DISSERTAÇÃO

UTILIZAÇÃO DE SCARs PARA AVALIAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO

ANA LUIZA AHERN BERALDO

Campinas, SP

2007

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

UTILIZAÇÃO DE SCARs PARA AVALIAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO

ANA LUIZA AHERN BERALDO

Orientador: Sérgio Augusto Morais Carbonell
Co-orientador: Carlos Augusto Colombo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical: Área de Concentração Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia - GMVB.

Campinas, SP

Fevereiro de 2007

Aos meus pais Antonio Ludovico e Maria Amélia que apoiaram, incentivaram e financiaram meus estudos e meus sonhos, aos meus irmãos Ana Lídia e Francisco, que muitas vezes foram trocados pelos *papers*, e à minha família. Em especial à minha madrinha Maria Cândida que me mostrou que o amor à profissão não tem limites,

DEDICO

Ao Almir, que sempre esteve ao meu lado, incentivando todos os meus sonhos,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Á toda minha família, motivo de meu maior orgulho, em especial aos meus avós que tanto amo, aos meus tios e primos;

-Á minha família de Paulínia: Vítor, Marisa, Carlos, Célia, Selma e Ângela;

- Aos pesquisadores Sérgio Carbonell, Carlos Colombo, Alisson Chiorato, pela paciência, confiança, amizade e ensinamento;

- Á todos os professores da Pós-Graduação do Instituto Agronômico - IAC, que nos ensinaram muito além do Melhoramento Genético Vegetal;

- Á professora Ana Lilia Alzate-Marin e Luciana Larsy Benchimol, pelas sugestões;

- Á Sociedade Brasileira de Genética por eleger este trabalho como o melhor na área de Melhoramento Genético de Plantas de 2006, agraciando-me com o prêmio Alcides Carvalho;

- Aos amigos Almir Samuel Zanca, Hamilton Jordão Júnior, Carlos Vildoso-Aguilar e Vicente Eugênio de Rosa Junior, pelos auxílios e sugestões no decorrer da dissertação;

- As funcionárias da Pós-Graduação, do Centro A.P.T.A de Grãos e Fibras e do Centro P & D de Recursos Genéticos Vegetais pela ajuda constante;

- Aos amigos da Pós-Graduação em especial Natalie, Daniela, Lívia e Thiago;

- Ás minhas queridas amigas Aline, Gabriela, Kamila, Camila, Alexandra, Cristiane, Daiana, por compreender minha ausência em quase todas as baladas dos últimos dois anos;

- Aos colegas Eliana, João Guilherme, Deniel e Francine, pelas constantes ajudas;

- Aos meus queridos amigos do Laboratório Thiaguinho, Miklos, Fernanda, Bruno, Giovana, às amigas Paula Lima, Milene, e Regina (obrigada pela ajuda no gel de acrilamida), à Hellen (obrigada pela tradução do artigo) e especialmente a Natalie, amiga querida e sincera. Obrigado a todos pela amizade verdadeira que cultivamos nestes dois anos de convívio;

- Aos divertidíssimos almoços na CATI e aos deliciosos Chocopês que embalaram várias tardes animadas;

- E para finalizar, aos meus feijoeiros, que foram as verdadeiras estrelas deste trabalho.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”

Paulo Freire

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS viii
ÍNDICE DE FIGURAS ix
RESUMO xiii
ABSTRACT xiv
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Importância econômica e social do feijão 3
2.2 Antracnose do feijoeiro 4
2.3 Variabilidade patogênica do *Colletotrichum lindemuthianum* 5
2.4 Marcadores moleculares para resistência à antracnose do feijoeiro 8
2.5 Piramidação de genes 11
2.6 Genes de resistência ao patógeno da antracnose no feijoeiro comum 12
2.7 Genes de resistência envolvidos no Programa de melhoramento de feijoeiro do IAC..... 22
2.8 Resposta a resistência ao patógeno segundo diferentes metodologias de inoculação 22
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 Germoplasma de feijoeiro 25
3.2 Isolados do patógeno da antracnose 26
3.3 Extração do DNA total das plantas de feijoeiro 27
3.4 Obtenção e visualização dos amplificados SCARs 28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4.1 Identificação das resistências nos genótipos por meio de inoculação do patógeno da antracnose 30
4.2 Detecção de genes candidatos de resistência as raças fisiológicas 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum* nos genótipos do IAC 34
4.3 Marcadores inespecíficos 35
4.4 Marcadores avaliados para a raça 31 39
4.5 Marcadores avaliados para a raça 65 45
4.6 Marcadores avaliados para a raça 89 46
4.7 Identificação de genes de resistência 49
4.8 Distribuição dos genes de resistência nos genótipos do programa de melhoramento do IAC 50
5 CONCLUSÕES 54

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56
7 ANEXOS 64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Exemplo de classificação de raça fisiológica de *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da reação das doze variedades diferenciadoras do feijoeiro.....	6
Tabela 2	Genes de resistência a diferentes raças de antracnose do feijoeiro, fontes de resistência e marcadores moleculares ligados aos mesmos, de acordo com diversos autores.....	13/15
Tabela 3	Nome do marcador, *locus*, seqüência, distância do marcador e ao gene, fragmento esperado dos marcadores utilizados, controles positivos utilizados e referências.....	29
Tabela 4	Nome do marcador, *locus*, distancia do marcador do gene, eficiências para as três raças de *Colletotrichum Lindemuthianum*.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 31 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)..... 31

Figura 2 Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 65 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)..... 32

Figura 3 Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 89 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)..... 32

Figura 4 Diferentes padrões de resposta em plântulas de feijoeiro às raças 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum*, onde R são genótipos resistentes e S genótipos susceptíveis..... 34

Figura 5 Gel de agarose (1,5%) para visualização da reação de amplificação sem a distinção dos genótipos Resistentes e Susceptíveis. FIGURA 5b: Visualização após digestão com a enzima *DdeI*, sem a distinção das amostras portadoras ou não da marca. Destacando: controle positivo (Cornell 49-242, +), controle positivo digerido com *DdeI* (Cornell 49-242, +d), controle negativo (Rosinha G_2, -), controle negativo digerido com *DdeI* (Rosinha G_2, -d), marcador de peso molecular (250 pb *DNA Ladder*, Invitrogen, M) em feijoeiro..... 36

Figura 6 Gel de acrilamida (10%) da reação de amplificação via PCR e visualização após digestão com a enzima *DdeI*, sem a distinção das amostras portadoras ou não da marca. Destacando: nas canaletas 1 e16 os marcadores de peso molecular de 100 e 10 pb (New England e Invitrogen, respectivamente); nas canaletas 1, 4, 6, 8, 10 e 12, as reações de PCR não digeridas dos genótipos Cornell 49-242, IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Aruã (controles positivos do gene), Rosinha G_2, A 300 e TO (controles negativos do gene); nas canaletas 3, 5, 7, o perfil de digestão dos genótipos (Cornell 49-242, IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Aruã, controles positivos respectivamente) e 9, 11, 13 (Rosinha G_2, A 300 e TO, controles negativos respectivamente) e na canaleta 14, reação de PCR em branco e na canaleta 15, reação de digestão em branco..... 37

Figura 7 Resultado da amplificação do marcador SCARZ04 em gel de agarose (1,5%) demonstrando a inespecificidade das marcas,

destacando controle positivo na canaleta 5 (AB 136 +), controle negativo na canaleta 6 (Rosinha G_2, -), e reação em branco na canaleta 7 e na canaleta 8, o marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder, New England Biolabs, M) em feijoeiro..... 38

Figura 8 Gel de agarose (1,5%) para visualização do amplificado de 1100pb oriundos do marcador SH18, destacando nas canaletas 1 e 10 o marcador de peso molecular (250pb DNA Ladder, New England Biolabs, M), na canaleta 2 um genótipo resistente portador da marca (Gen96A13 P3-6-1B-2), nas canaletas 3 – 6 amostras susceptíveis com ausência da marca (A300, Pérola, G 916 e Leg Pintado, respectivamente), na canaleta 7, um genótipo susceptível ao inoculo porém com análise molecular positiva (Gen96A13 P2-1-1B-1) e o controle positivo do marcador(G 2333), na canaleta 8 e na canaleta 9, a reação em branco em feijoeiro..... 40

Figura 9 Gel de agarose (1,5%) para visualização da banda de 400 pb gerada pelo marcador SCAR SAB3, destacando na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250pb DNA Ladder, Invitrogen, M), nas canaletas 2 e 3 genótipos resistentes portadores da marca (G 2338 e Vax 1, respectivamente), nas canaletas 4-7 genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300, Carioca Precoce, Rosa 700 e Carioca Comum, respectivamente), nas canaletas 8 e 9, genótipos susceptíveis com presença da marca (G 916 e Pérola) na canaleta 10, o controle positivo (TU), e na canaleta 11, a reação em branco..... 41

Figura 10 Amplificação com o marcador SB12, visualizando amplificado de 350 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250pb DNA Ladder, Invitrogen, M), nas canaletas 2 - 5 genótipos resistentes portadores da marca (IAC Carioca Aruã, Mar. 2, Pompadour e Vax 1, respectivamente), nas canaletas 6 e 7 genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300 e Carioca Precoce), na canaleta 8 genótipo susceptível com presença da marca (G 916) na canaleta 9, o controle positivo (BAT93), e na canaleta 10, a reação em branco..... 42

