

# MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO FEIJOEIRO DO BIOAGRO/UFV

Apoio Financeiro: FAPEMIG, CNPq, CAPES, PADCT/FINEP e PICDT/CAPES

Ana Lilia Alzate-Marin<sup>1</sup>, Maricilia Cardozo de Arruda<sup>1,2</sup>, Ronan Xavier Correa<sup>1</sup>, Silvia Nietsche<sup>1</sup>, Geraldo Assis de Carvalho<sup>1</sup>, Fábio Gelape Faleiro<sup>1</sup>, Aloisio Sartorato<sup>3</sup>, Claudia Ferreira<sup>1</sup>, Everaldo Gonçalves de Barros<sup>4</sup> e Maurilio Alves Moreira<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador, D.S. BIOAGRO/UFV. 36571-000 Viçosa, MG. e-mail: [alzate@alunos.ufv.br](mailto:alzate@alunos.ufv.br)

<sup>2</sup> Pesquisador, M.Sc. UNEMAT Av. São João s/n, Cavalhada, 78200-000 Cáceres-MT

<sup>3</sup> Pesquisador, D.S. Embrapa Arroz e Feijão, C. Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO.

<sup>4</sup> Professor, Ph.D. Depto de Biologia Geral/UFV. 36571-000 Viçosa, MG. e-mail: [ebarros@mail.ufv.br](mailto:ebarros@mail.ufv.br)

<sup>5</sup> Professor, Ph.D. Depto de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV. 36571-000 Viçosa, MG. e-mail: [moreira@mail.ufv.br](mailto:moreira@mail.ufv.br)

O programa de melhoramento do feijoeiro visando resistência a doenças com auxílio de marcadores moleculares do BIOAGRO/UFV vem sendo conduzido desde 1992, com auxílio do PADCT/FINEP e da FAPEMIG. O programa é baseado em retrocruzamentos visando a piramidação de genes de resistência à antracnose, mancha-angular e ferrugem no cultivar Carioca Rudá (A 285). Na primeira fase do projeto, o programa de melhoramento teve como objetivos determinar o modo de herança dos genes das fontes de resistência a antracnose, ferrugem e mancha angular do feijoeiro causadas pelos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*, respectivamente, usadas no programa, e identificar marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a esses genes.

Os cultivares TO, AB 136 e G 2333 possuidores dos genes *Co-4*, *Co-6* e *Co-4<sup>2</sup>\_Co-5\_Co-7*, respectivamente, foram usados como fontes de resistência a antracnose. Como fonte de resistência a ferrugem foi usado o cultivar Ouro Negro. Os cultivares AND 277, Mexico 54, MAR 2, Cornell 49-242 e Ouro Negro foram usados como fontes de resistência a mancha angular. Os genes destes cultivares conferem resistência a todas as raças de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas no Brasil (Rava *et al.*, Fitopatol. bras., 19:167-172, 1994; Thomazella *et al.*, BIC 43:82-83, 2000) e a todas as raças de *U. appendiculatus* e *P. griseola* (excepto raça 63.63) identificadas no programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV (Faleiro, F.G. Tese de mestrado. UFV, Viçosa. 1997; Nietsche *et al.* J. Phytopathol. 148:117-122, 2000).

O progenitor suscetível usado foi o cultivar comercial Rudá (Mesoamericano) desenvolvido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (A 285) e recomendado pela Embrapa Arroz e Feijão. O cultivar Rudá possui grãos do tipo carioca, é altamente produtivo, mas suscetível a maioria das raças de *C. lindemuthianum*, *P. griseola* e *U. appendiculatus*.

Sementes das cultivares identificadas anteriormente foram obtidas junto ao Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colômbia) e Embrapa Arroz e Feijão. Isolados dos patótipos 65 e 73 de *C. lindemuthianum* foram cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão. Isolados do patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* e *P. griseola* usados, pertencem a micoteca do BIOAGRO/UFV.

