 1%. Os insertos genômicos foram enviados para Genomics Technology Support Facility (Michigan State University, East Lansing, MI) e seqüenciados por meio do *Applied Biosystems cycle sequencing technology*. Fragmentos de DNA maiores que 700 pb foram seqüenciados a

partir das duas extremidades e analisados com o programa BL2SEQ do WorkBench (San Diego Supercomputer Center, University of Califórnia, San Diego). O mesmo programa foi utilizado para determinar seqüências redundantes. Para a detecção das seqüências de microssatélites utilizou-se o programa SSEARCH (Smith-Waterman Local Alignment) também pertencente ao WorkBench.

2.4. Seleção dos *primers* e análise de PCR

Foram sintetizados *primers* específicos contendo 18 a 25 pb complementares às seqüências que flanqueiam os microssatélites. Utilizou-se o programa PRIMER3 do WorkBench (San Diego Supercomputer Center, University of Califórnia, San Diego). Os pares de *primers* foram desenhados para amplificar um produto de PCR com tamanho entre 150 a 300 pb e para terem uma temperatura de desnaturação (T_m) de 45 a 50 °C. A utilização de T_m homogênea permite a amplificação de PCR de todos os SSRs em uma mesma temperatura de anelamento.

Os *primers* foram testados nos clones BAC que deram origem aos SSRs e em 10 variedades de feijão. A reação de PCR foi realizada em 20 µl de solução contendo 50 ng de DNA, 0,8 unidades de taq DNA polimerase (Perkin Elmer), tampão 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP e 0,15 µM de cada *primer*. A amplificação foi efetuada em termociclador utilizando-se o procedimento de *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu em uma desnaturação inicial de 94 °C, por 2 minutos, seguido de 15 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, uma etapa de anelamento por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72 °C, por 30 segundos. A temperatura de anelamento foi de 62 °C a 48 °C, reduzindo 1 °C a cada ciclo. Após os 15 ciclos, procedeu-se mais 20 ciclos com desnaturação de 94 °C, anelamento de 47° C e extensão de 68 °C, sendo 30 segundos cada etapa. Foi ainda incluída uma última etapa de extensão a 72 °C, por 5 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com prata (kit Silver SequenceTM DNA da Promega).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores microssatélites para o feijoeiro foram desenvolvidos utilizando quatro clones BAC disponíveis no laboratório de melhoramento de feijão da Michigan State University (MSU Dry Bean Breeding & Genetics Program). Os clones BAC foram sub-clonados e 890 colônias foram hibridizadas com as três sondas, (AT)₁₅, (CT)₁₅ e (ATT)₁₀. Esses oligonucleotídeos foram escolhidos como sondas por serem estes os microssatélites mais freqüentes no genoma das plantas superiores (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; BRUNEL, 1994; McCOUCH et al., 1997). YU et al. (1998, 1999), estudando os microssatélites presentes no genoma do feijão, encontraram essas mesmas repetições, AT/TA e CT/AG, como as mais comuns nessa espécie.

Das 890 colônias, 375 foram hibridizadas positivamente na primeira seleção. Destas, 72 foram positivas na segunda hibridização, o que corresponde a 8% do total de colônias analisadas. Verificou-se, por meio de enzima de restrição e gel de agarose, que das colônias potenciais, 62 possuíam inserto genômico. Os 62 clones foram seqüenciados e 27 apresentaram seqüências de microssatélites (Tabela 1).

TABELA 1 – Resultado dos clones seqüenciados

Clones seqüenciados	62
Não continham inserto	6
Contaminação com DNA de <i>Escherichia coli</i>	3
Seqüência redundante	4
Problemas no seqüenciamento	6
Não continham microssatélites	16
Seqüências com microssatélites	27

Dois clones que continham microssatélites não puderam ser utilizados, pois as repetições se encontravam muito próximas da extremidade, inviabilizando o desenho de *primers*. Alguns clones apresentaram mais de um microssatélite. Quando possível, os *primers* foram desenhados de forma que mais de um SSR fosse amplificado. Em alguns casos foram desenhados mais de um par de *primers* para o mesmo clone, um para cada SSR encontrado.

