SUELEN NOGUEIRA DESSAUNE

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES E HERANÇA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NO FEIJOEIRO-COMUM

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

D475i
2010

Dessaune, Suelen Nogueira, 1984-
Identificação de fontes e herança da resistência à ferrugem asiática da soja no feijoeiro-comum / Suelen Nogueira Dessaune. – Viçosa, MG, 2010.
xii, 53f. : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Feijão - Resistência a doenças e pragas. 3. Ferrugem-da-soja. 4. *Phakopsora pachyrhizi*. 5. Marcadores genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6522

SUELEN NOGUEIRA DESSAUNE

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES E HERANÇA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NO FEIJOEIRO-COMUM

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

APROVADA EM: 05 de fevereiro de 2010

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

Prof. Maurilio Alves Moreira (Co-Orientador)

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Profª. Tânia Maria Fernandes Salomão

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros (Orientador)

A Verdade

A porta da verdade estava aberta,
Mas só deixava passar
Meia pessoa de cada vez.

Assim não era possível atingir toda a verdade,
Porque a meia pessoa que entrava
Só trazia o perfil de meia verdade,
E a sua segunda metade
Voltava igualmente com meios perfis
E os meios perfis não coincidiam verdade...

Arrebentaram a porta.
Derrubaram a porta,
Chegaram ao lugar luminoso
Onde a verdade esplendia seus fogos.
Era dividida em metades
Diferentes uma da outra.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.
Nenhuma das duas era totalmente bela
E carecia optar. Cada um optou conforme
Seu capricho, sua ilusão, sua miopia.

Carlos Drummond de Andrade

Aos meus pais, Luzimar e Edna.

À minha irmã, Mila.

Ao meu amor, Handerson.

DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pela presença constante em minha vida e pela proteção e bênçãos concedidas.

Aos meus pais Luzimar e Edna, pelo amor incondicional, por todo apoio e incentivo em minha educação e por serem meus maiores exemplos de fé, coragem, humildade e perseverança.

À minha querida irmã Mila, presente especial de Deus, pelo amor, amizade, companheirismo e por todos os momentos de alegria, mesmo quando estávamos tão distantes.

Ao meu namorado Handerson, pelo apoio e incentivo constantes, pelo imenso amor, carinho e compreensão, por sempre torcer pelo meu sucesso profissional e acreditar nos nossos sonhos.

Ao meu orientador, professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, apoio e incentivo desde 2004, pela competência, confiança e amizade e por ter contribuído para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus co-orientadores, os professores Maurilio Alves Moreira e José Eustáquio de Souza Carneiro, pelas sugestões, pela amizade e atenção sempre a mim dispensadas.

Aos membros da banca examinadora, Professora Tânia Maria Fernandes Salomão e Doutora Eveline Teixeira Caixeta, pelas críticas sempre construtivas, contribuições e sugestões para a melhoria desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, particularmente, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela excelente formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de pesquisa: iniciação científica e mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Genética Molecular de Plantas e Proteína pela agradável convivência e auxílio nas atividades científicas, em especial ao Thiago, Klever, Bruno, Lorêta, Fernanda, Giselle, Newton, Demerson, Luiz Cláudio, Leonardo, Márcia, Matheus e Jeziel.

Aos funcionários Cássio, Zé Carlos, Sr. José Pinto e Gláucia pela disponibilidade e pelo auxílio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, e aos colegas de curso, pelos importantes ensinamentos.

À Coordenação do curso de Genética e Melhoramento, pelo apoio.

À Janaína, pelo carinho e amizade em todos os momentos, pelo aprendizado compartilhado e por estar sempre pronta a me ajudar.

À estagiária Martha, pelo auxílio e disponibilidade que foram essenciais para a concretização deste trabalho, e pelos momentos de descontração compartilhados no laboratório.

Aos amigos da Biologia 2003, pela amizade, companheirismo e pela troca de ensinamentos que foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Aos amigos Leandro, Camilla, Nívea, Valéria, Luana e Rubana pela amizade incondicional, carinho, atenção e apoio em todos esses anos de convivência.

Aos meus familiares, amigos, colegas e, enfim, a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

Biografia

SUELEN NOGUEIRA DESSAUNE, filha de Luzimar Conde Dessaune e Edna Maria de Souza Nogueira Dessaune, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 07 de janeiro de 1984. Residente em Cachoeiro de Itapemirim, concluiu o ensino fundamental e médio no "Colégio Jesus Cristo Rei", nos anos de 1998 e 2001, respectivamente.

Em 2003, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Graduou-se licenciada e bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Genética e Biologia Molecular, em 18 de janeiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Profº Everaldo Gonçalves de Barros, submetendo-se à defesa de tese em 05 de fevereiro de 2010.

Índice

Resumo ix
Abstract xi
1. Introdução Geral 1
2. Objetivos 7
3. Referências Bibliográficas 8

Capítulo 1

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM À FERRUGEM DA SOJA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA NO ACESSO PI 181996

Resumo 10
1. Introdução 11
2. Material e Métodos 15
   2.1. Material genético e cruzamento 15
   2.2. Condições de plantio 17
   2.3. Inoculações com isolado monopustular de *P. pachyrhzi* 18
   2.4. Avaliação da doença 19
   2.5. Análise estatística 20
   2.6. Estudo de herança 20
3. Resultados e Discussão 21
   3.1. Reação de genótipos de feijoeiro-comum e de acessos de soja a *P. pachyrhizi* 21
   3.2. Estudo de herança 24
4. Conclusões 27
4. Referências Bibliográficas 28

Capítulo 2

ANÁLISE DE LIGAÇÃO ENTRE MARCADORES MICROSSATÉLITES E O GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA SOJA NO ACESSO DE FEIJOEIRO-COMUM PI 181996

Resumo..... 33
1. Introdução 35
2. Material e Métodos 40
   2.1. Material genético 40
   2.2. Obtenção dos *bulks* resistente (R) e suscetível (S)..... 40
   2.3. Análise com *primers* microssatélites..... 40
3. Resultados e Discussão 44
4. Conclusões 50
5. Referências Bibliográficas 51

Resumo

DESSAUNE, Suelen Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Identificação de fontes e herança da resistência à ferrugem asiática da soja no feijoeiro-comum.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Orientadores: Maurilio Alves Moreira e José Eustáquio de Souza Carneiro.

Desde 2001, quando ocorreu seu primeiro relato no Brasil, a ferrugem asiática da soja (FAS), incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tem ocasionado sérios prejuízos à cultura da soja. O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais indicado, pois é mais efetivo, seguro e menos oneroso quando comparado ao controle químico. Um fator que tem dificultado a identificação de cultivares resistentes é a alta severidade e variabilidade apresentada pelo patógeno. *P. pachyrhizi* possui uma ampla gama de hospedeiros, dentre eles o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*). A FAS já foi detectada em genótipos de feijoeiro sob condições naturais de cultivo no Brasil e em outros países. Assim, no futuro, esta doença poderá se tornar um problema também para a cultura do feijoeiro. Por isso, os objetivos deste trabalho foram caracterizar genótipos de feijão-comum quanto à reação à FAS e determinar a herança da resistência no acesso PI 181996. Além disso, procurou-se identificar marcadores microssatélites (SSR) ligados ao gene de resistência presente em PI 181996. Foram testados doze genótipos de feijoeiro quanto à reação a *P. pachyrhizi*. Também foram testados os acessos de soja PI 200492, PI 547878, PI 462312 e PI 459025. Eles apresentam os genes de resistência *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*, respectivamente. Para a determinação da herança, foi obtida uma população F_2 derivada do cruzamento entre o acesso PI 181996 e a cultivar US Pinto 111 (suscetível à FAS). Todos os genótipos, bem como os indivíduos F_2, foram inoculados com um isolado monopustular do patógeno. Para identificar marcadores moleculares ligados ao gene de resistência presente em PI 181996, foram analisados 173

primers SSR. Doze genótipos de feijoeiro e quatro Pis de soja foram avaliados quanto à resistência à FAS. Três genótipos de feijoeiro foram considerados resistentes e os outros nove e todos os quatro acessos de soja foram suscetíveis à FAS. O teste do Qui-quadrado mostrou que a resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996 é monogênico dominante. Por meio da técnica da análise de segregação em *bulk* não foi encontrada nenhuma marca potencialmente ligada ao gene de resistência à FAS presente no acesso de feijoeiro-comum PI 181996. Um maior número de *primers* SSR deve ser testado para encontrar potenciais marcas associadas a este gene. Este tipo de informação é de grande importância para os programas de melhoramento, pois podem permitir a rápida mobilização desse gene de resistência para cultivares comerciais de feijão-comum, minimizando danos futuros que a ferrugem da soja possa vir a causar à cultura do feijoeiro.

Abstract

DESSAUNE, Suelen Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Identification of sources and resistance inheritance mode to asian soybean rust in common bean.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisers: Maurilio Alves Moreira and José Eustáquio de Sousa Carneiro.

Since 2001, when it was first detected in Brazil, the asian soybean rust (ASR), incited by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, has caused serious damages to the soybean crop. The use of resistant cultivars is the most appropriate control measure as it is more effective, safer and less expensive than the chemical control. A factor that has hampered the identification of resistant cultivars to ASR is the high severity and variability of the pathogen. *P. pachyrhizi* has a wide host range, including the common bean (*Phaseolus vulgaris*). ASR has already been detected in bean genotypes under natural conditions in Brazil and in other countries. Thus, in the future, this disease could also become a problem for the bean crop. Therefore, the objectives of this work were to characterize common bean genotypes in relation to their reaction to ASR and to determine the resistance inheritance mode in the PI 181996. And also to search for microsatellite markers (SSR) linked to the resistance gene present in PI 181996. Twelve bean genotypes were tested for their reaction to *P. pachyrhizi.* The soybean accessions PI 200492, PI 547878, PI 462312 and PI 459025 were also tested. They harbor the resistance genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* and *Rpp4*, respectively. For determination of the inheritance pattern, an F_2 population was obtained from the cross PI 181996 X US Pinto 111 (susceptible to ASR). All genotypes, and the F_2 plants were inoculated with a single-spore *P. pachyrhizi* isolate. To identify molecular markers linked to the resistance gene present in PI 181996, 173 SSR primer-pairs were analyzed. Twelve common bean genotypes and four soybean Pis were tested for resistance to ASR. Three of the common bean genotypes were

considered resistant and the other nine and all four soybean accessions were susceptible to ASR. The chi-squared test showed that resistance to ASR in the common bean plant accession PI 181996 is monogenic and dominant. The use of the bulked segregant analysis technique did not detect any SSR marker linked to the ASR resistance gene present in common bean PI181996. A greater number of SSR primers needs to be tested to detect potential markers associated with this gene. This type of information has great importance for breeding programs because it can allow a prompt transfer of this resistance gene to common bean commercial cultivars, minimizing future damage that soybean rust could cause to the bean crop.

1. Introdução Geral

A ferrugem asiática da soja – FAS, doença incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., tem sido um grave problema para os produtores de soja (*Glycine max* L. Merrill) no mundo todo. Isso se deve às sérias perdas que ela ocasiona na produtividade da cultura. O primeiro relato da FAS ocorreu no Japão, em 1903. Desde então, se disseminou rapidamente pelo continente asiático, permanecendo endêmica, porém com surtos epidêmicos esporádicos. Na década de 1990, foi relatada pela primeira vez no continente africano; em 2001, na América do Sul (Paraguai e Brasil) e em 2004, nos Estados Unidos (Embrapa Soja, 2009). As perdas na produção ocasionadas pela FAS chegaram a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada em níveis epidêmicos. No Brasil, a doença já é considerada endêmica nas principais regiões produtoras. As perdas na safra 2007/2008 alcançaram 418,5 mil toneladas e o custo total da ferrugem, incluindo custo com o controle e perdas na produtividade, somaram US$ 2,38 bilhões (Embrapa Soja, 2009).

O fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório (biotrófico), ou seja, não provoca a morte de seus hospedeiros, mas desenvolve estratégias efetivas para explorar células vivas como fontes de alimento. O ciclo de vida deste patógeno inicia-se com a produção de urediniósporos (esporos), oriundos de urédias, que atingem as folhas da planta hospedeira na face superior ou inferior e germinam, se a temperatura for favorável ou houver pelo menos seis horas de molhamento foliar. Dos urediniósporos germinados forma-se um tubo germinativo, capaz de penetrar os tecidos foliares (Zambolim, 2006). Em uma infecção por *P. pachyrhizi*, a penetração ocorre principalmente de forma direta, pelas junções das células da epiderme (Magnani et al., 2007).

Os sintomas iniciais da ferrugem são caracterizados por minúsculos pontos (de no máximo 1 mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, de uma coloração esverdeada a cinza-esverdeada. Na medida em que a doença progride, podem ser observadas uma ou mais urédias, que representam os corpos de frutificação do fungo e que irão produzir e liberar os urediniósporos. Uma vez liberados, os urediniósporos serão facilmente disseminados pelo vento para lavouras próximas ou a longas distâncias (Yorinori et al., 2003). Segundo Bromfield (1984), as lesões resultantes da infecção por *P. pachyrhizi* podem ser de dois tipos: lesões TAN, de coloração bronze, indicando suscetibilidade, ou lesões RB (*reddish-brown*), de coloração castanho-avermelhada, caracterizando resistência.

O controle químico com fungicidas é, até o momento, o principal método de controle da FAS (Embrapa Soja, 2009). Entretanto, o controle por meio do uso de cultivares resistentes é mais indicado, pois constitui um método efetivo, seguro e menos oneroso quando comparado ao químico. Entre os obstáculos encontrados no processo de identificação de cultivares resistentes está, principalmente, a alta severidade e variabilidade de *P. pachyrhizi*. Em estudos desenvolvidos por Bromfield (1981), em Taiwan, foi constatada a existência de pelo menos uma raça do patógeno contendo três genes de avirulência. Essa raça é capaz de provocar alterações na planta hospedeira resultando em doença, caso a planta não tenha pelo menos um gene de resistência que reconheça um dos genes de avirulência.

Já foram identificados na espécie *G. max* quatro genes dominantes (*Rpp1, Rpp2, Rpp3* e *Rpp4*), de efeito principal, conferindo resistência, porém, a um limitado número de isolados de *P. pachyrhizi*. Genótipos de soja portadores desses genes, quando infectados por raças avirulentas de *P. pachyrhizi*, apresentam lesões do tipo RB. Entretanto, a resistência conferida pelos genes *Rpp1, Rpp2* e *Rpp3* foi rapidamente suplantada em condições de campo. Já a resistência conferida pelo gene *Rpp4* foi

suplantada em experimentos envolvendo inoculações artificiais (Hartman et al., 2005). Em estudo mais recente, desenvolvido por Garcia et al. (2008), foi descoberto, após inoculação com um único isolado de *P. pachyrhizi*, um novo gene de resistência à FAS na soja, que foi denominado de *Rpp5*. Entretanto, estudos com diferentes isolados se fazem necessários, a fim de verificar se a resistência conferida por *Rpp5* é ampla.

O fungo *P. pachyrhizi* possui uma ampla gama de hospedeiros, o que representa um potencial risco para diversas outras culturas, além da soja. Segundo Ono et al. (1992) e Rytter et al. (1984), *P. pachyrhizi* é capaz de infectar aproximadamente 30 espécies pertencentes a 17 gêneros de leguminosas, além de 60 espécies de outros diferentes gêneros.

Considerando uma mesma espécie hospedeira, existem genótipos que apresentam distintas reações ao patógeno. Em espécies silvestres de soja, genótipos incompatíveis com vários isolados de *P. pachyrhizi* têm sido identificados e caracterizados quanto à herança da resistência. Avaliando acessos de *G. canescens*, *G. clandestina*, *G. tabacina* e *G. tomentella* nativos da Austrália, Burdon e Speer (1984) verificaram que pelo menos um acesso de cada uma destas espécies foi resistente a todos os oito isolados de *P. pachyrhizi* com os quais foi inoculado. Com base na reação diferencial apresentada pelos acessos, os autores identificaram seis distintas combinações de virulência entre os isolados do fungo. Isso permitiu, inclusive, a proposição de uma série diferenciadora para o patógeno. Esses autores também iniciaram um estudo para determinar a herança da resistência apresentada pelos acessos de *G. canescens* e *G. clandestina*. Os resultados demonstraram que, assim como em *G. max*, a resistência é conferida por genes dominantes de herança simples. Posteriormente, em um trabalho mais exaustivo, Burdon (1988) avaliou o controle genético da resistência a *P. pachyrhizi* apresentada por sete linhagens de *G. canescens*. Este autor verificou que em seis destas

linhagens a resistência era monogênica, e que em apenas uma delas, dois genes independentes governavam o caráter.

Um hospedeiro alternativo de *P. pachyrhizi* que merece destaque é o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), que representa um alimento básico para a população mundial, sendo o Brasil, o maior produtor e consumidor desta leguminosa. O primeiro relato sobre a virulência de *P. pachyrhizi* em acessos de feijoeiro foi feito por Stavely et al. (1985). Neste trabalho, a partir de inoculações artificiais, foram identificados genótipos resistentes. Em estudos mais recentes, a FAS foi observada em acessos de feijoeiro sob condições naturais de cultivo no Brasil, na África do Sul, nos Estados Unidos e na Argentina (Du Preez et al., 2005; Lynch et al., 2006; Pastor-Corrales et al., 2007; Ivancovich et al., 2007).

Em trabalho desenvolvido por Miles et al. (2007), cultivares de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem do feijoeiro, incitada por *Uromyces appendiculatus* F. Strauss (syn. *U. phaseoli* G. Winter), foram testadas com seis isolados de *P. pachyrhizi* de diferentes países. A resistência a todos os seis isolados foi identificada entre as cultivares avaliadas. Entretanto, apesar de serem resistentes, nenhuma dessas cultivares é imune, ou seja, elas apresentam algum tipo de sintoma da doença quando infectadas. Além disso, também por meio deste estudo, ficou evidenciado que não existe uma correspondência entre a resistência à ferrugem do feijoeiro e a resistência à FAS. Stavely et al. (1985) compararam as cultivares de feijoeiro e soja suscetíveis à FAS quanto ao tamanho das lesões e à produção de esporos, por meio de inoculações artificiais com *P. pachyrhizi*. As cultivares de feijoeiro apresentaram lesões menores e uma menor produção de esporos. Ainda, de acordo com Stavely et al. (1985), quando estes mesmos sintomas são avaliados em cultivares de feijoeiro suscetíveis, inoculadas com *P. pachyrhizi* e *U. appendiculatus*, o patógeno da FAS ocasiona lesões menores e com menor produção de esporos que o patógeno da ferrugem do feijoeiro. Assim, conclui-se que *P. pachyrhizi* oferece menos riscos à

cultura do feijoeiro-comum que *U. appendiculatus*. A menor severidade da FAS em *P. vulgaris* quando comparado a acessos de *G. max*, por meio de ensaios com inoculação natural e em condições de cultivo, também foi relatada por Du Preez et al. (2005), Lynch et al. (2006), Pastor-Corrales et al. (2007) e Ivancovich et al. (2007). No entanto, devido à alta variabilidade de *P. pachyrhizi*, além de seu amplo espectro de hospedeiros e sua alta capacidade de dispersão, muitos melhoristas acreditam que a FAS poderá também se tornar um sério problema para a cultura do feijoeiro, principalmente nas regiões onde ela é endêmica.

Assim como a mancha-angular, a FAS também poderá se tornar um problema para a cultura do feijoeiro. A mancha-angular do feijoeiro, doença incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, era considerada de pequena importância até meados da década passada, uma vez que ocorria apenas no final do ciclo da cultura, sendo por isso negligenciada. Entretanto, atualmente a mancha-angular é tida como uma das doenças mais agressivas para a cultura do feijoeiro, pois surge logo no início do ciclo, podendo causar perdas de até 70% na produção (Sartorato, 2002). Portanto, a identificação e a caracterização de fontes de resistência à FAS em *P. vulgaris* são medidas estratégicas importantes a serem adotadas pelos programas de melhoramento do feijoeiro que visam resistência a doenças.

Com base nas informações apresentadas, e considerando as soluções atualmente oferecidas pela biotecnologia, foi que surgiu a expectativa de se identificar e transferir genes de resistência à FAS presentes em variedades não melhoradas de feijoeiro para cultivares comerciais, tanto desta espécie quanto de soja. O atual trabalho, ao identificar fontes de resistência à FAS no feijoeiro-comum e estudar o modo de herança, pretende disponibilizar informação útil aos melhoristas, uma vez que o gene de resistência identificado em genótipo de feijoeiro poderá, no futuro, ser transferido para cultivares comerciais. Isso possibilitará avanços na agricultura e o controle

da FAS de maneira sustentável, já que a aplicação de fungicidas poderá ser substituída pelo controle genético.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar 12 genótipos de feijoeiro-comum quanto à reação à ferrugem asiática da soja (FAS);
- Estudar e determinar a herança da resistência à FAS no acesso de feijoeiro PI 181996;
- Identificar marcadores moleculares microssatélites (SSR) associados ao gene de resistência à FAS presente no acesso PI 181996.

3. Referências Bibliográficas

Bromfield, K.R. (1981). **Differential reaction of some soybean accessions to *Phakopsora pachyrhizi*.** Soybean Rust News, 4: 2 (Abstract).

Bromfield, K.R. (1984). **Soybean rust.** Saint Paul: American Phytopathological Society. 65 p.

Burdon, J.J., Speer, S.S. (1984). A set of differential *Glycine* hosts for the identification of races of *Phakopsora pachyrhizi*. **Euphytica**, 33: 891-896.

Burdon, J.J. (1988). Major gene resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in *Glycine canescens*, a wild relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 75: 923-928.

Du Preez, E.D., Van-Rij, N.C., Lawrance, K.F. (2005). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on dry beans in South Africa. **Plant Disease**, 89: 206 (Abstract).

Embrapa Soja. Disponível em: **http://www.cnpso.embrapa.br/.** Acesso em Setembro/2009

Garcia, A., Calvo, E.S., Kiihl, R.A.S., Harada, A., Hiromoto, D.M., Vieira, L.G.E. (2008). Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117: 545-553.

Hartman, G.L., Miles, M.R., Frederick, R.D. (2005). Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, 89: 664-666.

Ivancovich, A.J., Botta, G., Rivadaneira, M., Saeig, E., Erazzú, L., Guillin, E. (2007). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp. in Argentina. **Plant Disease**, 91: 111 (Abstract).

Lynch, T.N., Marois, J.J., Wright, D.L., Harmon, P.F., Harmon, C. L., Miles, M.R., Hartman, G.L. (2006). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* species in the United States. **Plant Disease**, 90: 970 (Abstract).

Magnani, E.B.Z., Alves, E., Araújo, D.V. (2007). Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, 32: 156-160.

Miles, M.R., Pastor-Corrales, M.A., Hartman, G.L., Frederick, R.D. (2007). Differential response of common bean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 91: 698-704.

Ono, Y., Buritica, P., Hennen, J.F. (1992). Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycology Research**, 96: 825-850.

Pastor-Corrales, M.A., Sartorato, A., Liebenberg, M.M., Del Peloso, M.J., Arraes Pereira, P.A., Nunes Junior, J., Diniz Campos, H. (2007). Evaluation of common bean cultivars from The United States for their reaction to soybean rust under field conditions in Brazil and South Africa. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 50: 123-124.

Rytter, J.L., Dowler, W.M., Bromfield, K.R. (1984). Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, 68: 818-819.

Sartorato, A. (2002). Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 27: 78-81.

Stavely, J.R., Rytter, J.L., Royer, M.H. (1985). Virulence of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 28: 35-36.