Cruzamentos entre o progenitor suscetível Rudá e todos os progenitores doadores de genes foram realizados em casa de vegetação. O cultivar Pinto 111 foi também usado como cultivar suscetível nos trabalhos referentes a ferrugem. Obtiveram-se gerações F<sub>2</sub> que foram avaliadas fenotípicamente quanto a resistência/suscetibilidade aos patótipos dos diferentes patógenos (Tabela 1).

Antes das inoculações, uma folha primária foi coletada e congelada a -80° C, para posterior extração de DNA, a qual foi realizada de acordo a metodologia de mini-preparação de Doyle e Doyle (Focus 12:13-15, 1990). A identificação de marcadores baseou-se na metodologia de *bulks* segregantes (Michelmores *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 88:9828-32, 1991). O DNA dos *bulks* e dos parentais foram amplificados com uma média de 500 *primers* decâmeros (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) pela técnica de RAPD. As reações de amplificação foram feitas de acordo com Williams *et al.* (Nucleic Acids Res. 18:6531-6535,

1990).

Tabela 1- Segregação da resistência em populações F<sub>2</sub>.

Pedigree	Patógeno	Patótipo	No. de plantas		Relação Esperada	$\chi^2$	P
			R <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>			
Rudá x TO	<i>C. lindemuthianum</i>	65	125	46	3:1	0,32	57,16
Rudá x AB 136	<i>C. lindemuthianum</i>	89	206	50	3:1	3,79	5,15
Rudá x G2333	<i>C. lindemuthianum</i>	73	181	14	15:1	0,15	69,85
Rudá x G2333	<i>C. lindemuthianum</i>	89	182	18	15:1	2,13	14,44
Pinto 111xOuro Negro	<i>C. lindemuthianum</i>	89	222	81	3:1	0,49	48,39
Pinto 111xOuro Negro	<i>U. appendiculatus</i>	Mistura <sup>3</sup>	155	59	3:1	0,75	38,64
Rudá x Ouro Negro	<i>U. appendiculatus</i>	Mistura <sup>3</sup>	161	51	3:1	0,10	75,18
Pinto 111xOuro Negro	<i>P. griseola</i>	31-23	231	71	3:1	2,10	14,73
Rudá x Mexico 54	<i>P. griseola</i>	63-19	126	43	3:1	0,018	89,33
Rudá x AND 277	<i>P. griseola</i>	63-23	145	48	3:1	0,002	96,43
Rudá x MAR 2	<i>P. griseola</i>	63-39	121	37	3:1	0,210	64,68
Rudá x Cornell 49-242	<i>P. griseola</i>	31-15	121	52	3:1	0,15	69,85

<sup>1</sup>R=resistente, <sup>2</sup>S=suscetível <sup>3</sup>mistura das raças 32, 45, 46, 47,49,52 e 56 de *U. appendiculatus*

Os potenciais marcadores RAPD detectados nos *bulks* segregantes foram primeiramente testados nos indivíduos constituintes de cada *bulk*. A co-segregação entre esses marcadores e o fenótipo de resistência/suscetibilidade foi determinada em plantas F<sub>2</sub> dos cruzamentos. Testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram utilizados para comparar as razões fenotípicas e genotípicas observadas e esperadas. Para determinar as posições dos marcadores identificados em relação aos locos foi usado o programa MAPMAKER (Lander *et al.* Genomics 1:174-181, 1987), versão 3.0, com *lod score* mínimo de 3.0.

Como resultado das avaliações, foi observado que os valores de qui-quadrado revelaram uma segregação de 3:1 (resistentes:suscetíveis) nas populações F<sub>2</sub> de quase todos os cruzamentos realizados. Somente as populações provenientes dos cruzamentos com o cultivar G 2333 mostraram uma segregação de 15:1 (Tabela 1). Tais resultados sugerem a ação de gene(s) independente(s) presentes nos cultivares TO, AB 136 e Ouro Negro para resistência antracnose; no cultivar Ouro Negro para resistência a ferrugem, e nos cultivares Mexico 54, Ouro Negro AND 277, MAR 2 e Cornell 49-242 para resistência a mancha angular, respectivamente. Dois genes independentes determinam resistência as raças 73 e 89 de *C. lindemuthianum* no cultivar G 2333.