Figura 11 Amplificação com o marcador SAS13 visualizando amplificado de 950 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250pb DNA Ladder, Invitrogen, M), nas canaletas 2 - 5 genótipos resistentes portadores da marca (AND 277, Chileno, G 2338 e IAC Carioca Akytã, respectivamente), nas canaletas 6 e 7 genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300 e Rosa 700), na canaleta 8-11, genótipos susceptíveis com presença da marca (Carioca Comum, Carioca precoce, G 916 e Pérola) na canaleta 12, o controle positivo (G 2333), e na canaleta 13, a reação em

branco..... 43

Figura 12 Amplificação com o marcador SCARY20 visualizando amplificado de 830 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250pb DNA Ladder, Invitrogen, M), na canaleta 2 genótipo resistente portador da marca (G 2338), nas canaletas 3-6 genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300, Bataav, Carioca precoce e G916), na canaleta 7, o controle positivo (TO), e na canaleta 8, a reação em branco..... 43

Figura 13 Amplificação com o marcador SCARAZ20 visualizando amplificado de 845 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250pb DNA Ladder, Invitrogen, M), na canaleta 2 e 3, genótipos resistentes portadores da marca (AND 277 e G 2338), nas canaletas 4-7 genótipos susceptíveis com ausência da marca (Gen99TG48-37-1, Gen96A46 51-1-1-1-52, Carioca comum e Rosa 700), na canaleta 8, genótipo susceptível com presença da marca (G 916) na canaleta 9, o controle positivo (AB 136), e na canaleta 10, a reação em branco..... 44

Figura 14 Histogramas representando a eficiência (em porcentagem) de marcadores SCARs em relação à raça 31 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro..... 45

Figura 15 Histogramas representando a eficiência (em porcentagem) de marcadores SCARs em relação à raça 65 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro..... 46

Figura 16 Histogramas representando a eficiência (em porcentagem de marcadores SCARs em relação à raça 89 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro. 47

Figura 17 Número de genes de resistência à antracnose presentes em genitores e linhagens de feijoeiro estimados a partir da presença de marcadores SCARs ligados aos mesmos. 50

Figura 18 Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 31 de *C. lindemuthianum*..... 51

Figura 19 Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 65 de *C.*

lindemuthianum. 51

Figura 20 Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 89 de *C. lindemuthianum*..... 52

BERALDO, Ana Luiza Ahern. **Utilização de SCARs para Avaliação de Genes de Resistência à Antracnose em Feijoeiro**. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-tropical) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

O feijoeiro é uma das leguminosas mais consumidas da América Latina e uma das principais fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas e fibras. No Brasil, a produtividade da cultura é baixa, considerando o potencial das cultivares, e uma das principais razões é o grande número de doenças, como a antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus. Existem 50 raças fisiológicas descritas deste patógeno, sendo as raças 31, 65 e 89 as mais freqüentes e importantes no Estado de São Paulo. Uma das alternativas para controle da doença é o uso de resistência genética. A incorporação de genes de resistência pelo melhoramento é feita por meio de cruzamentos artificiais com diferentes doadores de genes para resistência visando piramidação destes em um único cultivar. No entanto, o conhecimento desta resistência em linhagens avançadas provenientes de cruzamentos múltiplos é de difícil identificação por inoculação de raças do patógeno. Em contrapartida, para auxiliar na identificação de genes de resistência pode-se recorrer ao uso de marcadores moleculares, a exemplo dos SCARs, de grande interesse por serem altamente específicos. No presente trabalho, oito marcadores do tipo SCAR foram selecionados na literatura e testados em 42 genitores e suas 76 linhagens do Programa de Melhoramento do IAC. Os objetivos do trabalho foram: a) identificar genótipos resistentes à antracnose com base na inoculação do patógeno em laboratório; b) detectar através dos SCARs a presença de genes de resistência ao *C. lindemuthianum* e observar os prováveis genes de maior freqüência nos genótipos avaliados e c) identificar os melhores marcadores SCARs para utilização no programa de melhoramento do feijoeiro. Foi possível identificar 17 genitores e 45 linhagens resistentes às três raças da antracnose estudadas; três genitores e seis linhagens resistentes às raças 31 e 65, duas linhagens resistentes às raças 31 e 89; três genitores e oito linhagens resistentes às raças 65 e 89; seis genitores e quatro linhagens resistentes à raça 31; três genitores e cinco linhagens resistentes à raça 65; dois genitores e duas linhagens resistentes à raça 89 e oito genitores e quatro linhagens susceptíveis às três raças. Três genitores e 9 linhagens apresentaram quatro genes de resistência, demonstrando a eficiência de seleção do Programa de Melhoramento do IAC. Foram eleitos como os melhores marcadores SCARZ20, SAS13 e SAB3 e identificou-se o gene *Co-6* como sendo o mais freqüente no grupo de genitores e linhagens, seguido por *Co-4*^{2}, *Co-9, Co-5,* e *Co-4.*

Palavras-chave: Marcadores moleculares, melhoramento genético, *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*.

BERALDO, Ana Luiza Ahern. **Using SCARs to the Evaluation of Anthracnosis Resistance Genes in Commom Bean**. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-tropical) – Pós-Graduação – IAC.

ABSTRACT

Common bean is one of the most consumed leguminosae of Latin America, being one of the major source of proteins, carbohydrates, vitamins and fibers. In Brazil the productivity of the trait is low, considering the potencial of the cultivars, e one of the main reason is large number of diseases, as anthracnosis, caused by the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus. There are 50 physiological races of the pathogen, and the most important and frequent races in the State of São Paulo are the 31, 65 and 89. One alternative to control the disease is the use of genetic resistance. The incorporation of resistance genes by plant breeding is made through artificial crossings with different resistance gene givers, aiming pyramiding these genes in one unique cultivar. Although, the knowledge of these resistance in advanced lineages proceeding by multiple crossings is of difficult identification by inoculation of the races of the pathogen. Molecular markers may be used to assist the identification of resistance genes. Amongst these markers we could detach SCARs for being highly specific. In the present work, eight SCAR markers had been selected from literature and tested in 42 genitors and its 76 ancestries of the IAC Breeding Program. The goals of the work were: a) identify resistant genotypes to anthracnose by pathogen inoculation; b) identify *C. lindemuthianum* resistance genes and their frequency in the genotypes, c) identify the best SCAR markers that can be used in the common bean breeding project. It was possible to identify 17 resistant genitors and 45 resistant lines towards the three studied races of anthracnose; three resistant genitors and six resistant lineages to the races 31 and 65, two resistant lines towards the races 31 and 89; three resistant genitors and eight resistant lines towards races 65 and 89; six resistant genitors and four resistant lines towards race 31; three resistant genitors and five resistant lines towards race 65; two resistant genitors and two resistant lines towards the race 89 and eight susceptible genitors and four susceptible lines towards the three races. Three genitors and 9 lines had presented four resistance genes, demonstrating the efficiency of selection of the IAC Breeding Program. We elected as the best markers SCARZ20, SAS13 and SAB3, and it was identified the *Co-6* gene as being the most frequent in the population, followed for *Co-4*^{2}, *Co-9, Co-5*, and *Co-4*.

Keywords: molecular markers, genetic improvement, *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum.*

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças do feijoeiro que ocorrem no Estado de São Paulo, a antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus, é uma das mais importantes por ocorrer nas três épocas de cultivo. O patógeno caracteriza-se por apresentar uma grande variabilidade, com 50 raças fisiológicas identificadas no Brasil (ANDRADE et al. 1999; THOMAZELLA et al. 2000, ALZATE-MARIN & SARTORATO, 2004). Tamanha variabilidade poderia dificultar a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno, o que não ocorre devido à existência dos genes específicos que conferem resistência às diferentes raças desse patógeno. Muitos dos genes encontrados são um meio eficiente e econômico de controlar a doença, como o gene *Co-1*, encontrado na variedade White Marrow Bean (BURKHOLDER, 1918), o *Co-2*, encontrado na linhagem Cornell 49-242 (MASTENBROEK, 1960), os genes *Co-3*, *Co-4* e *Co-5* presentes nas variedades Mex 222, To e Tu, respectivamente (BANNEROT et al. 1971 e FOUILLOUX, 1979).

O programa de melhoramento do feijoeiro do IAC busca incorporar resistência às raças fisiológicas da antracnose economicamente mais importantes e de maior ocorrência no Estado de São Paulo. Uma das maneiras de reunir genes de resistência às principais raças em uma mesma cultivar é recombinando genitores que os possuem, estratégia essa chamada de piramidação gênica. Desta forma a resistência pode ser considerada ampla e duradoura e, conseqüentemente, a cultivar pode ser plantada em um maior número de regiões do Estado. Para tanto, é primeiramente necessário identificar os genes de resistência de interesse presentes nos genitores a serem recombinados. Posteriormente, nas gerações avançadas dos cruzamentos, deve-se conhecer quais genes de resistência foram herdados. Finalmente, as linhagens finais, denominadas superiores, portadoras de um ou mais gene de resistência à antracnose, além de outras características agronômicas desejáveis, poderão ser recomendadas para os agricultores como mais uma opção de plantio.

