MÁRCIA REGINA COSTA

MELHORAMENTO DE FEIJÕES PRETO E VERMELHO VISANDO A RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR, COM AUXÍLIO DE MARCADORES MOLECULARES

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
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

T
C837m
2007

Costa, Márcia Regina, 1978-
Melhoramento de feijões preto e vermelho visando a resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, com auxílio de marcadores moleculares / Márcia Regina Costa. – Viçosa, MG, 2007.
xi, 88f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 74-88.

1. Feijão - Resistência a doenças e pragas. 2. Feijão - Melhoramento genético. 3. Marcadores genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 635.65293

MÁRCIA REGINA COSTA

MELHORAMENTO DE FEIJÕES PRETO E VERMELHO VISANDO A RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR, COM AUXÍLIO DE MARCADORES MOLECULARES

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: 10 de agosto de 2007.

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

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Pedro Crescêncio de S. Carneiro

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Aos meus pais **Vitor** e **Lia**, que não mediram esforços para que esse sonho fosse realizado, pelo amor e carinho constantes, pela alegria, compreensão e incentivo durante a minha vida.

DEDICO

Aos meus irmãos **Marcone** e **Mariana**, pelo carinho, amor e torcida para o meu sucesso.

Aos meus avós, **Conceição**, **Maria**, **Natalino** (*in memorian*) e **Francisco** (*in memorian*).

Ao querido **Idelmar**, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e constante proteção.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram, depositando toda confiança na minha pessoa e que são a razão do meu viver.

Aos meus irmãos Marcone e Mariana pela companhia, apoio e convivência.

Ao meu namorado Idelmar, pelo apoio, companheirismo, incentivo, conselhos, carinhos e, principalmente, por está sempre presente em todos os momentos.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, que foi um “pai científico”, me orientando desde 1998, pela confiança, amizade, orientação e por sua colaboração em na minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pelo apoio recebido, pelas sugestões e pela amizade.

Ao Professor José Eustáquio de Souza Carneiro pelas valiosas sugestões, participações no desenvolvimento deste trabalho, paciência e amizade.

Aos membros da banca examinadora, professores José Eustáquio, Pedro e aos doutores Trazilbo e Eveline, pelas críticas e contribuições para a melhoria deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e melhoramento pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Aos amigos do laboratório e do campo: Thiago, Demerson, Pedro, Marcos, Naldo, Newton, Carlos, Bia, Ana, Andréia, Cassiana, Glauco, Jorge, Marcinha, Polyana, Valéria, Suelen, Bruno, Jeziel, Lelisangela, José Eduardo, Alisson, Camila, Fernada, Josi, Marcelo pelo agradável convivência.

Ao amigo Klever que muito contribuiu, sem medir esforços, na realização deste trabalho e pela sua amizade.

A estagiária e amiga Janaína que muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, juntamente com a Glauce.

As amigas do clube da Luluzinha, Letícia, Cíntia, Lílian, Eliesi, Grasi, Cris e Hermínia que muito me apoiaram e sempre estiveram ao meu lado, mesmo estando de longe.

Aos amigos, Carlinha, Toninho, Dartagnan, Fernando, Taboca, Fernanda, Marcelinho, Adilson, Luciano, Toninho, Porquinho, Betinho, Beto, Gisele, Augusto, Adhemar, Fernando, Tatiana, Marinaldo, que muito me apoiaram.

Aos funcionários Aloísio, Gláucia, Fausto, Rose, Rita e Conceição pelo apoio durante o doutorado. Em especial ao Sr. Pintinho, Gilberto e todos os funcionários de campo que muito me ajudaram na condução dos trabalhos em casa de vegetação e no campo.

Aos amigos do curso pela com grande amizade e companheirismo, em especial a Leonarda, Luiz, Fábio e aos coordenadores do GenMelhor (2005/2006).

Aos novos colegas da UNIMONTES, em especial a Dulce, que me receberam com muita atenção, carinho e compreensão.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

MÁRCIA REGINA COSTA, filha de Vítor Edis da Costa e Maria José da Costa, nasceu em Diamantina, Minas Gerais, em 09 de setembro de 1978.

Em março de 1997, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), colando grau em maio de 2002.

Em fevereiro de 2004, concluiu o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A partir de março de 2004, iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 10 de agosto de 2007.

Em fevereiro de 2007, tornou-se professora do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros/UNIMONTES.

SUMARIO

Páginas
RESUMO viii
ABSTRACT x
1. INTRODUÇÃO GERAL 1
2. OBJETIVOS 3
3. REVISÃO DE LITERATURA 4
3.1. Doenças do feijoeiro e fontes de resistência 4
3.2. Uso de marcadores moleculares e piramidação de genes de resistência a patógenos no melhoramento do feijoeiro 11

CAPÍTULO 1
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LINHAGENS DE FEIJÃO PRETO RESISTENTES À ANTRACNOSE, MANCHA-ANGULAR E FERRUGEM 16
1. INTRODUÇÃO 16
2. MATERIAIS E MÉTODOS 18
2.1. Obtenção de linhagens de grão tipo preto 18
2.2. Extração e amplificação de DNA e seleção por meio de marcadores moleculares 18
2.2.1. Extração de DNA 18
2.2.2. Amplificação de DNA com marcadores SCAR 19
2.2.3. Seleção por meio de marcadores moleculares 19
2.3. Caracterização fenotípica das linhagens obtidas 20
2.3.2. Inoculação e avaliação da reação a *Colletotrichum lindemuthianum* 20
2.3.2. Inoculação e avaliação da reação a *Uromyces appendiculatus* 21
2.3.3. Inoculação e avaliação da reação a *Pseudocercospora griseola* 22
2.4. Avaliação do potencial produtivo das linhagens obtidas em condições de campo 22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
3.1. Obtenção de linhagens de grão tipo preto 25
3.2. Análise da reação a C. lindemuthianum, U. appendiculatus e P. griseola 25
4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO 41

CAPÍTULO 2
OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES CONTENDO GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR 42
1. INTRODUÇÃO 42
2. MATERIAIS E MÉTODOS 44
2.1. Escolha de novas fontes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular 44
2.2. Validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular e seleção 45
2.3. Cruzamentos e obtenção de populações 47
2.4. Extração e amplificação de DNA 47
2.4.1. Extração de DNA 47
2.4.2. Amplificação de DNA com marcadores SCAR 49

Páginas

2.4.3. Amplificação de DNA com marcadores RAPD.....49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
3.1. Validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular 51
3.2. Cruzamentos e obtenção de populações.....53
4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO 61

CAPÍTULO 3
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, MANCHA-ANGULAR E FERRUGEM EM VARIEDADES DE FEIJÃO VERMELHO.....62
1. INTRODUÇÃO.....62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....64
2.1. Cruzamentos e seleção com o cultivar Vermelhinho 64
2.2. Cruzamentos e seleção com o cultivar Ouro Vermelho 65
2.3. Extração de DNA e amplificação por SCAR 66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
3.1. Seleção nas populações Vermelhinho e Rudá “R” 67
3.2. Seleção nas populações Ouro Vermelho e Rudá “R1” 68
4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO 72

CONCLUSÕES GERAIS 73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....74

RESUMO

COSTA, Márcia Regina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Melhoramento de feijões preto e vermelho visando a resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, como o auxílio de marcadores moleculares.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: José Eustáquio de Souza Carneiro e Maurilio Alves Moreira.

Antracnose, ferrugem e mancha-angular, incitadas, respectivamente, por *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Pseudocercospora griseola,* são importantes doenças que causam sérios prejuízos à cultura do feijoeiro. O programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV desenvolveu uma linhagem com grãos carioca (Rudá "R") contendo os seguintes genes de resistência: *Co-4*, *Co-6* e *Co-10* (antracnose)*; Ur-ON* (ferrugem) e *Phg-1* (mancha-angular). Para transferir tais genes para feijão de grão preto, foi conduzido um programa de retrocruzamentos, auxiliado por marcadores moleculares, envolvendo Rudá "R" e o cv. Diamante Negro (genitor recorrente). A partir da autofecundação de 32 plantas RC_3F_1, foram obtidas 40 linhagens com grãos pretos que possuíam combinações de, no mínimo, três marcas ligadas aos genes mencionados. As linhagens foram avaliadas quanto à resistência a diferentes raças de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola.* As linhagens DNR14 e DNR16 foram resistentes a todas as raças avaliadas de *C. lindemuthianum*, com exceção da raça 2047. As linhagens DNR12, DNR31, DNR36 e DNR38 foram resistentes às duas raças de *U. appendiculatus* avaliadas. As linhagens DNR3, DNR4, DNR5, DNR7, DNR8, DNR10, DNR12, DNR24, DNR30, DNR33 e DNR34 foram resistentes a todas raças de *P. griseola* avaliadas. O potencial produtivo das 40 linhagens também foi avaliado nas safras de "inverno" em 2006 e de "seca" em 2007. Todas as linhagens apresentaram rendimento estatisticamente igual ou superior a Rudá "R" e Diamante Negro. Para incrementar a pirâmide de genes no *background* preto, plantas RC3F2 (Diamante Negro x Rudá "R") contendo os genes *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* foram cruzadas com a isolinha carioca Rudá "R1", portadora dos genes $Co\text{-}4^2$, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*. A partir deste cruzamento e seleção com marcadores moleculares, foram obtidas 35 famílias F_4 com grãos pretos e com, no mínimo, cinco marcas de resistência. Plantas F_2 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1"], contendo os genes $Co\text{-}4^2$, *Co-5*, *Co-6*, e *Phg-1*, foram cruzadas com indivíduos de famílias $F_{2:3}$, contendo

os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11*, para transferência de genes *Ur* para a pirâmide. Foi possível obter oito famílias F_3 com, no mínimo, cinco marcas associados a genes de resistência, porém, duas delas apresentaram grãos carioca e as demais, grãos fora dos padrões aceitáveis para os grupos carioca e preto. Plantas [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1"], contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* foram cruzadas com o cv. MAR 2 (*Phg-MAR 2*) e as que continham os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10* e *Ur-ON* foram cruzadas com o cv. Cornell 49-242 (*Phg-3*). Plantas RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") contendo os genes *Co-4*, *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*, foram cruzados com indivíduos RC_3F_2 (Rudá x BAT 332), que possuíam o gene *Phg-6*^{2}. Nos três cruzamentos, a cada geração as plantas obtidas foram selecionadas com marcadores moleculares ligados a cada gene envolvido nos cruzamentos além dos marcadores para os genes *I e bc-3*. A partir do primeiro cruzamento foram obtidas 16 plantas com, no mínimo, oito genes, sendo que nove delas geraram sementes de cor preta. No segundo, obteve-se 13 plantas com oito ou nove genes que geraram somente sementes F_3 pretas, mas com brilho. No terceiro, dez famílias F_4 foram obtidas com, no mínimo, dois genes e todas com grãos pretos. Para transferir genes de resistência para feijões de grão vermelho, cruzamentos e ciclos de retrocruzamentos entre o cv. Vermelhinho (genitor recorrente) e Rudá "R" foram conduzidos, bem como entre Ouro Vermelho (genitor recorrente) e Rudá "R1". Nesses cruzamentos as seleções também foram realizadas por marcadores moleculares ligados aos genes envolvidos e no padrão de cor dos grãos. Para o cruzamento entre Vermelhinho e Rudá "R" foram obtidas 19 famílias RC_2F_3 contendo no mínimo dois genes e com grãos vermelhos. No outro cruzamento, 29 famílias RC_2F_3 de grãos vermelhos e com quatro marcas, no mínimo, foram selecionadas. Diante dos resultados podê-se concluir que a seleção assistida por marcadores moleculares no processo de obtenção de linhagens com vários genes de resistência é eficiente, que os marcadores moleculares ligados a genes de resistência devem ser altamente específicos para que possam auxiliar no processo de transferência de genes para outros *backgrounds* genéticos e que a transferência de genes entre cultivares de grupos de cor de grão diferentes é demorado, exigindo a realização de um maior número de retrocruzamentos para a recuperação do tipo de grão original.

ABSTRACT

COSTA, Márcia Regina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2007. **Improvement of red and black beans for resistance to anthracnose, rust and angular leaf spot with the aid of molecular markers.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisers: José Eustáquio de Souza Carneiro and Maurilio Alves Moreira.

Anthracnose, rust, and angular leaf spot incited by *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* and *Pseudocercospora griseola*, respectively, are important diseases causing serious damages to the common bean crop. The common bean breeding program of BIOAGRO/UFV developed a line with carioca type grains (Rudá "R") containing the following resistance genes: *Co-4*, *Co-6* and *Co-10* (anthracnose); *Ur-ON* (rust) and *Phg-1* (angular leaf spot). To transfer those genes to a black bean background, a backcrossing program was conducted with the aid of molecular markers, by involving Rudá "R" (donor genitor) and cultivar Diamante Negro (recurrent genitor). By selfing 32 BC_3F_1 plants, 40 black grained lines were obtained that possessed combinations with at least three markers linked to those genes. The lines were evaluated for resistance to the different races of *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* and *P. griseola*. Lines DNR14 and DNR16 were resistant to all evaluated races of *C. lindemuthianum*, except for race 2047. Lines DNR12, DNR31, DNR36 and DNR38 were resistant to two races of *U. appendiculatus*. Lines DNR3, DNR4, DNR5, DNR7, DNR8, DNR10, DNR12, DNR24, DNR30, DNR33 and DNR34 were resistant to all races of *P. griseola* tested. The yield potentials of all 40 lines were evaluated during the “winter” season of 2006 and the “dry” season of 2007. The yield potentials of all lines were statistically equal to or higher than those of Rudá “R” and Diamante Negro. To increase the gene pyramid in the “black-type” background BC_3F_2 plants (Diamante Negro x Rudá "R") containing the genes *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON and Phg-1* were crossed with the carioca line Rudá "R1" carrying the genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* and *Phg-1*. From this crossing and selection with molecular markers, 35 F_4 families with black grains and at least five resistance markers were obtained. F_2 plants [BC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1"] containing the genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, and *Phg-1* were crossed with plants of the $F_{2:3}$ families containing the genes *Ur-ON*, *Ur-5* and *Ur-11* for transfering the *Ur* genes to the black bean pyramid. It was possible to obtain eight F_3 families with at least five markers

associated to resistance genes; however, two of them showed carioca type grains, whereas the grains of the other ones did not present the grain patterns acceptable for either the groups carioca or black. Plants [BC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1"] containing the genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* and *Phg-1* were crossed with the cultivar MAR 2 (*Phg-MAR 2*) and those with the genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10* and *Ur-ON* were crossed with the cultivar Cornell 49-242 (*Phg-3*). BC_3F_2 plants (Diamante Negro x Rudá "R") containing the genes *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* and *Phg-1* were crossed with BC_3F_2 individuals (Rudá x BAT 332) harboring the *Phg-6*^{2} gene. In the three crossings and at each generation, the plants obtained were selected with molecular markers linked to each gene involved into crossings and also with markers for the genes *I* and *bc-3* which confer resistance to the *Bean Common Mosaic Virus*. From the first cross, 16 plants with at least eight genes were obtained, and nine out of the 16 plants generated black-colored seeds. From the second cross, 13 plants with eight or nine genes generating only black F_3 seeds were obtained, but they were all shiny. From the third cross, ten F_4 families with black grains and at least two resistance genes were obtained. To transfer resistance genes to red-grained beans, crossings and backcrossing cycles were conducted between the cv. Vermelhinho (recurrent genitor) and Rudá "R", as well as between cv. Ouro Vermelho (recurrent genitor) and Rudá "R1". In those crossings, selection were also based on molecular markers linked to the genes of interest and on the grain color pattern. For the crossing between cv. Vermelhinho and Rudá "R", BC_2F_3 19 families containing at least two resistance genes and red grains were obtained. In the other crossing, 29 BC_2F_3 families with red grains and at least four markers were selected. According to the results, the following conclusions were drawn: the selection assisted by molecular markers in the process for obtaining lines with several resistance genes is efficient; the molecular markers should be tightly linked to the resistance genes; and transferring the genes between cultivars from different grain groups is slow, and requires a high number of backcrossings for recovering the original grain type.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos alimentos básicos da população mundial, e é a leguminosa mais consumida mundialmente. O feijão é uma importante fonte de proteínas (22% de sua constituição), vitaminas (folatos) e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn), especialmente em países em desenvolvimento (MIKLAS et al. 2006). No Brasil, o feijão representa 18,5% da proteína consumida pela população, chegando a representar, na região Nordeste do país, 34% do ferro consumido (LAJOLO et al., 1996). Além da grande importância na dieta do brasileiro, o feijão é um produto agrícola de relevância econômica e social, por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que utilizam alta tecnologia.

O Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor mundial de feijão. Na safra 2005/2006, a produção brasileira foi de 3,265 milhões de toneladas, ocupando uma área de 4,2 milhões de hectares. O consumo *per capita* de feijão no Brasil está em torno de 16 kg/ano, sendo a que a preferência é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão (CONAB, 2007). O feijão preto é consumido principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio de Janeiro. Já nas demais regiões do país, o consumo é quase exclusivo de feijão do tipo carioca. No caso do feijão vermelho, seu consumo é bastante restrito a determinadas regiões, como é o caso da Zona da Mata Mineira.

Apesar da produtividade ter aumentado nos últimos anos, a média nacional, de apenas 808 kg/ha, ainda é pouco expressiva (CONAB, 2007).

A baixa produtividade é atribuída a vários fatores, como o cultivo em consórcio, o plantio com baixo nível tecnológico, a desorganização do mercado, a falta de integração dos diversos elos na cadeia produtiva e a alta incidência de doenças. O feijoeiro-comum é suscetível a um grande número de doenças de origem fúngica, bacteriana e virótica. As doenças fúngicas mais importantes da parte aérea da planta são a antracnose, a ferrugem e a mancha-angular, incitadas, respectivamente, por *Colletotrichum lindemuthianum, Uromyces appendiculatus* e *Pseudocercospora griseola*. Entre as bacterioses, a de maior importância é o crestamento-bacteriano-comum,

incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e, entre as viroses, o mosaico-comum do feijoeiro (BCMV).

O uso de cultivares resistentes é uma das estratégias mais eficientes no controle das doenças, pois, além de diminuir o custo de produção, reduz os impactos negativos ao ambiente pela aplicação de agrotóxicos. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro é objetivo constante dos programas de melhoramento. Porém, muitos fungos que atacam a cultura apresentam grande variabilidade patogênica, o que dificulta a obtenção de cultivares com resistência mais durável. Além disso, há grande dificuldade de associar em um mesmo cultivar, pelos métodos convencionais de melhoramento, genes de resistência a várias raças de diferentes patógenos. Dessa forma, marcadores moleculares vêm sendo usados como ferramenta para auxiliar no processo de seleção de genótipos contendo simultaneamente múltiplos alelos de resistência (KELLY e MIKLAS, 1998; YU et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2005).

Em trabalhos do programa de melhoramento do feijoeiro BIOAGRO/UFV, com o auxílio de marcadores moleculares, RAGAGNIN et al. (2003) piramidaram genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) nos cultivares cariocas Rudá e Pérola, de grãos tipo carioca. A isolinha derivada do Rudá, contendo estes genes de resistência piramidados, foi denominada de Rudá “R”. ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo $Co\text{-}4^2$ e introduziu o alelo *Co-5* na pirâmide já presente em Rudá, com o intuito de tornar a pirâmide de resistência à antracnose mais eficaz, obtendo a isolinha “Rudá R1”. O alelo $Co\text{-}4^2$ introduzido é o mais efetivo entre os já caracterizados, sendo o único capaz de conferir resistência à raça 2047 de *C. lindemuthianum*. Novos trabalhos estão sendo conduzidos para que estas pirâmides de genes de resistência sejam transferidas para cultivares do tipo preto e vermelho.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter linhagens e populações de feijão do tipo preto e vermelho com genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular com auxílio de marcadores moleculares.

Os objetivos específicos foram:

1) Para o feijão preto:

1.1) Obter linhagens a partir de indivíduos RC_3F_1 (Diamante Negro x Rudá "R") contendo genes de resistência à antracnose (*Co-4* e *Co-6*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*);

1.2) Caracterizar as linhagens obtidas quanto à resistência a diferentes raças de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*;

1.3) Avaliar, em condições de campo, o comportamento das linhagens contendo os genes de resistência já piramidados;

1.4) Incorporar novos genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular para as poulações de feijão preto já piramidados.

2) Para o feijão vermelho:

2.1) Incorporar os genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6 e Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) no cultivar Vermelhinho;

2.2) Incorporar os genes de resistência à antracnose (*Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6 e Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) no cultivar Ouro Vermelho.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Doenças do feijoeiro e fontes de resistência

A produtividade do feijoeiro é altamente comprometida pela ocorrência de diversas doenças e pragas. VIEIRA (2004) citou mais de 40 doenças que podem acometer o feijoeiro, das quais cerca de quinze são de maior importância. As demais, apesar de menor importância, podem causar danos severos em condições específicas.

No território nacional, as doenças do feijoeiro de maior relevância são a antracnose, a ferrugem, a mancha-angular, o mofo-branco e a murcha-de-fusarium, todas de origem fúngica. Entre as bacterioses, a de maior importância é o crestamento-bacteriano-comum e, entre as viroses, o mosaico-comum.

Os fungos apresentam grande número de formas patogênicas especializadas denominadas raças fisiológicas. Não é possível dizer ao certo quantas raças de *Uromyces appendiculatus*, agente causal da ferrugem do feijoeiro, ocorrem no país e nem a sua distribuição geográfica. Este fungo é um parasita obrigatório que se caracteriza por apresentar alta variabilidade, o que dificulta o trabalho de melhoramento visando à resistência. MORA (1986) identificou 53 raças de *U. appendiculatus* a partir de 80 isolados monopustulares coletados em oito estados brasileiros (SC, PR, SP, RJ, MG, ES, GO e PE) e apenas quatro dessas raças foram encontradas em mais de um estado. FALEIRO et al. (1999) identificaram 13 raças a partir de 15 isolados coletados em diferentes municípios de Minas Gerais e demonstraram a existência de raças diferentes em uma mesma folha, confirmando a alta variabilidade genética do patógeno. Portanto, pode-se dizer que, em cada região produtora de feijão, ocorre grande número de raças, e, além disso, nem sempre são as mesmas de ano para ano (VIEIRA, 1972).