De acordo com a Tabela 2, usando estas mesmas populações F<sub>2</sub>, 20 marcadores moleculares tipo RAPD foram identificados como ligados em acoplamento aos genes de resistência a antracnose, ferrugem e mancha angular. Tais marcadores estão sendo utilizados no processo de geração de isolinhas carregando os diferentes genes e, posteriormente, serão utilizados no processo de piramidação de genes de resistência em cultivares tipo carioca do programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

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

Marcador RAPD	Distância (cM) e orientação	Gene de Resistência	Patógeno	Fonte de resistência	Referência
OPAZ20 <sub>940</sub>	7,1 – acoplamento	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	Alzate-Marin et al. (BIC 42:13-14, 1999)
OPH18 <sub>830</sub>	6,5 – acoplamento	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Antracnose	G 2333	Alzate-Marin et al. (Phytopathology 89:281-285, 1999)
OPAS13 <sub>950</sub> <sup>1</sup>	11,2– acoplamento	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Antracnose	G 2333	Alzate-Marin et al. (1999b)
OPZ04 <sub>560</sub> <sup>2</sup>	2,5 – acoplamento	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	Alzate-Marin et al. (RENAFE 6:48-50, 1999)
OPAZ09 <sub>950</sub> <sup>2</sup>	20,4 - repulsão	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	Alzate-Marin et al. (1999c)
OPY20 <sub>830</sub>	Sem recombinantes	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	Arruda et al. (Phytopathology 90:758-761, 2000)
OPC8 <sub>900</sub>	9,7 - acoplamento	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	Arruda et al. (2000)
OPB3 <sub>1800</sub>	3,7 - repulsão	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	Arruda et al. (2000)
OPF10 <sub>1.050</sub>	6,5 – acoplamento	(?)	Antrac-ferrugem	Ouro Negro	Corrêa et al. (Crop Sci. 40:804-807, 2000)
OPBA8 <sub>560</sub>	2,2 – acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	Ferrugem	Ouro Negro	Corrêa (1999)
OPAJ18 <sub>560</sub>	11,1 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	Ferrugem	Ouro Negro	Corrêa (1999)
OPX-11 <sub>550</sub>	5,8 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	Ferrugem	Ouro Negro	Faleiro et al. (Genet. and Mol. Biol. 23:399-402, 2000)
OPE4 <sub>500</sub>	5,8 - acoplamento	Resis.raça 63.39	mancha-angular	MAR-2	Ferreira et al. (Bragantia 58:247-252, 1999)
OPH13 <sub>490</sub>	5,5 - acoplamento	<i>Phg-1</i>	mancha-angular	AND 277	Carvalho et al. (Fitopatol. Bras. 23:482-485, 1998)
OPN2 <sub>890</sub>	5,9 - acoplamento	<i>Phg-2</i>	mancha-angular	Mexico 54	Sartorato et al. (BIC 42: 21-22, 1999)
OPAC14 <sub>2400</sub>	6,6 - acoplamento	<i>Phg-2</i>	mancha-angular	Mexico 54	Sartorato et al. (1999)
OPE4 <sub>500</sub>	5,8 - acoplamento	Resis.raça 63.39	mancha-angular	Cornell 49-242	Nietsche et al., (2000)
OPN2 <sub>890</sub>	5,9 - acoplamento	?	Mancha-angular	Cornell 49-242	Nietsche et al., (2000)
OPAA19 <sub>400</sub>	10,0 - acoplamento	Resis. raça 63.39	Mancha-angular	Ouro Negro	Corrêa (Tese de Doutorado UFV, Viçosa, 1999)
OPM2 <sub>425</sub>	5,6 - acoplamento	Resis.raça 63.23	Mancha-angular	Ouro Negro	Corrêa (1999)

<sup>1</sup>Previamente relatado por Young et al. (Theor. Appl. Genet. 96:87-94, 1998); <sup>2</sup> identificado no cruzamento Michelite x AB 136