Uma das maneiras de se identificar os genes de resistência presentes num material genético é por meio do uso de marcadores moleculares. Foram identificados mais de 30 marcadores baseados em polimorfismos de DNA amplificado ao acaso, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA)* ligados a 17 genes principais que controlam a resistência a quatro patógenos do feijoeiro (KELLY & MIKLAS, 1996). No caso específico da antracnose, 19 marcadores RAPD ligados aos principais genes de

resistência. Destes, oito deles foram transformados em marcadores baseados na amplificação de região de seqüência característica, SCARs (*Sequence Characterized Amplified Region*). Este tipo de marcador é mais confiável em relação aos RAPDs, por apresentar amplificação, via reação em cadeia da polimerase, PCR (*Polymerase Chain Reaction)*, de apenas um *locus* por meio de "primers" específicos.

Desta forma, visando introduzir o uso de marcadores moleculares no programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico-IAC, o presente estudo teve como objetivo:

a) Obter a resposta de incompatibilidade /compatibilidade de linhagens avançadas e genitores utilizados para recombinação do programa de melhoramento do feijoeiro do IAC em relação às raças fisiológicas mais importantes de *C. lindemuthianum* (31, 65 e 89) no Estado de São Paulo, por meio de inoculação com isolados monospóricos em plântulas;

b) Detectar por meio de marcadores SCARs a possível presença de genes de resistência às raças fisiológicas 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum* em linhagens avançadas e genitores utilizados na recombinação genética de feijoeiros e observar os prováveis genes de maior freqüência nos genótipos avaliados.

c) Identificar os melhores marcadores SCARs para utilização no programa de melhoramento do feijoeiro;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica e social do feijão

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie diplóide com 22 cromossomos, pertencente à ordem Rosales e à família Leguminosae. É uma planta herbácea cujo hábito de crescimento pode ser determinado ou indeterminado. O modo preferencial de reprodução da espécie é por autogamia, que é facilitada pelo mecanismo de cleistogamia, sendo que a taxa de fecundação cruzada pode chegar a 5%, de acordo com CIAT (1974).

O feijão é uma das principais fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras para a população brasileira. Feijões secos, com 10% de umidade, contém de 22 a 25% de proteínas, 45 a 50% de carboidratos digeríveis (amido e sacarose) e em torno de 1% de lipídios (BULISANI, 2003).

A produção da cultura é dividida em três épocas de plantio: a das águas, da seca e de inverno, com plantios em agosto-setembro, janeiro-fevereiro e maio-junho, respectivamente. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2006), a cultura teve uma área plantada na safra de 2005/2006 de 4.251 mil ha, sendo 1.233 mil ha do feijão da primeira safra, 2.0548 mil ha do feijão da segunda safra e 937.2 a na terceira safra.

A produção nacional da cultura na safra 2005/2006 foi de 3.473,2 mil toneladas sendo 1.149 mil t da primeira safra, 1.469,7 mil t na segunda safra e 854,5 mil t na terceira (CONAB, 2006).

A produção nacional de feijão foi superior em 2,0% (70,8 mil toneladas) à da safra passada (2004/2005). Desse total, a Região Sul participa com 31,0%, a Nordeste com 28,5%, a Sudeste com 24,20%, a Centro-Oeste com 12,7%, e a Norte com 3,6%. Destacam-se como maiores produtores os estados do Paraná, com 807,2 mil toneladas, Minas Gerais, com 534,1 mil toneladas, Bahia, com 341,4 mil toneladas, Goiás com 323,1 mil toneladas, São Paulo, com 297,6 mil toneladas, e Ceará com 233,6 mil toneladas (CONAFE, 2006).

A produtividade do feijoeiro no estado de São Paulo é baixa (ao redor de 800 kg/ha), mesmo considerando-se o alto potencial genético das cultivares utilizadas nas lavouras paulistas (acima de 3.000 kg/ha). Vários fatores estão relacionados com a baixa produtividade, como a ocorrência de doenças e pragas em todas as épocas de plantio da

cultura, adversidades climáticas, adubação deficiente e/ou baixa fertilidade do solo, o uso inadequado de cultivares, o inadequado espaçamento de plantas, o zoneamento agrícola inadequado, dentre outros. Dentre as doenças mais importantes que afetam a cultura pode-se citar a antracnose, a mancha angular e a murcha de fusário, que afetam diretamente a produção.

Segundo MAHUKU & RIASCOS (2004), várias estratégias podem ser usadas para combater a antracnose, mas o uso de cultivares resistentes é a medida mais eficiente e barata, uma vez que dispensa o uso de defensivos agrícolas. Uma menor aplicação de defensivos pode significar um menor nível de dano ambiental, além de diminuir consideravelmente o custo final da lavoura.

2.2 Antracnose do feijoeiro

Dentre as principais doenças que afetam a cultura, a antracnose, causada pelo patógeno *C. lindemuthianum* Sacc & Magnus, é a mais importante, pois ela é capaz de infectar a planta durante as três épocas de cultivo do feijoeiro, sendo freqüente não apenas no Estado de São Paulo, mas também nos outros principais estados produtores de feijão no Brasil, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba (RAVA et al. 1994; ALZATE-MARIN et al. 2003a).

Segundo BALARDIN et al. (1997), tanto a forma mitospórica como a meiospórica do patógeno são altamente variáveis e diferenciam-se em tipos fisiológicos e genéticos. O agente causal da antracnose diferencia-se em raças fisiológicas que afetam de forma diferenciada determinadas cultivares de um mesmo hospedeiro.

Os sintomas da antracnose podem aparecer em toda a parte aérea da planta. As lesões da base do caule crescem podendo causar podridão de coloração preta, enfraquecendo-o e tornando-o incapaz de suportar a copa da planta (ZAMBOLIN & CHAVES, 1978). As lesões se caracterizam por apresentar inicialmente pequenas manchas marrons escuras e posteriormente negras, podendo causar necrose dos tecidos das nervuras quando encontram-se em estado avançado. Esses sintomas são mais facilmente visualizados nas vagens, podendo cobrí-las parcialmente e depreciando drasticamente o produto para comercialização.

A disseminação da doença pode ocorrer por meio de respingos de chuvas, ventos, implementos agrícolas, homem, insetos e vários outros agentes, sendo que a

maior fonte de inóculo, do ponto de vista epidemiológico, é representada pelas sementes infectadas. Essas são responsáveis pela disseminação da doença em longas distâncias. Este patógeno possui a capacidade de sobreviver no solo associado à presença de restos de cultura por um a dois anos (ZAUMEYER & THOMAS, 1957 *apud* DAVIDE, 2006). A ampla distribuição destas raças no Brasil é facilitada pelo livre comércio de grãos entre os estados e pela reutilização dos mesmos grãos para futuros plantios em uma mesma área, acarretando em um aumento no potencial de inóculo do patógeno de uma safra para outra (THOMAZELLA et al. 2000 e ALZATE-MARIN et al. 2003a).

O fator limitante para o controle da antracnose no feijoeiro é a existência de um grande número de raças de *C. lindemuthianum* (diferentes patótipos, com diferentes tipos ou números de genes de avirulência). Além disso, existe o surgimento de novas raças, o que justifica a importância de se caracterizar tanto as raças como os bancos de germoplasma em busca de novas fontes de resistência, para introduzí-las em futuros programas de melhoramento (BIGIRIMANA & HÖFTE, 2001).

2.3 Variabilidade patogênica do *Colletotrichum lindemuthianum*

A antiga classificação da variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* era representada pelos grupos *Alfa, Beta, Gama, Delta*, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro I e Brasileiro II, e as raças fisiológicas dentro destes grupos de *Alfa, Alfa BR, Epsilon, Eta, Gama, Delta, Teta, Lambda, Capa, Mu*, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro I, *Zeta*, Brasileiro II e *Sigma*. A partir de 1998, um novo sistema de classificação de número binário foi proposto na primeira Reunião Latino Americana de Antracnose do Feijoeiro realizada em Cali, Colômbia (CIAT, 1990), deixando-se a antiga denominação usada desde 1918 (CARBONELL et al. 1999).

Dessa forma, a padronização das raças fisiológicas do *C. lindemuthianum* passou a ser feita através de um conjunto de doze variedades diferenciadoras internacionalmente aceitas para classificar e confirmar as raças do patógeno de acordo com o sistema binário, que caracteriza as diferentes respostas de infecção causada pelas variantes (raças ou patótipos) do patógeno (CIAT, 1990) e, diante disso, a questão da variabilidade do número de variedades utilizadas foi solucionada (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplo de classificação de raça fisiológica de *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da reação das doze variedades diferenciadoras do feijoeiro.

Ordem	Variabilidade Diferenciadora	Valor Binário	Exemplo de isolado	
			Peru	Costa Rica
1	Michelite[b]	1	R (0)	S (1)
2	MDRK[a]	2	S (2)	R (0)
3	Perry Marrow[a]	4	S (4)	R (0)
4	Cornell 49242[b]	8	R (0)	S (8)
5	Widusa[a]	16	R (0)	S (16)
6	Kaboon[a]	32	R (0)	R (0)
7	México 222[b]	64	R (0)	S (64)
8	PI 207262[b]	128	R (0)	S (128)
9	TO[b]	256	R (0)	S (256)
10	TU[b]	512	R (0)	R (0)
11	AB 136[b]	1024	R (0)	S (1024)
12	G 2333[b]	2048	R (0)	S (2048)
	Raça[1]		6	3545

[1]A designação das raças é obtida pela soma dos valores binários das variedades diferenciadoras susceptíveis.
[a]Genótipos Andinos; [b]Genótipos Mesoamericanos.