Yorinori, J.T., Paiva, W.M., Costamilan, L.M., Bertagnolli, P.F. (2003). **Ferrugem da Soja (*Phakopsora pachyrhizi*): Identificação e Controle.** Londrina: Embrapa Soja. (Folder).

Zambolim, L. (2006). **Ferrugem Asiática da Soja.** Viçosa/MG: Editora Suprema. 139p.

Capítulo 1

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM À FERRUGEM DA SOJA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA NO ACESSO PI 181996

Resumo

Dentre as doenças que ocasionam maiores prejuízos aos produtores de soja, destaca-se a ferrugem asiática da soja – FAS, incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. No Brasil, foram relatadas perdas de até 90% na produção. O fungo *P. pachyrhizi* apresenta uma ampla gama de espécies hospedeiras como, por exemplo, o feijão-comum, que tem grande importância social e econômica para o país. Experimentos recentes conduzidos em vários países verificaram a incidência de *P. pachyrhizi* em plantas de feijoeiro cultivadas em condição de campo. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram identificar fontes de resistência à FAS no feijoeiro-comum e determinar a herança da resistência no acesso PI 181996, por meio de inoculações com isolado monopustular do fungo. Os acessos de soja que apresentam os genes de resistência à FAS *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* também foram testados. Dos doze genótipos de feijoeiro avaliados, três foram considerados resistentes (Ouro Negro, Pérola e PI 181996). Dos acessos de soja, nenhum apresentou resistência ao isolado, o que comprova que os genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* foram suplantados. O teste do Qui-quadrado mostrou que o caráter resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996 apresenta uma frequência de 3 plantas resistentes para 1 planta suscetível, com 55,34% de probabilidade, o que indica que a herança é monogênica dominante. Tais informações são de grande importância para os melhoristas, pois podem permitir a rápida transferência desse gene de resistência para cultivares comerciais de feijão-comum, minimizando danos futuros caso esta doença venha a se tornar um problema para a cultura do feijoeiro.

1. Introdução

A ferrugem asiática da soja – FAS, incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., possui alto potencial de dano à cultura da soja, pois pode causar rápido amarelecimento e queda prematura das folhas, prejudicando a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho do grão e, consequentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade (Yang et al., 1991).

De acordo com dados da Embrapa Soja (2009), a partir de 2001, quando a FAS foi identificada no Brasil, epidemias vêm sendo constatadas praticamente em todas as regiões produtoras do país, ocasionando muitos prejuízos aos agricultores e exigindo altos gastos com o manejo da doença.

A principal forma de controle da FAS baseia-se na aplicação de fungicidas, os quais oneram substancialmente a produção, além de serem nocivos ao ambiente (Embrapa Soja, 2009). Por isso, o uso de cultivares resistentes constitui o método mais recomendado para o controle, pois é mais barato e seguro, quando comparado ao método químico. Entretanto, a identificação e a estabilidade dessas fontes de resistência têm sido muito difícil, devido, principalmente, à alta variabilidade de *P. pachyrhizi*. A grande diversidade genética desta espécie fitopatogênica foi observada, por exemplo, em um estudo desenvolvido por Yamaoka et al. (2002), em que foram identificadas dezoito raças do patógeno em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão.

Já foram identificados na soja cinco genes R dominantes e independentes para a resistência à ferrugem da soja: *Rpp1*, identificado no acesso PI 200492 (McLean e Byth, 1980), *Rpp2* em PI 230970 (Bromfield e Hartwig, 1980), *Rpp3* (PI 462312) (Bromfield e Melching, 1982), *Rpp4* (PI 459025) (Hartwig,1986) e *Rpp5* (PI 200456), relatado mais recentemente por Garcia et al. (2008). No entanto, os genes *Rpp1-Rpp4* não

são mais efetivos no combate à infecção por *P. pachyrhizi* (Hartman et al., 2005) e o gene *Rpp5* ainda requer mais avaliações, a fim de se verificar se a resistência por ele conferida é ampla.

P. pachyrhizi tem uma ampla gama de hospedeiros, a qual inclui a soja cultivada (*Glycine max*), além de outras espécies do gênero *Glycine* e outros gêneros dentro da família das leguminosas. Ono et al. (1992) observaram a ocorrência natural de *P. pachyrhizi* em 31 espécies de 17 gêneros das leguminosas, além de 60 espécies de 28 gêneros de famílias diferentes, as quais foram confirmadas como hospedeiros adicionais após inoculação. Em trabalho desenvolvido por Bonde et al. (2008), foram selecionadas, para avaliação quanto à reação à *P. pachyrhizi*, plantas economicamente importantes para os Estados Unidos, bem como plantas que poderiam servir como meio de sobrevivência para o patógeno em períodos de entressafra no país. Observou-se que, do número limitado de espécies de leguminosas avaliadas, kudzu, soja e ervilha foram as mais suscetíveis. Assim, por intermédio de alguns desses hospedeiros alternativos, o inóculo pode ser mantido nas épocas de entressafra, parasitando outras espécies de plantas, que não a soja, no campo.

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre os hospedeiros alternativos de *P. pachyrhizi*. Ele representa a leguminosa mais importante utilizada para consumo humano direto (Gepts et al., 2008). É fonte de proteínas (~ 22% de sua constituição), vitaminas (folatos) e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn), principalmente em países em desenvolvimento (Miklas et al., 2006). O Brasil representa o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum, com uma média atual de consumo de 12,7 kg/per capita/ano (Embrapa Arroz e Feijão, 2009). Apesar da relevância desta cultura para o país, o rendimento médio nacional ainda é muito baixo, cerca de 846 kg/ha (IBGE, 2009). Dentre os fatores que explicam essa situação está o grande número de doenças que acometem o feijoeiro (Vieira et al., 2005).

Vários autores relatam a ocorrência da FAS no feijão-comum em condições de campo no Brasil, na África do Sul, nos Estados Unidos e na Argentina (Du Preez et al., 2005; Lynch et al., 2006; Pastor-Corrales et al., 2007; Ivancovich et al., 2007). A doença também foi estudada sob condições controladas, por exemplo, no trabalho desenvolvido por Souza et al. (2008). Nesta pesquisa, foram avaliados 45 acessos de feijoeiro inoculados com uma mistura de raças de *P. pachyrhizi*, sendo que destes, 14 foram considerados resistentes, mas nenhum foi imune. Em outro trabalho, desenvolvido por Miles et al. (2007) também foram identificados acessos de *P. vulgaris* resistentes a seis isolados do patógeno, sem que fosse observada imunidade. Com relação aos acessos suscetíveis, o que se verificou até o momento é que o patógeno é menos agressivo no feijoeiro, ou seja, os sintomas provocados por *P. pachyrhizi* são mais amenos nesta cultura, quando comparada com a soja (Stavely et al., 1985; Du Preez et al., 2005; Lynch et al., 2006; Pastor-Corrales et al., 2007; Ivancovich et al., 2007). Apesar da menor severidade da ferrugem da soja no feijoeiro, ela poderá, no futuro, devido à alta variabilidade de *P. pachyrhizi*, ocasionar sérios danos aos produtores e muitos prejuízos à economia nacional.

Assim como a mancha-angular do feijoeiro, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, a FAS também poderá se tornar um problema para a cultura. Anteriormente, a mancha-angular era negligenciada, pois sua ocorrência se dava apenas no final do ciclo e, por isso, não era considerada um risco para a produção. Contudo, hoje, esta doença pode causar perdas de até 70%, afetando seriamente o setor agrícola do país (Sartorato, 2002). Desta forma, trabalhos que visem identificar e estudar fontes de resistência à FAS são de grande importância, uma vez que poderão gerar muitas informações úteis aos melhoristas a fim de evitar que, no futuro, a doença se torne um problema também para a cultura do feijoeiro.

Após a identificação fontes de resistência, uma etapa fundamental no estudo da resistência é a determinação da herança, ou seja, o conhecimento do modo de ação dos genes que governam o caráter. A identificação dos genes pode futuramente facilitar a sua transferência para cultivares comerciais suscetíveis. Em estudo desenvolvido por Burdon (1988), foi determinada a herança da resistência à ferrugem da soja em *G. canescens*. Este autor estudou o caráter em sete linhagens desta espécie e verificou que em seis delas a resistência era controlada por um gene dominante.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos principais identificar fontes de resistência à FAS no feijoeiro-comum, a partir da caracterização de genótipos mantidos no banco ativo de germoplasma do feijoeiro da UFV (BAGF/UFV), e determinar a herança da resistência a *P. pachyrhizi* no acesso PI 181996, por meio de inoculações com isolado monopustular do fungo. A reação de acessos de soja contendo os genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* também foi determinada usando o mesmo isolado. Desta forma, pretende-se gerar informações úteis a programas de melhoramento, a fim de evitar que a FAS, que já traz tantos danos para a cultura da soja, venha também prejudicar a produção de feijão-comum.

2. Material e Métodos

2.1. Material genético e cruzamento

Doze genótipos de feijoeiro-comum foram caracterizados quanto à reação à FAS. Dentre eles estão: fontes de resistência a doenças do feijoeiro, como a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular; cultivares comerciais dos grupos carioca, preto e vermelho; e uma linhagem elite, desenvolvida pelo programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Alguns dos exemplares avaliados no presente estudo foram escolhidos também por já terem sido resistentes à FAS em trabalhos anteriores. A Tabela 1 resume as características dos genótipos avaliados.

As sementes de todos os genótipos avaliados foram obtidas a partir da coleção do banco ativo de germoplasma do feijoeiro da UFV (BAGF/UFV).

Além dos genótipos de feijoeiro, também foram avaliados, quanto à reação ao isolado monopustular de *P. pachyrhizi*, os acessos de soja PI 200492 (cultivar Komata), PI 547878 (isolinha de Williams contendo o gene *Rpp2* oriundo da PI 230970), PI 462312 (cultivar Ankur) e PI 459025 (cultivar Bing-Nan), os quais apresentam os genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*, respectivamente. As sementes desses acessos também foram fornecidas pelo BIOAGRO/UFV.

Tabela 1. Descrição dos genótipos avaliados quanto à reação a *Phakopsora pachyrhizi*.

Genótipo	*Pool* gênico	Características[a]
AND 277	Andino	Fonte de resistência à mancha-angular do feijoeiro. Possui o gene *Phg-1* (Caixeta et al., 2005; Ragagnin et al., 2009).
Compuesto Negro Chimaltenango (CNC)	Mesoamericano	Fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro. Fonte de resistência à ferrugem da soja (Miles et al., 2007; Pastor-Corrales et al., 2007). Segundo Pastor-Corrales e Frederick (2008), a resistência à ferrugem da soja em CNC é controlada pela interação de dois genes dominantes complementares em ambos os pares.
IAPAR 14	Mesoamericano	Cultivar brasileira desenvolvida pelo IAPAR. IAPAR 14 é tolerante à ferrugem, antracnose e crestamento bacteriano comum sob condições de campo (Souza, 2009). Essa cultivar apresentou resistência à ferrugem da soja em experimento conduzido no campo, no Brasil por Nunes Junior et al. (2005) e em experimento em casa de vegetação, desenvolvido por Souza et al. (2008).
Mexico 309	Mesoamericano	Fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro. Possui o gene de resistência *Ur-5* (Steadman et al., 2002).
Ouro Negro	Mesoamericano	Cultivar brasileira de grão do tipo preto. Fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro, antracnose e mancha-angular. Possui os genes *Co-10* (antracnose) e os genes de resistência temporariamente nomeados de *Ur-ON* (ferrugem) e *Phg-ON* (mancha-angular) (Faleiro et al., 2004; Ragagnin et al., 2009).
Ouro Vermelho	Mesoamericano	Cultivar brasileira de grão do tipo vermelho.
P-33-5-1	Mesoamericano	Linhagem desenvolvida pelo BIOAGRO/UFV. Apresenta o *background* genético da cultivar brasileira de grão do tipo carioca Pérola, mas com resistência simultânea à ferrugem do feijoeiro (gene *Ur-ON*), antracnose (genes *Co-4*, *Co-6*, and *Co-10*), e mancha-angular (gene *Phg-1*) (Ragagnin et al., 2009). Fonte de resistência à ferrugem da soja (Souza et al., 2008).
Pérola	Mesoamericano	Cultivar brasileira de grão do tipo carioca. Fonte de resistência à ferrugem da soja (Souza et al., 2008).
PI 181996	Mesoamericano	Fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro. Possui o gene de resistência *Ur-11* (Steadman et al., 2002). Fonte de resistência à ferrugem da soja (Miles et al., 2007; Pastor-Corrales et al., 2007; Souza et al., 2008).
Redlands Pioneer	Andino	Fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro. Possui o gene de resistência *Ur-13*. Fonte de resistência à ferrugem da soja (Souza et al., 2008).
Rudá	Mesoamericano	Cultivar brasileira de grão do tipo carioca.
US Pinto 111	Mesoamericano	Cultivar usada como controle suscetível em experimentos com ferrugem conduzidos no BIOAGRO/UFV.