Dependendo das raças que prevalecem em certa região, um cultivar de feijão pode se comportar como resistente ou suscetível. Muitas vezes, um cultivar tido como resistente comporta-se como suscetível porque foi infectado por uma raça nova do patógeno. Isso aconteceu com os cultivares de feijão preto Milionário 1732 e Rico 1735, lançados em 1983: além de muito

produtivos, eram resistentes à ferrugem (VIEIRA, 1983); contudo, poucos anos depois de distribuídas as sementes, passaram a ser infectados.

A ferrugem incitada é uma importante doença do feijoeiro, especialmente nos plantios da “seca” e do “inverno”, quando as condições para o seu desenvolvimento (temperaturas moderadas, 17-22ºC) são mais favoráveis. Estudos genéticos têm evidenciado que a resistência a *U. appendiculatus* é controlada por gene dominante único (ou bloco gênico) e que existem muitos genes de efeito menor atuando na determinação desse caráter (CARVALHO et al., 1978; MEINERS, 1981; STAVELY, 1984a; STAVELY, 1984b; GRAFTON et al., 1985; STAVELY e GRAFTON, 1985; WEBSTER e AINSWORTH, 1988; FALEIRO, 1997). FALEIRO (1997), estudando a herança da resistência do cultivar Ouro Negro a quatro patótipos de *U. appendiculatus*, mostrou que um gene "maior", possivelmente associado a genes "menores", seria responsável pela resistência à ferrugem deste cultivar. No entanto, dois genes independentes parecem estar envolvidos na resistência aos patótipos 44 e 52 no cruzamento entre os cultivares Olathe e Aurora (GRAFTON et al., 1985). Além disso, estes últimos autores demonstraram que o cultivar Olathe apresenta gene que tem comportamento complementar a outro presente na linhagem T-39, que confere resistência ao patótipos 44 de *U. appendiculatus.*

Nove genes de resistência à ferrugem foram identificados: *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-6* (PARK et al., 2004), *Ur-7* (PARK et al., 2003), *Ur-9*, *Ur-11*, *Ur-12* (JUNG et al., 1998) e *Ur-13* (MIENIE et al., 2005). Pelo menos outros quatro ainda não foram nomeados, um na linhagem BAC 6 (JUNG et al., 1996), um do cultivar Ouro Negro (CORRÊA et al., 2000) e dois no cultivar Dorado (MIKLAS et al., 2000). No mapa integrado do feijoeiro, segundo KELLY et al. (2003) e KELLY e VALLEJO (2004), podem ser observados genes de resistência à ferrugem organizados em *clusters* com alguns genes de resistência à antracnose. No grupo de ligação B1, por exemplo, os genes *Ur-9* e *Co-1* estão ligados. No grupo B4 são observados os genes *Ur-5* com o *Co-3/Co-9* e o *Ur-ON* ligado ao *Co-10*. Já o *Ur-3* encontra-se ligado ao gene *Co-2* no grupo de ligação B11.

Entre as fontes de resistência à ferrugem encontram-se os cultivares Aurora (gene *Ur-3*), México 235 (gene *Ur-4*), México 309 (gene *Ur-5*), Golden Gate Wax (gene *Ur-6*), GN 1140 (gene *Ur-7*), US 3 (gene *Ur-8*), Pompadour Checa (gene *Ur-9*), PI 181996 (alelo $Ur\text{-}3^2$) e Belmidak RR-11 (gene *Ur-11*)

(BASSETT, 2004). As principais fontes de resistência à ferrugem utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV são os cultivares Ouro Negro (gene *Ur-ON*), México 309 (gene *Ur-5*) e Belmidak RR-11 (gene *Ur-11*).

Outra importante doença que ataca o feijoeiro é a antracnose, cujo agente é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Esse patógeno também apresenta raças fisiológicas, mas em número inferior ao apresentado pela ferrugem. O levantamento feito por RAVA et al. (1994) mostrou a ocorrência de 25 diferentes raças de *C. lindemuthianum* no território brasileiro.

A alta umidade relativa do ar e temperatura entre 13 e 26 ^{o}C favorecem a ocorrência dessa doença. Entre os fatores que contribuem para a disseminação do patógeno, encontram-se as chuvas moderadas freqüentes acompanhadas de ventos e, na disseminação a curta distância, o salpico de chuva sobre os resíduos de colheita (PASTOR-CORRALES, 1985). A disseminação a longas distâncias realiza-se, principalmente, por meio de sementes (SINGH, 1991; PASTOR-CORRALES, 1985), de insetos e do próprio homem (PASTOR-CORRALES, 1985).

As perdas causadas pela antracnose podem chegar a 100% quando são empregadas sementes contaminadas em regiões onde prevaleçam condições ideais para o desenvolvimento da doença (PELOSO, 1992).

Vários genes que conferem resistência à antracnose já foram caracterizados em diversos cultivares. KELLY e YOUNG (1996) propuseram uma nomenclatura para designar os genes de resistência à antracnose, usando o símbolo *Co* (de *Colletotrichum*). Até o momento, foram identificados dez genes independentes de resistência à antracnose (*Co-1* a *Co-10*); no entanto, MÉNDEZ-VIGO et al. (2005) relataram que os genes *Co-3* e *Co-9* são alelos de um mesmo loco. Com exceção do alelo de resistência do loco c*o-8*, todos os outros são dominantes e nos locos *Co-1*, *Co-3* e *Co-4* existe uma série alélica (MIKLAS et al., 2006).

O gene *Co-2*, presente no cultivar Cornell 49-242, foi intensivamente utilizado como fonte de resistência à antracnose. Outros genes de resistência estão presentes nos cultivares Michigan Dark Red Kidney (gene *Co-1*), México 222 (gene *Co-3*), TO (gene *Co-4*), TU (gene *Co-5*), AB 136 (genes *Co-6 e co-8*), G 2333 (genes *Co-4*^{2}*, Co-5* e *Co-7*) e Ouro Negro (gene *Co-10*) (BASSETT, 2004; ALZATE-MARIN et al., 2003). Vários outros alelos foram identificados e

estão presentes nos cultivares Kaboon (*Co-1*^{2}), Perry Marrow (*Co-1*^{3}), AND 277 (*Co-1*^{4}), Widusa (*Co-1*^{5}), México 227 (*Co-3*^{2}), Sel 1308 (*Co-4*^{2}) e PI 207.262 (*Co-4*^{3}) (BASSETT, 2004). Todas estas fontes têm sido utilizadas em diversos programas de melhoramento. O gene *Co-2*, entretanto, não fornece proteção contra diversas raças encontradas no Brasil (MENEZES & DIANESE, 1988), inclusive a raça 89, predominante em Minas Gerais (RAVA et al., 1994). Entre as principais fontes de resistência à antracnose utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV encontram-se os cultivares TO (gene *Co-4*), AB 136 (gene *Co-6*), G2333 (genes *Co-4*^{2}, *Co-5* e *Co-7*). O cultivar Ouro Negro (Honduras 35), que é utilizado como fonte de resistência à ferrugem nesse programa, também tem se mostrado uma boa fonte de resistência à antracnose. Possuidor do gene *Co-10*, confere resistência a 14 dos 15 principais patótipos de *C. lindemuthianum* encontrados no Brasil (ALZATE-MARIN et al., 2003).

A mancha-angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, era considerada de pequena importância no passado, pois aparecia no final do ciclo da cultura, não causando grandes perdas. Entretanto, hoje é considerada de grande importância, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios “da seca” ou safrinha nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SARTORATO, 2001), podendo causar redução de até 70% na produção.

Temperaturas entre 16 e 28 ^{o}C, com ótimo em 24 ^{o}C, e alta umidade são condições favoráveis ao desenvolvimento de *P. griseola*. Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece a sua disseminação (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956).

Pensava-se, inicialmente, que o número de raças de *P. griseola* fosse baixo (ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ, 1979). Entretanto, estudos posteriores indicam que essa conclusão estava incorreta. Foram identificados 26 raças de *P. griseola* a partir de 72 isolados coletados no Brasil (NIETSCHE, 2000).

Quase todos os cultivares plantados no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular. Entretanto, fontes de resistência têm sido encontradas (VIEIRA et al., 1999).

NIETSCHE et al. (1997) avaliaram diversas fontes potenciais de resistência no estado de Minas Gerais, sendo México 54, AND 277 (possuidor

do gene *Phg-1*), MAR 2 e Cornell 49-242 identificadas como as mais promissoras fontes de resistência às principais raças do Estado. SARTORATO et al. (1999) identificaram um gene de resistência no cultivar México 54, o qual foi denominado *Phg-2*. Em estudo realizado por NIETSCHE et al. (2000), foi verificado que os genes *Phg-1* e *Phg-2* conferiram resistência a 17 e 16 raças, respectivamente, de 25 raças avaliadas. CORREA et al. (2001) também estudaram a herança da resistência às raças 63.23 e 63.39 e encontraram um gene dominante no cultivar Ouro Negro controlando esta característica. CAIXETA et al. (2005), em seus estudos de alelismo, concluíram que México 54 apresenta, além de *Phg-2*, os genes *Phg-5* e *Phg-6*; BAT 332 possui o alelo *Phg-6*^{2}*,* MAR 2 apresenta o gene *Phg-4* e um alelo *Phg-5*^{2} e o cultivar AND 277 possui os alelos *Phg-2*^{2}, *Phg-3*^{2} e *Phg-4*^{2}, além de *Phg-1*, e o cultivar Cornell 49-242, o gene *Phg-3*. De todos estes genes, somente *Phg-2* foi mapeado no grupo de ligação B8 (MIKLAS et al., 2006). A localização no mapa integrado do feijoeiro para os demais genes ainda não é conhecida.

Além dos genes de efeito maior, a resistência à mancha-angular também foi correlacionada a cinco regiões de *quantitative trait loci* (QTL) identificadas em uma população oriunda do cruzamento entre os cultivares DOR 364 e G 19833 e mapeadas nos grupos de ligação B4 e B10 (LOPEZ et al., 2003).

Segundo OLIVEIRA (2002), os cultivares Antioquia 8, CAL 143, Equador 299 e México 235 também são potencialmente úteis aos programas de melhoramento, apresentando resistência às raças 63.19, 31.17, 63.55 e 63.23 de *P. griseola.* Dentre as principais fontes de resistência à mancha-angular utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV encontram-se os cultivares AND 277, Cornell 49-242, MAR 2, BAT 332, Ouro Negro e México 54.

O crestamento-bacteriano-comum, incitado por *Xantomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, ocorre em quase todas as regiões produtoras de feijão, apresentando grande importância no norte do Paraná, no Rio de Janeiro, no Brasil Central e na Zona da Mata de Minas Gerais. Esta doença ocorre principalmente nas áreas de menor altitude e, portanto, mais quentes, sobretudo por ocasião do plantio das águas (RAVA e SARTORATO,1994). Altas temperaturas e umidade favorecem o desenvolvimento da doença. A penetração da bactéria ocorre por aberturas naturais, como estômatos ou por ferimentos.

O controle químico desta doença não tem sido eficiente (WELLER e SAETTLER, 1976). Desta forma, o uso de sementes sadias e a incorporação de resistência genética a cultivares adaptados e produtivos é a alternativa mais eficiente e econômica de controle. A resistência a essa doença apresenta alguns problemas que dificultam o sucesso dos trabalhos, como por exemplo, a variabilidade do patógeno, a metodologia de inoculação e a avaliação, além da reação diferencial entre folhas e vagens, podendo, em uma mesma planta, ocorrer suscetibilidade nas vagens e resistência nas folhas e vice-versa (RAVA, 1985).

A resistência genética ao crestamento-bacteriano-comum é complexa e já foram identificados 22 QTLs associados à resistência distribuídos nos 11 grupos de ligação do feijoeiro (KELLY et al., 2003). Muitas variedades podem apresentar grau moderado de resistência durante o seu desenvolvimento vegetativo, mas mostram-se suscetíveis durante a sua fase reprodutiva. O cultivar PI 207.262 apresentou reação altamente resistente nas folhas e ligeiramente suscetível nas vagens, enquanto GN 1140 apresentou folhagem altamente suscetível e vagens moderadamente suscetíveis, e a Bush Roma nº 4 foi moderadamente suscetível nas folhas e altamente suscetível nas vagens. Esses fatos indicam que as reações nesses cultivares se devem a recombinações de genes que controlam as respostas de partes distintas da planta à infecção bacteriana (COYNE e SCHUSTER,1974).

KOBAYASTI et al. (1999) avaliaram 35 cultivares de feijão quanto à resistência a crestamento-bacteriano-comum, nas condições de casa-de-vegetação e campo. Os cultivares H 4-22, H 4-9, CI 164-2, CI 257-1, IAPAR 14, CI 107-4, CI 140, CI 164-4, RELAV 37.19 e CI 107-6 foram classificadas pela reação foliar como resistentes em campo e LP 91-22, CI 257-1 e CI 107-4, como resistentes em casa-de-vegetação. Os cultivares Carioca, ANPAT 8.12, ANLAV 8.28 e Ouro Negro foram classificados como suscetíveis em campo, e CI 257, ANPAT 8.12, Milionário, Carioca MG, CI 128, CI 164-3, H 4-22 e CI 257-2, como suscetíveis em casa-de-vegetação. SILVA et al. (1999) classificaram as linhas CB 511687-1, CB 733753 e o cultivar Diamante Negro como resistentes e os cultivares Rosinha G-2 e Compuesto Chimaltenango 2, como suscetíveis. O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV vem utilizando o cultivar Diamante Negro como genitor recorrente para obtenção de linhagens de grãos pretos com genes de

resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular piramidados em seu *background*. Dentro desse processo, tem-se o objetivo da manutenção dos genes para resistência ao crestamento-bacteriano-comum.

O mosaico-comum (BCMV, *Bean Common Mosaic Virus*) encontra-se amplamente disseminado nas regiões produtoras de feijão do Brasil. No campo, essa doença é transmitida por meio de afídeos (pulgões). Em altas temperaturas (acima de 30 ºC) ocorre o aparecimento dos sintomas de necrose, conhecida também como “raiz negra” ou “necrose-do-topo” (GROGAN e WALKER,1978). Quando os sintomas de necrose aparecem, a virose passa a ser denominada de BCMNV (*Bean Common Mosaic Necrosis Virus*). A necrose sistêmica é uma reação de hipersensibilidade das plantas resistentes à infecção causada pelo vírus.

A resistência do BCMV é condicionada por uma série multialélica. Vários genes já foram caracterizados, dentre eles um alelo dominante denominado *I* e outros três de caráter recessivo (*bc-3*, $bc\text{-}1^2$, $bc\text{-}2^2$), todos mapeados em grupos de ligação diferentes.

A resistência dominante ao BCMV e BCMNV condicionada pela presença do gene *I* tem sido uma estratégia para o controle destas doenças por longo tempo (KELLY, 1997). Entretanto, a presença da necrose-induzida por temperatura insensível (TINI) causando a BCMNV, na presença do gene *I*, pode apresentar um problema, pois a sua presença causa uma resposta de hipersensibilidade resultando em necrose vascular e, conseqüentemente, na morte das plantas infectadas. Desta forma, a piramidação do gene dominante *I* e dos genes específicos, tornam uma estratégia eficiente, estável e durável para o controle da BCMV e BCMNV (KELLY et al.,1995).

Interações epistáticas ocorrem entre os diferentes genes de resistência quando plantas são inoculadas com algumas estirpes específicas que causam BCMV e BCMNV. Por causa do efeito epistático entre os genes *bc-3* e *I*, o efeito do gene *I* não pode ser detectado fenotipicamente na presença do *bc-3*. O gene *bc-3* confere resistência a todas as estirpes que causam BCMV e BCMNV na presença do gene dominante *I*.

Atualmente, o BCMV tem diminuído sua importância devido às novas variedades recomendadas possuírem o gene *I,* o que lhes conferem resistências a várias estirpes do vírus. Porém, deve-se ter o cuidado em manter este gene nos programas de melhoramento para que a doença não volte a ser

um problema para a cultura. O cultivar Diamante Negro possui resistência a esta doença e está sendo utilizado no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV como genitor recorrente para a obtenção de linhagens de grãos pretos resistentes à antracnose, ferrugem e mancha-angular piramidados em seu *background*. Porém, não se sabe qual gene tal cultivar possui. SANTANA (2006), utilizando marcadores moleculares específicos para cada gene, sugeriu que a resistência do cultivar Diamante Negro é devido a presença do gene *bc-3*. Dentro desse processo, tem-se o objetivo da manuntenção do seu gene para resistência ao BCMV.

3.2. Uso de marcadores moleculares e piramidação de genes de resistência a patógenos no melhoramento do feijoeiro

Com o avanço na utilização de marcadores moleculares, as informações a respeito da diversidade genética do germoplasma das grandes culturas vêm ganhando importantes aplicações nos programas de melhoramento, uma vez que a determinação precisa do grau de parentesco entre linhas ou populações pode auxiliar os melhoristas na obtenção de combinações genéticas mais favoráveis. Os marcadores moleculares têm sido utilizados no estabelecimento de filogenia, determinação de similaridade genética, estudos evolucionários, mapeamento, piramidação de genes, entre outros (FU et al., 1993). Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) têm sido utilizados em diversos programas de melhoramento do feijoeiro para a marcação de genes específicos e para estudos de caracterização de cultivares (variabilidade genética) (YOUNG et al., 1998; ALZATE-MARIN et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2003b). As informações geradas com o uso dos marcadores RAPD, juntamente com informações de características agronômicas, podem ser usadas no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento.

A possibilidade de introduzir no mesmo cultivar um conjunto de genes de resistência para um ou mais patógenos (piramidação de genes) tem despertado grande interesse dos melhoristas. A piramidação de genes de resistência para diferentes raças de um mesmo patógeno é geralmente muito difícil ou mesmo impraticável utilizando somente técnicas do melhoramento convencional, por causa da necessidade de realização de inoculações múltiplas e devido a interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência, especialmente quando o cultivar já possui um gene que confere

resistência a várias raças do patógeno (SINGH et al., 2001). Trabalhos demonstraram que o acúmulo de genes confere maior resistência ao cultivar do que a soma da resistência observada nas linhagens parentais (YOSHIMURA et al., 1995; HUANG et al., 1997; SINGH et al., 2001; RAGAGNIN et al., 2003).

A piramidação de genes de resistência tem sido sugerida como uma estratégia para proporcionar resistência durável a diferentes raças de um mesmo patógeno (NELSON, 1979). Apesar da piramidação de genes não ser uma idéia nova, não há muitos exemplos na literatura de suas aplicações no melhoramento de plantas. Uma possível explicação para este fato é a dificuldade encontrada no processo de combinação de diferentes genes de resistência via métodos tradicionais de melhoramento. Entretanto, marcadores de DNA ligados a genes de resistência possibilitam a identificação precisa dos genótipos contendo os genes de resistência desejados permitindo que eles sejam facilmente acumulados em um único genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares (MILACH e CRUZ, 1997).

De acordo com JOHNSON (1984), a resistência durável a doenças é aquela que permanece efetiva durante seu uso prolongado e amplo, em ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno. Segundo SCHAFER e ROELFS (1985), a probabilidade de um patógeno superar a resistência de uma pirâmide com quatro ou seis genes é muito baixa. Para que isso ocorra, mutantes que surgem independentemente devem ser combinados, ou eles devem surgir simultaneamente ou seqüencialmente no mesmo isolado. NELSON (1979) argumenta que a resistência, decorrente dos efeitos parciais de numerosos genes na planta, exerce menor pressão de seleção sobre o patógeno e, assim, deve ser mais durável. Apesar desse conceito não ser universalmente aceito, há evidência experimental que dá suporte à existência desses efeitos parciais de resistência em alguns sistemas hospedeiro/parasita (BRONDY et al., 1986; PEDERSEN e LEATH, 1988). De acordo com essa teoria, a durabilidade de um cultivar piramidado dependerá do número de genes de resistência a ser vencido pelo patógeno, ou seja, quanto maior o número de genes piramidados mais difícil será vencer a resistência.

Visando auxiliar os programas de melhoramento, os marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) estão sendo usados no mapeamento de genes de resistência a importantes patógenos que causam doenças no feijoeiro. A identificação de

marcadores moleculares ligados a genes de resistência viabiliza a piramidação de genes de resistência em um único cultivar sem a necessidade de inoculações múltiplas (MICHELMORE et al., 1991). Segundo KELLY e MIKLAS (1999), a seleção assistida por marcadores (MAS) é a melhor estratégia no desenvolvimento de genótipos com resistência mais durável por meio da piramidação de genes em combinação com QTL de efeito maior.

Os progamas de melhoramento têm utilizado principalmente a resistência raça-específica para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Quando o patógeno apresenta alta variabilidade, a combinação de diferentes genes específicos para cada raça em um mesmo *background* genético representa uma eficiente alternativa de controle.

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foram desenvolvidas linhas quase isogênicas (NILs, *Near Isogenic Lines*), com grãos do tipo carioca, contendo os genes de resistência à ferrugem provenientes do cultivar Ouro Negro (FALEIRO et al.,1997), os genes de resistência à antracnose *Co-10*, *Co-6* e *Co-4*, dos cultivares Ouro Negro, AB 136 e TO, respectivamente (ALZATE-MARIN et al., 1999; ALZATE-MARIN et al., 2003), e o gene de resistência à mancha-angular, gene *Phg-1*, da linhagem AND 277 (CARVALHO et al.,1998). As NILs foram utlizadas para piramidar estes genes em um só cultivar.