Segundo YOUNG et al. (1998), a raça fisiológica do isolado é determinada adotando-se valores binários, através da reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras a cada isolado. Os somatórios dos valores binários referentes a reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras determinam a raça fisiológica do isolado inoculado (Tabela 1).

As 12 variedades diferenciadoras possuem genes de resistência para a antracnose. A cultivar Michelite possui o gene *Co-11*, a cultivar Michigan Dark Red Kidney o gene *Co-1*, a cultivar Perry Marrow o gene *Co-1*^{3}, a Cornell 49-242, que possuiu o gene *Co-2*, a cultivar Kaboon o gene *Co-1*^{2}, a cultivar México 222 o *Co-3*, a cultivar PI 207262 com o gene *Co-4*^{3} e o gene *Co-9*, TO o gene *Co-4*, a TU o gene *Co-5* e a AB 136 o gene *Co-6* e o gene *co-8*, e a cultivar G 2333 com os genes *Co-4*^{2}, *Co-5 e*

Co-7. Ainda segundo YOUNG et al. (1998), as variedades diferenciadoras Perry Marrow e Kaboon podem apresentar mais de um gene de resistência.

Das 50 raças do patógeno já identificadas no Brasil (1, 5, 7, 8, 17, 23, 31, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105, 109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 137, 193, 217, 249, 320, 321, 337, 339, 343, 453, e 585) (ANDRADE et al. 1999; THOMAZELLA et al. 2000; ALZATE-MARIN & SARTORATO, 2004), os patótipos mais freqüentes são os 65, 73, 81 e o 87, ocorrentes principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal. O Estado do Paraná apresentou a maior variabilidade de raças de *C. lindemuthianum* (29 raças), seguido por Goiás (17 raças), Santa Catarina (16 raças) e o Rio Grande do Sul (14 raças) (ALZATE-MARIN & SARTORATO, 2004).

TALAMI et al. (2004) coletaram 43 isolados em regiões do Sul de Minas, Alto Paranaíba, Zona da Mata, Triângulo Mineiro, Goiás, Paraná e São Paulo. Destes isolados foram identificadas onze raças fisiológicas do *C. lindemuthianum*. Com base nas análises de inoculação com os materiais coletados, verificou-se que no Sul de Minas Gerais predominavam as raças 65 e 89. Na Zona da Mata, predominavam as raças 337, 65, 87 e 81. No Triângulo Mineiro foram encontradas principalmente as raças 81 e 87. No Alto do Paranaíba, o único isolado encontrado foi o da raça 65. Em São Paulo, o único isolado coletado foi da raça 73 e, em Goiás, o isolado avaliado pertencia à raça 593. Os pesquisadores observaram que as raças 65, 69, 73 e 81 apresentavam maior distribuição geográfica no Brasil. Segundo CARBONELL et al. (1999), as principais raças do patógeno encontradas no Estado de São Paulo são a 31, 65 e 89, sendo a raça 89 a mais agressiva.

Segundo BIGIRIMANA & HÖFTE (2001), o maior fator limitante para o controle da antracnose no feijoeiro é a existência de uma enorme variabilidade de raças de *C. lindemuthianum*. E, desta forma, a teoria do gene a gene, segundo a qual para cada gene de resistência, existe um gene que confere avirulência ao patógeno e vice-versa, pode ser um fator que dificulta o melhoramento da cultura, pois pode ser necessária a reunião de diversos genes para a obtenção da resistência completa ao patógeno.

Desta forma, a grande variabilidade do *C. lindemuthianum* resultou em contínua queda na resistência de cultivares comerciais (MAHUKU & RIASCOS, 2004). Isso porque cultivares portadoras de um único gene de resistência controlam a doença por poucos anos, até o aparecimento de novas raças do patógeno. Por isso, o único caminho para tornar a resistência mais duradoura é a incorporação de diferentes tipos de genes de

resistência em uma única cultivar (CASTANHEIRA et al. 1999), por meio de contínuas combinações genéticas (KELLY & MIKLAS, 1998).

CHIORATO (2004) avaliou os resultados obtidos na reação de 993 acessos do Banco de Germoplasma do IAC a raças fisiológicas do *C. lindemuthianum*. Para a raça 31, a quantidade de acessos suscetíveis foi de 31%, enquanto que a de resistentes foi de 69%. Para a raça 65, foram 36% de genótipos resistentes contra 64% suscetíveis, e para a raça 89, foram 30% de resistentes e 70% suscetíveis. Dos 993 acessos analisados, 172 mostraram-se resistentes às três raças, fornecendo considerável variabilidade de genótipos a serem introduzidos em cruzamentos futuros. No entanto, neste estudo não foram identificados quais os genes envolvidos nestes materiais, podendo estes genótipos possuírem novos genes ou apenas um gene maior.

ARAYA (2003) afirmou que as implicações genéticas da co-evolução em cada ambiente são que as populações do patógeno nativas ou emergentes possuem diferentes mecanismos de patogenidade (genes), uma vez que seus respectivos hospedeiros oferecem uma diversidade similar quanto a genes de resistência. Neste sistema é primordial conhecer as raças presentes para selecionar os materiais com resistência a essas raças e eventualmente iniciar a introgressão desses genes em cultivares comerciais. Assim, será possível identificar genótipos com resistência duradoura mediante a combinação de diversas fontes de resistência presentes no germoplasma de diferentes centros de domesticação do feijoeiro.

Sendo assim, torna-se relativamente complexo combater esta doença. Normalmente, o controle da antracnose do feijoeiro comum pode ser alcançado pelo uso combinado de práticas culturais, produtos químicos, da resistência varietal às várias raças do patógeno e por meio da piramidação de genes de interesse em uma única cultivar.

2.4 Marcadores moleculares para resistência à antracnose do feijoeiro

O surgimento dos marcadores moleculares possibilitou o mapeamento de diversos genes relacionados com a resistência às principais doenças em diversas culturas, inclusive na cultura do feijoeiro. Nos casos em que se observa ligação entre alelos de resistência a doenças com marcadores moleculares, estes podem ser usados na seleção assistida das plantas com provável resistência a estas doenças, principalmente nas etapas iniciais e intermediárias dos programas de melhoramento. Porém, nas etapas

finais, as inoculações com o patógeno ainda são necessárias para a confirmação da resistência ou da suscetibilidade de determinada planta ao patógeno (ALZATE-MARIN, 2005).

Com a engenharia genética e a biotecnologia, o melhoramento genético de plantas deu um grande passo, uma vez que, através dessas técnicas, já é possível transferir genes de interesse para uma variedade qualquer e, até mesmo, introduzir genes de espécies diferentes (MOHAN et al. 1997), com a vantagem de saber se a introdução do gene foi ou não bem sucedida logo nas primeiras gerações, através da presença ou da ausência do gene que pode ser identificado a partir do DNA extraído de folhas jovens das plantas através dos marcadores moleculares.

Existem diversas técnicas que auxiliam a seleção de plantas através de marcadores moleculares. Dentre elas, pode-se citar os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), os RFLPs (*Restriction Fragments Length Polymorphims*), os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), os SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), dentre outros (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Até 1996, tinham sido identificados marcadores RAPD ligados a 17 genes principais que controlam a resistência a patógenos diversos do feijoeiro (KELLY & MIKLAS, 1996). Atualmente, segundo MIKLAS (2006), existem 42 SCARs ligados a *loci* de resistência às doenças: crestamento bacteriano (seis marcadores), fogo selvagem (um marcador), vírus do mosaico comum (três marcadores), vírus do mosaico dourado (dois marcadores), vírus do nanismo (um marcador), ferrugem (dez marcadores), mofo branco (três marcadores), antracnose (doze marcadores SCAreoli, SAS13, SH18, SBB14, SAB3, SB12, SCARY20, SCARC08, SCARAZ20, SCARZ04, SF10), mancha angular (seis marcadores).

Estes marcadores podem ser utilizados na seleção efetiva e indireta de plantas portadoras do(s) gene(s) de resistência e, conseqüentemente, para a piramidação dos mesmos numa única cultivar.

Um dos problemas encontrados para a utilização dos marcadores RAPD para a seleção assistida é inerente à técnica propriamente dita. Ou seja, à sua baixa reprodutibilidade entre laboratórios (JUN et al. 2002). Nesse sentido e visando transpor tais limitações, os RAPDs podem ser convertidos em marcadores mais confiáveis, a exemplo dos SCARs, que são altamente específicos e os produtos da amplificação podem ser detectados com a ajuda de eletroforese em gel (NIETSCHE et al. 2000). Isso tudo porque os primers SCAR são mais longos do que aqueles dos marcadores RAPDs,

e a temperatura de anelamento é mais estringente, evitando assim um anelamento mal sucedido e a conseqüente produção de bandas espúrias ou indesejáveis. Outra importante vantagem é que em alguns casos, os marcadores SCARs podem ser de natureza co-dominante.

Para obtenção de um SCAR a partir de bandas RAPD, os mesmos são selecionados, clonados, seqüenciados, e assim são desenhados oligonucleotídeos contendo de 17 a 30 bases para amplificação específica do fragmento selecionado (HERNANDEZ, 1999). O polimorfismo pode ser detectado diretamente pela presença ou ausência da banda, ou por meio de clivagem com enzimas de restrição, em ambos os casos após migração por eletroforese em substrato específico (agarose ou acrilamida).