[a] Referências adicionais: Bean Improvement Cooperative - BIC, List of *Phaseolus vulgaris* L. Genes, Version 2009: http://www.css.msu.edu/bic/PDF/Bean_Genes_List_2010.pdf; e USDA/ARS National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network - GRIN: http://www.ars-grin.gov/npgs/index.html.

O acesso de feijoeiro PI 181996 e a cultivar US Pinto 111 foram utilizados como genitores em hibridações artificiais. PI 181996 e US Pinto 111 foram, respectivamente, resistente e suscetível ao isolado de *P. pachyrhizi* utilizado neste estudo. Além disso, outros trabalhos publicados relatam a resistência do acesso PI 181996 à FAS (Miles et al., 2007; Pastor-Corrales et al., 2007; Souza et al., 2008) e a suscetibilidade de US Pinto 111 (Souza et al., 2008).

A partir do cruzamento entre os genitores, foram obtidas sementes F_1. A natureza híbrida das plantas F_1 foi confirmada fenotipicamente (cor de flor). Por meio da autofecundação dos híbridos, foi obtida a população segregante F_2, que foi submetida à análise de segregação da resistência por meio de inoculações artificiais com um isolado monopustular do fungo *P. pachyrhizi*.

Como testemunha suscetível, nos ensaios envolvendo inoculações, e no processo de multiplicação do inóculo, foi utilizada a cultivar de soja Conquista, por ser severamente infectada pelo patógeno. Sementes desta cultivar também foram obtidas junto à UFV.

Para uniformizar o poder germinativo das sementes de todo o material genético usado, estas foram multiplicadas em casa de vegetação antes da realização dos experimentos.

2.2. Condições de plantio

Para a caracterização quanto à reação à FAS, seis sementes de cada genótipo de feijoeiro e dos acessos de soja, além da testemunha Conquista, foram semeadas em vasos plásticos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg de 4-14-8 (N-P-K) por m^3 de substrato. Cada vaso continha três sementes, totalizando assim, dois vasos para cada exemplar.

No estudo da herança da resistência à FAS no acesso PI 181996, as plantas da população F_2, de seus genitores e da testemunha suscetível, foram conduzidas sob as mesmas condições e utilizando os mesmos procedimentos relatados anteriormente, exceto pelo fato de que não foram utilizadas repetições.

2.3. Inoculações com isolado monopustular de *P. pachyrhizi*

O isolado monopustular de *P. pachyrhizi* utilizado nos ensaios envolvendo inoculações foi gentilmente cedido pelo professor Sérgio Brommonschenkel, do departamento de Fitopatologia, da UFV. Este isolado foi obtido a partir de urediniósporos coletados de plantas infectadas localizadas em campos experimentais do Campus da UFV.

Para manter a viabilidade e aumentar a quantidade de inóculo, os esporos do isolado monopustular foram periodicamente inoculados na cultivar de soja suscetível Conquista, em casa de vegetação. Os esporos resultantes da multiplicação foram armazenados sob baixa umidade, à temperatura de -80 °C, a fim de manter sua viabilidade e evitar a germinação precoce.

As inoculações foram realizadas aproximadamente aos 15 dias após a semeadura, quando a primeira folha trifoliolada das plantas atingiu cerca de 3/4 do seu desenvolvimento completo. Antes do preparo do inóculo, foi feita a reversão da dormência dos urediniósporos. Para isto eles foram submetidos ao choque térmico em banho-maria a 40 °C por 10 min, seguido de hidratação por 24 horas em placa de Petri. Após a hidratação, os urediniósporos foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, visando uma melhor dispersão. A concentração final do inóculo foi de $3{,}0 \times 10^5$ urediniósporos/mL, conforme proposto por Brogin (2005). A suspensão de esporos foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias e do primeiro trifólio das plantas, com o auxílio de um pincel de

cerdas finas. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmaras de nevoeiro, onde permaneceram a 25 °C no escuro, durante 24 h. Passado este período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação (20 $\pm$ 5 °C), onde permaneceram até a avaliação dos sintomas da doença.

2.4. Avaliação da doença

Os graus de reação ao patógeno foram determinados com base em uma escala de avaliação que considera cinco tipos de infecção, sendo: 1- ausência de esporulação; 2- esporulação presente, porém menos do que 10% das lesões esporulando; 3- 11 a 25% das lesões esporulando; 4- 26 a 40% das lesões esporulando; e 5- 65 a 100% das lesões esporulando (Souza et al., 2008).

As avaliações foram feitas por dois avaliadores independentes no 16º dia após a inoculação, pela observação visual das lesões em ambas as faces das folhas inoculadas.

Cada uma das plantas utilizadas na caracterização de genótipos quanto à reação ao isolado de *P. pachyrhizi* teve suas notas registradas e, posteriormente, foram obtidas notas médias das repetições para análise estatística. Para definir a resistência ou suscetibilidade de cada genótipo, obtiveram-se as notas médias de cada um deles, sendo que quando a média era $\leq$ 3,00, o genótipo era considerado resistente, e quando era > 3,00, suscetível.

Na avaliação das plantas F_2, as que apresentaram predominantemente grau 1, 2 ou 3 foram consideradas resistentes, e as que apresentaram prevalência de grau 4 ou 5 foram consideradas suscetíveis. Todos os graus apresentados foram registrados, tanto o predominante quanto os presentes em menor frequência.

2.5. Análise estatística

O experimento para avaliar a reação de genótipos de feijoeiro-comum e de soja ao isolado monopustular de *P. pachyrhizi* foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso (DIC). Neste delineamento, cada vaso, com três indivíduos (plantas), representou uma repetição, sendo que foram utilizados dois vasos por tratamento. Os tratamentos foram os genótipos de feijoeiro, de soja e a testemunha Conquista.

Após a avaliação, foram obtidas as notas médias de cada repetição, que foram utilizadas para análise de variância.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Programa Genes (ftp://ftp.ufv.br/dbg/genetica).

2.6. Estudo de herança

A determinação do controle genético da resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996 foi realizada com base na avaliação fenotípica da população segregante F_2 US Pinto 111 x PI 181996 inoculada com isolado monopustular do fungo *P. pachyrhizi*. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para testar a frequência de plantas resistentes e suscetíveis à FAS da população F_2 segregante, avaliadas após a inoculação com o isolado de *P. pachyrhizi*. A análise dos dados foi feita com o auxílio do Programa Genes (ftp://ftp.ufv.br/dbg/genetica).

Com base no padrão de herança da resistência à FAS relatado em outros trabalhos, a principal hipótese a ser testada é a de que um gene dominante, de efeito principal, controla o caráter. Desta forma, a frequência esperada na população F_2 é de 3:1 (três plantas resistentes para uma planta suscetível). Apesar disso, também foram testadas as freqüências de 15:1, 9:7 e 13:3, que também envolvem dois genes segregantes, para que fosse afirmado com mais certeza como se dá a herança.

3. Resultados e Discussão

3.1. Reação de genótipos de feijoeiro-comum e de acessos de soja a *P. pachyrhizi*

O resultado da análise de variância indicou que existe diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F, entre todos os tratamentos testados. Ou seja, as notas médias de reação à doença dos genótipos diferiram estatisticamente entre si.

Também foi observada diferença significativa, a 5% de probabilidade, quando os genótipos foram comparados entre si, excluindo-se a testemunha suscetível, e ao compararem-se as médias de todos os genótipos *versus* a média da testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância referente às notas médias de reação à doença dos genótipos.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	16	27,913788	1,744612	8,3282**
Genótipos	15	26,465397	1,76436	8,4225**
Genótipos *vs.* Testemunha	1	1,448391	1,448391	6,9141*
Resíduo	17	3,5612	0,209482	
Total	33	31,475		

*Significativo a 5% de probabilidade.
**Significativo a 1% de probabilidade.

Do total de 12 genótipos de feijoeiro-comum avaliados quanto à reação ao isolado monopustular de *P. pachyrhizi*, três foram considerados resistentes, pois obtiveram nota média $\leq$ 3,00. São eles: Ouro Negro, Pérola e PI 181996. Todos os outros genótipos de feijão foram considerados suscetíveis, uma vez que apresentaram notas médias > 3,00. Nenhum dos genótipos apresentou nota 1,00, ou seja, nenhum foi imune à FAS. (Tabela 3).

Tabela 3. Nota média de reação a *P. pachyrhizi* apresentada pelos genótipos de feijoeiro-comum avaliados.

Genótipo de feijoeiro-comum	Nota média de reação à doença
AND 277	3,66
CNC	4,33
IAPAR 14	3,83
Mexico 309	5,00
Ouro Negro	2,66
Ouro Vermelho	3,33
P-33-5-1	3,66
Pérola	2,50
PI 181996	2,66
Redlands Pioneer	4,66
Rudá	4,83
US Pinto 111	4,83

A resistência do acesso PI 181996 à FAS já foi relatada em trabalhos anteriores. No estudo desenvolvido por Miles et al. (2007), este acesso foi resistente a seis diferentes isolados de *P. pachyrhizi*, provenientes de Taiwan, Brasil, Paraguai, Tailândia e Zimbábue. Entretanto, esses autores acreditam que esta resistência não está associada àquela conferida pelo gene *Ur-11* à ferrugem do feijoeiro. Pastor-Corrales et al. (2007), ao realizarem ensaios em casa de vegetação, observaram que PI 181996 era resistente a seis isolados do patógeno, oriundos da África, Ásia e América do Sul. Além disso, esse acesso destacou-se entre os mais resistentes em experimentos sob condições de campo no Brasil e na África do Sul (Pastor-Corrales et al., 2007). Souza et al. (2008) também relataram a resistência de PI 181996 quando inoculado com uma mistura de raças de *P. pachyrhizi*, obtida a partir de plantas naturalmente infectadas. Deste modo, observa-se que esse acesso apresenta resistência ampla à FAS e que, por isso, pode ser considerada uma boa fonte de resistência. O resultado obtido neste e nos outros trabalhos citados quanto à reação de PI 181996 à FAS justificam o seu estudo mais detalhado.

A cultivar Pérola também teve sua resistência relatada no trabalho desenvolvido por Souza et al. (2008). Ela pode ser considerada uma boa

fonte de resistência à FAS e, por isso, necessita de estudos detalhados acerca do controle genético da resistência.

A cultivar Ouro Negro teve sua resistência relatada pela primeira vez neste trabalho. Também poderá ser utilizada em estudos futuros que visem ao controle da FAS. Além disso, esta cultivar representa uma fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro, mancha-angular e antracnose, que são doenças importantes para a cultura. Ouro Negro é uma das principais fontes de genes de resistência utilizada no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Todos os acessos de soja avaliados quanto à reação a isolado de *P. pachyrhizi* foram considerados suscetíveis. Eles obtiveram uma nota média de 5,00, valor idêntico ao da testemunha Conquista.