Vários marcadores RAPD foram identificados e *primers* SCARS construídos. RAGAGNIN et al. (1998) identificaram, no cultivar Ouro Negro, o marcador $OPX11_{630a}$ ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 5,8 cM. CORRÊA (1999) desenvolveu, também em Ouro Negro, dois marcadores SCAR mapeados a 4,3 cM ($SCARF10_{1071}$) e 6,0 cM ($SCARBA08_{530}$) do gene que confere resistência à ferrugem. ARRUDA (1998), trabalhando com populações F_2 do cruzamento de Rudá x TO, verificou que o marcador $OPY20_{830}$ encontrava-se ligado ao gene *Co-4*, não apresentando recombinantes. MENARIM et al. (1998), trabalhando com uma população oriunda do cruzamento de AB 136 x Rudá, identificaram o marcador $OPAZ20_{940}$ ligado ao gene *Co-6* a uma distância de 7,4 cM. CARVALHO et al. (1998) verificaram que o marcador $OPH13_{490}$ está ligado em acoplamento ao gene *Phg-1* de resistência à mancha-angular presente na linhagem AND 277, a uma distância de 5,5 cM. Os marcadores $OPN02_{890}$, $OPAC14_{2400}$ e $OPE04_{650}$ estão ligados em acoplamento, respectivamente, a 5,9, 6,6 e 11,8 cM de distância do

gene de resistência de *P. griseola* presente em México 54. Os marcadores $OPN02_{890}$ e $OPE04_{650}$ também estão ligados ao gene de resistência presente em Cornell 49-242 a uma distância de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente (NIETSCHE et al., 2000). CAIXETA et al. (2003) relataram que os marcadores $OPAA07_{950}$ e $OPAO12_{950}$ estão ligados a 5,1 e 5,8 cM, respectivamente, do gene de resistência de *P. griseola* do cultivar BAT 332. Muitos dos marcadores RAPD foram transformados em marcadores SCAR, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Marcadores SCAR ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem, antracnose e mancha-angular, desenvolvidos no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Marcador	Distância (cM)	Gene de resistência	Doença	Fonte de resistência	Referência
SCARY20[a]	1,2	*Co-4*	antracnose	TO	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARC08 [a]	7,8	*Co-4*	antracnose	TO	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARAZ20 [a]	7,1	*Co-6*	antracnose	AB136	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARZ04 [a]	2,9	*Co-6*	antracnose	Michelite	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARAA19 [a]	10,1	*Phg-ON*	man. ang.	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004b)
SCARBA16 [a]	7,1	*Phg-ON*	man. ang	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004b)
SCARM02 [a]	5,3	*Phg-ON*	man. ang	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004b)
SCARH13 [a]	5,6	*Phg-1*	man. ang	AND277	NIETSCHE et al. (2000)
SCARN02 [a]	5,9	*Phg-2*	man. ang	México 54	SARTORATO et al. (2000)
SCARAE19 [a]	1,0	*Ur-11*	ferrugem	Belmidak RR-3	QUEIROZ et al. (2004c)
SCARF10 [a]	4,3	*Ur-ON*	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
SCARBA08 [a]	6,0	*Ur-ON*	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)

a= fase de acomplamento

Em outros programas de melhoramento do feijoeiro, vários marcadores moleculares foram identificados para genes de resistência a doenças, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-bacteriano-comum e BCMV.

Marcador	Gene de resistência	Doença	Referência
SCARBC420	*QTL*	Crestamento-bacteriano	YU et al. (2000)
SCARBC409	*QTL*	Crestamento-bacteriano	ARIYARANTHE et al. (1999)
SCARAP6	*QTL*	Crestamento-bacteriano	MIKLAS et al. (2000)
PV- tttc 001	*QTL*	Crestamento-bacteriano	YU et al. (2004)
SCARW13	*I*	BCMV	MELLOTO et al. (1996)
SCARC11	*bc-3*	BCMV	JOHNSON et al. (1997)
$E_{ACA}M_{CGG}$	*bc-3*	BCMV	MUKESHIMANA et al (2005)
SCARBD5	*bc-1*[2]	BCMV	MIKLAS et al. (2000)
SCARAB3	*Co-5*	Antracnose	VALLEJO e KELLY (2001)
SCARAS13	*Co-4*[2]	Antracnose	YOUNG et al. (1998)
SCARI19	*Ur-5*	Ferrugem	MIKLAS et al. (2000)
PV- atct 001	*Phg-Esal*	Mancha-angular	SILVA et al. (2002)

Trabalhos com genes de resistência já piramidados em algum genótipo de interesse vêm sendo mostrados. KELLY et al. (1995) conseguiram piramidar os genes *I*, *bc-1*, *bc-1*^{2}, *bc-2, bc-2*^{2} e *bc-3* com o uso de marcadores moleculares e fazendo testes de progênie para os genes que não possuíam marcas ligadas. MIKLAS e KELLY (2002) lançaram dois cultivares, USCR-7 e USCR-9, que possuem os genes *I* e *bc-3* que conferem resistência a todas as estirpes do BCMV e BCMNV, além de possuírem resistência a algumas raças de ferrugem e de antracnose (possuem o gene *Co-1*).

O *United States Department of Agriculture* (USDA), em colaboração com as Estações de Experimentação Agrícola de Michigan, Nebraska e North Dakota, EUA, já desenvolveram 51 linhagens com genes para BCMV e ferrugem piramidados em diversos *backgrounds* (PASTOR-CORRALES, 2003). Em Honduras, linhas de feijão carregando o gene de resistência *Ur-11* de origem mesoamericana foram infectadas por uma raça de *U. appendiculatus* recém identificada. Porém, outras linhas que possuíam o gene *Ur-11* associado com o gene *Ur-4* (de origem andina) se mostram resistentes a tal raça (STAVELY et al., 1997). Outras linhagens de feijoeiro, com genes piramidados para resistência a uma ou mais doenças foram citadas por BEAVER et al. (2003), COYNE et al. (2003) e KELLY et al. (2003).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, RAGAGNIN et al. (2003) piramidaram genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) no genitor dos cultivares Rudá e Pérola, de grãos do tipo carioca. COSTA et al. (2006) utilizaram a pirâmide de genes no *background* carioca como genitor doador em retrocruzamentos com o cultivar Diamante Negro que possui grão preto, além da resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico-comum. Posteriormente, ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo *Co-4*^{2} e introduziu o alelo *Co-5* na pirâmide do *background* Rudá, com o intuito de tornar mais eficiente a pirâmide de resistência à antracnose. O alelo *Co-4*^{2} introduzido é o mais efetivo entre os já caracterizados, sendo o único capaz de conferir resistência à raça 2047 de *C. lindemuthianum*. SOUZA (2005) piramidou os genes de resistência *Ur-5* (México 309), *Ur-11* (Belmidak RR-3) e *Ur-ON* (Ouro Negro) também no *background* carioca, utilizando o cultivar Rudá como genitor recorrente.

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE LINHAGENS DE FEIJÃO PRETO RESISTENTES À ANTRACNOSE, MANCHA-ANGULAR E FERRUGEM

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que mais consome feijão-comum no mundo. O consumo *per capita* chega em torno de 16 kg/ano e 17,5 kg/ano considerando o consumo de feijão-comum e de caupi. O consumo varia conforme a região, condição financeira e o tipo do grão. O grão do tipo preto, por exemplo, é consumido preferencialmente nos Estados da região sul, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Já o consumo do grão vermelhinho é bem regionalizado, sendo, principalmente, consumido na Zona da Mata Mineira. O feijão carioca, por outro lado, é o tipo mais consumido em todo o país, atingindo 79% da preferência (WANDER, 2005 e WANDER, 2007).

Apesar de o Brasil ser classificado como o maior produtor mundial de feijão, com uma produção de 3,265 milhões de toneladas, ainda não é suficiente para abastecer o mercado interno em relação ao feijão do tipo preto. Apesar do constante aumento da produção do feijão preto ao redor de 30% no decorrer dos últimos anos, o Brasil ainda apresenta uma grande demanda por este tipo de feijão, que é suprida por importações, principalmente da Argentina. O volume de importações anual de feijão preto adquirido da Argentina tem variado entre 80 e 100 mil toneladas (FNP/SECEX, 2007).

Além disso, de um modo geral, a produtividade é baixa, com apenas 808 kg/ha (CONAB, 2007). Uma das principais razões para esta baixa produtividade é a alta incidência de doenças. VIEIRA (2004) citou mais de 40 doenças que podem acometer o feijão e comprometer a sua produtividade. A antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), a mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), podem ser citadas como as principais doenças fúngicas da parte aérea da planta. Entre as bacterioses, a de maior importância é o crestamento-bacteriano-comum, incitado por *Xanthomonas*

axonopodis pv. phaseoli e, entre as viroses, o mosaico-comum do feijoeiro (BCMV) e o mosaico-dourado do feijoeiro (BGMV).

Vários cultivares de grãos pretos têm sido lançados recentemente, como Valente, Grafite, Campeiro e Supremo. Porém, todos eles são suscetíveis às principais doenças da cultura (EMBRAPA, 2007). O cultivar Ouro Negro (Honduras 35), desde 1991 é um dos cultivares desse grupo que tem se mantido no mercado por vários anos, além de ser um cultivar com ampla aceitação pelos produtores e consumidores, apresenta resistência a várias raças de *C. lindemuthianum* e de *U. appendiculatus*, e a algumas raças de *P. griseola*. Outro cultivar de grãos pretos que tem se destacado desde o seu lançamento em 1991, é o Diamante Negro. Ele possui alto potencial de produtividade, resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico comum, além de excelentes qualidades comerciais e culinárias (EMBRAPA, 1991). Entretanto, Diamante Negro é altamente suscetível a várias raças de *C. lindemuthianum*, *P. griseola* e *U. appendiculatus* (COSTA, 2004).

Em trabalhos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, assistido por marcadores moleculares, foram obtidas linhagens avançadas contendo, individualmente, genes de resistência à antracnose (*Co-10*, *Co-6* e *Co-4*), à ferrugem (*Ur-ON*) e à mancha-angular (*Phg–1*). Simultaneamente, foram identificados marcadores moleculares ligados a esses genes. Em seguida, essas linhagens foram intercruzadas e isolinhas contendo estes genes de resistência foram desenvolvidas (RAGAGNIN et al., 2003). O genótipo recuperado nas isolinhas foi o do cultivar Rudá, com grãos do tipo carioca, nos quais foram denominadas Rudá “R”. COSTA et al. (2006) usou Rudá “R” como genitor doador em retrocruzamentos com o cultivar Diamante Negro, para transferir para este a pirâmide de genes de resistência contida em Rudá “R”, obtendo plantas RC_3F_1. Para o prosseguimento do processo, o objetivo do presente trabalho foi obter linhagens de grãos pretos, a partir de plantas RC3F1 (Diamante Negro x Rudá “R”), caracterizá-las quanto a reação a diversas raças de *C. lindemuthianum*, *P. griseola* e *U. appendiculatus*, além de avaliar o seu comportamento no campo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção de linhagens de grão tipo preto

O material genético recorrente utilizado no trabalho foi o genitor Diamante Negro, cultivar pertencente ao grupo comercial preto, originário de cruzamentos realizados no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, e selecionado pela EMBRAPA Arroz e Feijão. É recomendado para as regiões Sul, Centro-Oeste e para os estados de Minas Gerais e São Paulo. Apresenta hábito de crescimento indeterminado e porte ereto. Possui alto potencial de produtividade, é bem aceito pelos produtores e consumidores, possui resistência ao crestamento-bacteriano-comum e ao mosaico-comum (EMBRAPA, 1991).

A obtenção de linhagens de grão tipo preto contendo genes de resistência aos patógenos de ferrugem (*Ur-ON*), antracnose (*Co-4, Co-6* e *Co-10*) e mancha-angular (*Phg-1*) foi por meio de autofecundações de sementes RC3F1 (Diamante Negro x Rudá "R") obtidas por COSTA (2004). A cada ciclo de autofecundação a seleção foi realizada por marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, juntamente com o aspecto comercial do grão (grãos semelhantes ao cultivar Diamante Negro).

As plantas RC_3F_1 foram autofecundadas e conduzidas até RC_3F_5 em casa de vegetação localizada no Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. As plantas RC_3F_5 foram conduzidas em campo para obtenção de maior número de sementes.

2.2. Extração e amplificação de DNA e seleção por meio de marcadores moleculares

As análises e seleção por meio de marcadores moleculares a cada ciclo da cultura foram realizadas no laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

2.2.1. Extração de DNA

A cada geração, folhas das plantas foram coletadas e armazenadas a $^{-}80°C$ até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi realizada de

acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

2.2.2. Amplificação de DNA com marcadores SCAR

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de SCAR em uma mistura de 15 μl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 100 μM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 5 picomoles de cada *primer* específico, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para uma etapa inicial de 94 ^{o}C por 3 min; 35 ciclos de 94 ^{o}C por 15 s, 1 min e 30 s para a temperatura de pareamento (específica para cada par de *primers*, como descrito na Tabela 1), 72 ^{o}C por 1 min e 30 s; e uma etapa final de 72 ^{o}C por 7 min.

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 3 μl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 μg/ml) e submerso em tampão SB 1X (hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico - BRODY e KERN (2004)). A separação eletroforética foi realizada durante um período de 3h, aproximadamente, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotodigitalizados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). O resultado da amplificação do *primer* SCARAZ20 foram aplicadas em gel de poliacrilamida nativo a 7%/TAE 1X (tris-acetato 40 mM, 1mM EDTA).

2.2.3. Seleção por meio de marcadores moleculares

A seleção para a presença dos genes de resistência de interesse a cada ciclo foi realizada somente por meio de marcadores moleculares ligados a esses genes (MAS – Seleção Assistida por Marcadores). Os *primers* utilizados no processo de seleção estão descritos na Tabela 1.

As plantas selecionadas a cada ciclo foram aquelas que possuíam o maior número de genes de resistência e que apresentavam tipo de grão semelhante ao de Diamante Negro. A seleção foi realizada com base em indivíduos e não por famílias.

Tabela 1 - Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum a ferrugem, antracnose e mancha-angular usados durante a seleção

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Doença	Temperatura de Pareamento (^{0}C)	Referência
$SCARY20_{830a*}$	1,2	*Co-4*	Antracnose	65	QUEIROZ et al. (2004a)
$SCARAZ20_{845a}$	7,1	*Co-6*	Antracnose	60	QUEIROZ et al. (2004a)
$SACRF10_{1050a}$	4,3	*Ur-ON*	Ferrugem	65	CORRÊA et al. (2000)
$SCARH13_{490a}$	5,5	*Phg-1*	Mancha-angular	62	NIETSCHE et al. (2000)

* a – Fase de Ligação em acoplamento

2.3. Caracterização fenotípica das linhagens obtidas

Doze sementes de Diamante Negro, de Rudá "R", das linhagens obtidas e de uma testemunha suscetível, para cada raça avaliada foram semeadas em vasos contendo 3 kg da mistura de solo e esterco curtido (4:1) e adubada com NPK, conforme as necessidades da cultura. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o momento da inoculação.

2.3.1. Inoculação e avaliação da reação a *Colletotrichum lindemuthianum*

A caracterização quanto à resistência da reação à *C. lindemuthianum* foi realizada utilizando as raças 55, 64, 65, 73, 81, 89, 117, 337, 458, 1033 e 2047 *de C. lindemuthianum*. O preparo do inóculo e a inoculação seguiram a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). O inóculo de cada raça foi reproduzido em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Os tubos com o inóculo foram incubados por 10 dias a 23 ^{o}C para a produção dos conídios utilizados na inoculação. A inoculação foi realizada 10 dias após o plantio, utilizando-se uma suspensão contendo 1,2 x 10^6 conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n$^{\underline{o}}$ 15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por sete dias em câmara de nevoeiro (20 $\pm$ 1 ^{o}C e >95% de umidade relativa), sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa-de-vegetação, onde permaneceram até a avaliação.

A avaliação dos sintomas da antracnose foi realizada 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES

(1992). 1- ausência de sintomas; 2- até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; 3- maior freqüência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 4- até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; 5- maior freqüência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 6- manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões no caule, ramos e pecíolos; 7- manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe, presença de abundantes lesões no caule, ramos e pecíolos; 8- manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento das plantas, lesões abundantes lesões no caule, ramos e pecíolo; e 9- maioria das plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.3.2. Inoculação e avaliação da reação a *Uromyces appendiculatus*

Para avaliar a reação a *U. appendiculatus*, foram utilizadas as raças 21.3 e 29.15 de *U. appendiculatus* classificadas por SOUZA (2005). As culturas monopustulares, armazenadas a 5 ^{o}C e 50% de umidade relativa, foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredósporos. A inoculação foi realizada quando as folhas primárias apresentaram aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. Os uredósporos, na concentração de 2,0 x 10^4 esporos/mL, foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e aspergidos em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro (20 $\pm$ 1 ^{o}C e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa-de-vegetação (20 $\pm$ 5 ^{o}C), onde permaneceram até a avaliação.

Aproximadamente quinze dias após a inoculação, foi realizada a avaliação dos sintomas considerando-se seis graus de reação, segundo a escala descrita por (STAVELY et al., 1983): 1- ausência de pústulas; 2-

manchas necróticas sem esporulação; 3- pústulas esporulando com diâmetro < 300 μm; 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300 a 499 μm; 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500 a 800 μm; e 6- pústulas esporulando com diâmetro > 800 μm. As plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis.

2.3.3. Inoculação e avaliação da reação a *Pseudocercospora griseola*

A caracterização da resistência à mancha-angular foi realizada utilizando as raças 63-19, 63-23 e 63-31, classificadas por NIETSCHE (1997 e 2000). O inóculo de cada raça foi reproduzido em placas de Petri contendo meio à base de polpa de tomate. A inoculação foi realizada na primeira folha trifoliolada, em ambas as superfícies da folha, com uma suspensão do patógeno previamente preparada e ajustada para a concentração de 2×10^4 conídios/mL. Os procedimentos de inoculação e transferência para a câmara de nevoeiro e para a casa-de-vegetação foram idênticos aos realizados no ensaio de ferrugem.

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

2.4. Avaliação do potencial produtivo das linhagens obtidas em condições de campo

Para avaliar o potencial produtivo das linhagens obtidas, dois experimentos foram montados e conduzidos na Estação Experimental da UFV

em Coimbra/MG (690 m de altitude, 20º45´S de latitude e 42º51´W de longitude). Um experimento foi montado na safra de “inverno” em 2006 e o outro, na safra da “seca” em 2007. No primeiro, utilizando o sistema de plantio direto e no segundo, o sistema convencional em que o solo foi previamente limpo, arado e gradeado. Em ambos, durante os períodos de deficiência hídrica, o suprimento de água foi mantido por irrigações suplementares. As adubações e outras práticas culturais foram realizadas de acordo com a recomendação para a cultura. O controle de mofo-branco foi realizado somente no segundo experimento, devido à elevada incidência de mofo-branco durante o período de permanência da cultura no campo. As pragas foram controladas nos dois experimentos antes que atingissem os níveis de dano econômico.

O delineamento utilizado para os dois experimentos foi o látice 7 x 7, com três repetições e parcelas de duas linhas de dois metros de comprimento, espaçadas de 0,5 m para o primeiro e de 0,6 m para o segundo, com densidade de 15 sementes por metro. Os tratamentos constituíram das 40 linhagens obtidas pela MAS e nove testemunhas, sendo duas linhagens (Rudá “R” e Vi 10.2.1) e sete cultivares (Diamante Negro, Ouro Negro, Supremo, Meia-Noite, Campeiro, Valente e Ouro Vermelho).

Os dados de produtividade de grãos foram submetidos à análise de variância por experimento, considerando todos os efeitos como fixos, exceto o erro. O modelo estatístico adotado foi o descrito abaixo:

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

Y_{ijk} = Observação referente ao tratamento i dentro do bloco k, na repetição j;

μ = média geral do experimento;

t_i = efeito do tratamento i (i = 1,2,...,49), admitindo $\sum_{i=1}^{n} t_i = 0$

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

$b_{k(j)}$ = efeito do bloco k dentro da repetição j (k = 1,2,...,7);

e_{ijk} = erro efetivo associado à observação Y_{ijk} com $e_{ijk} \sim NID(0, \sigma_e^2)$.

Após as análises de variância individuais, foi realizada a análise de variância conjunta das duas safras para verificação de interação. Novamente, todos os efeitos foram considerados fixos, com exceção do erro médio, de acordo com o modelo estatístico:

$Y_{ij(s)} = \mu + t_i + a_s + (r/a)_{j(s)} + (ta)_{is} + e_{ij(s)}$, em que:

$Y_{ij(s)}$ = Valor observado do tratamento i (i = 1, 2,...,49) na bloco j (j = 1, 2, 3), na safra s (s = 1,2);

μ = média geral do experimento;

t_i = efeito do tratamento i;

a_s = efeito da safra s;

$(r/a)_{j(s)}$ = efeito do bloco j dentro da safra s;

$(ta)_{is}$ = efeito da interação entre o tratamento i e a safra s;

$e_{ij(s)}$ = erro aleatório associado à observação Y_{ijs} com $_{eijs}$ ~ NID (0, σ_e^2).

Com os dados de médias também foi realizado o teste de Dunnett (VIEIRA, 1999), para comparar as médias de produtividade de grãos. As análises de variâncias individuais e conjunta foram realizadas utilizando-se o programa MSTAT-C (1991) e o teste de média foi realizado, utilizando o programa GENES (CRUZ, 2006).

Durante a condução dos experimentos em condições de campo, a avaliação da severidade de ferrugem e mancha-angular também foi efetuada. As avaliações dos sintomas de ferrugem e mancha-angular foram de acordo com os itens 2.3.2 e 2.3.3 deste capítulo, respectivamente. A avaliação da severidade de antracnose não foi realizada devido o não aparecimento dos sintomas dessa doença durante a condução do experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de linhagens de grão tipo preto

A partir da autofecundação de 32 plantas RC_3F_1 (Diamante Negro x Rudá "R"), com pelo menos três marcas ligadas a genes de resistência, foi possível obter 40 linhagens RC_3F_5. A cada ciclo de autofecundação a seleção foi realizada em plantas que possuíam pelo menos três marcas ligadas a genes de resistência e tipo de grãos semelhantes ao do cultivar recorrente Diamante Negro. A genealogia, denominações e a presença dos genes de resistência, inferida pela presença do marcador correspondente, das 40 linhagens selecionadas estão descritas na Tabela 2. Todas as linhagens obtidas possuem grãos pretos e com padrão semelhante aos de Diamante Negro.

3.2. Análise da reação a *C lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*

Para cada raça de *C lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* testada, dez a doze plantas das 40 linhagens do cruzamento Diamante Negro x Rudá "R" (DNR), dos genitores Diamante Negro e Rudá "R" e uma testemunha suscetível, o Vermelhinho, foram avaliadas.