Exitem várias utilizações para os marcadores moleculares no melhoramento de plantas. ARRUDA et al. (2000), por exemplo, relataram que a seleção de plantas através de marcadores moleculares é a maneira mais eficaz de se selecionar plantas com genes de resistência piramidados em uma única cultivar, quando as linhagens intermediárias ainda estão segregando. Além disso, a piramidação gênica assistida através de marcadores moleculares dispensa inoculações múltiplas dos patógenos nas plantas (ALZATE-MARIN et al. 2000), diminuindo assim o tempo e o custo final do programa de melhoramento.

ALZATE-MARIN et al. (2005) relataram que os marcadores moleculares ainda podem ser usados nos processos de retrocruzamento para facilitar ou acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente. Neste caso, é definido um "*fingerprint*" molecular do recorrente e este é comparado com aqueles obtidos das linhagens criadas ao longo do processo de melhoramento. Somente são utilizadas nos próximos ciclos de retrocruzamento, aquelas linhagens que carregam o alelo de resistência e que possuam um "*fingerprint*" semelhante ao do genitor recorrente.

Outra estratégia do uso dos marcadores moleculares é na sua utilização no pós-melhoramento na distinção dos melhores materiais e serem lançados como cultivares. Os cultivares melhorados tendem a ser muito parecidos, uma vez que os programas de melhoramento têm, em sua maioria, os mesmos objetivos de seleção (cultivares produtivos, resistentes a diversas doenças, etc) (SCHUSTER et al., 2006). Desta forma, os marcadores moleculares podem distinguir as melhores candidatas a cultivar, baseado nos números de genes de resistência encontrados pelos marcadores.

2.5 Piramidação de genes

A piramidação ou a associação de diferentes genes de resistência em uma mesma cultivar tem sido proposta como uma forma de obter uma resistência duradoura e de amplo espectro (KELLY et al. 2003). Geralmente, como as cultivares mais utilizadas pelos produtores contém poucos genes de resistência, a probabilidade de quebra dessa resistência pelo patógeno pode ser alta.

Segundo ALZATE-MARIN et al. (2005), a piramidação é um processo extremamente difícil e trabalhoso de se obter, principalmente pela dificuldade de identificar, de modo preciso, os sintomas de resistência após múltiplas inoculações. Dessa forma, o monitoramento dos alelos de resistência por meio de marcadores moleculares a eles ligados pode se constituir numa importante estratégia de seleção indireta desses genes, evitando as dificuldades inerentes ao processo de seleção via análise dos sintomas.

YOUNG & KELLY (1997) sugeriram que a piramidação para resistência múltipla deveria contemplar genes provenientes dos dois centros de origem aceitos para a espécie cultivada, Mesoamericano e Andino, com a finalidade de prolongar a resistência à antracnose na cultivar obtida, dificultando assim a quebra da resistência pelo hospedeiro.

Um exemplo desta proposta é o uso da seleção assistida por marcadores moleculares no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Iniciado em 1992, foram piramidadas no genitor recorrente Rudá (S), os alelos independentes de resistência *Co-4* e *Co*-6 ao *C. lindemuthianum* procedentes das cultivares TO e AB 136, respectivamente, os alelos de resistência à antracnose (*Co-10*) e ferrugem (*Ur-?)* que estão ligados entre si na cultivar Ouro Negro e o alelo de resistência à mancha angular da cultivar AND 277 (*Phg-1*) (RAGAGNIN et al. 2003). Seguindo esta metodologia, foi possível obter em três gerações de retrocruzamento, isolinhas similares àquelas da cultivar recorrente Rudá, possuindo os alelos independentes de resistência (*Co-6, Co-4, Co-10, Ur-? e, Phg-1).* As isolinhas obtidas foram selecionadas com base na resposta ao inóculo dos patógenos e as melhores foram selecionadas através dos marcadores moleculares do tipo RAPD ($OPY20_{830}$, $OPB3_{1800}$, $OPAZ20_{940}$, $OPH18_{830}$, $OPAS13_{950}$, $OPF10_{1050}$, $OPX11_{550}$, $OPAB8_{560}$, $OPN2_{890}$, $OPAC14_{2400}$, $OPH13_{490}$ e, $OPE4_{500}$), para auxiliar a seleção de isolinhas homozigotas resistentes mais próximas do progenitor recorrente (ALZATE-MARIN et al. 2005).

Devido à falta de reprodutividade dos marcadores RAPDs, na seleção de plantas contendo todos os genes de interesse, alguns marcadores foram convertidos em marcadores SCARs para os genes *Co-4* (OPY20 e OPC08) e *Co-6* (OPAZ20 e OPZ04) passando a se chamar, então, SCARY20, SCARC08, SCARAZ20 e SCARZ04, respectivamente (QUEIROZ et al. 2004). Recentemente, famílias com bons índices de produção e apresentando resistência múltipla à ferrugem e à antracnose foram identificadas e posteriormente utilizadas com sucesso como doadoras de genes para piramidação em retrocruzamentos (ARRUDA et al. 2005).

LIU et al. (2000) demonstraram a eficiência da piramidação em outras culturas ao desenvolver linhas isogênicas de trigo contendo diferentes genes de resistência ao míldio. Utilizando este procedimento, os autores foram capazes de desenvolver uma cultivar contendo três genes de resistência a essa doença (*Pm2, Pm4q e Pm21*) por meio do monitoramento da seleção por marcadores moleculares.

2.6 Genes de resistência ao patógeno da antracnose no feijoeiro comum

Foram identificados onze genes que condicionam resistência ao patógeno da antracnose em feijoeiro comum. Para dez deles, *Co-1*, *Co-1*^{2}, *Co-2*, *Co-4*, *Co-4*^{2}, *Co-4*^{3}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-9*, *Co-10*, dominantes, e para o *co-8*, recessivo, foram desenvolvidos marcadores moleculares ligados aos mesmos (Tabela 2). Destes genes, o *Co-1*, *Co-3* e o *Co-4*, apresentam várias formas alélicas.

ALZATE-MARIN & SARTORATO (2004) relataram que cultivares diferenciadoras que possuem o gene *Co-4* e seus alelos e os genes *Co-6* e *Co-5*, individualmente ou em associação com outros genes, são aqueles que apresentam maior resistência à antracnose no Brasil. No mesmo trabalho, os autores descreveram que as cultivares Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49-242, Widusa, Kaboon, México 222, PI 207262, TO, TU, AB 136 e G 2333 são resistentes a 7, 31, 26, 29, 27, 35, 9, 45, 44, 50 e 50 raças da antracnose descritas pelos autores no Brasil. Estes resultados mostram a importância das cultivares G 2333 (*Co-4*^{2}, *Co-5* e *Co-7*), PI 207262 (*Co-4*^{3} e *Co-9*), TO (*Co-4*), AB 136 (*Co-6* e *co-8*) e TU (*Co-5*) em programas de melhoramento (Tabela 2). Destaque também para o alelo *Co-1*^{2}, da cultivar Andina Kaboon, que é a principal fonte de resistência para raças andinas e é incompatível com 36 raças do patógeno. O gene *Co-2,* presente na cultivar Cornell 49-242, confere resistência a 27 patótipos dentre eles os 65, 81 e 87, que são amplamente distribuídos pelo Brasil.

A Tabela 2, baseada nos trabalhos de BALARDIN et al. (1997) e ALZATE-MARIN & SARTORATO (2004), demonstra a ampla variabilidade do patógeno da antracnose e confirma a superioridade das cultivares Cornell 49-242, TO, G 2333, TU e AB 136, como genitores doadores de genes de resistência ao patógeno *C. lindemuthianum,* utilizados pelo programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico.

Estudos de mapeamento têm mostrado que esses *loci* multialélicos residem em diferentes grupos de ligação no mapa de feijão (FREYRE et al. 1998). O *locus Co-1* está localizado no grupo de ligação B1; *Co-2* no B11; *Co-3* no B4, *Co-4* no B8; *Co-5* e *Co-6* em B7; e *Co-9* e *Co-10* no B4 (GEFFROY et al. 1999; MIKLAS et al. 2000; MIKLAS et al. 2006).

Tabela 2. Genes de resistência a diferentes raças de antracnose do feijoeiro, fontes de resistência e marcadores moleculares ligados aos mesmos, de acordo com diversos autores.