Os resultados encontrados para os acessos de soja estão de acordo com aqueles obtidos por Hartman et al. (2005). Portanto, os genes *Rpp1* (PI 200492), *Rpp2* (PI 547878), *Rpp3* (PI 462312) e *Rpp4* (PI 459025) que antes eram eficientes contra a FAS, não são mais capazes de impedir a infecção por *P. pachyrhizi*. Outros trabalhos recentemente desenvolvidos também relataram a suscetibilidade de pelo menos um desses acessos de soja a isolados oriundos da Ásia, África, América do Sul e Estados Unidos (Bonde et al., 2006; Pham et al., 2009; Paul e Hartman, 2009).

Sabe-se que, até o presente momento, a FAS não representa um grande problema para a cultura do feijoeiro. Entretanto, a maior parte dos genótipos de feijão avaliados neste trabalho foi suscetível ao isolado de *P. pachyrhizi*. Segundo Liebenberg et al. (2006), quando plantado próximo à soja infectada e em condições apropriadas para o desenvolvimento da doença, o feijoeiro pode apresentar séria desfoliação, acompanhada de necrose e clorose. Além disso, muitos trabalhos já relataram a ocorrência da FAS no feijão-comum em condições de campo no Brasil, na África do Sul, nos Estados Unidos e na Argentina (Du Preez et al., 2005; Lynch et al., 2006; Pastor-Corrales et al., 2007; Ivancovich et al., 2007). Tudo isso

mostra que, apesar da menor severidade da FAS no feijoeiro, existe a possibilidade da doença trazer, no futuro, sérios prejuízos aos agricultores. Assim, a descoberta de fontes de resistência representa uma boa medida preventiva tomada pelos melhoristas a fim de se evitar que a doença se torne um grave problema para a cultura do feijoeiro.

Não existem cultivares de soja que apresentem uma resistência ampla à *P. pachyrhizi*. Além disso, os genes que anteriormente conferiam resistência foram suplantados (Hartman et al., 2005). Deste modo, a identificação de fontes de resistência no feijoeiro abre a possibilidade de transferência de genes de feijão para soja, via transgenia, com o objetivo de reduzir os prejuízos causados pela FAS.

3.2. Estudo de herança

Um total de 186 plantas F_2 derivadas do cruzamento entre a cultivar US Pinto 111 e o acesso PI 181996 foram avaliadas quanto à reação à FAS. Após a avaliação visual de cada uma delas, 136 foram consideradas resistentes e 50, suscetíveis. A Tabela 4 mostra o resultado do teste de Quadrado.

Tabela 4. Teste do Quadrado na população F_2 US Pinto 111 x PI 181996 para determinação da herança do caráter resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996

Esperado[1]	Observado	Qui-quadrado (χ^2)	P(%)[2]
3R : 1S	136R : 50S	0,3512	55,34%
15R : 1S	136R : 50S	135,12	0%
9R : 7S	136R : 50S	21,51	0%
13R : 3S	136R : 50S	8,07	0,45%

[1]Plantas resistentes (R) e suscetíveis (S).
[2]Probabilidade em porcentagem.

Como observado na Tabela 4, a frequência que melhor se adequa à segregação da resistência observada na população F_2 é a de 3 : 1. Ou seja, a população F_2 US Pinto 111 x PI 181996 segregou na proporção de 3 plantas resistentes para 1 planta suscetível, com um valor de χ^2 de 0,3512 e uma probabilidade de 55,34%. Este resultado indica que a resistência do acesso de feijoeiro-comum PI 181996 à FAS é monogênica dominante, ou seja, é controlada por um gene com dois alelos que apresentam relação de dominância completa entre si.

O resultado encontrado neste estudo está de acordo com outros já relatados na literatura. Ao estudarem acessos de *G. canescens* e *G. clandestina*, espécies silvestres de soja, Burdon e Speer (1984) verificaram que, do mesmo modo que em *G. max*, um único gene dominante era responsável pelo caráter resistência à FAS. Em trabalho posterior, Burdon (1988), ao avaliar sete linhagens de *G. canescens*, constatou que, em seis delas, a resistência era monogênica, e que em apenas uma delas, dois genes independentes controlavam o caráter.

A herança da resistência à FAS também já foi estudada no feijoeiro. Pastor-Corrales e Frederick (2008) conduziram um estudo com o objetivo de determinar o controle genético da resistência na cultivar CNC. Eles analisaram a segregação da resistência à *P. pachyrhizi* em 241 plantas F_2, derivadas do cruzamento entre a cultivar suscetível Mexico 309 e CNC. Os resultados mostraram que a resistência à FAS na cultivar CNC é controlada pela interação de dois genes dominantes complementares. Isso quer dizer que para que ocorra resistência é necessário que estejam presentes dois alelos dominantes de cada um dos genes. Dessaune et al. (2009) avaliaram quatro populações segregantes para determinar a herança da resistência à FAS no acesso PI 181996. Populações F_2 e F_3 resultantes do cruzamento entre US Pinto 111 e PI 181996 e do cruzamento entre Mexico 309 e PI 181996 foram inoculadas com uma mistura de raças de *P. pachyrhizi*, obtida a partir de plantas naturalmente infectadas em campos experimentais

do Campus da Universidade Federal de Viçosa. Após a avaliação visual das plantas, verificou-se que as populações F_2 segregaram numa proporção de 3 plantas resistentes para 1 planta suscetível e que as populações F_3 segregaram na frequência de 5 plantas resistentes para 3 plantas suscetíveis. Dessa forma, os autores concluíram que a resistência à FAS no acesso PI 181996 é monogênica dominante.

Vale ressaltar que o trabalho atual diferencia-se do trabalho de Dessaune et al. (2009) pelo uso de um isolado monopustular do fungo para determinar a herança da resistência à FAS em PI 181996. Os dados deste estudo comprovam aqueles encontrados por Dessaune et al. (2009), ou seja, o caráter é controlado por um gene com dois alelos que apresentam relação de dominância completa entre si. Além disso, sabe-se que em uma mistura de raças pode haver mais de um genótipo do fungo interagindo com o genótipo da planta, o que pode levar à obtenção de frequências inadequadas e que podem gerar conclusões errôneas acerca da herança do caráter. Por isso, o estudo utilizando o isolado monopustular é de grande importância, pois a partir dele apenas um genótipo do fungo irá interagir com o da planta, resultando em uma frequência ideal para que se determine a herança.

A partir da determinação da herança do caráter resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996 podem ser realizados estudos moleculares com o propósito de marcar e isolar o gene de interesse. Assim, a manipulação deste gene ficará mais fácil e mais rápida, possibilitando a geração de cultivares comerciais de feijão e, até mesmo, de soja resistentes à *P. pachyrhizi* e que evitem os prejuízos causados pela FAS.

4. Conclusões

Por meio da inoculação com isolado monopustular de *P. pachyrhizi*, 12 genótipos de feijoeiro-comum foram caracterizados quanto à reação à ferrugem asiática da soja (FAS). Destes, 3 foram considerados resistentes, inclusive o acesso PI 181996. Além disso, foram testados 4 acessos de soja, portadores de genes de resistência à FAS, e que foram considerados suscetíveis.

Foi realizado o cruzamento entre o acesso PI 181996 e a cultivar US Pinto 111 (suscetível à FAS) para a obtenção de uma população F_2, que foi submetida à análise de segregação da resistência. As plantas F_2 foram inoculadas com isolado monopustular de *Phakopsora pachyrhizi* e, após a avaliação fenotípica, foi feito o teste do Qui-quadrado que indicou que o caráter resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996 é monogênico dominante.

5. Referências Bibliográficas

Bonde, M.R., Nester, S.E., Austin, C.N., Stone, C.L., Frederick, R.D. (2006). Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae* isolates. **Plant Disease**, 90: 708-716.

Bonde, M.R., Nester, S.E., Berner, D.K., Frederick, R.D., Moore, W.F., Little, S. (2008). Comparative susceptibilities of legume species to infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 92: 30-36.

Brogin, R.L**.** (2005). **Mapeamento de genes de resistência a ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência a septoriose em soja.** Piracicaba: ESALQ-USP. 93p. (Tese-Doutorado).

Bromfield, K.R., Hartwig, E.E. (1980). Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, 20: 254-255.

Bromfield, K.R., Melching, J.S. (1982). Sources of specific resistance to soybean rust. **Phytopathology**, 72: 702 (Abstract).

Burdon, J.J., Speer, S.S. (1984). A set of differential *Glycine* hosts for the identification of races of *Phakopsora pachyrhizi*. **Euphytica**, 33: 891-896.

Burdon, J.J. (1988). Major gene resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in *Glycine canescens*, a wild relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 75: 923-928.

Caixeta, E.T., Borém, A., Alzate-Marin, A.L., Fagundes, S.A., Silva, M.G.M., Barros, E.G., Moreira, M.A. (2005). Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, 145: 237-245.

Dessaune, S.N., Souza, T.L.P.O., Silva, M.F., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2009). Soybean rust resistance in the common bean cultivar PI 181996. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 52: 76-77.

Du Preez, E.D., Van-Rij, N.C., Lawrance, K.F. (2005). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on dry beans in South Africa. **Plant Disease**, 89: 206 (Abstract).

Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em**: http://www.cnpaf.embrapa.br/.** Acesso em Setembro/2009

Embrapa Soja. Disponível em: **http://www.cnpso.embrapa.br/.** Acesso em Setembro/2009

Faleiro, F.G., Ragagnin, V.A., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2004). Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, 138: 213-218.

Garcia, A., Calvo, E.S., Kiihl, R.A.S., Harada, A., Hiromoto, D.M., Vieira, L.G.E. (2008). Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117: 545-553.

Gepts, P., Aragão, F.J.L., Barros, E., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J., Lariguet, P., McClean, P., Melotto, M., Miklas, P., Pauls, P., Pedrosa-Harand, A., Porch, T., Sánchez, F., Sparvoli, F., Yu, K. (2008). Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore, P.H., Ming, R. (Eds). **Genomics of tropical crop plants.** Publisher Springer. p. 113-143.

Hartman, G.L., Miles, M.R., Frederick, R.D. (2005). Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, 89: 664-666.

Hartwig, E.E. (1986). Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, 26: 1135-1136.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2009). Disponível em: **http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/.** Acesso em Dezembro/2009

Ivancovich, A.J., Botta, G., Rivadaneira, M., Saeig, E., Erazzú, L., Guillin, E. (2007). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp. in Argentina. **Plant Disease**, 91: 111 (Abstract).

Liebenberg, M.M., Liebenberg, A.J., Pretorius, Z.A. (2006). The occurrence of asian soybean rust (caused by *Phakopsora pachyrhizi*) on common bean in South Africa. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 49: 49-50.

Lynch, T.N., Marois, J.J., Wright, D.L., Harmon, P.F., Harmon, C. L., Miles, M.R., Hartman, G.L. (2006). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* species in the United States. **Plant Disease**, 90: 970 (Abstract).

McLean, R.J., Byth, D.E. (1980). Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, 31: 951-956.

Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E., Blair, M.W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS. **Euphytica**, 147: 234-230.

Miles, M.R., Pastor-Corrales, M.A., Hartman, G.L., Frederick, R.D. (2007). Differential response of common bean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 91: 698-704.

Nunes Junior, J., Campos, H.D., Sartorato, A., del Peloso, M.J., Pastor-Corrales, M.A., Arraes Pereira, P.A. (2005). **Ferrugem asiática da soja em cultivares de feijoeiro-comum.** In: VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO, Brasil. p.466-469.

Ono, Y., Buritica, P., Hennen, J.F. (1992). Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycology Research**, 96: 825-850.

Pastor-Corrales, M.A., Sartorato, A., Liebenberg, M.M., Del Peloso, M.J., Arraes Pereira, P.A., Nunes Junior, J., Diniz Campos, H. (2007). Evaluation of common bean cultivars from The United States for their reaction to soybean rust under field conditions in Brazil and South Africa. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 50: 123-124.

Pastor-Corrales, M.A., Frederick, R.D. (2008). Resistance to the soybean rust pathogen (*Phakopsora pachyrhizi*) in common bean cultivar CNC. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 51: 20-21.