Os resultados das avaliações das linhagens DNR quanto à reação as raças de *C. lindemuthianum* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Linhagens obtidas pela seleção com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência

Genealogia (RC_3F_5)	Denominação	Genes de resistência*
93.15.1.1.1	DNR1	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
93.15.1.1.15	DNR2	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
93.15.5.8.3	DNR3	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
93.15.5.8.7	DNR4	*Co-4, Co-6, Phg-1*
93.15.5.8.10	DNR5	*Co-4, Co-6, Phg-1*
93.15.5.8.14	DNR6	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
93.15.5.8.15	DNR7	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.34.1.5	DNR8	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.34.1.6	DNR9	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.34.1.9	DNR10	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.34.1.11	DNR11	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.34.1.16	DNR12	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.1.1	DNR13	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.1.2	DNR14	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.1.3	DNR15	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.1.5	DNR16	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.1.7	DNR17	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.1.10	DNR18	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.1.14	DNR19	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.1.15	DNR20	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.1.18	DNR21	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.1.19	DNR22	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.2.2	DNR23	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.3	DNR24	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.4	DNR25	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.7	DNR26	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.5.8	DNR27	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.9	DNR28	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.10	DNR29	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.11	DNR30	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.5.12	DNR31	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.5.13	DNR32	*Co-4, Co-6, Phg-1*
101.4.40.5.14	DNR33	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
101.4.40.7.4	DNR34	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.40.10.13	DNR35	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.8.1.8	DNR36	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.8.2.1	DNR37	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.8.2.3	DNR38	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.8.2.4	DNR39	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
101.4.8.2.6	DNR40	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*

* A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

Tabela 3 – Caracterização fenotípica das linhagens oriundas do cruzamento entre Diamante Negro e Rudá "R" quanto à reação a diferentes raças de *Colletotrichum lindemuthianum*

Genótipos	**Genes de resistência***	**Raças de *Colletotrichum lindemuthianum***										
		55	**64**	**65**	**73**	**81**	**89**	**117**	**337**	**458**	**1033**	**2047**
DNR1	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R/S	R	S
DNR2	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR3	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R	R	R/S	R	R/S	S/R	R	R	S
DNR4	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R/S	R	R	R	S
DNR5	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R/S	R	R	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR6	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	R/S	R	R	R	R/S	S/R	R	R/S	S
DNR7	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R	R	R	R	R	S/R	R	R	S/R
DNR8	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R/S	R/S	R	S/R
DNR9	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R	R	R	R	R	R	R/S	R	R/S
DNR10	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R	R	R	R	R	R/S	R/S	R	R/S
DNR11	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	R/S	R	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR12	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR13	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S/R
DNR14	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**
DNR15	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R/S	R	R/S	R	R	R	R	R	S
DNR16	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**
DNR17	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR18	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R/S	S
DNR19	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR20	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R	R/S	R	R	R	R	R	S
DNR21	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR22	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	R/S	R	R/S	R	R/S	R	R/S	R	S
DNR23	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R/S	R/S	R	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR24	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR25	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR26	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R/S	R/S	R	R	R	R	R	S

Continua...

Tabela 3. Continuação

Genótipos	Genes de resistência*	Raças de *Colletotrichum lindemuthianum*										
		55	**64**	**65**	**73**	**81**	**89**	**117**	**337**	**458**	**1033**	**2047**
DNR27	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R/S	S	R	R/S	R	R	R	R	R	S
DNR28	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR29	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR30	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	S	R/S	R	R	R	R/S	R	R	S
DNR31	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR32	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	R/S	R/S	R/S	R	R	R	R	R	R	S(4)[a]
DNR33	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S(4)
DNR34	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R/S	S/R	R	R	R	R	R	R	R	S(4)
DNR35	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S/R	R	R	R	R	R	R	R	S(4)
DNR36	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR37	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	R/S	R	R	R	R	R	R/S	R	S
DNR38	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S/R	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR39	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S/R	R	R	R	R	R	R	R	S
DNR40	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	R/S	R	R	R	R	R	R	R	S
Diamante Negro**		R	R/S	S	S	S	R/S	R/S	S	S/R	S	S
Rudá “R”**	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R/S	R	R	R	R	R	R	R	R	S/R
Vermelhinho***		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

* A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente; ** Genitores das linhagens; *** Testemunha suscetível; R= Resistente; S= Suscetível; R/S= mistura de mais plantas resistentes do que suscetíveis; S/R= mistura de mais plantas suscetíveis do que resistentes; a= valores entre parênteses correspondem a nota de avaliação. Em negrito, linhagens que apresentaram resistência a todas as raças avaliadas.

Observando os resultados da Tabela 3, verifica-se que o genitor Rudá "R" foi resistente a dez raças de *C. lindemuthianum* e segregante em relação à resistência à raça 2047, como encontrado por RAGAGNIN et al. (2003). O cultivar Diamante Negro comportou-se como resistente à raça 55, segregante para reação às raças 64, 81, 89, 117 e 458 e suscetíveis às demais. As linhagens DNR14 e DNR16 foram resistentes a dez das 11 raças avaliadas, apresentando suscetibilidade somente à raça 2047. Essas duas linhagens apresentaram marcas para os genes *Co-4*, *Co-6* e *Co-10*, mostrando a eficiência dos marcadores usados no processo de seleção. Todas as linhagens apresentaram resistência à raça 89, uma das mais freqüentes no estado de Minas Gerais (ARRUDA, et al., 2007).

As reações das linhagens frente à raça 65 merecem destaque. Grande parte das linhagens (24) segregou com relação à reação a essa raça, apresentando plantas resistentes e suscetíveis. Sete delas (DNR27, DNR28, DNR29, DNR30, DNR31, DNR33 e DNR36) foram suscetíveis, e em todas elas há pelo menos a presença de duas marcas ligadas aos genes de resistência à antracnose. Uma explicação para tal situação seria a seleção de plantas recombinantes, ou seja, que apresentam a marca para o gene de interesse, mas não o próprio gene. Porém, esse evento deve ter ocorrido somente para um dos genes, visto que estas linhagens apresentaram um bom espectro de resistência em relação às outras raças avaliadas.

Algumas das linhagens (DNR7, DNR8, DNR9, DNR10 e DNR13) apresentaram-se como segregantes, com plantas resistentes e suscetíveis à raça 2047, assim como o genitor Rudá "R". Já outras (DNR32, DNR33, DNR34 e DNR35) foram classificadas como suscetíveis, mas com um grau menos severo, todas apresentando nota 4. A resistência a esta raça só é conferida pela presença do alelo $Co\text{-}4^2$, presente no cultivar G2333. Este resultado indica que houve complementação entre os genes piramidados nas linhagens. Nota-se que todas essas linhagens, à exceção da DNR33, apresentaram a combinação das marcas ligadas aos genes *Co-4* e *Co-10*.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por RAGAGNIN et al. (2003), que mostraram que linhagens com genes piramidados apresentaram maior nível de resistência do que a soma da resistência observada nas linhagens parentais. Outros autores também verificaram que o acúmulo de genes pode conferir maior resistência ao cultivar derivado do que a

soma da resistência observada nas linhagens parentais (YOSHIMURA et al., 1995; HUANG et al., 1997; SINGH et al., 2001).

Os resultados das avaliações das linhagens quanto à reação a duas raças de *U. appendiculatus* estão descritas na Tabela 4.

O genitor Rudá "R" foi resistente às duas raças e o Diamante Negro comportou-se como suscetível à raça 21.3 e como segregante à 29.15. Verificou-se que as linhagens DNR12, DNR31, DNR36 e DNR38 foram resistentes e a DNR28 foi suscetível às duas raças avaliadas. Novamente, observa-se a presença de linhagens recombinantes (20%), que apresentaram a marca do gene *Ur-ON*, mas foram suscetíveis, principalmente para a raça 21.3. O contrário também foi observado, linhagens que não apresentaram a marca, mas comportaram-se como resistentes à raça 29.15, porém, neste caso não se pode descartar a hipótese destas linhagens terem herdado algum gene de resistência presente no Diamante Negro, visto que este cultivar comportou-se como segregante frente a esta raça.

O resultado da avaliação das linhagens quanto à reação a três raças de *P. griseola* estão apresentados na Tabela 5.

O genitor Diamante Negro foi suscetível a três raças avaliadas, enquanto o Rudá "R", resistente. Onze linhagens (DNR3, DNR4, DNR5, DNR7, DNR8, DNR10, DNR12, DNR24, DNR30, DNR33 e DNR34) foram resistentes a todas raças. Nenhuma delas comportou-se como suscetível às três raças.

Assim como nas avaliações frente a *C. lindemuthianum* e *U. appendiculatus*, linhagens recombinantes estavam presentes. Treze linhagens não apresentaram a marca para o gene *Phg-1*, mas mostraram resistência para pelo menos uma das raças. Por outro lado, 25 delas, apresentaram a marca, mas não foram resistentes às três raças.

Os dados de avaliação frente à raça 63.55 de *P. griseola* foram contraditórios em relação aos obtidos por RAGAGNIN et al. (2003). Naquele trabalho, a linhagem Rudá "R", bem como o cultivar AND 277, foram classificados como suscetíveis à raça 63.55. Como no presente trabalho a isolinha Rudá "R" e algumas linhagens comportaram-se como resistentes, torna-se necessário a reclassificação da raça 63.55, para verificar se não houve contaminação da mesma.

Tabela 4 – Caracterização fenotípica das linhagens oriundas do cruzamento entre Diamante Negro e Rudá "R" quanto à reação a diferentes raças de *Uromyces appendiculatus*

Genótipos	Genes de resistência*	Raças de *Uromyces appendiculatus*	
		21.3	29.15
DNR1	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R
DNR2	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
DNR3	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S/R	R
DNR4	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR5	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR6	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S/R	R
DNR7	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
DNR8	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
DNR9	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R/S
DNR10	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
DNR11	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S/R	R
DNR12	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**
DNR13	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S/R	R
DNR14	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R
DNR15	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R
DNR16	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R
DNR17	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R
DNR18	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R
DNR19	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R
DNR20	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R
DNR21	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R
DNR22	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR23	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR24	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR25	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR26	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R
DNR27	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	S
DNR28	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R
DNR29	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S/R	R
DNR30	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R
DNR31	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**
DNR32	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R/S	R
DNR33	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
DNR34	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S/R	R
DNR35	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R
DNR36	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**R**	**R**
DNR37	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S/R	R
DNR38	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**R**	**R**
DNR39	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R
DNR40	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R/S	R
Diamante Negro**		S	R/S
Rudá "R"**	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R
Vermelhinho***		S	S

* A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente; ** Genitores das linhagens; *** Testemunha suscetível; R= Resistente; S= Suscetível; R/S= mistura de mais plantas resistentes do que suscetíveis; S/R= mistura de mais plantas suscetíveis do que resistentes. Em negrito, linhagens que apresentaram resistência a todas as raças avaliadas.

Tabela 5 – Caracterização fenotípica das linhagens oriundas do cruzamento entre Diamante Negro e Rudá "R" quanto à reação a diferentes raças de *P. griseola*

Genótipos	Genes de resistência*	Raças de *Pseudocercospora griseola*		
		63.55	63.21	63.23
DNR1	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R	S
DNR2	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	S/R
DNR3	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR4	***Co-4, Co-6, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR5	***Co-4, Co-6, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR6	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	S	R
DNR7	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR8	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR9	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R	R
DNR10	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR11	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R	R
DNR12	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R
DNR13	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	S	S
DNR14	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	S	S
DNR15	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R	R/S
DNR16	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	S	S
DNR17	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S
DNR18	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S
DNR19	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	S	S
DNR20	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	R	S
DNR21	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R	S
DNR22	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R/S	S	S
DNR23	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R	R
DNR24	***Co-4, Co-6, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR25	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R	R
DNR26	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	S	R	R
DNR27	*Co-4, Co-6, Phg-1*	R	S	R
DNR28	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R	R
DNR29	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R	R
DNR30	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR31	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	S	R	R
DNR32	*Co-4, Co-6, Phg-1*	S	R	R
DNR33	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**R**	**R**	**R**
DNR34	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**R**	**R**	**R**
DNR35	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S
DNR36	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R/S	S
DNR37	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S
DNR38	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R	R	S
DNR39	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	R/S	S	R/S
DNR40	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	S
Diamante Negro**		S	S	S
Rudá "R"**	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	R	R	R
Vermelhinho***		S	S	S

* A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente; ** Genitores das linhagens; *** Testemunha suscetível; R= Resistente; S= Suscetível; R/S= mistura de mais plantas resistentes do que suscetíveis; S/R= mistura de mais plantas suscetíveis do que resistentes. Em negrito, linhagens que apresentaram resistência a todas as raças avaliadas.

Nenhuma das isolinhas obtidas por RAGAGNIN et al. (2003), apresentou-se como recombinantes. Porém, no processo utilizado pelos autores, a seleção foi efetuada por uma combinação de inoculações e marcadores moleculares. Somente as isolinhas tidas como resistentes eram amplificadas com os marcadores, o que eliminava possíveis recombinantes. KELLY et al. (1995) e MIKLAS e KELLY (2002) também usaram durante o processo de obtenção de linhagens com genes de resistência piramidados, inoculações e marcadores moleculares ligados aos genes envolvidos na piramidação para realizar a seleção.

Segundo FALEIRO et al. (2003), vários estudos de herança têm mostrado o envolvimento de genes de efeito maior e genes de efeito menor no controle genético da resistência a diversos patógenos. Em um processo de seleção assistida por marcadores moleculares, a seleção é feita por marcas ligadas a genes de efeito maior. Assim, a seleção feita somente com base nos marcadores pode levar à "perda" de genes de efeito menor presentes nas linhagens parentais. A resistência a algumas raças pode ser governada pela interação entre os genes de efeito menor com os genes de efeito maior. Este fato pode explicar porque algumas linhagens apresentando a marca de um determinado gene, não mantiveram o espectro de resistência apresentada pela isolinha doadora, Rudá "R". Como RAGAGNIN et al. (2003) selecionaram as isolinhas também por inoculações, esses genes de efeito menor foram mantidos, principalmente em relação à resistência à ferrugem, uma vez que para avaliar a reação a *U. appendiculatus* os autores usaram uma mistura de raças do patógeno.

A obtenção de linhagens com combinações de diferentes genes de resistência por métodos de melhoramento convencional seria impraticável ou até mesmo impossível, dependendo da combinação de genes, devido a interações gênicas entre os alelos de resistência. Além disso, considerando que cada gene de resistência é independente, faz-se necessário trabalhar com uma população grande a cada geração, devido a falta de um método de seleção simultânea, por inoculações, para todos os genes de resistência. Apesar de no processo de piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular com grãos pretos, nem todas as linhagens obtidas apresentarem completa resistência a todas as raças de cada patógeno e ter ocorrido o aparecimento de linhagens recombinantes, a seleção somente com

base em marcadores moleculares mostrou-se eficiente, pois a condução desta população, sem o uso de marcadores moleculares, não seria possível.

3.3. Avaliação do potencial produtivo das linhagens obtidas no campo

As 40 linhagens RC_3F_6 obtidas foram submetidas a um ensaio de competição para avaliar o seu potencial produtivo em duas safras, "inverno" de 2006 e "seca" de 2007. O resumo da análise de variância da característica produtividade de grãos (kg/ha) dessas linhagens está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resumo das análises de variância da produtividade de grãos (kg/ha), safras de "inverno" 2006 e "seca" de 2007 da avaliação das linhagens DNR (Diamante Negro x Rudá "R"). Coimbra-MG

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Inverno 2006	Seca 2007
Tratamentos	48	335965,2**	379221,1*
Linhagens(L)	39	142574,1^{ns}	313133,5^{ns}
Testemunhas (T)	8	899461,6**	695076,6**
L vs T	1	3370799,9**	429481,9^{ns}
Erro	78	110958,7	240846,3
CV(%)		11,7	15,3
Média Geral		2837,4	3208,5
Média Linhagens		2909,2	3182,9
Média Testemunhas		2518,2	3322,5
Eficiência do látice		102,9	108,5

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

Pode-se observar que o coeficiente de variação tiveram valores baixos, 11,7% e 15,3%, nas safras "inverno de 2006" e "seca de 2007", respectivamente, indicando boa precisão experimental. Estes valores estão dentro dos recomendados para a cultura segundo MARQUES JÚNIOR (1997). A eficiência do látice comparada ao delineamento de blocos ao acaso foi baixa (2,9% e 8,5%) para as duas safras avaliadas, indicando boa uniformidade da área experimental utilizada.

Observou-se diferenças significativas nas safras "inverno de 2006" ($P \leq 0,01$) e "seca de 2007" ($P \leq 0,05$) para a fonte de variação tratamentos. Porém, na decomposição dos tratamentos, não observou-se diferença significativa considerando somente as linhagens. Isso significa que não houve

variabilidade entre as mesmas. O fato de as linhagens obtidas apresentarem genealogias comuns nas primeiras gerações da seleção (tabela 2) diminuiu a variabiliade entre as linhagens. O contraste entre linhagens e testemunhas foi significativo (P≤0,01) na safra “inverno de 2006”, indicando que existe diferença entre as médias das linhagens e das testemunhas.

Considerando a análise conjunta das duas safras (Tabela 7) verificou-se efeito significativo a 1% de probabilidade para as fontes de variação tratamentos e testemunhas e a 5% para o contraste linhagem vs testemunha. Novamente, não foi possível observar diferença significativa considerando as linhagens. Já as fontes interação tratamento x safras, testemunhas x safra e linhagens vs testemunhas x safra foram significativos a 1% de probabilidade pelo teste F. A interação linhagens x safra não foi significativa, indicando que o comportamento das linhagens foi semelhante nas duas safras.

Tabela 7 – Resumo das análises de variância conjunta da produtividade de grãos (kg/ha), referente as safras “inverno” de 2006 e “seca” de 2007 da avaliação das linhagens DNR (Diamante Negro x Rudá “R”). Coimbra-MG

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Safra (S)	1	10128860,2
Tratamento (T)	48	310471,1**
Linhagem (L)	39	201981,3 ^{ns}
Testemunha (Te)	8	790986,1**
L vs Te	1	697450,7*
Tratamento x Safra	48	404753,9**
L x S	39	253687,8 ^{ns}
Te x S	8	803627,3**
L vs Te x S	1	3105342,6**
Erro	156	175902,5
CV(%)		12,5
Média Geral		3022,9
Média Linhagens		3046,0
Média Testemunhas		2920,3

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

O desempenho médio das linhagens e testemunhas, avaliadas na safra “inverno” de 2006, está apresentado na Tabela 8 A média geral nesta safra foi de 2.837,4 kg/ha. Todas as linhagens, com exceção da DNR5, apresentaram produção estatisticamente igual à do cultivar Diamante Negro. Elas também apresentaram produção estatisticamente igual às dos cultivares Meia-Noite, Campeiro e Ouro Negro, os quais são recomendadas. Dezoito das linhagens

apresentaram produção superior em relação aos cultivares Supremo, Valente e Ouro Vermelho e às linhagens Vi 10.2.1 e Rudá “R” (Tabela 8).

Na safra “inverno” de 2006, as linhagens obtidas e as testemunhas foram também avaliadas em relação à incidência das doenças durante o ciclo da cultura. Trinta e cinco linhagens foram suscetíveis à mancha-angular. Apenas cinco comportaram-se como resistentes, e destas, somente duas possuíam a marca para o gene *Phg-1*. As demais, mesmo possuindo a marca para este gene, foram suscetíveis, inclusive a linhagem doadora do gene, Rudá “R” (Tabela 8). Este resultado mostra que o gene *Phg-1* não conferiu resistência às raças que ocorreram no campo. Algumas linhagens não possuíam a marca, mas foram resistentes, indicando que pode haver algum outro gene envolvido no processo que não tenha sido previamente identificado.

Quanto à avaliação para a ferrugem, oito linhagens foram suscetíveis, sendo que sete delas comportaram-se como linhagens recombinantes, visto que possuíam a marca para o gene *Ur-ON*, mas foram suscetíveis. Nas outras 32 linhagens resistentes, oito não possuíam a marca para o gene, mas foram resistentes, mostrando-se também como recombinantes (Tabela 8). Não houve avaliação para resistência à antracnose por não terem sido observados sintomas da doença em nenhuma linhagem ou testemunha.

As dez linhagens que apresentaram os melhores desempenhos no campo, na safra “inverno” de 2006, foram as DNR21, DNR37, DNR25, DNR19, DNR12, DNR38, DNR1, DNR33, DNR31 e DNR17. Em casa de vegetação, todas essas foram suscetíveis somente à raça 2047 de *C. lindemuthianum,* com exceção das linhagens DNR31 e DNR33, que também foram suscetíveis à raça 65. Com relação às raças de *U. appendiculatus*, sete foram resistentes às duas raças, DNR12, DNR31, DNR1, DNR33, DNR36, DNR37 e DNR38. As demais foram suscetíveis à raça 21.3. Quanto às avaliações para as raças de *P. griseola*, somente as linhagens DNR12 e DNR33 foram resistentes às três raças. Das demais, cinco foram resistentes a duas raças e três resistentes somente a uma das três raças avaliadas.

A produtividade média das linhagens e testemunhas, avaliadas na safra “seca” de 2007, está apresentada na Tabela 9. A média geral nesta safra foi de 3.208,5 kg/ha. Somente a testemunha Ouro Vermelho apresentou produtividade estatisticamente superior à isolinha Rudá “R”. Os demais tratamentos, não diferiram dos genitores Diamante Negro e Rudá “R”. Todas as

linhagens tiveram suas produtividades estatisticamente iguais aos cultivares comerciais usados como testemunhas. Nesta safra não houve incidência de doenças no campo.

As dez linhagens que apresentaram os melhores desempenhos, na safra "seca" de 2007, foram as DNR18, DNR15, DNR14, DNR21, DNR23, DNR33, DNR26, DNR35, DNR19 e DNR9. Em casa de vegetação, todas essas foram suscetíveis somente à raça 2047 de *C. lindemuthianum,* com exceção das linhagens DNR33, mas que apresentou suscetibilidade a raça 65. Para a avaliação às raças de *U. appendiculatus*, as linhagens DNR9, DNR26, DNR33 e DNR35 foram resistentes às duas raças avaliadas e a demais foram suscetíveis à raça 21.3. Nas avaliações para as raças de *P. griseola*, somente a linhagem DNR33 apresentou resistência às três raças. Das demais, seis foram resistentes a duas raças e três resistentes somente a uma das três raças avaliadas.

A produtividade média das linhagens e testemunhas, avaliadas nas duas safras, está apresentada na Tabela 10. Somente a testemunha Ouro Vermelho e a linhagem DNR21 apresentaram produtividade estatisticamente superior à isolinha Rudá "R". Os demais tratamentos, não diferiram dos genitores Diamante Negro e Rudá "R". Todas as linhagens tiveram suas produtividades estatisticamente iguais aos cultivares comerciais usados como testemunhas.

Como a interação linhagens x safra não foi significativa, as médias da análise conjunta (Tabela 10) torna-se mais interessante. As dez linhagens que apresentaram as maiores médias foram DNR21, DNR18, DNR33, DNR15, DNR19, DNR17, DNR12, DNR35, DNR14 e DNR37. Entre essas, destacam-se a DNR33 e DNR12 que apresentaram resistentes homozigotas a todas as raças testadas, dos três patógens, com exceção da raça 2047 de *C. lindemuthianum*. Todas as dez linhagens poderão ser incluídas em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) 2007/2009, onde serão complementados os dados de produtividade e resistência a doenças em uma rede de ensaio nacional. Além disso, poderão ser utilizadas como genitores doadoras de genes de resistência em outros programas de melhoramento, visto que as mesmas apresentam características comerciais, além do espectro de resistência.