Gene	Fonte de resistência	Raças resistentes	Marcadores	Referências dos Marcadores
Co-1	MRDK	1, 5, 8, 9, 17, 64, 65, 69, 72, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 96, 97, 101, 105, 109, 117, 121,125, 135, 193, 201, 209, 217, 249, 256, 257, 320, 321, 337, 357, 448, 449, 453, 457, 465, 469, 521, 585, 833, 1033, 1165, 1344, 1472, 1545, 1600, 1601, 1673, 1677, 1641, 1929, 1993	$OF10_{530}$	Vallejo & Kelly, 2002
*Co-1*²	Kaboon	1, 2, 5, 7, 9, 17, 19, 65, 73, 81, 89, 193, 201, 209, 256, 257, 320, 321, 337, 448, 449, 453, 457, 465, 469, 521, 833, 1033, 1165, 1344, 1431, 1472, 1545, 1600, 1601, 1673, 1677, 1741, 1929, 1993	SE act/Mcca	Melotto & Kelly, 2000; Vallejo & Kelly, 2002
*Co-1*³	Perry Marrow	1, 2, 9, 17, 19, 65, 73, 81, 89, 193, 201, 209, 256, 257, 320, 321, 337, 448, 449, 457, 465, 521, 833, 1033, 1344, 1472, 1545, 1600, 1601, 1673, 1929, 1993		Melotto & Kelly, 2000
*Co-1*⁴	AND277	64, 65, 73, 81, 87, 89, 119 e 453		Alzate-Marin *et al.* 2003
Co-2	Cornell 49-242	1, 2, 7, 17, 19, 23, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 86, 87, 96, 97, 101, 102, 117, 119, 193, 209, 256, 257, 320, 321, 337, 339, 343, 357, 448, 449, 453, 465, 469, 833, 1344, 1431, 1472, 1600, 1601,	$OQ4_{1440}$, $OPH20_{450c}$, $B355_{1000}$	Mastenbroek, 1960; Adam-Blondon *et al.* 1994; Young & Kelly 1996.; Geffroy *et al.*,1999

Tabela 2...Continuação

Gene	Fonte de resistência	Raças resistentes	Marcadores	Referências dos Marcadores
Co-3	Mexico 222	1, 2, 7, 8, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 137, 256, 257, 521, 1033, 1165, 1431, 1545, 1673, 1677, 1929,		Bannerot, 1965
Co-3²	Mexico 227			Fouilloux, 1979
Co-4	TO	1, 2, 7, 8, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105,109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 137, 193, 201, 209, 217, 249, 521, 585, 1033, 1165, 1545,	SCARY20, SCARC08, OPY20, PJO1	Queiroz *et al.* .; 2004; Alzate-Marin *et al.* , 2002 ; Arruda et al. 2000
Co-4²	G 2333	1,2, 5, 7, 8, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105,109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 137, 193, 201, 209, 217, 249, 256, 257, 320, 321, 337, 339, 343, 357, 448, 449, 453, 457, 465, 469, 521, 585, 833, 1033, 1045, 1165, 1344, 1431, 1472, 1545, 1600, 1601, 1673, 1677, 1741, 1929, 1992, 2047	$OAL9_{740}$, SAS13, SH18, SBB14, OPH18, $OPAS13_{950}$	Young *et al.* , 1998; Melotto & Kelly, 1998; Alzate-Marin *et al.* 2001, Awale & Kelly, 2001.
Co-4²	SEL 1308			
Co-4³	PI 207262	1, 2, 7, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 64, 65, 69, 73, 81, 87, 89, 95, 193, 256, 257, 320, 321, 337, 357, 521, 833, 1033, 1344, 1545, 1600, 1601,	$OPAS13_{950}$	Alzate-Marin *et al.* 2007
Co-5	TU	1, 2, 5, 7, 8, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105, 109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 137, 193, 201, 209, 217, 249, 256, 257, 320, 321, 337, 339, 343, 357, 448, 449, 453, 457, 465, 469, 1033, 1165, 1344, 1431, 1472	$OAB3_{430}$, SAB3	Vallejo & Kelly, 2001
	SEL 1360			
	G 2333			
	G 2338			
Co-6	AB 136	1, 2, 5, 7, 8, 9, 17, 19, 23, 31, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81,83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105, 109, 111, 117,119, 121, 123, 125, 127, 137, 193, 201, 209, 217, 249, 256, 257, 320, 321, 337, 343, 357, 448, 449, 453, 457, 465, 469, 521, 585, 833,	OPZ09 $OPZ04_{560}$, SCAR AZ20, SCAR Z04	Alzate-Marin *et al.* , 1999.; Alzate-Marin, *et al.* 2000 ; Queiroz *et al.* , 2004
	Catrachita		$OPAH1_{780}$ e $OPAZ20_{890}$	Young & Kelly, 1996
Co-7	G 2333			Young *et al.* 1998

Tabela 2...Continuação

Gene	Fonte de resistência	Raças resistentes	Marcadores	Referências dos Marcadores
co-8	AB136		$OPZ20_{950}$	Alzate-Marin *et al.* , 2001
Co-9	BAT 93	7, 23, 31, 38, 65, 79, 89	SB12	Geffroy *et al.* , 1999.; Mendez de Vigo *et al.* , 2002
Co-10	Ouro Negro	23, 64, 67, 73, 81, 83, 87, 89, 95, 102, 117, 119, 343, 453	SF10	Alzate-Marin *et al.* 2003; Côrrea *et al.* 2000
Co-11	Michelite	2, 64, 256, 320, 448, 1344, 1472, 1600		Gonçalves-Vidigal *et al.* 2005

Locus Co-1

O gene *Co-1*, antigamente conhecido como gene A, é o único gene de resistência descrito no grupo gênico andino (KELLY & VALLEJO, 2004) e foi primeiramente encontrado na cultivar na cultivar Michigan Dark Red Kidney.

Foram também encontrados dois outros alelos do *Co-1* nas cultivares Kaboon e na cultivar Perry Marrow (MELOTTO & KELLY, 2000), sendo denominados de $Co\text{-}1^2$ e $Co\text{-}1^3$, respectivamente.

ALZATE-MARIN et al. (2003a), buscando descobrir qual gene conferia resistência à antracnose na cultivar AND 277, realizaram cruzamentos entre a cultivar AND277 com Perry Marrow (cultivar suscetível), com MDRK (*Co-1*), Kaboon ($Co\text{-}1^2$) e Ouro Negro (*Co-10*) e analisaram a segregação dos cruzamentos. Os autores descobriram que o gene responsável pela resistência era um quarto alelo, denominado $Co\text{-}1^4$.

Locus Co-2

O gene *Co-2* era conhecido como ARE e foi encontrado em 1960 primeiramente na cultivar Cornell 49-242 por MASTENBROEK (KELLY & VALLEJO, 2004). Este gene representa umas das maiores fontes de resistência à antracnose nas áreas não tropicais (ADAM - BLONDON et al. 1994). Segundo BALARDIN et al. (1997) e ALZATE-MARIN et al. (2004), a cultivar Cornell 49-242 possui resistência às raças 1, 2, 7, 17, 19, 23, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 86, 87, 96, 97, 101, 102, 117, 119, 193, 209, 256, 257, 320, 321, 337, 339, 343, 357, 448, 449, 453, 465, 469, 833, 1344,

1431, 1472, 1600, 1601 O amplo espectro de resistência demonstrado revela a importância dessa cultivar e desse gene para os programas de melhoramento.

ADAM-BLONDON et al. (1994), utilizando quatro pares de linhas isogênicas para o *Co-2*, encontraram um marcador RAPD fortemente ligado ao gene. O amplificado RAPD obtido e digerido com uma enzima de restrição (*DdeI)* revelou polimorfismo para plantas resistentes e suscetíveis e foi transformado em um marcador SCAR. Ao marcador SCAR foi dado o nome de SCH20 -1 e SCH20-2 (Tabela 2), pois ambos derivaram do marcador RAPD RoH20. Esse marcador está localizado a 0,5 cM do gene e se mostrou altamente específico, podendo assim ser utilizado na seleção de plantas portadoras ou não do gene de resistência. O mesmo marcador foi usado por GEFFROY et al. (1999) para testar a eficiência do mesmo também em genótipos Mesoamericanos, uma vez que foi desenvolvido para genótipos Andinos. Para isso foram utilizados 10 genótipos comerciais Andinos e Mesoamericanos resistentes (Ardinal, Janus, Talisman, Coktel, Vilbel, Filão, Calypso, Argus, Cupidon e Fruidor) e três linhas isogênicas para o gene *Co-2*. A cultivar Cornell 49242 foi a fonte original do gene *Co-2*. Após digestão do fragmento amplificado com os primers SCH20 com a enzima *DdeI*, todos os genótipos portadores do gene *Co-2* apresentaram um fragmento de 136 pb associado à marca de resistência. Porém, duas cultivares suscetíveis (BAT 93 e TO) também apresentaram os padrões associados com a resistência, ou seja, ao *Co-2*. Essa ambigüidade continuou mesmo após a digestão com outras enzimas de restrição. Desta forma, os autores demonstraram que este marcador SCH20 só poderia ser aplicado em materiais de origem Andina.

De acordo com ALZATE-MARIN et al. (2003b) quando se usa a cultivar Cornell 49-242 como fonte de resistência à antracnose, diferentes genes dominantes ou recessivos podem ser observados de acordo com o cruzamento. Isso é deve-se à complexidade do *loci Co-2*, além da interação de outros genes independentes também presentes na cultivar Cornell 49-242. Desta forma, dificulta-se a identificação dos genes presentes em cultivares melhoradas contendo essa fonte de resistência.

Locus Co-3

O gene *Co-3* foi descrito pela primeira vez por BANNEROT em 1965 era chamado de Mexique 1 e é encontrado na cultivar México 222. FOUILLOX (1979) encontrou um segundo alelo desse gene *Co-3*^{2} na variedade mesoamericana México

227. Apesar desse gene ser pouco utilizado nos programas de melhoramento do feijoeiro, sabe-se que este gene confere resistência às raças 1, 5, 7, 8, 17, 23, 31, 55 e 137.