Primers específicos foram desenhados flanqueando 29 seqüências de microssatélites. Utilizou-se como critério para desenhar esses *primers*, uma temperatura de anelamento entre 45 e 50 °C. Essa faixa de temperatura escolhida foi a mesma utilizada para outros *primers* desenvolvidos para feijão (YU et al., 1999), o que permite que todo o conjunto de *primers* de microssatélite do feijoeiro seja amplificado sob as mesmas condições nas reações de PCR. O teste e nível de polimorfismo dos microssatélites desenvolvidos foram investigados amplificando os clones BAC que originaram as seqüências e 10 cultivares de feijão, Rudá, BAT 332, Cornell 49-242, México 54, MAR-2, AND 277, Jalo EEP558, BAT 93, Black Magic e Sel 1308. Desses pares de *primers* testados, 3 não apresentaram nenhum produto e 5 amplificaram bandas múltiplas. A amplificação de bandas múltiplas pode ser, segundo AKAGI et al. (1996), consequência de seqüências de *primers* inapropriados ou condições de PCR imprópria. A não amplificação de alelos pode ser atribuída à divergência nas seqüências que flanqueiam os SSRs, criando um alelo nulo (SMULDERS et al., 1997), ou condições impróprias de PCR para estes pares de *primers* (LAVI et al., 1994).

Vinte e um pares de *primers*, o que corresponde a 72,4% do total de *primers* testados, amplificaram bandas únicas e bem definidas, sendo que 15 apresentaram bandas polimórficas e 7 monomórficas (Tabela 2). O número de alelos por loco variou de um a seis. Alguns exemplos dessas amplificações estão apresentados na Figura 1. A denominação dos microssatélites desenvolvidos foi dada seguindo os critérios propostos por YU et al. (2000b), onde coloca-se PV de *Phaseolus vulgaris*, seguido pela unidade repetitiva e um número arbitrário começando de 001. Esse número vai aumentando à medida que microssatélites com a mesma unidade repetitiva vão sendo desenvolvidos.

TABELA 2 – Descrição dos microssatélites desenvolvidos e sua variação alélica nos 10 genótipos de feijoeiro testados