Tabela 8 – Médias da produtividade de grãos (kg/ha), marcadores dos genes e notas atribuídas às reações à ferrugem (F) e à mancha-angular (MA) das linhagens e testemunhas avaliadas na safra "inverno" 2006. Coimbra, MG.

Tratamento	Média(Kg/ha)		Genes de resistência**	F***	MA***
DNR21	**3348,6**	**a**[1]	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**4(S)**	**5 (S)**
Meia-Noite*	3245,7	A		1 (R)	4 (R)
DNR37	**3211,3**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**2 (R)**	**4 (R)**
DNR25	**3187,4**	**A**	***Co-4, Co-6, Phg-1***	**2 (R)**	**6 (S)**
DNR19	**3122,8**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**2 (R)**	**5 (S)**
DNR12	**3108,5**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**2 (R)**	**5 (S)**
DNR38	**3107,6**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***	**2 (R)**	**5 (S)**
Campeiro*	3105,0	A		2 (R)	6 (S)
DNR1	**3099,1**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON***	**4 (S)**	**4 (R)**
DNR33	**3079,8**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**1 (R)**	**6 (S)**
DNR31	**3075,6**	**A**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***	**1 (R)**	**6 (S)**
DNR17	**3063,1**	**A**	***Co-4, Co- Co-10,6, Ur-ON***	**4 (S)**	**6 (S)**
DNR24	3063,0	A	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	4 (R)
DNR18	3036,9	A	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*	2 (R)	5 (S)
DNR13	3036,5	A	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*	5 (S)	5 (S)
DNR6	3026,2	A	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*	2 (R)	6 (S)
DNR39	3018,3	A	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*	3 (R)	5 (S)
DNR34	3000,9	A	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	1 (R)	6 (S)
DNR32	3000,4	A	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	6 (S)
DNR8	2987,4	A	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR20	2959,3	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	3 (R)	5 (S)
DNR30	2949,5	Ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	5 (S)
DNR16	2939,8	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	4 (S)	5 (S)
DNR9	2913,9	Ab	*Co-4, Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	4 (R)
DNR29	2893,1	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR28	2883,7	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR15	2882,9	Ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	5 (S)	5 (S)
DNR35	2878,4	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	3 (R)	5 (S)
DNR7	2867,7	Ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	6 (S)
DNR10	2858,1	Ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	5 (S)
DNR36	2856,5	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*	2 (R)	6 (S)
Ouro Negro*	2825,4	Ab		1 (R)	6 (S)
DNR22	2758,3	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	5 (S)	5 (S)
DNR40	2741,4	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR2	2736,7	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	3 (R)	5 (S)
DNR27	2682,6	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR14	2673,9	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	4 (S)	6 (S)
DNR26	2671,3	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*	3 (R)	4 (R)
DNR23	2666,1	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	3 (R)	5 (S)
DNR3	2663,0	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
DNR4	2645,8	Ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*	1 (R)	6 (S)
DNR11	2484,0	Ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	5 (S)
Vi 10.2.1*	2226,5	B		1 (R)	4 (R)
DNR5	2190,0	B	*Co-4, Co-6, Phg-1*	2 (R)	5 (S)
Supremo*	2148,1	B		2 (R)	3 (R)
Ouro Vermelho*	2089,5	B		4 (S)	5 (S)
Valente*	1758,3	B		6 (R)	3 (R)
Diamante Negro*	3091,4	A		6 (S)	6 (S)
Rudá "R"*	2173,6	B	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*	1 (R)	6 (S)

[1] Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Dunnett (P≤0,01); R= plantas resistentes; S = plantas suscetíveis; DNR = linhagens desenvolvidas neste trabalho; * testemunhas; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente; *** Notas referentes a avaliação de ferrugem (F) e mancha-angular (MA). Em negrito, as dez linhagens com melhor desempenho.

Tabela 9 – Médias da produtividade de grãos (kg/ha) e marcadores dos genes, das linhagens e testemunhas avaliadas na safra "seca" de 2007. Coimbra, MG.

Tratamento	Média (Kg/ha)		Genes de resistência**
Ouro Vermelho*	4027,0	a[1]	
Meia-Noite*	3899,9	ab	
Supremo*	3892,1	ab	
DNR 18	**3820,4**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON***
DNR 15	**3712,5**	**ab**	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR 14	**3701,8**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR 21	**3674,0**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR 23	**3634,8**	**ab**	***Co-4, Co-6, Phg-1***
DNR 33	**3575,9**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR 26	**3548,3**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON***
DNR 35	**3500,0**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***
DNR 19	**3417,1**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***
DNR 9	**3407,9**	**ab**	***Co-4, Ur-ON, Phg-1***
DNR 17	3397,4	ab	*Co-4, Co- Co-10,6, Ur-ON*
DNR 5	3380,9	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 12	3324,5	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 3	3317,6	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 30	3302,0	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR 4	3300,7	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 10	3288,7	ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 8	3288,2	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR 7	3224,2	ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
Ouro Negro*	3204,8	ab	
DNR 37	3138,7	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 16	3134,6	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 28	3132,6	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 6	3116,0	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR 27	3109,8	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
Vi.10.2.1*	3107,2	ab	
Valente*	3039,0	ab	
DNR 34	3038,1	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 20	3027,4	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 38	3021,3	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 29	3019,0	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
Campeiro*	3005,8	ab	
DNR 11	3004,7	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 31	2952,4	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 13	2931,6	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR 39	2927,6	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*
DNR 40	2926,8	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR 2	2924,7	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR 36	2788,7	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR 25	2752,6	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 22	2729,1	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 24	2627,3	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR 1	2606,0	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*
DNR 32	2590,0	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
Diamante Negro*	2998,9	a	
Rudá "R"*	2727,7	b	*Co-4, Co-6, Ur-ON, Phg-1*

[1] Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Dunnett (P≤0,01); DNR = linhagens desenvolvidas neste trabalho; * testemunhas; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente. Em negrito, as dez linhagens com melhor desempenho.

Tabela 10 – Médias da produtividade de grãos (kg/ha) das linhagens e testemunhas pela análise conjunta e os marcadores dos genes. Coimbra, MG.

Tratamento	Média (Kg/ha) das duas safras avaliadas		Genes de resistência**
Meia-Noite*	3572,8	a	
DNR21	**3511,3**	**a**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR18	**3428,65**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON***
DNR33	**3327,85**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR15	**3297,7**	**ab**	***Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR19	**3269,95**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***
DNR17	**3230,25**	**ab**	***Co-4, Co- Co-10,6, Ur-ON***
DNR12	**3216,5**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR35	**3189,2**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***
DNR14	**3187,85**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1***
DNR37	**3175,**	**ab**	***Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON***
DNR9	3160,9	ab	*Co-4, Ur-ON, Phg-1*
DNR23	3150,45	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR8	3137,8	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR30	3125,75	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR26	3109,8	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*
DNR10	3073,4	ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR6	3071,1	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR38	3064,45	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
Ouro Vermelho*	3058,25	ab	
Campeiro*	3055,4	ab	
DNR7	3045,95	ab	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DN16	3037,2	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
Supremo*	3020,1	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DN34	3019,5	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
Ouro Negro*	3015,1	ab	
DNR31	3014,	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR28	3008,15	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR20	2993,35	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR3	2990,3	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR13	2984,05	ab	*Co-4, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR4	2973,25	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR39	2972,95	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*
DNR25	2970,	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR29	2956,05	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR27	2896,2	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR1	2852,55	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON*
DNR24	2845,15	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR40	2834,1	ab	*Co-4, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
DNR2	2830,7	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR36	2822,6	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON*
DNR32	2795,2	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR5	2785,45	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
DNR11	2744,35	ab	*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
DNR22	2743,7	ab	*Co-4, Co-6, Phg-1*
Vi 10.2.1*	2666,85	ab	
Valente*	2398,65	ab	
Diamante Negro*	3045,15	a	
Rudá "R"*	2450,65	b	

[1] Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Dunnett (P≤0,01); DNR = linhagens desenvolvidas neste trabalho; * testemunhas; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente. Em negrito, as dez linhagens com melhor desempenho.

4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Com o objetivo de fobter linhagens de grãos pretos, a partir de plantas RC_3F_1 (Diamante Negro x Rudá "R"), caracterizá-las quanto à reação a diversas raças de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola*, além de avaliar o seu comportamento no campo, foi possível obter os seguintes resultados:

- 40 linhagens RC_3F_5 (Diamante Negro x Rudá "R") de grãos pretos contendo combinações de no mínimo, três das cinco marcas dos genes envolvidos (*Co-4, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1*);

- das 40 linhagens obtidas, duas (DNR14 e DNR16) foram resistentes a dez raças de *C lindemuthianum* avaliadas, apresentando suscetibilidade somente à raça 2047; as linhagens DNR12, DNR31, DNR36 e DNR38 foram resistentes às raças 21.3 e 29.15 de *U. appendiculatus*; onze linhagens (DNR3, DNR4, DNR5, DNR7, DNR8, DNR10, DNR12, DNR24, DNR30, DNR33 e DNR34) apresentaram resistência às raças 63.55, 63.23 e 63.21 de *P. griseola*.

- pela avaliação do potencial produtivo das 40 linhagens nas safras "inverno" de 2006 e "seca" de 2007, não verificou-se diferença significativa entre as linhagens nas duas safras e, na análise conjunta, a interação linhagem x safra também não foi significativa. Na primeira safra, todas as linhagens, com exceção da DNR5, apresentaram produtividade estatisticamente igual ao Diamante Negro e superior ao Rudá "R". Elas também apresentaram produção estatisticamente igual às dos cultivares Meia-Noite, Campeiro e Ouro Negro e 18 apresentaram produção superior em relação aos cultivares Supremo, Valente e Ouro Vermelho e às linhagens Vi 10.2.1 e Rudá "R". Na segunda, todas as linhagens tiveram suas produtividades estatisticamente iguais ao Diamante Negro e Rudá "R". As linhagens que apresentaram as maiores médias nas duas safras foram DNR21, DNR18, DNR33, DNR15, DNR19, DNR17, DNR12, DNR35, DNR14 e DNR37.

Diante dos resultados pôde-se concluir que é possível a transferência de vários genes de resistência para um mesmo genótipo com auxílio dos marcadores moleculares.

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES CONTENDO GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR

1. INTRODUÇÃO

A produtividade média do feijão-comum no Brasil, de 808 kg/ha (CONAB, 2007) é pouco expressiva, apesar do país ser o maior produtor do mundo. A baixa produtividade é atribuída a vários fatores, entre eles a grande suscetibilidade do feijoeiro ao ataque de pragas e doenças. Entre as 40 doenças citadas por VIEIRA (2004) que podem atingir o feijoeiro, 15 se destacam como de maior importância.

No manejo de doenças, o uso de cultivares resistentes é uma estratégia bastante eficiente, pois além de diminuir o custo de produção, reduz os impactos negativos ao ambiente, uma vez que evita a aplicação exagerada de agrotóxicos. Neste sentido, o desenvolvimento de cultivares com maior espectro de resistência é uma busca constante dos programas de melhoramento. A piramidação de genes de resistência é uma estratégia que tem sido sugerida para proporcionar resistência durável e de amplo espectro (NELSON, 1978). Pelos métodos convencionais de melhoramento, há uma grande dificuldade no processo de combinação de diferentes genes de resistência, demandando a realização de inoculações múltiplas ou seqüenciais em uma mesma população (MICHELMORE, 1995). Além disso, interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência também dificultam o reconhecimento de alelos em um mesmo genótipo (SINGH et al., 2001). Entretanto, marcadores de DNA ligados a genes de resistência possibilitam a identificação dos genótipos contendo os genes de resistência desejados, permitindo que eles sejam acumulados em um único genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares (MILACH e CRUZ, 1997; KELLY e MIKLAS, 1998; YU et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2005).

Vários genes de resistência já foram identificados em diferentes cultivares, que são indicados como fontes de resistência. O cultivar Ouro

Negro, por exemplo, apresenta um amplo espectro de resistência a *U. appendiculatus* (ferrugem) e a *C. lindemuthianum* (antracnose) (FALEIRO,1997; ALZATE-MARIN et al., 2003). Além de Ouro Negro, outras fontes de resistência à antracnose também foram caracterizadas, entre elas os cultivares TO (gene *Co-4*), AB136 (gene *Co-6*) e G2333 (*Co-4*^{2}, *Co-5* e *Co-7*). Para a ferrugem, além do Ouro Negro (*Ur-ON*), os cultivares México 309 (*Ur-5*) e Belmidak RR-11 (*Ur-11*) também são indicados como excelentes fonte de resistência (BASSETT, 2004). A linhagem AND 277 (*Phg-1*) e os cultivares MAR 2 (*Phg-4 e Phg-5*^{2}), BAT 332 (*Phg-6*^{2}) e Cornell 49-242 (*Phg-3*) são algumas das fontes de resistência para a mancha-angular (CAIXETA et al., 2005). Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência têm sido identificados e usados na seleção assistida por marcadores (SARTORATO et al., 2000; FERREIRA et al., 2000; NIETSCHE, et al., 2000; CAIXETA et al., 2003).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, RAGAGNIN et al. (2003) piramidaram genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) nos genomas dos cultivares Rudá e Pérola, os quais possuem grãos do tipo carioca. As linhagens provenientes de Rudá contendo os alelos de resistência *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* foram denominadas de Rudá "R". Porém, os autores relataram que apenas a introgressão do gene *Phg-1* não foi suficiente na pirâmide não foi eficiente no controle da mancha-angular em condições de campo. Posteriormente, ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo *Co-4*^{2} e introduziu o alelo *Co-5* na pirâmide presente em Rudá, com o intuito de tornar mais eficente a pirâmide de resistência à antracnose. Paralelamente, SOUZA (2005) piramidou os genes de resistência *Ur-5* (México 309), *Ur-11* (Belmidak RR-3) e *Ur-ON* (Ouro Negro) também no *background* carioca, utilizando o cultivar Rudá como genitor recorrente. COSTA et al. (2006), utilizaram a linhagem Rudá "R" como genitor doador para a obtenção de linhagens com grãos pretos em retrocruzamentos com o cultivar Diamante Negro. O presente trabalho objetivou ampliar a base da pirâmide introduzida no *background* preto a partir de cruzamentos com outras fontes de resistência contendo genes distintos daqueles presentes na pirâmide original.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Escolha de novas fontes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular

Para incrementar a pirâmide com outros genes de antracnose, foram escolhidos os alelos *Co-5* e *Co-4*^{2}, pelo fato destes já estarem sendo utilizados pelo Programa de piramidação do BIOAGRO/UFV e pelo fato de *Co-4*^{2} ser o mais eficiente alelo de resistência caracterizado, até o momento, contra as raças de C. *lindemuthianum*.

Em trabalhos recentes conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, a isolinha Rudá "R" foi cruzada com duas linhagens carioca, G-19-1-1-7 e G-1-46-7, possuidoras dos genes *Co-4*^{2} e *Co-5*, respectivamente. Sementes F_1 contendo os genes *Ur-ON*, *Phg-1*, *Co-6*, *Co-10*, *Co-4*^{2} (da linhagem G-19-1-17) e *Co-5* (da linhagem G-1-46-7), obtidas por ARRUDA (2005), neste trabalho foram denominadas de Rudá "R1" (Figura 1).

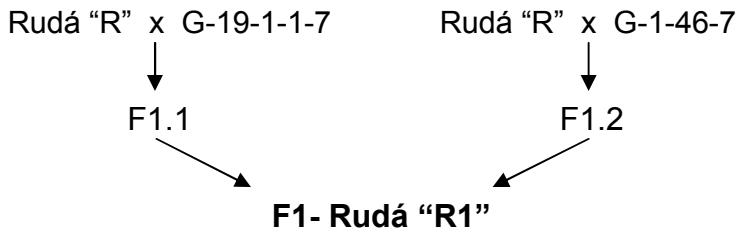

Figura 1: Esquema dos cruzamentos realizados para a obtenção das sementes Rudá "R1" utilizadas como fonte doadora de genes de resistência.

SOUZA (2005) trabalhando com outras fontes de resistência à ferrugem além do Ouro Negro (*Ur-ON*), utilizou os cultivares México 309 e Belmidak RR-3 como fontes dos genes de resistência *Ur-5* e *Ur-11*, respectivamente. Neste trabalho obteve-se isolinhas com o *background* carioca contendo cada gene separadamente, que posteriormente foram intercruzadas obtendo famílias F2:3 contendo os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11*. As sementes dessas famílias utilizadas como fonte de resistência para incrementar a pirâmide de genes de resistência à ferrugem para o *background* preto.

Para aumentar o espectro de resistência à mancha-angular, novas fontes de resistência foram utilizadas. Os cultivares BAT 332, MAR 2 e Cornell 49-242 por apresentarem amplo espectro de resistência, como mostra a Tabela 1, foram escolhidos como fontes doadoras de genes de resistência para os cruzamentos.

Tabela 1. Reação dos cultivares AND 277, MAR 2, Cornell 49-242 e BAT 332 à *Pseudocercospora grioseola* e seus respectivos genes de resistência

Cultivares	Genes*	**Raças de *P. griseola*[1]**					
		63.23	63.39	63.19	31.17	61.41	61.31
AND 277	*Phg-1*, *Phg-2*[2], *Phg-3*[2] e *Phg-4*[2]	R	S	R	R	R	R
MAR 2	*Phg-4* e *Phg-5*[2]	R	R	R	R	R	R
Cornell 49-242	*Phg-3*	R	S	R	R	S	R
BAT 332	*Phg-6*[2]	S	R	S	S	R	S

* Estudo de alelismo conduzido por CAIXETA et al. (2003); [1]Raças caracterizadas por NIETSCHE et al. (2001).

2.2. Validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular e seleção

Para possibilitar o uso dos marcadores ligados aos genes de resistência identificados e testados em feijões do tipo carioca, todas as marcas foram testadas no cultivar Diamante Negro. Além disso, as marcas também foram verificadas nos genótipos que serviram como genitores doadores.

Os marcadores moleculares testados nos genitores estão descritos na Tabela 2.

Para o processo de seleção, os marcadores citados acima que se mostraram úteis, ou seja, que discriminaram os genitores, foram utilizados juntamente com os marcadores usados na seleção com os genes da pirâmide do Rudá “R”, descritos na Tabela 3.

Os marcadores SCARBC420 (YU et al., 2000) e SCARBC409 (ARIYARANTHE et al., 1999), ligados a QTLs associados à resistência ao crestamento-bacteriano-comum também foram testados para o seu eventual uso no monitoramento desses QTLs presentes no cultivar Diamante Negro, usado como genitor recorrente.

Com o mesmo objetivo, foram testados os SCARW13 (MELLOTO et al., 1996) e SCARC11 (JOHNSON et al., 1997) ligados aos genes *I* e *bc-3*, que conferem resistência ao mosaico-comum.

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

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Temperatura de pareamento (°C)
$SCARAS13_{950a}$	11,3	*Co-4*[2]	Antracnose	G2333	69
$SCARAB03_{400a}$	16,4	*Co-5*	Antracnose	G2333	65
$SCARI19_{460a}$	3,3	*Ur-5*	Ferrugem	México 309	53
$SCARAE19_{890r}$	1,0	*Ur-11*	Ferrugem	Belmidak RR-3	58
$SCARN02_{890a}$	5,9	*Phg-Mex*	Mancha-angular	México 54	65
$OPE04_{500a}$	5,8	*Phg-Mar 2*	Mancha-angular	MAR 2	35
$OPAO12_{950a}$	5,8	*Phg-Bat332*	Mancha-angular	BAT 332	35
$OPX11_{550a}$	5,8	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	35
$SCARBC420_{a}$		*QTL*	Crestamento-bacteriano	XAN 159	45
$SCARBC409_{a}$		*QTL*	Crestamento-bacteriano	XAN 159	56
$SCARW13_{690a}$	1,0	*I*	BCMV	N84004	68
$SCARC11_{420r}$	1,0	*bc-3*	BCMV	BAT 93	56

a = fase de ligação em acoplamento; r = fase de ligação em repulsão

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

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Temperatura de pareamento (°C)
$SCARY20_{830a}$	1,2	*Co-4*	Antracnose	TO	65
$SCARAZ20_{940a}$	7,1	*Co-6*	Antracnose	AB 136	60
$SCARH13_{490a}$	5,5	*Phg-1*	Mancha-angular	AND 277	62
$SCAR\ F10_{1050a}$	6,9	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	65

a = fase de ligação em acoplamento; r = fase de ligação em repulsão

A cada ciclo de autofecundação, a seleção dos genótipos de interesse foi efetuada somente com base na presença da marca do gene de resistência e no padrão de grão preto semelhante ao de Diamante Negro.

2.3. Cruzamentos e obtenção de populações

Para substituir o alelo *Co-4* pelo *Co4*^{2} e adicionar o alelo *Co-5*, plantas RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) contendo os genes *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*, obtidas por COSTA et al. (2005), foram cruzadas com plantas F_1- Rudá “R1”. Após a confirmação da obtenção de plantas F_1, essas foram conduzidas por autofecundações em casa de vegetação até a geração F_4. A cada ciclo houve seleção com base nos marcadores moleculares ligados a cada gene de resistência. As sementes F_5 foram levadas a campo para multiplicação e obtenção de sementes em número suficiente para a condução posterior de experimentos de avaliação de potencial produtivo (Figura 2A).

Após a obtenção de plantas F_2 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá “R”) x Rudá “R1”] contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1*, estas foram cruzadas com indivíduos de famílias $F_{2:3}$ que continham os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* e *background* carioca. Após a verificação da obtenção de plantas F_1 oriundas deste cruzamento, as mesmas foram conduzidas por autofecundações em casa de vegetação até a obtenção de famílias F_3 (Figura 2B).

Os cruzamentos com as fontes doadoras de genes de resistência à mancha-angular foram conduzidos separadamente. Plantas F_3 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá “R”) x Rudá “R1”] contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* foram cruzadas com MAR 2 e Cornell 49-242. Estes cultivares são de origem mesoamericana e apresentam grãos de cor creme e preto, respectivamente. Ciclos de autofecundações foram conduzidos para a obtenção das populações F_2 dos dois cruzamentos (Figura 2 C e D). Uma terceira população também foi conduzida, derivada do cruzamento entre plantas RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”), contendo os genes *Co-4*, *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*, e plantas RC_3F_2 (Rudá x BAT 332) obtidos por OLIVEIRA (2002), com *background* carioca (Figura 3).