Locus Co-4

O gene *Co-4* era chamado de Mexique 2 e foi encontrado no genótipo TO por FOUILLOX em 1979. Segundo KELLY & VALLEJO (2004), um segundo alelo desse gene, denominado *Co-4*^{2}, foi encontrado na cultivar SEL 1308, e um terceiro alelo o *Co-4*^{3}, foi encontrado na cultivar PI 207262 (ALZATE-MARIN et al. 2007).

Utilizando RAPD, ARRUDA et al. (2000) identificaram os marcadores ($OPY20_{830C}$, $OPC08_{900C}$, $OP116_{850C}$, $OPJ01_{1380C}$, $OPB03_{1800T}$ e $OPA18_{830T}$) ligados ao gene *Co-4* na cultivar TO, usando para isso populações segregantes do cruzamento entre TO e Rudá. A cultivar TO é de grande importância no melhoramento, pois é resistente a 44 das 50 raças de antracnose descritas no Brasil. O marcador $OPY20_{830c}$ encontrado está localizado 0cM do gene na cultivar TO e mostrou ser eficiente pois também forneceu amplificações nas cultivares PI 207262 e G 2333.

O marcador RAPD $OAS13_{950}$, descrito por YOUNG et al. (1998), foi transformado em SCAR por MELOTTO & KELLY (1998) e foi chamado de SAS13. AWALE & KELLY (2001) também desenvolveram marcadores SCARs SH18 e SBB14 para introdução na seleção assistida, a partir dos marcadores RAPD $OH18_{1150c}$ e $OBB14_{1150}$ ligados ao gene *Co-4*^{2} na cultivar SEL 1308 e eles também testaram outro marcador, o SAS13, e os resultados mostraram que para selecionar genótipos portadores do *Co-4*^{2}, os marcadores mais eficientes seriam SH18 e SBB14 uma vez que os autores afirmam que o marcador SAS13 pode amplificar seqüências consenso para todos os alelos do gene *Co-4.*

Em estudos independentes, ALZATE-MARIN et al. (2001a) identificaram o marcador RAPD $OPH18_{1200c}$ como sendo ligado ao gene *Co-4*^{2} na cultivar G 2333. Nesse trabalho também foi testado o marcador $OPAS13_{950}$ demonstrando-se também sua ligação ao mesmo gene a uma distância de 9,2 cM, para o primeiro e a 0 cM para o segundo.

Em 2002, foram validados marcadores RAPDs ligados ao gene *Co-4* na cultivar PI 207262 (ALZATE-MARIN et al. 2002). Já em 2007, confirmou se que esta cultivar possuía dois genes independentes de resistência, sendo um deles um alelo do *Co-4*, o

Co-4^3 (ALZATE-MARIN et al. 2007). Para isso, utilizaram os marcadores OPY20 e OPJ01 descritos anteriormente por ARRUDA et al. (2000) e ligados ao *Co-4* na cultivar TO, e OPH18 e OPAS13$_{950}$, ligados ao *Co-4*^{2} nas cultivares SEL 1308 e G 2333 (ALZATE-MARIN et al. 2001; YOUNG & KELLY, 1997). Os resultados demonstraram que somente o marcador OPAS13$_{950}$ estava presente em todas as plantas resistentes à raça 65 e não estava presente nas plantas suscetíveis, estando ligado a 3,5 cM do gene *Co-4*^{3}. Os resultados mostraram que este marcador poderia ser útil nos programas de melhoramento na identificação de isolinhas portadoras do gene.

Marcadores RAPDs foram transformados em SCARs para o gene *Co-4*, derivados dos RAPDs OPY20 e OPC08 e para o gene *Co-6*, derivados dos RAPDs OPAZ20 e OPZ04. Os novos marcadores foram então denominados de SCARY20, SCARC08, SCARAZ20 e SCARZ04 com distâncias de 1,2 cM, 7,8 cM, 7,1 cM e 2,9 cM, respectivamente. Estes marcadores estão sendo utilizados no programa de melhoramento de feijoeiro do BIOAGRO (UFV-MG), onde foram desenvolvidos com o objetivo de piramidar diferentes genes de resistência em cultivares comerciais QUEIROZ et al. (2004).

Locus Co-5

Antigamente conhecido como Mexique 3, o gene *Co-5* foi descrito inicialmente na cultivar TU originária do cruzamento entre Tenderette x México. Além desta, pode-se encontrar este gene nas cultivares SEL 1360 e G 2333 (FOUILLOUX, 1979). Foi identificado na população segregante do genótipo SEL 1360, o marcador RAPD OPB03$_{450}$, cuja distância do gene *Co-5* e da cultivar TU foi de 15,4 cM. A banda do RAPD OPB03$_{450}$ também foi observada na cultivar G 2338 (ALZATE-MARIN et al. 2002).

Este marcador foi convertido em SCAR o qual passou a se chamar SAB3 (VALLEJO & KELLY 2001). Para testar a eficiência do novo marcador, um cruzamento entre as cultivares Black Magic (resistente) e a SEL 111 (susceptível) foi realizado e a população segregante oriunda deste cruzamento foi inoculada com a raça 7 da antracnose. Os resultados demostraram que o SAB3 apresenta um fragmento de 400pb e que está a 12,98 cM do gene. Os autores ainda afirmaram que este marcador foi eficiente na seleção de genótipos portadores do *Co-5*.

Locus Co-6

Segundo KELLY & VALLEJO (2004), a resistência conferida por este gene foi descoberta inicialmente por SCHWARTZ et al. (1982) na cultivar AB 136. Posteriormente, YOUNG & KELLY (1996) observaram que a cultivar Catrachita (derivada da cultivar AB 136) também carregava este gene, ao qual nomeou-se de *Co-6*. Este é um gene de grande importância no melhoramento do feijoeiro, principalmente nos programas, pois no Brasil, o gene *Co-6* confere resistência a todas as raças identificadas.

Em 1999, ALZATE-MARIN et al. identificaram, através de cruzamentos entre as cultivares AB 136 (R), Michelite (S) e Mexico 222 (S), os marcadores $OPZ04_{560}$ e $OPZ09_{950}$, ligados ao gene *Co-6* em acoplamento e repulsão, respectivamente. O marcador $OPZ04_{560}$ foi eficiente para diferenciar genótipos resistentes e susceptíveis quando o genitor feminino foi Michelite ou México 222. Assim, ALZATE-MARIN et al. (2000), por meio de cruzamentos efetuados entre a cultivar possuidora do *Co-6*, AB 136 e a cultivar susceptível Rudá, identificaram um novo marcador RAPD $OPAZ20_{940}$ em populações segregantes do cruzamento entre AB 136 x Rudá. O marcador está localizado a 7,1cM do gene. Os marcadores $OPZ04_{560}$ e $OPAZ20_{940}$ foram convertidos em SCARs e denominados de OPAZ20 e OPZ04, e são amplamente utilizados nos programas de melhoramento do BIOAGRO (QUEIROZ *et al.* 2004).

Locus Co-7

PASTOR-CORALES et al. (1994) identificaram os genes de resistência presentes na cultivar G 2333 utilizando, para isso, a raça 521 da antracnose. Como o gene *Co-5* não confere resistência a essa raça, concluiu-se que esses autores tinham encontrado dois genes de resistência nesta cultivar. Em 1996, YOUNG et al. concluíram que a cultivar G2333 possuía um terceiro gene de resistência (*Co-5*). Já os autores YOUNG et al. (1998), confirmaram que a cultivar G 2333 possuía três genes independentes (*Co-4*^{2}*, Co-5 e Co-7*). De acordo com KELLY & VALLEJO (2004), o *locus Co-7* foi descrito como sendo o terceiro gene independente da cultivar G 2333. Ainda segundo este autor, este gene não apresenta grande importância para os

programas de melhoramento da cultura. Até o momento, nenhum marcador foi associado a ele.

Locus co-8

ALZATE-MARIN et al. (2001), por meio de cruzamentos entre as cultivares AB 136 (resistente a todas as raças fisiológicas da antracnose do Brasil) e Rudá (susceptível), testaram o marcador RAPD $OPAZ20_{950c}$ para verificar a presença do gene durante os avanços de geração. Estes materiais foram inoculados com 18 patótipos de *C. lindemuthianum* e em uma das linhas ocorreu uma segregação de 1:3 (resistente: susceptível), indicando a presença de um gene recessivo, o *co-8,* neste genótipo.

Locus Co-9

O gene *Co-9* foi descrito pela primeira vez por GEFFROY et al. (1999), na cultivar BAT 93. MENDEZ de VIGO et al. (2002) encontraram uma ligação entre o marcador RAPD $OB12_{350}$ e o gene *Co-9*, presente na linhagem A 1220 e, construíram um marcador SCAR (SB12) para monitorar esse gene.

Segundo KELLY & VALLEJO (2004), a presença da marca SCAR na cultivar BAT 93 e na cultivar PI 207262 confirmaram que o gene *Co-9,* presente na cultivar BAT 93, era proveniente de seu genitor, o PI 20.72.62.

Realizando estudos de alelismo, ALZATE-MARIN et al. (2007) demonstraram que a cultivar PI 207262 possui os genes de resistência $Co\text{-}4^3$ *e Co-9*. Os mesmos autores afirmam que o gene Co-9 presente na cultivar PI 207262 provém de um dos seus genitores, o BAT 93. Com base nas diferentes respostas de inoculação dos dois genótipos, os autores sugeririam que a cultivar BAT 93 possui outros genes de resistência ou apresenta, então, outros fatores complementares.