Nome *	SSR	Seqüência do primer	Tamanho banda(pb)	Nº de alelos	Tm
PV attf001	(ATTT) ₅	CAAAAAGAACATAATCAGAA CTTAGTTGTATTGATTGGA	165	3	48 48
PV catt001	(CATT) ₃	AGGGTGTACATAGATTAGATAG GAGATCCTTATATTGTAATGTG	193	1	48 48
PV ct001	(CT) ₂ (CAT) ₂ (CT) ₄	GATACTATCAAGACACGATTAC GTATATACACTGAAGCAATAAGT	248	2	48 48
PV ag006	(CA) ₅ n (AG) ₆	ATATAAACTAGGACGATGAC ATATTGACTTATGAGTATCTGAG	210	1	47 47
PV att001	(ATT) ₄ n (TTA) ₃	GTTTCTATAATTTTCTCACTTAAC GTATCATTATGTTGTATTCT	295	2	49 48
PV aaat002	(AAAT) ₄	AGGAATACA ACATAAATGATAC GATACTCAAAGTAAATTTGGT	238	2	48 48
PV at010	(AT) ₁₆	AGACTCACGTTTCTTATTTT GACTTAATCTTATATGGGACAT	171	6	48 50
PV gtat001	(GTAT) ₃	ACGTGTCCTATAGTTTGTAC CTTTACTCAGGTTCTCTTTA	272	1	49 49
PV taa002	(TG) ₂ (TAA) ₄	AAGATAATCCTAAGAGGTGA GTTATAATCCGATCA TGTTT	300	1	48 49
PV taaa003	(TAAA) ₃	GTCAATATAAATTATTGTAAGC GATTTAGTTTGATTTATTGTGT	221	2	46 48
PV ttc001	(TTC) ₄ n (GT) ₂ (TG) ₃	ATATTTAGTGGACTGTCAAA GTTATCAAATGTAAAGGGAT	192	3	47 48
PV ttc002	(TTC) ₄ CC (TCGG) ₃	ATATCTTACAGCCATTACATTC CTCATCACCCAGTCACCT	203	2	51 54
PV aat002	(AAT) ₄ n (AATT) ₃	TCCTAATTATTTATGGTAAGAG CAATTGTATATAGAGTCAACTAAA	121	2	48 48
PV ct002	(CT) ₅ (TGTT) ₃	TTAGACTTTCAAACATTACAC GATACTACTTAAATGAGGAACA	122	2	48 48
PV taaaa001	(TAAAA) ₃	GTCAATATAAATTATTGTAAGCA GATTTAGTTTGATTTATTGTGT	221	2	49 48
PV at011	(AT) ₆	TATACAACGGGAGATATTTA TGGTTATTAAGAAGCTAAGAC	293	2	48 49
PV att003	(ATT) ₇ (AGT) ₂	AATCCTACAAATTATGGC TCACTAAAGAGATATGAACTAAC	237	2	47 48
PV taca001	(TACA) ₃	CTTTCCTTGAGTATTAAGAAG GACTATTCTAAAATCTTCTCCT	220	1	48 48
PV ag007	(AG) ₈ n (GA) ₄	AGA TGATAACTGGTCTGAGT TTTCTTAAACACTGATGATG	187	2	48 48
PV att004	(ATT) ₅	TACTGTCCTTCTTTTCTC CATACGGAGATATTTACTCATA	298	1	49 49
PV tgtt001	(TTA) ₂ (TGTT) ₃	ATATTAACAGTCTTACCTTGG TTTGGTAAATAAGTGATGTC	244	2	48 48

* Os microssatélites foram nomeados seguindo a nomenclatura proposta por YU et al. (2000b).

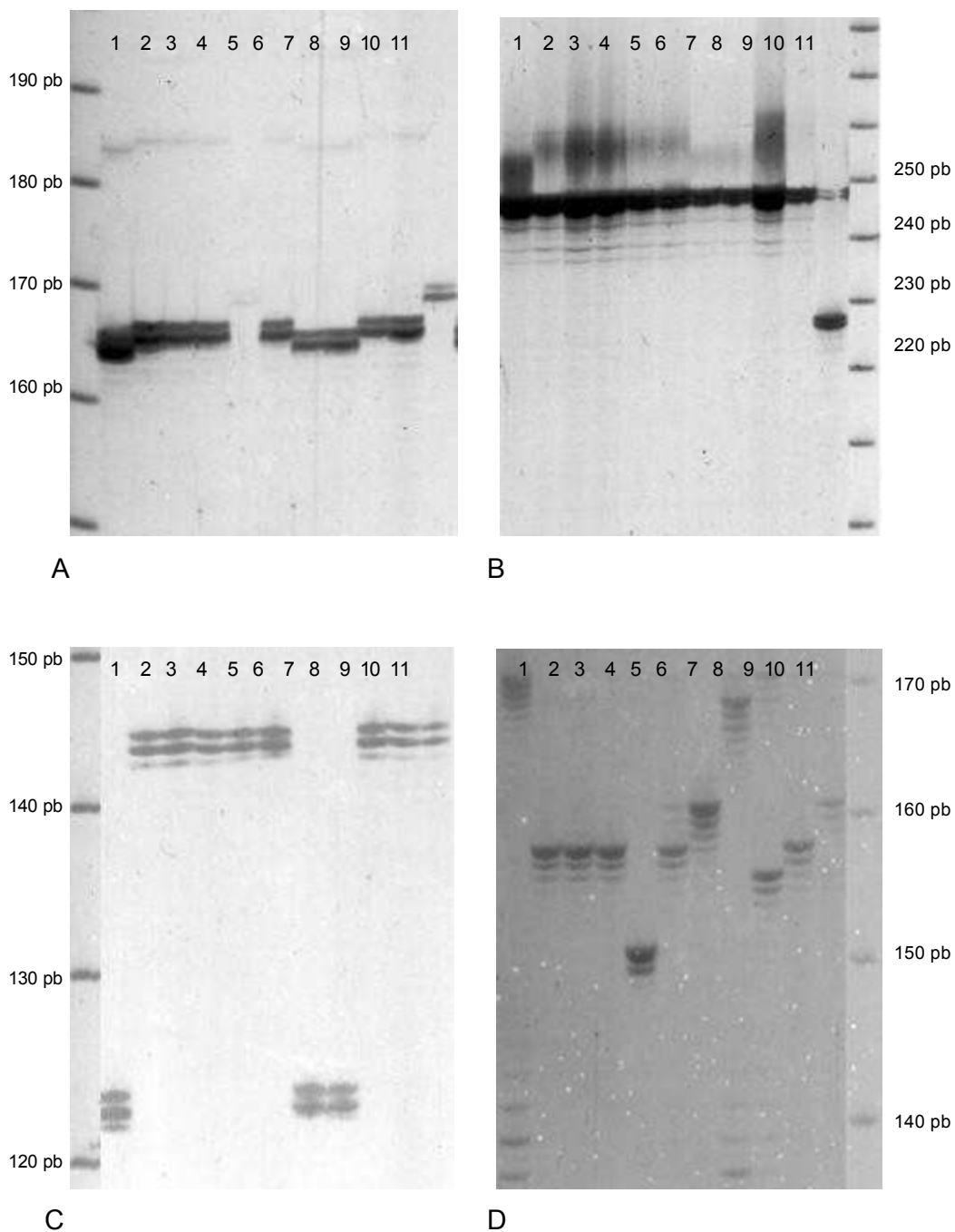


FIGURA 1. Análise eletroforética dos produtos amplificados com alguns *primers* de SSR desenvolvidos no presente trabalho. Linha 1 corresponde aos clones BAC; 2, a variedade Rudá; 3, BAT 332; 4, Cornell 49-242; 5, México 54; 6, MAR-2; 7, AND 277; 8, Jalo EEP558; 9, BAT 93; 10, Black Magic; 11, Sel 1308. 1A: Amplificação do microssatélite PV attt001; 1B: microssatélite PV ct001; 1C: microssatélite PV ct002; e 1D: microssatélite PV at010.

Os *primers* PV at010 amplificaram o microsatélite com o maior número de repetições e geraram produtos com a maior variação alélica. Segundo WEBER (1990), o número de alelos em um microsatélite está normalmente correlacionado com o número de repetições que eles apresentam, sendo que maiores número de repetições em geral levam a maior polimorfismo. No entanto, outros pares de *primers* observados neste trabalho, como PV taaa003 e PV taaaa001, possuem SSR com apenas 3 repetições e amplificam 2 alelos enquanto os pares PV ag006, PV taa002 e PV att004 com 11, 6 e 5 repetições, respectivamente, apresentam bandas monomórficas. Essas observações sugerem a não existência de uma correlação entre o número de unidade repetitiva e número de alelos detectados. Esta falta de correlação também foi relatada por PANAUD et al. (1996), YU et al. (1999) e RALLO et al. (2000).

No presente trabalho, foram detectados polimorfismos em microsatélites com pequeno número de repetições como (TAAA)₃. Não existe nenhuma definição do número de repetições que devem existir para considerar a seqüência repetitiva como microsatélite (YU et al., 1999). No entanto, PETES et al. (1997) sugerem um tamanho variando de 15 a 50 pares de bases. Os dados do trabalho de YU et al. (1999) demonstraram que pequenas repetições, por gerar polimorfismo, são também importantes fontes para o desenvolvimento de marcadores SSR polimórficos em feijão, confirmando o observado no presente trabalho.