2.4. Extração e amplificação de DNA

As análises de seleção por meio de marcadores moleculares a cada ciclo da cultura foram realizadas no laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

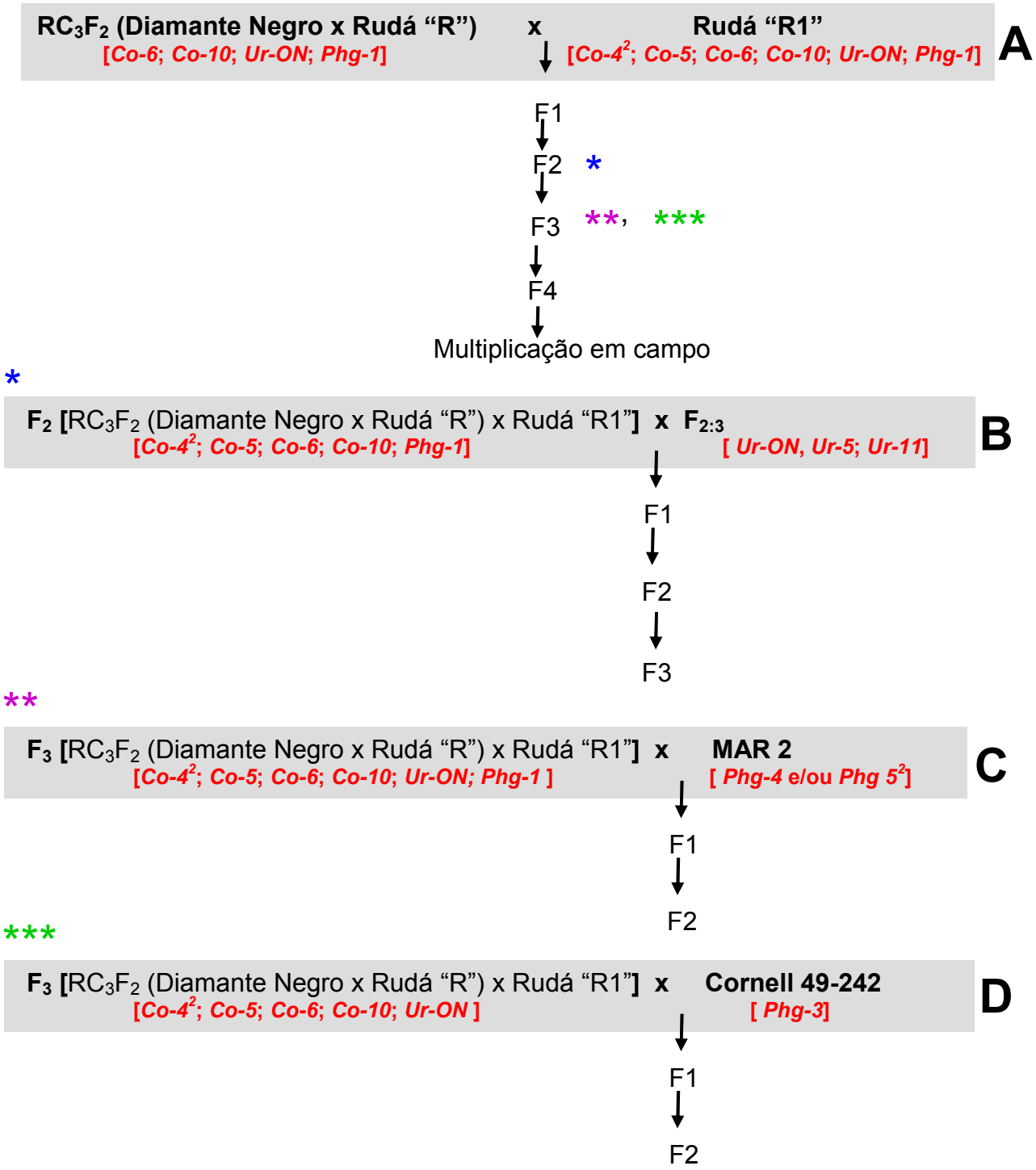

Figura 2: Esquema dos cruzamentos realizados para a obtenção das populações segregantes. **A**- Esquema para incorporação dos genes de resistência, *Co4*^{2} e *Co-5*, à antracnose; **B**- Esquema para incorporação dos genes de resistência, *Ur-11 e Ur-5*, à ferrugem; **C** e **D**- Esquema para incorporação dos genes de resistência à mancha-angular dos cultivares MAR 2 e Cornell 49-242, respectivamente.

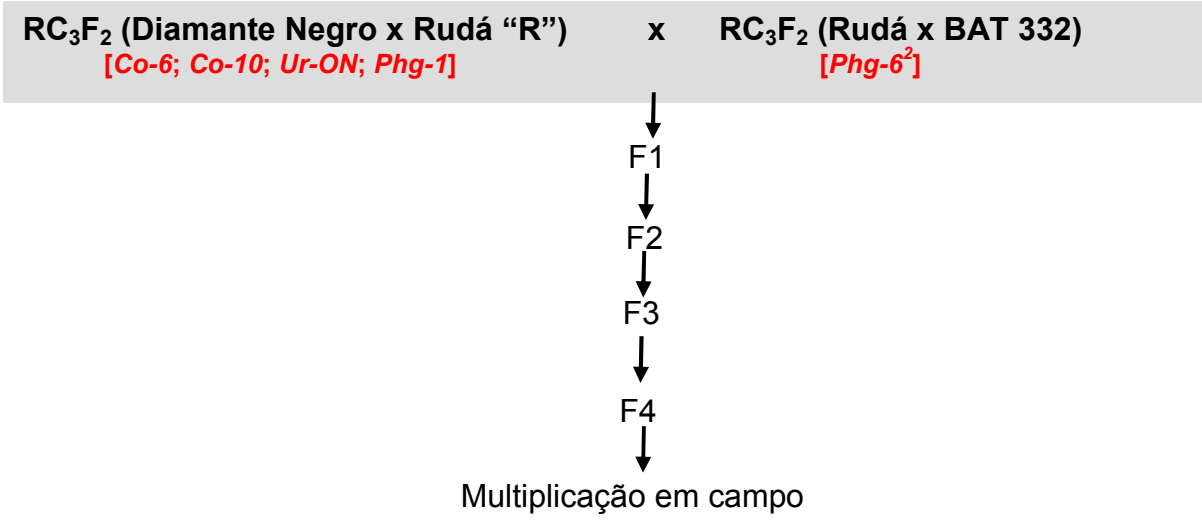

Figura 3: Esquema do cruzamento realizado para incorporação do gene de resistência à mancha-angular do cultivar BAT 332.

2.4.1. Extração de DNA

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

2.4.2. Amplificação de DNA com marcadores SCAR

Este processo foi descrito no item 2.2.2 do capítulo 1 deste trabalho. As temperaturas de pareamento específicas para cada par de *primers* estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

2.4.3. Amplificação de DNA com marcadores RAPD

Amostras de DNA das plantas foram amplificadas pela técnica de RAPD em uma mistura de 25 μl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 100 μM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 4 μM do *primer*, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos de

94 ^{o}C por 15 s, 35 ^{o}C por 30 s e 1 min a 72 ^{o}C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min.

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 3 μl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 μg/ml) e submerso em tampão SB 1X (hidróxido de sódio 10 mM, pH 8,5 ajustado com ácido bórico - BRODY e KERN (2004)). A separação eletroforética foi realizada durante um período de 3h, aproximadamente, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotodigitalizados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular

Os resultados obtidos para a validação dos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência que foram incorporados na nova pirâmide de genes estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos das possíveis novas fontes de resistência doadoras de genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador	Gene de Resistência	Genótipos								
		Diamante Negro	Cornell 49-242	AND 277	Rudá "R1"	México 309	Belmidak RR-3	Ouro Negro	BAT 332	MAR 2
$SCARAS13_{950a}$	*Co-4*^{2}	-			+					
$SCARAB03_{400a}$	*Co-5*	-			+					
$SCARI19_{460a}$	*Ur-5*	-			-	+				
$SCARAE19_{890r}$	*Ur-11*	-			-		-			
$SCARN02_{890a}$	*Phg-Cornell*	-	+	+	-					
$OPE04_{500a}$	*Phg-Mar 2*	-			-					+
$OPAO12_{950a}$	*Phg-Bat332*	-			-				+	
$OPX11_{550a}$	*Ur-ON*	+			+			+		
$SCAR\ F10_{1050a}$	*Ur-ON/ Co-10*	-			+	+		+		
$SCARW13_{690a}$	*I*	-			+	-		-	-	
$SCARC11_{420r}$	*bc-3*	-			+	-		-	-	

a = fase de ligação em acoplamento; r= fase de ligação em repulsão; + = presença da marca; - = ausência da marca. Em cinza, marcadores que não poderão ser usados para a seleção assistida do gene de resistência com o qual ele está ligado durante o processo de piramidação.

Os marcadores moleculares SCARAS13 e SCARAB03, ligados aos genes *Co-4*^{2} e *Co-5*, respectivamente, não amplificaram o DNA do cultivar Diamante Negro, podendo desta forma, serem utilizados na seleção assistida durante o processo de piramidação.

Com relação aos genes de ferrugem, nem todos podem ser utilizados na seleção assistida. O marcador SCARAE19, ligado em repulsão ao gene *Ur-11* não foi polimórfico quando comparado ao cultivar Diamante Negro (Figura 4B). Da mesma forma, o OPX11 também não diferenciou os genitores (Figura 4A). Já o marcador SCARI19 não amplificou o DNA de Diamante Negro. Portanto, somente o marcador SCARI19 poderá ser utilizado na seleção assistida. Cabe

ressaltar que o marcador SCARF10 está ligado aos genes *Ur-ON* e *Ur-5*, não tendo como discriminar, pelo marcador, os dois genes no processo de piramidação. Como os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* conferem, individualmente, resistência a todas as raças de ferrugem encontrados na micoteca do BIOAGRO, tornou-se impraticável a piramidação dos três genes no *background* do Diamante Negro.

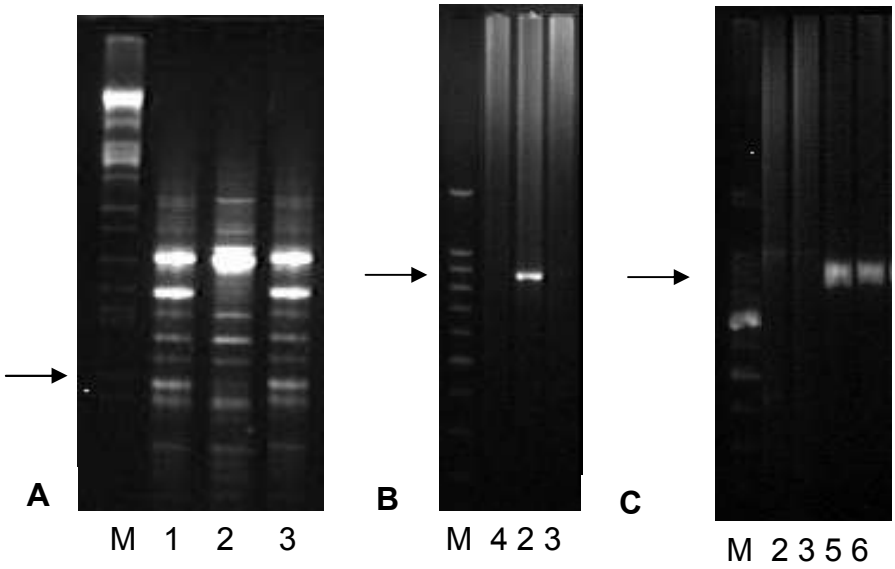

Figura 4: Produtos de amplificação do DNA com os *primers* $OPX11_{550}$ (**A**), $SCARAE19_{890}$ (**B**) e $SCARN02_{890}$ (**C**). Os cultivares Ouro Negro, Rudá, Diamante Negro, Belmidak RR-3, Cornell 49-242 e AND 277, estão representados nas colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A coluna M em (A) contém DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI, *Bam*HI e *Hin*dIII; em (B) e (C) contém marcadores de tamanho de 100pb DNA *ladder* Promega. As setas indicam as bandas de tamanho específico, correspondentes ao marcadores ligados aos genes de resistência.

Para os genes de resistência à mancha-angular, os marcadores SCARN02, OPAO12 e OPE04 ligados aos genes *Phg-3*, *Phg-6*^{2} e *Phg-Mar 2*, respectivamente, foram polimórficos ao amplificar o cultivar Diamante Negro. Porém, o SCARN02 também amplifica o gene *Phg-1*, ficando dessa forma impossibilitado piramidar os genes *Phg-1* e *Phg-3*, em um mesmo genótipo, por seleção assistida.

Para os *primers* $SCARBC420_{420}$ e $SCARBC409_{409}$, ligados a QTLs associados à resistência ao crestamento-bacteriano-comum, não foi possível ajustar uma condição de reação que permitisse amplificar as bandas

características dos marcadores moleculares no cultivar Diamante Negro. Assim, tais marcadores não puderam ser utilizados no processo de seleção assistida, visando à manutenção da resistência ao crestamento-bacteriano-comum proveniente do Diamante Negro.

Os marcadores moleculares ligados aos genes *I* e *bc-3* também foram validados para serem usados no processo de piramidação. Como o marcador SCARC11 ligado em repulsão ao gene *bc-3* não amplifica o DNA do Diamante Negro, conclui-se que a resistência ao BCMV presente em tal cultivar, é devida ao gene *bc-3*. Quanto ao marcador SCARW13, ligado ao gene *I*, não foi possível detectar produto de amplificação, o que permite concluir que o Diamante Negro não deve possuir esse gene. No Brasil não há estirpes do BCMV que diferenciam a presença dos dois genes. Portanto, pelas informações moleculares, acredita-se que o genótipo do Diamante Negro quanto à presença do gene recessivo *bc-3* e o dominante *I*, seja *bc-3bc-3*, *ii*. Segundo SANTANA (2006), o cultivar Rudá também apresenta resistência ao BCMV e apresenta genótipo provável, de acordo com os marcadores moleculares dos respectivos genes, *Bc-3Bc-3*, *II*. Como a maioria dos genótipos doadores de genes de resistência são linhagens que possuem *background* carioca do cultivar Rudá, durante o processo de piramidação dos genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, também é possível que se faça a piramidação dos genes *bc-3* e *I*, o primeiro proveniente do cultivar Diamante Negro e o segundo das linhagens com *background* de Rudá.

MILACH e CRUZ (1997) citaram que a identificação precisa de genótipos contendo genes de resistência desejados, usando marcadores de DNA ligados a genes de resistência, permite que eles sejam facilmente acumulados em um único genótipo via seleção assistida por marcadores moleculares. Entretanto, os marcadores moleculares devem ser bem específicos para cada gene, permitindo que o mesmo possa ser transferido a vários outros cultivares modernos ou linhagens elite utilizando-se somente o marcador molecular (STAVELY, 2000).

3.2. Cruzamentos e obtenção de populações

Plantas RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) contendo os genes *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*(sem a marca para o gene *Co-4*), foram cruzados com

indivíduos Rudá "R1" (*Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*) obtendo-se 40 plantas F_1. Devido à incerteza da homozigose dos locos de resistência dos genitores, todos os marcadores (SCARAS13, SCARAB03, SCARAZ20, SCARF10 e SCARH13) ligados a genes de resistência foram testados. Destas 40 plantas, cinco foram selecionadas com todas as marcas e conduzidas por autofecundação. Quinze sementes de cada uma das cinco plantas F_2 foram plantadas e tiveram seu DNA testado com os mesmos marcadores citados acima além dos marcadores para os genes *bc-3* e *I*. Nesta geração (F_3) foi possível selecionar oito plantas com todas as marcas, porém, somente seis delas foram conduzidas para a próxima geração por possuírem grãos pretos. De um total de 95 plantas F_4, 35 foram selecionadas e multiplicadas no campo para a obtenção de número de sementes suficiente para posterior montagem de um ensaio de competição para verificação do potencial produtivo das famílias selecionadas. Na Tabela 5, estão descritas as genealogias e as marcas presentes nas 35 plantas selecionadas. Todas elas apresentaram grãos pretos semelhantes aos do cultivar Diamante Negro, porém, somente duas apresentaram todas as marcas.

Na geração F_2 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1"] plantas contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, e *Phg-1* (sem a marca para o gene *Ur-ON*) foram cruzadas com indivíduos de famílias $F_{2:3}$ oriundas do intercruzamento de linhagens que continham os genes *Ur-ON*, *Ur-5* e *Ur-11* e *background* carioca. Como o marcador SCARAE19 ligado ao gene *Ur-11* não pôde ser usado na seleção e o SCARF10 marca os genes *Ur-5* e *Ur-ON*, as plantas foram selecionadas somente para a marca ligada ao gene *Ur-5* com relação à resistência à ferrugem, juntamente com as marcas ligadas aos genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1, I e bc-3.* As plantas F_1 oriundas deste cruzamento, selecionadas com base nas marcas, foram conduzidas por autofecundações e foram obtidas 66 plantas F_2, das quais 17 foram selecionadas com pelo menos cinco marcas. A partir dessas plantas F_2 selecionadas, 75 plantas F_3 foram geradas. Como na geração anterior, estas plantas foram selecionadas com base nos marcadores moleculares. Oito famílias F_3 apresentaram pelo menos cinco marcas (Tabela 6), porém, nenhuma delas apresentou grãos pretos. O padrão de grão carioca, com cor de fundo creme claro e rajas marrons, foi observado em duas famílias (família 29.4 e 27.3) e que poderão ser utilizadas no melhoramento. Nas demais, os grãos apresentaram padrões distintos dos

desejáveis, ou seja, pretos e cariocas. O objetivo do presente trabalho foi obter linhagens de grãos pretos, porém, nenhuma das famílias obtidas com as marcas desejadas apresentou tal padrão de cor. Para a obtenção de linhagens pretas, seria necessário realizar pelo menos um retrocruzamento com uma linhagem de grão preto contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Phg-1, I e bc-3* para aumentar a probabilidade de obtenção de linhagens com todos os estes genes e mais o *Ur-5,* além da cor de grão preto.

Tabela 5 – Famílias F_4 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] selecionadas com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e no tipo de grão

Genótipos	Genes de resistência**
F_4 [RC_3F_2 (DN* x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.2.4	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.2.7	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, I*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.2.9	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.2.14	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.5.4	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.5.5	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, I,bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 2.5.5	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.14.12	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.8.5	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.8.6	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.8.15	*Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.8.16	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 5.8.19	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.1	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.2	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.4	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.5	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.8	*Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.9	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.10	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.11	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.4.12	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.1	*Co-4*^{2}*, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.2	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.5	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.6	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.9	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.10	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.11	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.12	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.13	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 8.14.14	*Co-4*^{2}*, Co-6, Co-10,Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 21.14.1	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 21.14.2	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] 21.14.5	*Co-4*^{2}*,Co-5, Co-10,Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*

* DN= Diamante Negro; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

Plantas [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá “R”) x Rudá “R1”] contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* foram cruzadas com o cultivar MAR 2 (*Phg-MAR2*) gerando 23 plantas F_1, das quais 5 foram selecionadas com pelo menos cinco marcas. Destas, foram geradas 67 plantas F_2, das quais 17 plantas também foram selecionadas com pelo menos cinco marcas. Na

Tabela 7 estão descritas as genealogias e as marcas dos genes de resistência que as plantas selecionadas possiam. Sete plantas geraram sementes F_3 de cor preta.

Tabela 6 – Famílias F_3 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ (*Ur-5*, *Ur-11*, *Ur-ON*) selecionadas com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e no tipo de grão.

Genótipos	Genes de resistência***
F_3 [(RC_3F_2 (DN* x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$** 46.1.2] 29.2	*Co-4^2,Co-5, Ur-5, I, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 46.1.2] 29.4	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Ur-5, I, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 46.1.2] 27.3	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Ur-5, I, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 44.1.1) 67.7	*Co-4^2,Co-5, Ur-5, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 44.1.1) 67.8	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Ur-5, I, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 44.1.1) 59.2	*Co-4^2,Co-5, Ur-5, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 44.1.1) 59.5	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Ur-5, I, bc-3*
F_3 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ 46.1.2) 46.2	*Co-4^2,Co-5, Ur-5, bc-3*

*DN= Diamante Negro; ** Famílias F2:3 contendo os genes *Ur-5*, *Ur-11*, *Ur-ON*; *** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

Tabela 7 – Famílias F_2 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] selecionadas com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e no tipo de grão

Genótipos	Genes de resistência***
F_2 [(RC_3F_2 (DN* x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 3.2	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 3.5	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 3.7	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 3.7	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 3.8	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 6.6	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 11.3**	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2,*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 11.6**	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 11.9	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 11.13**	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 11.23**	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 12.17	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 12.18**	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 12.19**	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 15.9	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 15.23**	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] 15.24	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-MAR2, bc-3*

*DN= Diamante Negro; ** Plantas que geraram sementes F3 de cor preta; *** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

Plantas [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá “R”) x Rudá “R1”] contendo os genes *Co-4*^{2}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10* e *Ur-ON* foram cruzadas com o cultivar Cornell 49-242 (*Phg-3*) gerando 26 plantas F_1. Seis plantas foram selecionadas com pelo menos cinco marcas. As 59 plantas F_2 oriundas das plantas F_1 selecionadas geraram 13 plantas que possuíam pelo menos cinco marcas. Suas genealogias e marcas dos genes de resistência presentes em cada uma delas estão apresentadas na Tabela 8. Todas as plantas selecionadas geraram sementes F_3 pretas, porém brilhantes, o que não é de interesse comercial. Desta forma, torna-se necessário que se façam ciclos de retrocruzamentos para obter grãos desejáveis de cor preta e sem brilho.

Observou-se que as plantas utilizadas no cruzamento não possuíam o gene *Phg-1*, pois o marcador molecular ligado ao gene de resistência à mancha-angular, SCARN02, presente no cultivar Cornell 49-242 também marca o gene *Phg-1*, impossibilitando que os dois sejam piramidados em um mesmo genótipo por meio de marcadores moleculares. O cultivar AND 277 é resistente ao patótipo 61-41 de *P. griseola*, caracterizado por NIETSCHE et al. (1997), e o Cornell 49-242 é suscetível. Desta forma, este patótipo poderia ser usado no processo de piramidação, selecionando assim, o gene do Cornell 49-242 via inoculação, enquanto que o gene do AND 277 poderia ser selecionado via marcador molecular. Porém, este patótipo não existe mais na micoteca do BIOAGRO e por isso não foi possível introgredir os dois genes de resistência em um mesmo genótipo. Recentemente, BALBI (2007) caracterizou isolados de *P. griseola* coletados em regiões produtoras de feijão em Minas Gerais e identificou isolados que causam reação de compatibilidade e incompatibilidade diferenciada entre os dois cultivares utilizados no presente trabalho. Desta forma, em uma etapa futura, isolinhas contendo os genes *Phg-1* e *Phg-3* separadamente, poderão ser intercruzadas para piramidar, desta forma, os dois genes.