Paul, C., Hartman, G.L. (2009). Sources of soybean rust resistance challenged with single-spored isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Crop Science**, 49: 1781-1785.

Pham, T.A., Miles, M.R., Frederick, R.D., Hill, C.B., Hartman, G.L. (2009). Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 93: 224-228.

Ragagnin, V.A., Souza, T.L.P.O., Sanglard, D.A., Arruda, K.M.A., Costa, M.R., Alzate-Marin, A.L., Carneiro, J.E.S., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2009). Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, 128: 156-163.

Sartorato, A. (2002). Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 27: 78-81.

Souza, T.L.P.O., Dessaune, S.N., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2008). Reaction of common bean lines to *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 51: 208-209.

Souza, T.L.P.O. (2009). **Obtenção de SNPs, Reação do Feijoeiro-comum à Ferrugem da Soja e Piramidação de Genes de Resistência a *Uromyces appendiculatus*.** Viçosa: UFV. 130p. (Tese-Doutorado).

Stavely, J.R., Rytter, J.L., Royer, M.H. (1985). Virulence of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 28: 35-36.

Steadman, J.R., Pastor-Corrales, M.A., Beaver, J.S. (2002). An overview of the 3rd Bean Rust and 2nd Bean Common Bacterial Blight International Workshops, March 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, 45: 120-124.

Vieira, C., Borém, A., Ramalho, M.A.P., Carneiro, J.E.S. (2005). Melhoramento do feijão. In: Borém, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais. p. 301-391.

Yamaoka, Y., Fujiwara, Y., Kakishima, M., Katsuya, K., Yamada, K., Hagiwara, H. (2002). Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 68: 52-56.

Yang, X.B., Tschanz, A.T., Dowler, W.M., Wang, T.C (1991). Development of yield loss models in relation to reductions of

components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, 81: 1420-1426.

Capítulo 2

ANÁLISE DE LIGAÇÃO ENTRE MARCADORES MICROSSATÉLITES E O GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DA SOJA NO ACESSO DE FEIJOEIRO-COMUM PI 181996

Resumo

O avanço das técnicas envolvendo o uso de marcadores moleculares tem permitido o desenvolvimento de diversos estudos que podem facilitar a condução de programas de melhoramento genético de plantas e animais. Marcas genéticas associadas a genes de interesse, por exemplo, podem auxiliar na introdução destes genes em genótipos de elevado valor comercial, pois permitem o monitoramento por meio da seleção assistida. Microssatélites (SSR) são repetições em *tandem* de 1 a 6 pb que podem ser encontradas ao longo do genoma, formando sítios altamente polimórficos. Como marcadores, apresentam várias vantagens e estão sendo amplamente utilizados em estudos genéticos. Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar marcadores SSR polimórficos entre os genitores de feijoeiro-comum PI 181996 e US Pinto 111 e entre *bulks* de indivíduos da geração F_2 resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática da soja (FAS). Também, procurou-se identificar marcadores polimórficos ligados ao gene de resistência presente em PI 181996. Para isso, foi extraído o DNA dos genitores e dos indivíduos dos *bulks* resistente (R) e suscetível (S). Para a amplificação do DNA, foram utilizados 173 *primers* SSR. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram identificados 43 marcadores polimórficos entre os genitores. Destes, 8 confirmaram o polimorfismo entre os *bulks* R e S. No entanto, quando estes marcadores foram testados individualmente nos componentes dos *bulks*, os polimorfismos não foram confirmados. Por isso, mais esforços

devem ser feitos na busca de marcas ligadas ao gene R, que poderão ser úteis na introdução desse gene em cultivares comerciais de feijão-comum.

1. Introdução

Os primeiros marcadores genéticos utilizados pelos cientistas para o desenvolvimento de estudos genéticos baseavam-se em características morfológicas dos indivíduos. Entretanto, devido às diversas limitações desse tipo de marcador, foram desenvolvidos os marcadores de DNA, que se baseiam na variação natural na sequência de bases do DNA. Ao contrário dos marcadores morfológicos, os marcadores de DNA apresentam alto nível de polimorfismo para cada loco estudado e não são afetados por diferentes condições ambientais ou fisiológicas do organismo, sendo amplamente usados em várias espécies para os mais variados tipos de análises genéticas.

Diversos tipos de marcadores de DNA encontram-se hoje disponíveis, diferenciando entre si quanto à capacidade em detectar polimorfismo, ao custo de aplicação, à facilidade de uso e à consistência de resultados (Borém, 2009). Os primeiros marcadores de DNA desenvolvidos foram os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). No entanto, com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na década de 80, pelo pesquisador britânico Kery Mullis (Mullis e Faloona, 1987), uma nova geração de marcadores ganhou espaço, dentre eles os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e microssatélites, que ficaram conhecidos como marcadores baseados em PCR. Segundo Borém (2009), os marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de diversidade genética, *fingerprinting*, mapeamento genético, isolamento de genes, seleção assistida por marcadores, entre outras aplicações.

Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são pequenas extensões de sequências de DNA contendo de 1 a 6 pb, repetidos em *tandem*. Estas sequências são altamente variáveis e amplamente distribuídas no genoma (Liu e Wendel, 2001). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo o desenho de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo. Assim, caso existam diferenças no número de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite, os produtos de PCR terão diferentes tamanhos e cada um dos segmentos amplificados representará um alelo diferente de um mesmo loco (Caixeta et al., 2009). Como marcadores, os SSR são multialélicos, codominantes, apresentam alto poder de resolução e os resultados produzidos são facilmente reprodutíveis. Essas características associadas à especificidade e rapidez da técnica de PCR, fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para os mais diversos tipos de estudos genéticos (Caixeta et al., 2009).

Além dos marcadores microssatélites, existem os marcadores baseados nas repetições microssatélites, como os EST-SSRs. Diferentemente dos marcadores microssatélites, que são provenientes de sequências de DNA genômico, esses marcadores são desenvolvidos a partir de sequências transcritas (ESTs) disponibilizadas nos bancos de dados e, por isso, estão concentrados em regiões ricas em genes (Varshney et al., 2005), o que pode facilitar estudos de ligação gênica. No entanto, os marcadores EST-SSRs são, em geral, menos polimórficos que os marcadores microssatélites derivados de bibliotecas genômicas (Cho et al., 2000; Eujayl et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que os marcadores microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores. Morgante e Olivieri (1993) foram os primeiros pesquisadores a identificar sequências

microssatélites localizadas em genes desses organismos. Com relação ao feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar marcadores microssatélites na espécie (Benchimol et al., 2007; Blair et al., 2003; Gaitán-Solís et al., 2002; Yu et al., 2000).

Uma das etapas mais importantes no uso dos marcadores moleculares é o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um loco de interesse. O método da análise de segregação em *bulk* (BSA), proposto por Michelmore et al. (1991), constitui um meio eficiente de identificar um marcador associado a uma característica. Para caracteres qualitativos é comum o uso do método de BSA. Neste método, indivíduos contrastantes para a característica de interesse, pertencentes a uma população segregante, geralmente F_2, são agrupados em dois *bulks*. Para isso, inicialmente, os indivíduos da F_2 são avaliados com base na expressão fenotípica e, a partir daí, quantidades iguais de DNA dos indivíduos contrastantes para a característica de interesse são agrupadas nos dois *bulks*. O DNA de cada um dos *bulks* é analisado quanto à presença de polimorfismos. O agrupamento dos indivíduos, teoricamente, iguala o *background* genético dos dois *bulks*, com exceção daqueles locos envolvidos com o caráter de interesse e, por conseguinte, os marcadores a eles associados. Assim, um eventual polimorfismo entre os dois *bulks* tem uma maior probabilidade de estar associado ao alelo que governa o caráter de interesse.

Dessa forma, muitos marcadores microssatélites ligados a genes de resistência a doenças em plantas têm sido identificados pelo método de BSA. Como exemplo, pode-se citar a identificação de um marcador SSR ligado ao alelo de resistência à mancha-angular do feijoeiro-comum (*Pseudocercospora griseola*), presente na linhagem 'ESAL-550'. O

marcador SSR está ligado a uma distância de 7,6 cM, em fase de acoplamento com o alelo de resistência (Silva et al., 2003).

Os marcadores moleculares ligados estreitamente a alelos de resistência a doenças em plantas, por exemplo, podem ser uma ferramenta bastante útil para os programas de melhoramento. Eles auxiliam no processo de transferência dos alelos favoráveis para cultivares comerciais suscetíveis, pois permitem monitorar a presença desses alelos. Esta metodologia é denominada de seleção assistida por marcadores (SAM) (Alzate-Marin et al., 2005) e constitui um exemplo da aplicação dos marcadores moleculares associados a características de interesse. Assim, em programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, como o Programa de Melhoramento de Feijoeiro do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), estes marcadores moleculares são capazes de agilizar processos como a piramidação de genes de resistência para cultivares de interesse.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram identificar marcadores microssatélites polimórficos entre o acesso PI 181996 e a cultivar US Pinto 111 de feijoeiro-comum, genitores de uma população F_2 segregante para a resistência à ferrugem asiática da soja (FAS), e entre os *bulks* de indivíduos F_2 resistentes e suscetíveis à FAS. Além disso, foi avaliada a ligação entre os marcadores polimórficos e o gene de resistência presente no acesso PI 181996. A identificação de um marcador potencialmente ligado ao gene de resistência à FAS no feijoeiro é de grande importância para os programas de melhoramento, pois pode facilitar e auxiliar no processo de transferência deste gene para as cultivares comerciais de feijoeiro, via melhoramento clássico, e de soja, via transgenia, suscetíveis à doença. Esta seria uma medida preventiva para a cultura do feijoeiro que ainda não sofre prejuízos com a doença. Por outro

lado, no caso da soja, os enormes danos causados pela FAS à produção poderiam ser minimizados e os prejuízos na economia, reduzidos.

2. Material e Métodos

2.1. Material genético

Foram escolhidos para a análise com marcadores microssatélites, o acesso de feijoeiro-comum PI 181996, resistente à FAS, e a cultivar US Pinto 111, suscetível. Eles foram utilizados como genitores para a obtenção de uma população F_2, avaliada fenotipicamente quanto à reação a *Phakopsora pachyrhizi* (patógeno causador da FAS), como detalhado no capítulo 1.

2.2. Obtenção dos *bulks* resistente (R) e suscetível (S)

Para obter os *bulks* R e suscetível S, foram selecionadas 8 plantas resistentes da população F_2, com nota 1, e 8 plantas suscetíveis, com nota 5. A escala de notas, bem como outros detalhes sobre a avaliação da população F_2, estão descritos no capítulo 1 deste trabalho. Para compor cada um dos *bulks*, foi feita a mistura em alíquotas iguais do DNA das plantas F_2 resistentes em uma amostra e suscetíveis em outra.

2.3. Análise com *primers* microssatélites

Para a identificação de marcadores microssatélites polimórficos, foi extraído o DNA dos genitores PI 181996 e US Pinto 111 e das plantas que constituíram cada um dos *bulks*, com base no método CTAB, descrito por

Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

Os *primers* SSR utilizados nas reações de PCR foram tomados de forma aleatória entre as várias sequências publicadas. Além destes, foram escolhidos alguns *primers* com suas sequências ainda não publicadas, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do BIOAGRO/UFV (Tanure, 2009). No total, foram utilizados 164 *primers* SSR. Também foram testados 9 *primers* EST-SSR, desenhados a partir de sequências transcritas de feijoeiro-comum (Hanai et al., 2007).

Todos os 173 *primers* foram utilizados na amplificação de amostras de DNA dos genitores PI 181996 e US Pinto 111. Aqueles que evidenciaram polimorfismo entre os genitores foram, por sua vez, usados para amplificar o DNA dos *bulks* R e S. E, por fim, os *primers* que evidenciaram polimorfismo também entre os *bulks* foram usados para amplificar individualmente o DNA de cada uma das 16 plantas constituintes dos *bulks*.