Os polimorfismos revelados por alguns pares de *primers* mostram que a diferença do número de bases entre alelos nem sempre é múltiplo do número de bases da unidade repetitiva. Um exemplo é o par de *primers* PV att001 que amplifica o microsatélite (ATT)₄n(TTTA)₃, e, portanto possui uma unidade repetitiva com 3 pb e outra com 4 pb. Este par amplifica duas bandas com diferença de apenas 1 pb. A mesma observação já foi relatada por RALLO et al. (2000). Segundo eles, o polimorfismo dos microsatélites pode não apenas ser baseado no número de repetições, mas também encontrados em regiões que flanqueiam os SSRs. Deleções e inserções de uma única base ou mesmo de fragmentos longos de DNA em regiões flanqueadoras como fonte de variação de SSRs foram mencionados em outros trabalhos (GIANFRANCESCHI et al., 1998; BUTELER et al., 1999). No presente trabalho observou-se ainda que o par de *primers* PV ttc002 amplifica uma banda de 203

pb no clone BAC que o originou. Esse fragmento contém o microsatélite TTC com 4 repetições e o TCGG com 3 repetições conforme seqüenciado. No entanto, esses *primers* amplificam em outro genótipo, um fragmento de 153 pb. Este fragmento com 50 pb a menos que o obtido no clone BAC indica que houve nesse genótipo uma deleção muito maior que o SSR. Esses dados confirmam que a variação dos marcadores microsatélites pode ser resultante de deleções/inserções fora das unidades repetitivas.

Microsatélites são marcadores eficientes tanto para mapeamentos quanto para seleção assistida em programas de melhoramento, pois são marcadores co-dominantes, baseados em PCR e altamente polimórficos. No entanto, seu desenvolvimento é trabalhoso, demorado e caro (RALLO et al., 2000). Para tentar contornar esses problemas, no presente trabalho, foram desenvolvidos marcadores microsatélites a partir de clones BAC. O procedimento adotado se mostrou um eficiente mecanismo de desenvolvimento de marcadores microsatélites. A estratégia de utilização de clones BAC disponíveis, por não haver a necessidade de construção de uma biblioteca grande de DNA, foi relativamente rápida e envolveu menor custo e trabalho. No entanto, apenas uma pequena região do genoma pode ser analisada com os *primers* desenvolvidos. A identificação futura desses marcadores envolvendo outros tipos de biblioteca deve ser realizada para que o genoma do feijoeiro seja saturado com esses marcadores. A utilidade dos marcadores microsatélites para programas de melhoramento aumenta à medida em que um maior número de *primers* é desenvolvido (PANAUD et al., 1996).

Os marcadores microsatélites desenvolvidos no presente trabalho combinados com os desenvolvidos anteriormente por YU et al. (1999, 2000b) e com os marcadores RFLP, AFLP, RAPD e SCAR proporcionam uma importante ferramenta para uso no melhoramento e no estudo genético do feijoeiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A., FUJIMURA, T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1071-1077, 1996.
- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.133, p.1131-1139, 1992.
- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p.125-133, 2001.
- BRUNEL, D.A. microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. **Plant Molecular Biology**, v.24, p.397-400, 1994.
- BUTELER, M.I., JARRET, R.L., LABONTE, D.R. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p.123-132, 1999.
- CAICEDO, A.L., GAITÁN, E., DUQUE, M.C., CHICA, O.T., DEBOUCK, D.G., TOHME, J. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. **Crop Science**, v.39, p.1497-1507, 1999.
- CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D. MACAULAY, M., MARSHALL, D., WAUGH, R. Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, v.156, p.847-854, 2000.
- CHEN, X., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, Y.G., McCOUCH, S.R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.553-567, 1997.
- CREGAN, P.B., BHAGWAT, A.A., AKKAYA, M.S. RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods Mol. Cell Biol.**, v.5, p.49-61, 1994.
- CREGAN, P.B., MUDGE, J., FICKUS, E.W., MAREK, L.F., DANESH, D., DENNY, R., SHOEMAKER, R.C. MATTHEWS, B.F., JARVIK, T., YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.919-928, 1999.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