Plantas RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) contendo os genes *Co-4*, *Co-6, Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1*, foram cruzados com plantas RC_3F_2 (Rudá x BAT 332), que possuíam o gene *Phg-6*^{2}. Das 15 plantas F_1 obtidas, apenas duas apresentaram quatro marcas. Estas duas plantas foram autofencundadas gerando plantas F_2 das quais, somente duas apresentavam a marca do gene *Phg-6*^{2}. Mesmo o número de plantas selecionado tenha sido muito pequeno, deu-se continuidade ao processo e elas geraram 20 plantas F_3, das quais 10

foram selecionadas com base nas marcas e na cor dos grãos, para terem suas sementes F_4 multiplicadas em campo. Na Tabela 9 encontram-se as genealogias e as marcas dos genes de resistência das dez famílias F_4 selecionadas. Todas as famílias apresentaram padrão de grão preto aceito comercialmente.

Tabela 8 – Famílias F_2 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell 49-242] selecionadas com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e no tipo de grão

Genótipos	Genes de resistência**
F_2 [(RC_3F_2 (DN* x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 3.2	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 3.6	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 3.13	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.3	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.7	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.11	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.12	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.13	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 41.3	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 41.13	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.16	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 4.17	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I*
F_2 [(RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x Rudá "R1") x Cornell] 8.3	*Co-4^2,Co-5, Co-6, Co-10,Ur-ON,Phg-1, Phg-3, I, bc-3*

*DN= Diamante Negro; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

Tabela 9 – Famílias F_4 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] selecionadas com base nos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e no tipo de grão

Genótipos	Genes de resistência**
F_4 [RC_3F_2 (DN* x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.5.1	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.5.3	*Phg-6^2, I*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.5.7	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.5.8	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.5.10	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.6.1	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.6.2	*Phg-1, Phg-6^2, I*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.6.4	*Phg-1, Phg-6^2, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.6.5	*Phg-1, Phg-6^2, I, bc-3*
F_4 [RC_3F_2 (DN x Rudá "R") x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)] 1.6.6	*Phg-1, Phg-6^2, I*

*DN= Diamante Negro; ** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

A presença dos genes *Co-4^2, Co-5, Co-6, Co-10* em um mesmo genótipo, torna-o resistente a todas as raças de *C. lindemuthianum*, já

caracterizadas no Brasil, inclusive a raça 2047. Essa raça ainda não foi encontrada no Brasil, mas tem ocasionado elevadas perdas de produção nos Estados Unidos, sendo importante obter cultivares resistentes a ela.

Segundo SOUZA et al. (2005), os genes *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-ON,* individualmente, conferem resistência a 12 isolados de *U. appendiculatus* caracterizados por eles, além de apresentarem amplo espectro de resistência no Brasil

NIETSCHE et al. (2001), avaliando diversos cultivares quanto à reação de resistência/suscetibilidade às raças 31.17, 61.31, 61.41, 63.19, 63.23 e 63.39 de *P. griseola*, verificaram que o cultivar AND 277 foi suscetível somente à raça 63.39 e o MAR 2 apresentou resistência a todas essas raças. Cornell 49-242 foi suscetível às raças 63.39 e 61.41, enquanto que BAT 332 foi resistente às raças 63.39 e 61.41. Assim, a combinação dos genes de resistência presentes nos cultivares AND 277, MAR 2, Cornell 49-242 e BAT 332 promoveria resistência a todas as raças avaliadas no Brasil. BALBI (2007) caracterizou 17 isolados coletados em diversas regiões do estado de Minas Gerais. Na avaliação destes isolados, os cultivares Cornell 49-242 e BAT 332 apresentaram resistência a 9 e 8 raças, respectivamente. Considerando as fontes de resistência AND 277 e MAR 2, houve reações diferenciadas quando inoculadas com as 12 raças de *P. griseola* caracterizadas por BALBI (2007), mostrando-se resistentes a 8 e 9 raças, respectivamente. Neste estudo, a combinação dos genes de resistência presentes nos quatro cultivares, promoveria uma resistência a 15 isolados, sendo que somente dois isolados da raça 63.63 causaram uma reação compatível nos quatro cultivares.

A piramidação de genes de resistência tem sido sugerida como uma estratégia para proporcionar resistência durável a diferentes raças de um mesmo patógeno e a patógenos distintos. NELSON (1979) argumenta que a resistência decorrente dos efeitos parciais de numerosos genes na planta, exerce menor pressão de seleção sobre o patógeno e, assim, deve ser mais durável. Estudo realizado por THRALL e BURDON (2003) indica que o surgimento de genótipos do patógeno capazes de suplantar uma pirâmide de genes de resistência no hospedeiro, cuja probabilidade é inversamente proporcional ao número de genes piramidados, não implicará diretamente em aumento da taxa de progresso da doença, uma vez que estes novos patótipos apresentarão menor agressividade. Esse fato é positivo dentro do ponto de

vista epidemiológico, pois indica que esta estratégia deverá manter a doença em nível abaixo do dano econômico, além de limitar sua rápida disseminação.

Desta forma, todas as populações desenvolvidas neste trabalho, apresentando pirâmides com diversas combinações de genes de resistência a diferentes patógenos e diferentes raças de um mesmo patógeno, apresentam alta potencialidade de uso nos programas de melhoramento. Além disso, se apresentarem alta produtividade, poderão ser lançadas como novos cultivares resistentes a diversas raças de antracnose, ferrugem e mancha-angular e estirpes do mosaico-comum.

Uma dificuldade encontrada, porém, na obtenção dessas populações, é o grande número de genes envolvidos na seleção. Quanto maior o número de genes de resistência envolvidos no processo de piramidação, maior terá que ser a população de trabalho para aumentar a chance de obtenção de plantas com todos os genes de interesse. Além disso, após o encontro de tais genes ainda há a preocupação com o aspecto dos grãos. Outra dificuldade encontrada, em alguns casos, é a falta de especificidade de alguns marcadores moleculares, impossibilitando o uso dos mesmos em diferentes populações.

4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Com o objetivo de ampliar a base da pirâmide introduzida no *background* preto a partir de cruzamentos com outras fontes de resistência contendo genes distintos daqueles presentes na pirâmide original, as seguintes populações foram geradas:

- 35 famílias F_4 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”] com grãos pretos, contendo no mínimo, quatro marcas dos genes *Co-4*^{2}*, Co-5, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1, I, bc-3*;

- oito famílias F_3 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x $F_{2:3}$ (*Ur-5*, *Ur-11*, *Ur-ON*) contendo, no mínimo, quatro marcas dos genes *Co-4*^{2}*, Co-5, Co-6, Ur-5, I, bc-3,* sendo que duas delas apresentaram grãos carioca e nenhuma grão preto;

- 17 famílias F_2 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x MAR 2] com, no mínimo, oito marcas dos genes *Co-4*^{2}*, Co-5, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-1, Phg-MAR2, I, bc-3*, sendo que sete delas geraram sementes de cor preta;

- 13 famílias F_2 [(RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x Rudá “R1”) x Cornell 49-242] com, no mínimo, oito marcas dos genes *Co-4*^{2}*, Co-5, Co-6, Co-10, Ur-ON, Phg-3, Phg-MAR2, I, bc-3*, sendo que todas geraram sementes de cor preta com brilho;

- 10 famílias F_4 [RC_3F_2 (Diamante Negro x Rudá ”R”) x RC_3F_2 (Rudá x BAT 332)], contendo as marcas dos genes *Phg-1, Phg-6*^{2}*, I, bc-3*, todas com grãos pretos.

Para ampliar uma pirâmide de genes de resistência, os marcadores moleculares ligados a cada um dos genes devem ser altamente específicos para que possam auxiliar no processo de transferência de genes para outros *backgrounds* genéticos

CAPÍTULO 3

PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR EM VARIEDADES DE FEIJÃO VERMELHO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Minas Gerais é um dos estados que mais contribuem para que o Brasil mantenha tal posição, sendo segundo maior produtor nacional de feijão, contribuindo com mais de 15% da produção nacional (FNP/SECEX, 2007).

Em Minas Gerais, as regiões Noroeste, Sul, Triângulo e Alto Paranaíba são as principais produtoras de feijão, sendo responsáveis por mais de 70% da produção estadual desse grão. O plantio de feijão nestas regiões é predominantemente comercial, caracterizado pelo alto nível de tecnologia empregado nas lavouras. A região da Zona da Mata mineira contribui com 10% do feijão produzido no Estado, porém, o cultivo nesta região é largamente dominado por pequenos e médios agricultores, em sua maioria utilizando baixo nível tecnológico. Cerca de 50% da área de cultivo desta região é ocupada por feijões com grão do tipo vermelho. Grãos vermelhos brilhantes e uniformes têm ampla aceitação entre os consumidores desta região, chegando a ser comercializado por até o dobro do preço de feijões com grãos do tipo carioca e preto (CARNEIRO et al., 2005). Desta forma, os feijões vermelhos apresentam grande importância sócio-econômica para a região da Zona da Mata mineira.

Os cultivares de grãos vermelhos comumentes plantados na região da Zona da Mata mineira são o Vermelhinho e o Ouro Vermelho. O cultivar Vermelhinho é um cultivar crioulo, comercializado nesta região há vários anos. Ouro Vermelho é um cultivar recentemente desenvolvido pelo programa de melhoramento do feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa e apresenta alta produtividade em comparação aos demais cultivares do mesmo grupo. Entretanto, tanto o Vermelhinho como o Ouro Vermelho apresentam alta suscetibilidade aos patógenos que mais atacam o feijoeiro, principalmente aos agentes causadores da antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-

bacteriano-comum e mosaico-comum, o que diminui, em muito, a sua produtividade e a qualidade dos grãos (CARNEIRO et al., 2005; ALZATE-MARIN et al., 2006). Porém, pouca atenção tem sido dada ao melhoramento genético visando incorporar genes de resistência a doenças nos feijões de grãos vermelhos.

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, RAGAGNIN et al. (2003) piramidaram genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg-1*) utilizando como genitor recorrente o cultivar Rudá, que possui o *background* do tipo carioca. A isolinha obtida com esta pirâmide foi denominada Rudá "R". Posteriormente, ARRUDA (2005) substituiu o alelo *Co-4* pelo $Co\text{-}4^2$ e introduziu o alelo *Co-5* na pirâmide do *background* Rudá, com o intuito de incrementar e tornar mais eficaz a pirâmide de resistência à antracnose, denominando a isolinha que possuía a nova pirâmide que foi denominada de Rudá "R1". Considerando a importância da resistência aos patógenos no feijoeiro e o fato de que os feijões do tipo vermelho foram muito pouco melhorados nesse aspecto, o objetivo deste trabalho foi transferir os genes das pirâmides das isolinhas Rudá "R" e Rudá "R1" para os cultivares Vermelhinho e Ouro Vermelho, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cruzamentos e seleção com o cultivar Vermelhinho

O genitor doador dos genes de resistência no processo de retrocruzamento foi a isolinha Rudá "R", desenvolvida pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, portada de grãos do tipo carioca e dos genes de resistência à antracnose (*Co*-6, *Co-10* e *Co-4*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha-angular (*Phg –1*). O genitor recorrente usado na piramidação foi o cultivar Vermelhinho. Esse é considerado um cultivar crioulo, sendo muito plantado pelos agricultores da região da Zona da Mata mineira. Este cultivar apresenta suscetibilidade aos agentes causais da antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-bacteriano e mosaico-comum (ALZATE-MARIN et al., 2006).

Cruzamentos entre Vermelhinho e Rudá "R" foram realizados obtendo-se sementes F_1. As plantas híbridas confirmadas, por autofecundação geraram sementes F_2. As plantas F_2 obtidas foram genotipadas utlizando marcadores moleculares ligados aos genes de resistência (Tabela 1). Sementes F_3 oriundas das plantas F_2 portadoras das marcas de interesse foram plantadas gerando plantas F_3. Da mesma forma que no ciclo anterior, as plantas foram selecionadas via marcadores moleculares. Aquelas selecionadas foram retrocruzadas com o cultivar Vermelhinho obtendo sementes RC_1F_1. As plantas RC_1F_1 selecionadas foram utilizadas para o segundo ciclo de retrocruzamento, gerando sementes RC_2F_1.

As sementes RC_2F_1 foram plantadas originando plantas RC_2F_1, as quais foram conduzidas por autofecundação para a obtenção da homozigose dos genes de resistência transferidos.

Em todas as etapas dos cruzamentos e retrocruzamentos, as sementes foram plantadas em casa de vegetação e amostras de DNA das plantas resultantes foram extraídas e amplificadas com marcadores moleculares ligados aos genes de resistência previamente identificados e testados (Tabela 1), de modo a monitorar o processo de piramidação dos genes e permitir a posterior seleção de plantas portadoras das marcas.

Tabela 1. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à antracnose, mancha-angular e ferrugem

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Referência
$SCARY20_{830a}$	1,2	*Co-4*	Antracnose	TO	QUEIROZ et al. (2004a)
$SCARH13_{490a}$	5,5	*Phg-1*	Mancha-angular	AND 277	NIETSCHE et al. (2000)
$SCARF10_{1050a}$	6,9	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al (2000)
$SCARBA08_{560a}$	6,0	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
$SCARAZ20_{940a}$	7,1	*Co-6*	Antracnose	AB 136	QUEIROZ et al. (2004a)

a = fase de ligação em acoplamento

2.2. Cruzamentos e seleção com o cultivar Ouro Vermelho

Em trabalhos recentes, conduzidos por ARRUDA (2005), a isolinha Rudá "R" foi cruzada sucessivamente com duas linhagens carioca, G-19-1-1-7 e G-1-46-7, possuidoras dos genes *Co-4*^{2} e *Co-5*, respectivamente. Ambas são oriundas do cruzamento entre Rudá e G2333. Este trabalho foi conduzido por que cedeu gentilmente sementes F_1 contendo os genes *Ur-ON*, *Phg-1*, *Co-6*, *Co-4*^{2} (da linhagem G-19-1-17) e *Co-5* (da linhagem G-1-46-7) (Figura 1).

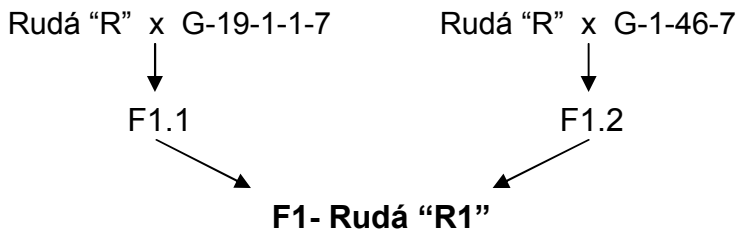

Figura 1: Esquema dos cruzamentos realizados para a obtenção das sementes Rudá "R1" utilizada como fonte doadora de genes de resistência em cruzamento com Ouro Vermelho.

As sementes F_1 (denominadas aqui como Rudá "R1") foram utilizadas como genitor doador para os cruzamentos com o cultivar Ouro Vermelho. Esse cultivar foi recomendado recentemente pelo convêncio UFV-Epamig-UFLA-EMBRAPA e foi utilizado como genitor recorrente. Assim como o cultivar Vermelhinho, o cultivar Ouro Vermelho é suscetível à antracnose, ferrugem, mancha-angular, crestamento-bacteriano-comum e mosaico-comum, porém apresenta um potencial produtivo maior do que o Vermelhinho (CARNEIRO et al., 2005).

Cruzamentos entre Ouro Vermelho e Rudá “R1” foram feitos obtendo-se sementes F_1. A seleção das plantas F_1 foi feita por meio de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência. Aquelas plantas selecionadas foram retrocruzadas com o cultivar Ouro Vermelho obtendo-se sementes RC_1F_1. As sementes foram plantadas e deram origem a plantas RC_1F_1, as quais, foram conduzidas a mais um ciclo de retrocruzamento e dois de autofecundação, obtendo-se, então, plantas RC_2F_3. A cada ciclo houve seleção com base nos marcadores moleculadres.

Nas etapas de seleção, amostras de DNA das plantas foram extraídas e amplificadas com marcadores moleculares ligados aos genes de resistência previamente identificados e testados (Tabela 2), para monitorar o processo de transferência dos genes.

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

Marcador	Distância (cM)	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Referência
$SCARH13_{490a}$	5,5	*Phg-1*	Mancha-angular	AND 277	NIETSCHE, et al. (2000)
$SCAR\ F10_{1050a}$	6,9	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA, et al. (2000)
$SCARBA08_{560a}$	6,0	*Ur-ON*	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA, et al. (2000)
$SCARAZ20_{940a}$	7,1	*Co-6*	Antracnose	AB 136	QUEIROZ, et al. (2004a)
$SCARAS13_{950a}$	11,3	*Co-4*[2]	Antracnose	G2333	YOUNG et al. (1998)
$SCARAB03_{400a}$	16,4	*Co-5*	Antracnose	G2333	VALLEJO AND KELLY, (2001)

a = fase de ligação em acoplamento

Além da seleção dos genes de resistência por marcadores moleculares, a cada ciclo, o padrão de cor das sementes também foi utilizado como critério de seleção. Portanto, foram selecionadas somente as plantas portadoras das marcas moleculares e com grãos vermelho brilhante uniforme.

2.3. Extração de DNA e amplificação por SCAR

A extração de DNA e amplificação por SCAR foram como estão descritos nos item 2.2.1. e 2.2.2., respectivamente, no capítulo 1 do presente trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção nas populações Vermelhinho e Rudá "R"

Cruzamentos entre Vermelhinho (genitor recorrente) e Rudá "R" (genitor doador) foram realizados, obtendo-se plantas F_2 e F_3. Em cada geração, amostras de DNA das plantas foram extraídas e amplificadas com os marcadores SCAR descritos na Tabela 1 de modo a selecionar aquelas que possuíam pelo menos três dos cinco genes de resistência. Na geração F_2 foram obtidas 203 plantas, das quais 47 possuíam as cinco marcas (Tabela 3). Destas, apenas quatro produziram sementes com a cor semelhante à do Vermelhinho, e as demais apresentaram grãos de cores variadas. Sessenta e oito plantas F_3 foram obtidas a partir das quatro plantas selecionadas e apenas 8 apresentaram pelo menos quatro marcas. Tais plantas foram retrocruzadas com o Vermelhinho obtendo-se 46 plantas RC_1F_1. Das 46 plantas RC_1F_1, sete possuíam pelo menos quatro marcas. Essas plantas selecionadas foram retrocruzadas com o cultivar Vermelhinho, obtendo 49 plantas RC_2F_1. Essas foram submetidas à seleção com marcadores moleculares, sendo que quatro foram selecionadas contendo quatro marcas e 16 contendo três. As plantas selecionadas foram conduzidas por autofecundação gerando sementes e posteriormente plantas RC_2F_2. Essas plantas foram também submetidas à seleção, das quais três foram selecionadas contendo pelo menos três marcas (Tabela 3).

As plantas RC_2F_2 selecionadas foram conduzidas por autofecundação, gerando plantas RC_2F_3, as quais foram multiplicadas no campo para produção de sementes para ensaio de competição. Para a multiplicação em campo foram selecionadas também plantas contendo uma e duas marcas, devido ao baixo número de plantas obtidas na RC_2F_2.

Todas as plantas selecionadas apresentaram grãos vermelhos brilhantes, semelhantes ao grão do cultivar Vermelhinho. Na Tabela 4 estão descritas as genealogias e os respectivos genes inferidos pela presença do marcador molecular correspondente.

Tabela 3. Número total de plantas analisadas e número de plantas selecionadas contendo pelo menos três marcas ligadas a genes de resistência, nas gerações F_2, F_3, RC_1F_1, RC_2F_1 e RC_2F_2 oriundas do cruzamento entre Vermelhinho x Rudá "R"

Geração	F_2	F_3	RC_1F_1	RC_2F_1	RC_2F_2
Total de plantas	203	68	46	49	41
Nº de plantas com pelo menos três marcas	47	8	6	20	3

Tabela 4- Genealogia das plantas RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") selecionadas e prováveis genes de resistência

Genótipos	**Genes de resistência***
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 1.3.1	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 1.3.3	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 1.3.9	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 3.6.7	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.1.3	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.1.6	*Co-4, Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.1.8	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.7	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.5	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.8	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.2	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.3	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.9	*Co-4, Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.3.10	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.1	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.2	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.6	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.8	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 7.4.10	*Co-10, Ur-ON*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 1.3.3.	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*
RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R") 1.3.9	*Co-10, Ur-ON, Phg-1*

***** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

3.2. Seleção na populações Ouro Vermelho e Rudá "R1"

Plantas de Ouro Vermelho foram cruzadas com o Rudá "R1" gerando 63 plantas F_1. Após a amplificação do DNA destas plantas com os marcadores listados na Tabela 2, 12 foram selecionadas com pelo menos quatro marcas.

As plantas F_1 selecionadas foram retrocruzadas com o genitor recorrente Ouro Vermelho, para a recuperação da cor vermelha dos grãos, obtevendo-se assim, 49 plantas RC_1F_1. Tais plantas foram submetidas à seleção por meio de

marcadores moleculares e 16 plantas foram selecionadas contendo pelo menos cinco marcas. A autofecundação destas plantas deram origem as RC_1F_2, as quais foram também submetidas à seleção. Vinte plantas RC_1F_2 foram selecionadas contendo pelo menos quatro marcas. Tais plantas foram retrocruzadas com o cultivar Ouro Vermelho, originando 94 plantas RC_2F_1. Como resultado da seleção destas plantas, 28 foram selecionadas com pelo menos quatro marcas (Tabela 5). Destas 28, apenas as que possuíam grãos vermelhos tiveram suas sementes plantadas e geraram 148 plantas RC_2F_2.

Não houve seleção quanto à presença das marcas dos genes de resistência na geração RC_2F_2, selecionando-se somente pelo aspecto do grão. Setenta e oito famílias RC_2F_2 possuiam grãos semelhantes ao do cultivar Ouro Vermelho. Estas famílias serão multiplicadas no campo para avaliações futuras.