As reações de amplificação do DNA com *primers* SSR tiveram volume total de 15 µL, contendo Tris-HCl 12 mM (pH 8,3), KCl 60 mM, $MgCl_2$ 2 mM, cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) numa concentração de 100 µM, 0,3 µM de cada *primer* (senso e anti-senso), 1U da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA.

As reações foram realizadas sob diferentes condições, dependendo do *primer* utilizado, em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA).

As sequências de *primers* obtidas a partir de Yaish e De La Vega (2003) foram utilizadas para amplificação do DNA de acordo com os procedimentos descritos pelos autores.

A amplificação com a maioria dos *primers* obtidos de Gaitán-Solís et al. (2002) e todos os obtidos de Blair et al. (2003) seguiu um procedimento

de *touchdown* PCR. Este procedimento teve início com uma etapa de desnaturação de 4 min a 94 ^{o}C, seguida de 20 ciclos, constituídos cada um de uma etapa inicial de 40 s a 94 ^{o}C, uma etapa de 40 s a 65 ^{o}C (diminuindo 1 ^{o}C a cada ciclo) e terminando em uma etapa de 1 min a 72 ^{o}C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a mais 20 ciclos, compostos cada um de uma etapa inicial de 40 s a 94 ^{o}C, seguida de uma etapa de 40 s a 46 ^{o}C e terminando em uma etapa de 1 min a 72 ^{o}C. Por fim, uma etapa de 7 min a 72 ^{o}C, seguida de uma redução para 4 °C. A amplificação com os outros *primers* obtidos de Gaitán-Solís et al. (2002) (BM 154, BM 156, BM 187, BM 200 e BM 213) foi de acordo com o seguinte procedimento: uma etapa de desnaturação de 2 min a 94 ^{o}C, seguida de 35 ciclos, cada um constituído de uma etapa inicial de 15 s a 94 ºC, 15 s a 50 ºC (BM 154) ou 52 °C (BM 156, BM 187, BM 200 e BM 213) e 15 s a 72 ºC. Após os 35 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 ºC e, e por fim, a temperatura foi reduzida para 4 ºC.

A amplificação com os *primers* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa seguiram a metodologia descrita por Tanure (2009).

A amplificação com os *primers* obtidos de Benchimol et al. (2007) também seguiu um procedimento de *touchdown* PCR. Este procedimento teve início com uma etapa de desnaturação de 4 min a 94 ^{o}C, seguida de 5 ciclos, compostos cada um de uma etapa inicial de 40 s a 94 ^{o}C, uma etapa de 40 s a 60 ^{o}C (a cada ciclo, esta temperatura diminuía de 0,5 °C) e terminando em uma etapa de 1 min a 72 ^{o}C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a mais 30 ciclos, compostos cada um de uma etapa inicial de 40 s a 94 ^{o}C, seguido de uma etapa de 40 s a 58 ^{o}C e terminando em uma etapa de 1 min a 72 ^{o}C. Por fim, uma etapa de 7 min a 72 ^{o}C, seguida de uma redução para 4 °C.

Para os *primers* obtidos a partir de Yu et al. (2000), um outro procedimento de *touchdown* PCR foi adotado. Este procedimento teve início com uma etapa de desnaturação de 2 min a 95 ^{o}C, seguida de 9

ciclos, compostos cada um de uma etapa inicial de 20 s a 94 ^{o}C, uma etapa de 40 s a 68 ^{o}C (a cada ciclo, esta temperatura diminuía de 1 ^{o}C) e terminando em uma etapa de 20 s a 72 ^{o}C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a mais 31 ciclos, compostos cada um de uma etapa inicial de 20 s a 94°C, seguido de uma etapa de 1 min a 60 ^{o}C e terminando em uma etapa de 20 s a 72 ^{o}C. Por fim, uma etapa de 10 min a 72 ^{o}C, seguida de uma redução para 4 °C.

As sequências de *primers* obtidas a partir de Hanai et al. (2007) foram utilizadas para amplificação do DNA de acordo com os procedimentos descritos pelos autores.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3,0 µL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e sacarose (40%) em água. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 10%, contendo acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1, tampão TAE 10X (Tris-base 400 mM, ácido acético 200 mM e EDTA 10 mM), na presença de 167,5 µL de persulfato de amônio 10% e 56,5 µL do catalisador TEMED, para um volume final de 25 mL de gel. Para a separação eletroforética, os géis foram submetidos a uma voltagem de 120 volts por 4 h e corados com solução de nitrato de prata, de acordo com o protocolo proposto por Sanguinetti et al. (1994), com modificação do tempo de imersão dos géis em cada uma das quatro soluções usadas no procedimento para 10 min. Os géis foram fotodocumentados utilizando o sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

3. Resultados e Discussão

A partir dos 173 *primers* testados, foram identificados 43 marcadores polimórficos entre os genitores de feijoeiro-comum PI 181996 e US Pinto 111, sendo 40 do tipo SSR e 3 do tipo EST-SSR. Todos os *primers* que resultaram na amplificação de bandas polimórficas de DNA, suas respectivas sequências e grupos de ligação são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Seqüências dos *primers* SSR e EST-SSR que resultaram em bandas polimórficas entre PI 181996 e US Pinto 111, os grupos de ligação (GL) onde alguns estão alocados e suas referências.

***Primers* SSR**	**Seqüência 5' → 3'**	**GL**	**Referência**
AJ 416392	R:ACTCCAACTTATTCTCTCTCTC F:TTGAAGAATAAATGAAGCCT		Yaish e De La Vega (2003)
BM 114	R:AGCCTGGTGAAATGCTCATAG F:CATGCTTGTTGCCTAACTCTCT	B09	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 140	R:TGCACAACACACATTTAGTGAC F:CCTACCAAGATTGATTTATGGG	B04	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 143	R:GGGAAATGAACAGAGGAAA F:ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	B02	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 152	R: AAGAGGAGGTCGAAACCTTAAATCG F: CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	B02	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 154	R:TCTTGCGACCGAGCTTCTCC F:CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	B09	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 156	R:CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC F:TGCTTGCATCTCAGCCAGAATC	B02	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 159	R:GGTGCTGTTGCTGCTGTTAT F:GGGAGATGTGGTAAGATAATGAAA	B03	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 165	R:TCAAATCCCACACATGATCG F:TTCTTTCATTCATATTATTCCGTTCA		Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 170	R:AGCCAGGTGCAAGACCTTAG F:AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	B06	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 172	R:CTGTAGCTCAAACAGGGCACT F:GCAATACCGCCATGAGAGAT	B03	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 175	R:CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT F:CCACTCTTAGCATCAACTGGA	B05	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 183	R:CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC F:TCTTACAGCCTTGCAGACATC	B07	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 184	R:AGTGCTCTATCAAGATGTGTG F:ACATAATCAATGGGTCACTG	B09/ 11	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 187	R:TTTCTCCAACTCACTCCTTTCC F:TGTGTTTGTGTTCCGAATTATGA	B06	Gaitán-Solís et al. (2002)

Tabela 5. Continuação.

***Primers* SSR**	**Seqüência 5' → 3'**	**GL**	**Referência**
BM 188	R:TCGCCTTGAAACTTCTTGTATC F:CCCTTCCAGTTAAATCAGTCG	B09	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 189	R:CTCCCACTCTCACCCTCACT F:GCGCCAAGTGAAACTAAGTAGA	B08	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 200	R:TGGTGGTTGTTATGGGAGAAG F:ATTTGTCTCTGTCTATTCCTTCCAC	B01	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 201	R:TGGTGCTACAGACTTGATGG F:TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	B07	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 213	R:AACCCTAAGCTTCACGCATTTG F:GAGAGATTGACGACGGTTT		Gaitán-Solís et al. (2002)
BMd-2	R:CAACAAACGGTGATTGACCA F:AGCGACAGCAAGAGAACCTC	B02	Blair et al. (2003)
BMd-17	R:AGATAGGAAGGGCGTGGTTT F:GTTAGATCCCGCCCAATAGTC	B02	Blair et al. (2003)
BMd-20	R:GTGAGGCAAGAAGCCTTCAA F:GTTGCCACCGGTGATAATCT	B05	Blair et al. (2003)
BMd-21	R:TGCGATGTTTGAGCATTTGT F:GGCTCCACCATCGACTACTG		Blair et al. (2003)
BMd-36	R:ACGTGCGTACGAATACTCAGTC F:CATAACATCGAAGCCTCACAGT	B03	Blair et al. (2003)
BMd-37	R:CCATCATAGAGGGCAACCAC F:GGCACGAGCAACAATCCTT	B06	Blair et al. (2003)
BMd-54	R:GAATGAGGGCGCTAAGATCA F:GGCTCCACCATCGACTACTG		Blair et al. (2003)
FC-cca 001	R:TCTGAAGTTTATGTGATGGT F:TAACATTCCTTTCATTTCAC		Tanure et al. (2009)
FC-ct 001	R:CTCATTGCGTCTACCAGTGC F:GGATCTTGGAGGGCAACCTA		Tanure et al. (2009)
GATS 91	R:GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG F:TCCGTGTTCCTCTGTCTGTG	B02	Gaitán-Solís et al. (2002)
IAC 06	R:ATGTTCTGCCTTTCGCTCCTT F:CCGGCTCCTGCTGACG		Benchimol et al. (2007)
IAC 25	R:TTCATGCACAATAAATCACT F:GAGACGTTTCATAATCAATA		Benchimol et al. (2007)
IAC 30	R:GGTGTCAGAAAATCAGAGGTAT F:AATAGAAATACAAGAGCCAATG		Benchimol et al. (2007)
IAC 47	R:CAAGTTGGAAAGAAGTGTGAG F:AAAGGGGTTGCTGAAGTT		Benchimol et al. (2007)
IAC 51	R:AACAGAGCAACGAAAAAGAAGG F:CCAGCAAATAAACAACCCCAAA		Benchimol et al. (2007)
IAC 54	R:CACCCTGTTGCATTGACTTAG F:CTTTTGCCTTGTTTGGAGAG		Benchimol et al. (2007)
IAC 66	R:TTCCACTCCCTCCCTATCTT F:AATCACATCTTTAACCCAACAG		Benchimol et al. (2007)
IAC 76	R:GAGAAAATTCAGAGGGTAGATG F:TTCATGGCCAATAATCAGG		Benchimol et al. (2007)
PV-atct001	R:TTTCCCGCCATAGAATATGTGAGA F:CAATTAAAACTCAACCAACCCAAATA		Yu et al. (2000)

Tabela 5. Continuação.

***Primers* SSR**	**Seqüência 5' → 3'**	**GL**	**Referência**
PV-gaat001	R:CACGGTACACGAAACCATGCTATC F:AAGGATGGGTTCCGTGCTTG	B04	Yu et al. (2000)
***Primers* EST- SSR**	**Seqüência 5' → 3'**	**GL**	**Referência**
PvM04	R:GCGCCGTCTTTTTGGTAGT F:GGTTCCTCCTCCTTCTGCT	B08	Hanai et al. (2007)
PvM11	R:TCCACCGACTTACCGAACA F:TGGGATTTTGAGCGTGTG	B08	Hanai et al. (2007)
PvM37	R:CGTGGTCGTGGTGGTG F:GGACAGGGGAATCTCACTA		Hanai et al. (2007)

A Figura 1 mostra o resultado da amplificação do DNA dos genitores com 14 pares de *primers* SSR. Nesta Figura, todos os *primers* testados resultaram em bandas polimórficas.