- GIANFRANCESCHI, L., SEGLIAS, N., TARCHINI, R. KOMJANC, M., GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., AFANADOR, L., KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, n.1, p.122-125, 1994.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.505-512, 1993.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.4, n.1, p.1-11, 1998.
- LAVI, U., AKKAYA, M., BHAGWAT, A., LAHAV, E., CREGAN, P.B. Methodology of generation and characteristics of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M.). **Euphytica**, v.80, p.171-177, 1994.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.203-221, 1987.
- McCOUCH, S.R., CHEN, X., PANAUD, O., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, Y.G., HUANG, N., ISHII, T., BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.89-99, 1997.
- 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.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.
- PANAUD, O., CHEN, X., McCOUCH, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, v.252, p.597-607, 1996.
- PARK, S.O., COYNE, D.P., BOKOSI, J.M., STEADMAN, J.R. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. **Euphytica**, v.105, n.2, p.133-141, 1999.

- PETES, T.D., GREENWELL, P.W., DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.146, p.491-498, 1997.
- RALLO, P., DORADO, G., MARTÍN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.984-989, 2000.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.
- SMULDERS, M.J.M., BREDEMEIJER, G., RUS-KORTEKAAS, W. et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of others *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.264-272, 1997.
- TOHME, J., GONZALEZ, D.O., BEEBE, S., DUQUE, M.C. AFLP analysis of gene pools of wild bean core collection. **Crop Science**, v.36, p.1375-1384, 1996.
- VANHOUTEN, V., MACKENZIE, S. Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. **Plant Molecular Biology**, v.40, p.977-983, 1999.
- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three mayor anthracnose resistance gene in common bean. **Crop Science**, v.37, p.940-946, 1997.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement**, v.41, p.45-46, 1998.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v.42, p.27-34, 1999.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. **Plant Breeding**, v.119, p.411-415, 2000a.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V, et al. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, v.91, n.6, p.429-434, 2000b.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

A mancha-angular do feijoeiro, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* tem se destacado como uma das principais doenças da parte aérea, causando sérios prejuízos, especialmente quando as condições ambientais são favoráveis. Dentre as estratégias de manejo integrado para esta doença, o uso de variedades resistentes tem sido considerada a principal medida, devido a sua eficiência, economicidade e menor prejuízo ao ambiente. No entanto, as variedades plantadas hoje no Brasil não apresentam níveis satisfatórios de resistência a mancha-angular, havendo a necessidade de desenvolvimento de programas de melhoramento visando resistência a essa doença. Os programas de melhoramento requerem contínua avaliação do germoplasma e eventual introgressão de diferentes genes em cultivares elites. Para auxiliar a introgressão, além de identificar fontes de resistência, é necessário: (1) caracterizar os genes das fontes; (2) identificar marcadores moleculares ligados a esses genes, disponibilizando marcadores para seleção assistida; e (3) testar o alelismo entre as fontes, visando identificar os genes que segregam independentemente, e que, portanto constituirão novo gene a ser incorporado no melhoramento.

Visando dar subsídios a programas de melhoramento, têm sido identificadas e caracterizadas fontes de resistência à mancha-angular. Para Minas Gerais, foram encontradas quatro principais fontes: AND 277, MAR-2, México 54 e Cornell 49-242. Estudos anteriores demonstraram que todas elas