Para tais famílias não ficarem sem as informações quanto à presença das marcas dos genes de resistência, uma amostra de duas sementes de cada família foram plantadas e tiveram seus DNA extraídos e amplificados com os mesmos marcadores usados nas seleções anteriores mais o marcador $SCARSW13_{690}$. Este marcador está ligado ao gene *I* que confere resistência ao mosaico-comum do feijoeiro. Como a linhagem usada neste processo como doadora de genes, Rudá "R1", possui a marca para tal gene e o Ouro Vermelho não, decidiu-se usar o marcador SCARSW13 também na seleção, visto que os feijões de grãos vermelhos da região da Zona da Mata Mineira apresentam alta suscetibilidade ao mosaico-comum. O marcador $SROC11_{420}$ que está ligado em repulsão ao gene *bc-3* não pôde ser usado na seleção devido à banda que amplifica os genótipos que não possuem tal gene de resistência, não ter sido detectada no Ouro Vermelho (SANTANA, 2006).

Os genótipos selecionados com as marcas de interesse (Tabela 6) serão usados como genitor doador de genes de resistência no programa de melhoramento de feijão vermelho por meio de seleção recorrente, em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa.

Mais de 18 genes estão envolvidos com a cor de fundo, nos padrões de manchas e listras e cor de halo no tegumento de feijão, o que implica em uma grande complexidade (GEPTS e DEBOUCK, 1993). Pouco se conhece sobre o controle genético da cor vermelha do tegumento de feijão. O que se observou neste trabalho é que a recuperação do padrão de cor vermelha desejável foi

difícil. No cruzamento do cultivar Vermelhinho com o Rudá “R”, por exemplo, até a geração F3 não observou-se nenhuma família contendo as marcas dos genes de resistência com cor vermelha desejável, necessitando de retrocruzamentos. Desta forma, ao trabalhar com feijões de cor, principalmente vermelho, envolvidos em cruzamentos com genitores de outros tipos de grãos, torna-se necessário a realização de ciclos de retrocruzamentos e condução de populações grandes para aumentar a probabilidade de se associar genes de resistência e grãos de cores desejáveis.

Tabela 5. Número total de plantas analisadas e número de plantas selecionadas contendo ou pelo menos cinco marcas ligadas a genes de resistência, nas gerações F_1, RC_1F_1, RC_1F_2 e RC_2F_1 oriundas do cruzamento entre Ouro Vermelho x Rudá “R1”

Geração	F_1	RC_1F_1	RC_1F_2	RC_2F_1
Total de plantas	63	49	82	94
Nº de plantas com pelo menos três marcas	12	16	20	28

Os materiais desenvolvidos neste trabalho serão testados quanto à produtividade e resistência à antracnose, ferrugem, mancha-angular e mosaico-comum. Aqueles que se destacarem quanto ao desempenho produtivo serão incluídas no ensaio de valor de cultivo e uso (VCU) e as que obtiverem os maiores espectros de resistência servirão de linhagens doadoras de genes de resistência para outros programas de melhoramento.

Tabela 6- Relação das plantas RC_2F_3 selecionadas e suas respectivas marcas de resistência

Genótipos	Genes de resistência*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 7.2.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, I*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.3) 5.11.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.3) 5.11.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, I*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 5.9.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 5.9.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.25.1) 8.4.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.1) 2.12.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 39.6.1) 13.8.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.1) 8.3.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.25.1) 8.3.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.1) 2.5.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.1) 2.5.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 39.6.1) 13.7.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 39.6.1) 13.6.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 39.6.1) 13.6.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 5.8.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 9.5.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 5.12.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 10.3.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 10.3.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 12.7.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 5.7.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 5.13.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 12.6.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, I*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.25.1) 5.9.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.25.1) 5.1.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.14.2) 5.10.2	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.28.5) 12.4.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1*
RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1" 31.25.1) 8.8.1	*Co-4^2,Co-5, Co-10,Ur-ON,Phg-1, I*

***** A presença dos genes foi inferida pela presença do marcador correspondente.

4. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Com o objtivo de transferir genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular para os cultivares de grãos vermelhos, Vermelhinho e Ouro Vermelho, as seguintes populações foram obtidas:

- 19 famílias RC_2F_3 (Vermelhinho x Rudá "R"), contendo, no mínimo, duas marcas dos genes *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Ur-ON* e *Phg-1* e com grãos vermelhos.

- 29 famílias RC_2F_3 (Ouro Vermelho x Rudá "R1") de grãos vermelhos e com quatro marcas no mínimo.

A transferência de genes de resistência entre cultivares de grupos de cor de grão diferentes, exige a realização de um maior número de retrocruzamentos para a recuperação do tipo de grão original, tornando o processo mais demorado.

CONCLUSÕES GERAIS

- A seleção assistida por marcadores moleculares no processo de obtenção de linhagens com vários genes de resistência é eficiente;
- Os marcadores moleculares ligados a genes de resistência devem ser altamente específicos para que possam auxiliar no processo de transferência de genes para outros backgrounds genéticos;
- A transferência de genes entre cultivares de grupos de cor de grão diferentes é demorado, exigindo a realização de um maior número de retrocruzamentos para a recuperação do tipo de grão original.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVAREZ-AYALA, G., SCHWARTZ, H.F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 22: 79-80**,** 1979.

ALZATE-MARIN, A.L., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Co-evolution of *Colletotrichum lindemuthianum* (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. **Genetics and Molecular Biology,** 22: 115-118, 1999a.

ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology,** 89: 281-285, 1999b.

ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO,A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Use of RAPD molecular markes for genetic variability studies in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:196-197, 2000.

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

ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., PELOSO, M.J. Del, BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agrícola,** 60: 283-290, 2003b.

ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A., BARROS,E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento

de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30: 333-342, 2005.

ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., SILVA, M.G.M., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Reação do cultivar de feijoeiro-comum "vermelhinho" à ferrugem, antracnose e mancha-angular. **Revista Ceres**, 56:164-170, 2006.

ARIYARANTHE ,H. M., COYNE, D.P.; JUNG, P. W., KROCH, A. K., VIDAVER, J. R.; STEADMAN, MIKLAS, P.N; BASSETT, M. J. Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregation population of common bean. **J.Am.Soc.Hort.Sci**.124:654-662.1999

ARRUDA, K.M.A. **Melhoramento genético de feijão tipo carioca com ênfase na piramidação de genes de resistência à antracnose**. Viçosa, MG UFV. Imprensa Universitária Viçosa. 2005 77p. (Tese MS). – 2005.

ARRUDA, K.M.A. , OLIVEIRA, M.S.G. , BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. **Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* na região do Alto Paranaíba e Noroeste do Estado de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira (Suplemento), 158-2007.**

BALBI, B Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* obtidos em Minas Gerais e avaliação de fontes de resistência do feijoeiro. Viçosa, MG. UFV, 2007. 40p. (Monografia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007

BALDONI, A.B, TEIXEIRA, F.F., SANTOS, J.B. Controle genético de alguns caracteres relacionados à cor da semente de feijão no cruzamento Rosinha X Esal 693. **Acta Scientiarum**, 24: 1427-1431, 2002.

BASSETT, M.J. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 1-24, 2004.

BEAVER, J.S., ROSAS, J.C., MYERS, J., ACOSTA, J., KELLY, J.D., NCHIMBI-MSOLLA, S., MISANGU, R., BOKOSI, J., TEMPLE, S., ARNAUD-SANTANA, E., COYNE, D.P. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. **Field Crops Research,** 82:87-102, 2003.

BRODY, R.J, KERN E.S. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques** 36:214-216, 2004

BRONDY, U., NELSON, R.R., GREGORY, L.V. The residual and interactive expression of “defeated” wheat stem rust resistance genes. **Phytopatology,** 76:546-549, 1986.

CAIXETA, E.T, BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., NIESTCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134:297-303, 2003.

CAIXETA, E.T, BORÉM, A., ALZATE-MARIN, A.L., FAGUNDES, S.A., SILVA, M.G.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, 145:237-245, 2005.

CARNEIRO, J.E.S.,CHAGAS, J.M., PAULA JR., T.J., SILVA, L.C., ARAUJO, G.A.A., CARNEIRO, P.C.S., DEL GIUDICE, M.P., MENEZES JR., J.A.N. Ouro Vermelho: Nova cultivar de feijão vermelho para Minas Gerais. **VIII CONAFE**, Goiânia, GO. P.525-527, 2005.

CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira,** 23:482-485, 1998.

CARVALHO, L.P., VIEIRA, C., CHAVES, G.M. Hereditariedade da resistência a cinco raças de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em *Phaseolus vulgaris* L. **Fitopatologia Brasileira**, 3: 181-185, 1978.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da agropecuária, AnoXIV, Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf> Acesso em julho de 2007.

CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 1999. 116p. (Tese DS) –1999.

CORRÊA, R. X., COSTA, M. R., GOODGOD, P. I., RAGAGNIN, V. A., FALEIRO, F. G., MOREIRA, M. A., BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

CORREA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHE, S., MOREIRA, M.A., BARROS E.G. Herança da resistência à mancha angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27-32, 2001.

COSTA, M. R. **Introgressão de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular no cultivar de feijão Diamante Negro.** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 2004. 89p. (Tese MS) –2004.

COSTA, M.R.,TANURE, J.P.M., CARNEIRO, J.E.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular na cultivar de feijão Diamante Negro. **VIII CONAFE**, Goiânia, GO. P.528-531, 2005.

COSTA, M.R.,TANURE, J.P.M., ARRUDA, K.M.A., CARNEIRO, J.E.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Pyramiding of anthracnose, angular leaf spot and rust resistance genes in black and red bean cultivars. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49: 187-188, 2006.

COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Genetic and breeding strategy for resistance to rust (*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Euphytica**, 24:795-803, 1975.

COYNE, D.P., STEADMAN, J.R., GODOY-LUTZ, G., GILBERTSON, R., ARNAUD-SANTANA, E., BEAVER, J.S., MYERS,J.R. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to management of bean diseases. **Field Crops Research**, 82:155-168, 2003.

CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.

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

EMBRAPA Arroz e Feijão. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.bc/pesquisa/feijão>. Acesso em julho de 2007.

FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro.** Viçosa, UFV, Imprensa Universitária. 1997. 65p. (Tese M.S.).

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

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOODGOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.

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

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

FNP Consultoria & AgroInformativos. Anuário da Agricultura Brasileira - AGRIANUAL 2007. São Paulo, **Agros Comunicação**, p.345-354, 2007.

FU, Y.K., DEYNZE, V.A., PAULS, R.P. **Methods in plant molecular biology and biotechnology,** [S.l.] CRC. p. 450,1993.

GEPTS, P., DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A., VOYSEST, O. (Eds.). **Common bean - Research for crop improvement. Cali:** CAB International. CIAT, Colômbia, 1993. p.7-53.

GONÇALVES, F.M.A., CARNEIRO, J.E.S., ARAUJO, G. A. A.,COELHO, L. M., MIGUEIS, A., MAIA, F.A.B. Comportamento de linhagens de feijão vermelho na Zona da Mata de Minas Gerais. **VII CONAFE**, Viçosa, MG. P.298-299, 2002.

GRAFTON, K.F., WEISER, G.C., LITTLEFIELD, L.J. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science,** 25: 537-539, 1985.

GROGAN, R.G., WALKER, J.C. The relation of common bean mosaic to black root of beans. **Journal Agric. Res.,** 77: 315-331, 1978.

HUANG, N., ANGELES, E. R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIEL, N., BENNETT, J., KHUSH, G. S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics,** 95: 313-320, 1997.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopatology**, 22:309-330, 1984.

JOHNSON, W.C., GUZMAN, P., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., TEMPLE, R.S., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgession into Andean common bean. **Crop Science**, 37: 248-254, 1997.

JOHNSON, W. C, GUZMAN, P., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A. B. V., TEMPLE, S., GILBERTSON, R. L., GEPTS, P. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science**. 37:248-254, 1997.

JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARIYARATHNE, H., STEADMAN, J.R., BEAVER, J., KAEPPLER, S. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**., 106: 601-604, 1996.

JUNG, G., COYNE, D.P., BOKOSI, J.M., STEADMAN, J.R., NIENHUIS, J., Mapping genes for specific and adult plant resistance to rust and abaxial leaf pubescence and their genetic relationship using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in common bean. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 123: 859–863, 1998.

KELLY, J.D., MIKLAS, P.N.. Marker-assisted selection. In: S. Singh (Ed.), **Common Bean Improvement in the Twenty-First Century**, p. 93–123. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1999.

KELLY, J.D. and VALLEJO, V.A.. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **Hortscience** 39:1196–1207, 2004.

KELLY, J.D., AFANADOR. L., HALEY, S.S. Pyramiding genes resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212, 1995

KELLY, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 82:135-154, 2003.

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

KELLY, J.D. A review of varietal response to bean common potyvirus in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Varieties Seeds** 10: 1–6, 1997.

KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; SANTOS, J.B. Avaliação de cultivares e linhagens de feijoeiro quanto à reação foliar e de vagens à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**., 23: p.40-47, 1999.

LAJOLO, F.M., GEMOVESE, M.I., MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M. J. O. (Eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: PATAFÓS, p. 23-56,1996.

LANZA, M. A., GUIMARÃES, C. T. & SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário** (Belo Horizonte) 21:97-108, 2000.

LÓPEZ, C.E., ACOSTA, I.F., JARA, C., PEDRAZA, F., GAIT´AN-SOL´IS, E., GALLEGO, G., BEEBE, S., TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology** 93: 88–95, 2003.

MARQUES JÚNIOR, O.G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão.** Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Tese DS) - 1997.

MEINERS, J.P. Genetics of disease resistance in edible legumes. **Annual Review of Phytopathology,** 19: 189-209, 1981.

MELOTTO, M., KELLY, J.D. SCAR markers linked to major disease genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 1998.

MELOTTO, M., KELLY, J. D. SCAR markes linked to major disease resistance genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 39: 1216–1219, 1997.

MENARIM, H., ALZATE-MARIN, A. L., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Identificação de marcador molecular RAPD ligado ao gene de resistência *Co-6* para antracnose do feijoeiro. **Revista Brasileira Genetica,** 21: 184, 1998.

MÉNDEZ-VIGO, B., RODRIGUEZ-SUAREZ, C., PANEDA, A., FERREIRA, J.J. and GIRALDEZ,R. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica** 141: 237–245, 2005.

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

MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of diseases resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, 15:393-427, 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. **Proc. Natl. Acad. Sci**., 88: 9828-32, 1991.

MIENIE, C.M.S., LIEBENBERG, M.M., PRETORIUS, Z.A. and MIKLAS, P.N. SCAR markers linked to the *Phaseolus vulgaris* rust resistance gene *Ur-13.* **Theoretical and Applied Genetics**, 2005.

MIKLAS, P.N., SMITH, J.R., RILEY, R., GRAFTON,K.F., SINGH, S.P., JUNG, G. and COYNE, D.P.. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 43: 39–40, 2000a.

MIKLAS, P.N., LARSEN, R.C., RILEY, R., KELLY, J.D.. Potential marker-assisted selection for bc-12 gene for resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. **Euphytica** 116: 211–219, 2000b.

MIKLAS, P.N., KELLY, J.D. Registration of two cranberry bean germplasm lines resistant to bean common mosaic and necrosis potyviruses: USCR-7 and USCR-9. **Crop Science** 42: 673–674, 2002.

MIKLAS, P. N. , KELLY, J. D., BEEBE, S. E., BLAIR, M. W. .Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica** 147: 105–131, 2006

MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidação de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ceiência Rural**, 27:685-689. 1997.

MORA, N.O.A. **Variabilidade patogênica de *Uromyces phaseoli* var. *typica Arth*. no Brasil e o problema da identificação de raças fisiológicas.** Viçosa, UFV, Imprensa Universitária. 1986. 68p. (Tese M.S.) - 1986.

MSTAT-C.. **A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments**. Michigan State University, 1991.

MUKESHIMANA, G., PANEDA, A., RODRIGUEZ, C., FERREIRA, J.J., GIRALDEZ, R. and KELLY,J.D. Markers linked to the *bc-3* gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. **Euphytica** 144: 291–299, 2005.

NELSON, R. R. The evolution of parasitic fitness. In HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. **Plant Disease,** An Advanced Treatise. New York: Academic Press, p. 23-46, 1979.

NIETSCHE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris*.** Viçosa, MG.UFV, Imprensa Universitária. 1997. 47p. (Tese M.S.). - 1997.

NIETSCHE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência.** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 2000. 65p. (Tese DS). - 2000.

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

NIETSCHE, 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. **Euphytica,** 117:77-84. 2001.

NIETSCHE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, 148:117–121, 2000.

NIETSCHE, S., BOREM,A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA, 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 Phytopathology** 148: 117–121, 2000.

OLIVEIRA, E.J. de **Seleção de linhagens de feijoeiro resistente à mancha-angular assistida por marcadores moleculares e identificação de novas fontes de resistência.** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária. 2002. 93p. (Tese MS). - 2002.

PARK, S.O., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R., CROSBY, K.M., BRICK, M.A. RAPD and SCAR markers linked to the *Ur-6* Andean gene controlling specific rust resistance in common bean. **Crop Science** 44: 1799–1807, 2004.

PARK, S.O., COYNE,D.P., STEADMAN, J.R., SKROCH, P.W. Mapping of the *Ur-7* gene for specific resistance to rust in common bean. **Crop Science** 43: 1470–1476, 2003.

PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. **La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum em América Latina** 19:15-22. 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ, M., FERNANDEZ, F., SCHOONHOVEN, A. (Eds.). **Frijol: investigación y produción.** Cali: PUND-CIAT, p.172-180, 1985.

PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del *primer* taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La**

antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).

PASTOR-CORRALES, M.A. Sources, genes for resistance, and pedigríes of 52 rust and mosaic resistant dry bean germplasm lines released by the USDA Beltsville Bean Project in collaboration with the Michigan, Nebraska and North Dakota Agricultural Experiment Stations. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46: 235-241, 2003.

PEDERSEN, W.L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopatology**, 26:369-378, 1988.

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

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

QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. P. O., RAGAGNIN, V. A., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 47: 237–238, 2004a.

QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. P. O., RAGAGNIN, V. A., BARROS, E. G. MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 47: 249–250, 2004b.

QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLARD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271-272. 2004c.

RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 46: 159-160, 2003.

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

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

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

RAVA, S.C.A., SARTORATO, A. & CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 28:5-6. 1985.

SANTANA, F.A. **Caracterização molecular e avaliação da reação do feijoeiro comum ao vírus do mosaico comum**. Viçosa, MG. UFV, 2006. 27p. (Monografia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SARTORATO, A. **Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* no feijoeiro comum**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS 1, 2001, Resumos.Goiânia: GO, 2001.CD-Room, Resumo 26.

SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira** 25: 637–642. , 2000.

SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease

resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 42: 21-22, 1999.

SCHAFER, J. F., ROELFS, A.P. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Piccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence, **Phytopathology**, 75:749-750, 1985.

SILVA, G. F., SANTOS, J. B., RAMALHO, M. A. P. Tagging resistance allele of the common bean to angular leaf spot by SSR and RAPD markers **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 45: 155-156, 2002

SILVA, S. A. G., RAVA, C. A., COSTA, J. G. C., MORAIS, O. P. Herança da resistência do feijoeiro ao crestamento bacteriano comum. **Fitopatologia Brasileira**, 24: 38-44, 1999.

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

SINGH, S., SIDHU, J. S., HUANG, N., VIKAL, Y., LI, Z., BRAR, D.S., DHALIWAL, H. S., KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 1011-1015, 2001.

SOUZA, T.L.P.O. **Classificação de raças fisiológica de *Uromyces appendiculatus* e piramidação de genes de resistência ao patógeno em feijão do tipo "carioca".** Viçosa, UFV. Viçosa, Imprensa Universitária 2005 96p, (Tese MS) - 2005.

SOUZA, T.L.P.O., ALZATE-MARIN, A.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Análise da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira,** 30:143-149, 2005.

STAVELY, J.R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology,** 74: 834, 1984a. (Resumo).

STAVELY, J.R. Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. **Phytopathology,** 74: 339-344, 1984b.

STAVELY, J.R. Pyramiding rust and viral resistance genes using traditional and marker techniques in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:1-4, 2000.

STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** 26: 4-6, 1983.

STAVELY, J.R., GRAFTON, K.F. Genetics of resistance to eight races of *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris* cultivar Mexico 235. **Phytopathology,** 75: 1310, 1985. (Resumo).

STAVELY, J.R., KELLY, J.D., GRAFTON, K.F., MULLINS, C.A., STRAW, A., MCMILLAN JR., R.T., BEAVER, J.S., MIKLAS, P.N., STEINKE, J., STEADMAN, J.R., COYNE, D.P., LINDGREN, D.T., SILBERNAGEL, M.J., Rust resistant bean germplasm releases, 1994–1996. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 40: 120–121, 1997.

STAVELY, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In*:* SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali: CIAT, 1989. p.159-194.

THRALL, P.H., BURDON, J.J. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. **Science**, 299:1735-1737, 2003.

VALLEJO, V., KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* gene in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43: 82-83, 2000.

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

VIEIRA, C. **Memórias de meio século de estudo sobre a cultura do feijão**. Editora UFV. 214p – Viçosa MG- 2004.

VIEIRA, C. Resistência horizontal às doenças e diversidade genética no melhoramento do feijoeiro no Brasil. **Revista. Ceres,** 19:261-279. 1972.

VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão**.** In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 817 p, 1999.

VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão**.** In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 817 p.

WANDER, A.E. Perspectivas de mercado interno e externo para o feijão. **VIII CONAFE**, Goiânia, 182:892-895, 2005.

WANDER, A.E. Produção e consumo de feijão no Brasil,1975-2005. **Informações Econômicas** 37: 7-21, 2007.

WEBSTER, D.M., AINSWORTH, P.M. Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap bean to *Uromyces appendiculatus*. **J. Am. Soc. Hortic. Sci**., 113: 938-940, 1988.

WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Chemical control of common and fuscous bacterial blight in Michigan navy (pea) beans. **Plant Disease Reporter**, Washington, 60: 793-797, 1976.

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

YOUNG, R., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment lenght polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics,** 77: 95-101, 1989.

YOUNG, R.A., KELLY, J. D. RAPD markes linked to three major antharacnose resisteance genes in common beans. **Crop Science,** 37:940-946.1997

YOUNG, R.A., MELOTTO, M.; NODARI, R. O., KELLY, J. D. Marker assisted dissection of the oligigenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics,** 96:87-94.1998

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

YU, K., PARK, S.J., ZHANG, B., HAFFNER, M., POYSA, V. An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. **Euphytica,** 138: 89–95, 2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo