

## DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR LIGADO AO GENE DE RESISTÊNCIA DA CULTIVAR MÉXICO 54 AO PATÓTIPO 63-19 DE *Phaeoisariopsis griseola*

Aloisio Sartorato<sup>1</sup>; Silvia Nietsche<sup>2</sup>; Everaldo G. de Barros<sup>3</sup> e Maurílio A. Moreira<sup>4</sup>

A mancha angular do feijoeiro comum apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, onde tem sido referida como a causa de importantes perdas na produção. A utilização de cultivares resistentes é o método de controle mais econômico além de ser considerado ecologicamente correto. Entretanto, a variabilidade que o patógeno (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.) apresenta (Sartorato et al., 1991; Nietsche, 1997), dificulta o desenvolvimento destas cultivares. Marcadores do tipo RAPD têm sido utilizados para monitorar genes de resistência a diversas doenças desta cultura. Infelizmente, esta técnica é reconhecida por sua sensibilidade a diversos fatores que reduz sua reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. Marcadores do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) são considerados altamente específicos evitando este risco. O objetivo do presente estudo foi o de desenvolver um marcador do tipo SCAR ligado ao gene de resistência à mancha angular, *Phg-2*, identificado no cruzamento entre as cultivares mesoamericanas México 54 (R) e Rudá (S) quando inoculado com o patótipo 63-19.

A banda RAPD N02<sub>(890)</sub> foi separada do gel de agarose, purificada com o Glass Max<sup>™</sup> DNA Isolation Matrix System (BRL) e clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega). Colônias bege do inserto foram colocadas para crescer em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. O plasmídeo foi purificado com o QIA Prep Spin Miniprep kit (Qiagen). O clone foi parcialmente seqüenciado utilizando-se o sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) e o primer universal M 13. Os dados do sequenciamento foram utilizados para desenhar dois primers, cada um contendo 20 nucleotídeos incluindo a seqüência do primer RAPD original. Estes primers foram sintetizados pela BioSynthesis. A reação de PCR para amplificação do primer sintetizado consistiu de 35 ciclos com a seguinte seqüência cada: 30 s a 94 °C, 60 s a 65 °C e 90 s a 72 °C. Ao final dos 35 ciclos a temperatura foi mantida a 4 °C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,2% contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo imerso em TBE (90 mM Tris-borate buffer, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Marcadores RAPD têm sido utilizados para monitorar genes de resistência em várias espécies de plantas, incluindo o feijoeiro comum. Entretanto, a utilização deste tipo de marcador tem sido questionada (Penner et al., 1993) devido à baixa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. Diante desta perspectiva, os marcadores do tipo SCAR representam uma alternativa interessante para aumentar esta reprodutibilidade.

---

<sup>1</sup>Pesquisador, Dr., Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO.

<sup>2</sup>Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, MG.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral & BIOAGRO, UFV.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular & BIOAGRO, UFV.

Dois primers, de 20 nucleotídeos cada um, SCAR N02 Forward-5'**ACCAGGGGCATTATGAACAG**<sup>3'</sup> e SCAR N02 Reverse-5'**ACCAGGGGCAACATACTATG**<sup>3'</sup>, foram sintetizados com base nos dados de sequenciamento. Os nucleotídeos em negrito correspondem à sequência do primer RAPD original. Estes primers foram testados nos genitores, nas plantas dos bulks resistente e suscetível e na população F<sub>2</sub> do cruzamento entre as cultivares México 54 e Rudá (Figura 1). O polimorfismo observado nas ampliações foi idêntico àquele revelado pelo correspondente marcador RAPD.

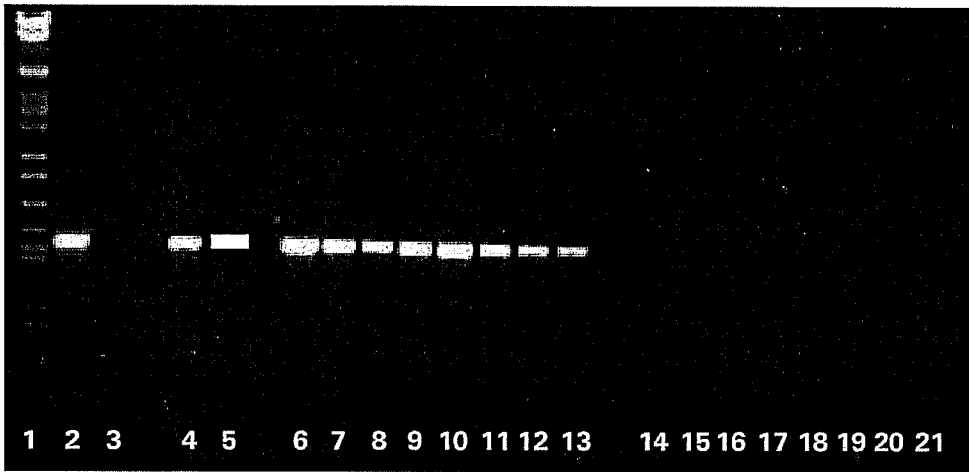


Fig. 1. Produtos da amplificação do DNA obtido com o primer SCAR OP N02 analisado em gel de agarose. Colunas 1= fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*; 2= cultivar resistente (México 54); 3= cultivar suscetível (Rudá); 4= bulk resistente; 5= bulk suscetível; 6-13= plantas F<sub>2</sub> resistentes e 14-21= plantas F<sub>2</sub> suscetíveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa: UFV, 1997. 47p. (Tese Mestrado).
- PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; LES DOMIER; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications* 2:341-345, 1993.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; MENTEN, J.O.M.; BERGAMIN FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola*. *Fitopatologia Brasileira* 16:43-46, 1991.