apresentam herança monogênica e dominante. Marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a esses genes foram identificados. Mais recentemente, uma nova fonte de resistência foi detectada, BAT 332. Esta fonte tem especial importância, por apresentar resistência complementar às fontes anteriormente identificadas. A combinação da resistência de BAT 332 com as demais fontes pode, portanto, resultar em variedades com resistência às principais raças do patógeno. No presente trabalho, foi estudada a herança da resistência dessa linhagem. Foi demonstrado que um único gene dominante confere resistência à mancha-angular. Dois marcadores RAPD ligados a esse gene foram identificados, OPAO12₉₅₀ e OPAA07₉₅₀. Estes marcadores foram mapeados a, respectivamente, 5,83 e 5,10 cM do gene. O marcador OPAO12₉₅₀, apesar de um pouco mais distante do gene, está sendo utilizado atualmente no programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV. Ele gera uma banda facilmente visualizada, facilitando a identificação de indivíduos que apresentam o gene de resistência. O primer OPAA07 amplifica um número grande de bandas, o que dificulta a visualização do marcador. A transformação futura deste marcador RAPD em SCAR será de grande utilidade para que ele possa ser mais eficiente em programas de melhoramento com seleção assistida.

Testes de alelismo foram realizados entre as cinco fontes de resistência. A utilização de diferentes cruzamentos e diferentes patótipos demonstrou uma complexidade muito maior que a reportada anteriormente na caracterização da herança da resistência desses genótipos. Foi observado que Cornell 49-242 possui apenas um gene dominante, propondo-se a denominação de *Phg-3*, México 54 três genes denominados de *Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*. Em MAR-2 foram encontrados dois genes, um independente designado *Phg-4* e outro uma forma alélica de *Phg-5*, denominado de *Phg-5*². Formas alélicas também foram encontradas em BAT 332, *Phg-6*² e em AND 277, *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*². Esses resultados são de especial importância para programas de melhoramento cujo objetivo é a piramidação de genes de resistência. Entendendo a relação entre os genes, o melhorista tem a oportunidade de escolher os genitores de seu programa de forma a obter variedades com o maior número e melhor combinação possível de genes de resistência.

Dentro das cinco fontes de resistência identificadas como potenciais para uso em programas de melhoramento em Minas Gerais, a única do grupo

andino é AND 277. Tem sido reportado a importância de combinar genes de resistência andinos e mesoamericano para obter variedades com resistência complementar a um grande número de raças de mancha-angular. Essa importância é consequência da grande variabilidade comprovada deste patógeno e da co-evolução patógeno/hospedeiro observada no feijoeiro. No entanto, os dados do presente trabalho levantaram dúvidas sobre a presença de genes andinos que conferem resistência à mancha-angular em AND 277. Trabalhos futuros devem ser realizados para caracterizar melhor a complexa resistência dessa variedade. Novas fontes de resistência do grupo andino também devem ser identificadas para que possam ser incorporadas nos programas de melhoramento.

A maioria dos marcadores identificados para feijão até o momento é do tipo RAPD, no entanto, novos marcadores como microssatélites (SSRs), comumente usados em genética humana, tem ganhado popularidade entre os melhoristas e geneticistas de plantas. A utilização desses eficientes marcadores em feijão tem sido limitada pela pequena disponibilidade de *primers* desenvolvidos para essa cultura. No presente trabalho, foram desenvolvidos alguns marcadores microssatélites utilizando clones BAC como fonte de DNA. Vinte e um *primers* amplificaram bandas únicas e bem definidas. O número de alelos por loco gerado por esses *primers* variou de um a seis, demonstrando o alto polimorfismo desses marcadores. O procedimento adotado se mostrou eficiente no desenvolvimento de marcadores microssatélites, sendo relativamente rápido e envolvendo menor custo e trabalho, quando comparado com o procedimento de construção de biblioteca genômica. No entanto, apenas uma pequena região do genoma, a contida nos clones BAC, pode ser analisada com os *primers* desenvolvidos. A identificação futura desses marcadores envolvendo outros tipos de biblioteca deve ser realizada para que todo o genoma do feijoeiro seja mapeado com esses marcadores. De qualquer maneira, esse conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos combinados com os demais marcadores disponíveis proporcionam uma importante ferramenta para uso no melhoramento e no estudo genético do feijoeiro. Além disso, esses marcadores microssatélites serão de grande utilidade para saturar região específica, a que contém os clones BAC, do mapa de ligação do feijoeiro.