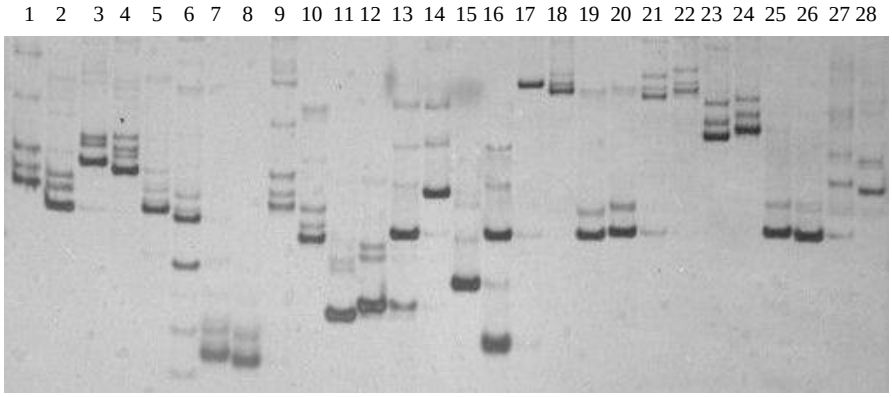

Figura 1. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA dos genitores da população F_2 US Pinto 111 x PI 181996 com *primers* SSR que evidenciaram polimorfismo. As canaletas correspondem a: 1 e 2, *primer* BM 140; 3 e 4, *primer* BM 159; 5 e 6, *primer* BM 170; 7 e 8, *primer* BM 172; 9 e 10, *primer* BM 183; 11 e 12, *primer* BMd-2; 13 e 14, *primer* BMd-21; 15 e 16, *primer* BMd-54; 17 e 18, *primer* IAC 25; 19 e 20, *primer* IAC 30; 21 e 22, *primer* IAC 47; 23 e 24, *primer* IAC 51; 25 e 26, *primer* IAC 54; 27 e 28, *primer* IAC 76. As canaletas ímpares contêm o DNA do acesso PI 181996 e as canaletas pares, o DNA de US Pinto 111.

Todos os *primers* que resultaram na amplificação de bandas polimórficas entre PI 181996 e US Pinto 111 foram utilizados também para amplificar o DNA dos *bulks* resistente (R) e suscetível (S) de indivíduos da população F_2 US Pinto 111 x PI 181996. A partir de um total de 43 *primers*, foram identificados 8 marcadores que eram ao mesmo tempo

polimórficos entre os genitores PI 181996 e US Pinto 111 e entre os *bulks* R e S, sendo todos do tipo SSR. Os *primers* que resultaram na amplificação de bandas de DNA polimórficas entre os genitores e entre os *bulks* são: BM 140, BM 156, BM 183, BM 201, FC-ct 001, IAC 30, IAC 76 e PV-gaat 001 (Tabela 5).

A Figura 2 mostra o resultado da amplificação do DNA dos genitores PI 181996 e US Pinto 111 e dos *bulks* R e S com 5 pares de *primers* SSR, dentre os 43 que já haviam evidenciado polimorfismo entre os genitores. Nesta Figura, apenas os *primers* BM 140 e IAC 76 resultaram em bandas polimórficas entre os genitores e entre os *bulks*.

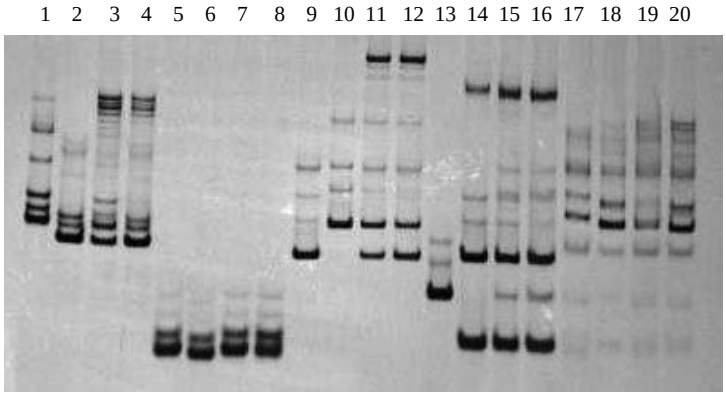

Figura 2. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA dos genitores e dos *bulks* R e S da população F_2 US Pinto 111 x PI 181996 com *primers* SSR. As canaletas correspondem a: 1 a 4, *primer* BM 140; 5 a 8, *primer* BM 172; 9 a 12, *primer* BMd-21; 13 a 16, *primer* BMd-54; 17 a 20, *primer* IAC 76. As canaletas 1, 5, 9, 13 e 17 contêm o DNA do acesso PI 181996, as canaletas 2, 6, 10, 14 e 18, o DNA da cultivar US Pinto 111, as canaletas 3, 7, 11, 15 e 19, o DNA do *bulk* R e as canaletas 4, 8, 12, 16 e 20, o DNA do *bulk* S. Apenas os *primers* BM 140 e IAC 76 confirmaram nos *bulks*, o polimorfismo anteriormente encontrado nos genitores.

Todos os *primers* que resultaram na amplificação de bandas polimórficas entre PI 181996 e US Pinto 111 e entre os *bulks* R e S foram testados em cada um dos 16 indivíduos constituintes dos *bulks*. Entretanto, de um total de 8 *primers*, não foi identificado nenhum marcador microssatélite associado ao gene de resistência à FAS. Isto é, o polimorfismo anteriormente identificado, por meio de marcadores

microssatélites, nos genitores e nos *bulks* R e S não foi confirmado nos indivíduos que compõem os *bulks*. A Figura 3 apresenta, como exemplo, o resultado da amplificação do DNA dos genitores PI 181996 e US Pinto 111, dos *bulks* R e S e dos indivíduos de cada um dos *bulks* com o *primer* SSR IAC 76. Como pode ser observado na Figura, o marcador não co-segregou com o fenótipo.

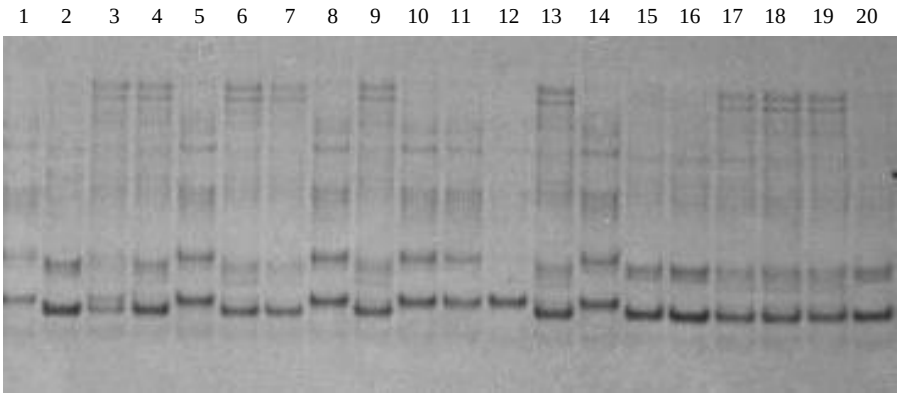

Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA dos genitores, dos *bulks* R e S e dos indivíduos da população F_2 US Pinto 111 x PI 181996, constituintes de cada um dos *bulks*, com o *primer* SSR IAC 76. As canaletas correspondem a: 1, DNA do acesso PI 181996; 2, DNA da cultivar US Pinto 111; 3, DNA do *bulk* R; 4, DNA do *bulk* S; 5 a 12, DNA de cada um dos 8 indivíduos constituintes do *bulk* R; 13 a 20, DNA de cada um dos 8 indivíduos constituintes do *bulk* S.

Esses resultados indicam que dentre os *primers* SSR e EST-SSR testados nenhum apresentou uma marca que estivesse ligada ao gene de resistência à FAS presente no acesso de feijoeiro-comum PI 181996.

A procura por marcas associadas a genes de interesse no feijoeiro-comum se dá de forma aleatória. Assim, quanto maior for o número de *primers* testados, maiores serão as chances de se encontrar marcas relacionadas às características de interesse. Como no atual trabalho não foi encontrada nenhuma marca molecular ligada ao gene de resistência à FAS no acesso de feijoeiro-comum PI 181996, novos *primers* SSR devem ser testados, a fim de se alcançar este objetivo.

Uma das estratégias preconizadas no controle de doenças é o uso de cultivares resistentes. Estas normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes, muitas vezes não adaptadas, para cultivares elite. Essa estratégia vem sendo usada com sucesso, em programas de melhoramento, há várias décadas. No processo de transferência de alelos de resistência, os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se estreitamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM), particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento (Alzate-Marin et al., 2005).

Assim, quando for encontrada uma marca molecular ligada ao gene de resistência à FAS do acesso de feijoeiro-comum PI 181996, o processo de transferência deste gene para a obtenção de cultivares comerciais resistentes será facilitado. Isso porque o gene poderá ser monitorado por meio do processo de SAM. O programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV já utiliza esta metodologia para a criação de cultivares resistentes. Este seria mais um gene que poderia ser transferido para as cultivares comerciais suscetíveis de feijão, a fim de prevenir eventuais danos que a ferrugem da soja possa trazer à cultura do feijoeiro. Além disso, o marcador molecular associado ao gene de resistência à FAS também poderá facilitar a transferência do mesmo para as cultivares de soja, via transgenia, com o objetivo de minimizar os danos causados pela doença a esta cultura.

4. Conclusões

A partir de 173 *primers* SSR, foram identificados 43 marcadores polimórficos entre os genitores da população F_2 US Pinto 111 x PI 181996. Destes 43 marcadores, apenas 8 confirmaram o polimorfismo entre os *bulks* resistente (R) e suscetível (S) de indivíduos F_2. A partir dos 8 marcadores polimórficos entre os genitores e os *bulks*, não foi identificada nenhuma marca ligada ao gene de resistência à FAS presente no acesso PI 181996. São necessários estudos com mais *primers* SSR para que se identifique esta marca molecular.

Todas as informações obtidas neste trabalho são de grande importância para os programas de melhoramento, pois irão contribuir para o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes, evitando que a FAS se torne um problema para a cultura do feijoeiro.

5. Referências Bibliográficas

Abdelnoor, R.V., Barros, E.G., Moreira, M.A. (1995). 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.

Alzate-Marin, A.L., Cervigni, G.D.L., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira,** 30: 333-342.

Benchimol, L.L., Campos, T., Carbonell, S.A.M., Colombo, C.A., Chioratto, A.F., Formighiere, E.F., Gouvêa, L.R.L., Souza, A.P. (2007). Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resource and Crop Evolution**, 54: 1747-1762.

Blair, M.W., Pedraza, F., Buendia, H.F., Gaitán-Solís, E., Beebe, S.E., Gepts, P., Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107: 1362-1374.

Borém, A. (2009). Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (Eds.). **Marcadores Moleculares.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais. p. 95-102.

Caixeta, E.T., Oliveira, A.C.B., Brito, G.G., Sakiyama, N.S. (2009). Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (Eds.). **Marcadores Moleculares.** Viçosa: UFV. Viçosa, Minas Gerais. p. 11-94.

Cho,Y.G., Ishii, G., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S. (2000). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 713-722.

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

Eujayl, I., Sorrells, M., Baum, M., Wolters, P., Powell, W. (2001). Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRS and genomic SSRS. **Euphytica**, 119: 39-43.

Gaitán-Solís, E., Duque, M.C., Edwards, K.J., Tohme, J. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Science**, 42: 2128-2136.

Hanai, L.R., Campos, T., Camargo, L.E.A., Benchimol, L.L., Souza, A.P., Melotto, M., Carbonell, S.A.M., Chioratto, A.F., Consoli, L., Formighieri, E.F., Siqueira, M.V.B.M., Tsai, S.M., Vieira, M.L.C. (2007). Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, 50: 266-277.

Liu, B., Wendel, J.F. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology**, 1: 205-208.

Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. (1991). 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. **Genetics**, 88: 9828-9832.

Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 3: 175-182.

Mullis, K., Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 55: 335-350.

Silva, G.F., Santos, J.B., Ramalho, M.A.P. (2003). Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology**, 26: 459-463.

Tanure, J. P.M. (2009). **Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para o feijão-comum.** Viçosa: UFV. 80p. (Tese-Mestrado).

Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23: 48-55.

Yaish, M.W.F, De La Vega. (2003). Isolation of $(GA)_n$ microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Biology**, 26: 337-342.

Yu, K., Park, S.J., Poysa, V., Gepts, P. (2000). Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, 91: 429-434.

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