Locus Co-10

ALZATE-MARIN et al. (2003c) visavam descobrir e caracterizar o gene de resistência presente na cultivar de sementes pretas Ouro Negro, através de estudos de alelismo com os genes *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, e *Co-6*. Através de análises de

segregação observaram que o gene presente na cultivar segregava independentemente dos genes estudados, além de ser um gene diferente daquele encontrado nas cultivares Widusa e PI 207262. Desta forma, os autores denominaram de *Co-10* o novo gene encontrado na cultivar Ouro Negro.

A inoculação da cultivar Ouro Negro com 19 raças de *C. lindemuthianum* mostrou que o gene *Co-10* é resistente às raças 23, 64, 67, 73, 81, 83, 87, 89, 95, 102, 117, 119, 343, 453, 1033, 1545, 1600 e suscetível às raças 65 e 2047.

Locus Co-11

A cultivar Mesoamericana Michelite é considerada uma cultivar suscetível universal e tem sido utilizada para caracterizar raças de *C. lindemuthianum*. Trabalhos anteriores revelaram que a cultivar Michelite apresenta mecanismos diferentes das demais cultivares para detectar as diferentes raças fisiológicas dos patógeno. No Brasil, a cultivar Michelite é resistente às raças 8, 64, 72, e 102. Recentemente, GONÇALVES-VIDIGAL et al. (2005) investigaram a herança da resistência da cultivar Michelite e caracterizaram a independência do gene, usando a raça 64. Assim, a cultivar Michelite foi cruzada com as cultivares MDRK, Kaboon, Perry Marrow, AND 277, Widusa, Cornell 49-242, TO, TU, AB 136, BAT 93, Ouro Negro, PI 20.72.62 (genótipos resistentes) e com México 222, suscetível à raça 64.

Testes de alelismo efetuados pelos autores precedentes indicaram a ação de dois genes dominantes e independentes, ou seja, os diferentes cruzamentos indicaram que cada uma das cultivares carrega um gene de resistência dominante e independente. Este resultado mostra a independência do gene na cultivar Michelite. O gene presente na cultivar Michelite é independente dos genes previamente caracterizados: *Co-1*, *Co-1*^{2}, *Co-1*^{3}, *Co-1*^{4}, *Co-1*^{5}, *Co-2*, *Co-3, Co-4, Co-4*^{2}, *Co-4*^{3}, *Co-5*, *Co-6*, *Co-9* e *Co-10*. Conseqüentemente, os autores propuseram que é o *Co-11* o gene de resistência à antracnose na cultivar Michelite.

2.7 Genes de resistência envolvidos nos programas de melhoramento do feijoeiro do IAC

Os programas de melhoramento de diversas instituições têm como objetivo incorporar, em seus blocos de cruzamentos, o maior número de genes de resistência a diversas doenças da cultura. Geralmente, os programas utilizam genes provenientes dos dois centros de origem da cultura (Mesoamericano e Andino) na tentativa de conseguir através da piramidação desses genes, obter-se uma resistência mais ampla e duradoura.

Nos programas de melhoramento realizados no Brasil, as cultivares mais utilizadas nos blocos de cruzamentos são: G 2333 (*Co-4*^{2}, *Co-5* e *Co-7*), PI 207262 (*Co-4*^{3} e *Co-9*), TO (*Co-4*), AB 136 (*Co-6* e c*o-8*) e TU (*Co-5*), por conferirem resistência a quase todas as raças descritas no país.

Com o auxílio da seleção assistida por marcadores moleculares, os melhoristas conseguem eleger as linhagens resistentes à antracnose, tendo como base o gene ao qual o marcador está ligado, facilitando, assim, o seu trabalho. Porém, ALZATE-MARIN et al. (1999), afirmaram que ré importante considerar que um marcador encontrado em uma determinada população, envolvendo um parental resistente específico, não é necessariamente polimórfico em uma outra população com parentais susceptíveis diferentes. Um exemplo disto foi encontrado pelos mesmos autores, os quais não encontraram polimorfismo entre os genótipos resistentes e susceptíveis quando utilizaram o marcador $OAH1_{780}$ em uma população de AB 136 x Michelite e México 222.

2.8 Resposta à resistência ao patógeno segundo diferentes metodologias de inoculação

Em estudos com pimentão, KIM et al. (1989) afirmaram que a resistência ao patógeno *Phytophthora capsici* é diferentemente expressa em plantas adultas e que em plântulas jovens, que se encontram no estágio de oito folhas, são geralmente susceptíveis a este patógeno. Para confirmar estes resultados, os autores selecionaram plantas que apresentavam este tipo de resistência e as compararam com plantas resistentes e susceptíveis, com diferentes metodologias de inoculação (inoculação no solo, inoculação no caule e spray foliar). Os autores comprovaram que para as três metodologias de inoculação, as oito cultivares avaliadas foram susceptíveis a doença no

estágio de plântula com duas folhas e que a resistência aumentava com a idade da planta. Eles afirmam ainda que a resistência relacionada com a idade da planta poderia ser resultado de mudanças fisiológicas ocorridas nos tecidos da raiz, e do caule, durante o desenvolvimento, e que isto também dependia do genótipo da planta.

O mesmo resultado também foi encontrado por HONG & HWANG (1998) estudando os efeitos da idade da planta de pimentão e do método de inoculação pelo patógeno *Colletotrichum coccodes.* Os autores também comprovaram que, em geral, as plantas mais velhas são mais resistentes a este patógeno. Os resultados demonstraram que todas as plantas com menos de duas folhas foram susceptíveis à doença independentemente das metodologias avaliadas (inoculação foliar e no solo), e que a resistência a doença aumentava com a idade da planta.

TORRES & MARINGONI (1999) avaliaram em feijão diferentes métodos de inoculação (agulhas múltiplas e lâmina de barbear dupla), em diferentes estágios de desenvolvimento fenológico e quanto a reação de cultivares ao ataque de *Xanthomonas axonopodis* PV. *phaseoli*. Para o método de agulhas múltiplas, os autores relataram que a severidade da doença foi maior no estágio de pré-floração. Já para o método de lâmina dupla, houve uma tendência de ocorrer menores índices de severidade no estágio de terceira folha trifoliada. Os autores afirmaram que as plantas de feijoeiro apresentam maior susceptibilidade a Xap na fase reprodutiva do que na vegetativa, independentemente da metodologia avaliada.

BIGIRIMANA & HÖFTE (2001) estudaram três diferentes metodologias para estudar a influência do estádio de crescimento de plântulas de feijoeiro na resistência à antracnose. Para isso, foram testadas três metodologias: a inoculação de sementes, inoculação de plântulas e a inoculação em folhas adultas destacadas. Estas metodologias diferiam principalmente quanto à época de inoculação. Com base nos resultados obtidos com as três metodologias, os autores afirmaram que a melhor maneira para avaliar plantas resistentes e susceptíveis à antracnose é a da folha destacada, pois, além de utilizar pouco espaço e inóculo, a planta não é eliminada podendo ainda vir a ser utilizada.

Em estudos preliminares, os mesmos autores testaram as metodologias de inóculo em plântulas e em folhas destacadas, com a cultivar Prelude com as raças 385, 401 e 69 de *C. lindemuthianum*. Eles observaram que a cultivar Prelude apresentou resultados diferentes nas duas metodologias, tendo concluído que esta resposta pode ser

explicada pela influência do estágio de desenvolvimento da plântula na resposta da resistência.

Sendo assim, os autores utilizaram, para estudar este fenômeno, a metodologia de folhas destacadas com inoculação das raças 385 e 401 do *C. lindemuthianum* e as cultivares Boterkoning, Prelude e Saxa. As folhas destacadas utilizadas no experimento tinham idade de 6, 8, 10, 12 e 14 dias.

Como resultados para a raça 385, a cultivar Boterkoning foi susceptível em todos os estágios de desenvolvimento da planta; já a cultivar Saxa foi resistente em todos os estágios de desenvolvimento da planta e a cultivar Prelude mostrou resultados interessantes: os genótipos foram resistentes com seis dias depois, com oito foram susceptíveis e depois do décimo dia, os genótipos voltaram a serem resistentes.

Para a raça 401, os mesmo resultados foram encontrados onde a cultivar Prelude as plantas mostraram resultados de resistência e susceptibilidade aos seis dias de idade.

Segundo PASTOR-CORALES et al. (1985) *apud* BIGIRIMANA & HÖFTE (2001), existem quatro grupos diferentes de cultivares em relação à resposta ao *C. lindemuthianum*: cultivares que são resistentes em todos os estágios de desenvolvimento da planta; cultivares que, quando no estádio de plântula são altamente susceptíveis, mas ao envelhecerem tornam-se resistentes; cultivares moderadamente resistentes e cultivares moderadamente suscetíveis. Os autores afirmaram ainda que plantas que são susceptíveis quando jovens podem apresentar genes de resistência não expressos no início do desenvolvimento da planta.

Estudando o tipo de reação ao *C. lindemuthianum* em plântulas e em plantas de feijoeiro PASTOR-CORRALES et al. (1994), demonstraram que a cultivar G2333 foi resistente nas duas situações. Já a cultivar ICA Pijao foi susceptível nas duas condições e, por fim, a cultivar G12488 foi susceptível em plântula e resistente em planta adulta. Quando uma planta é resistente nos dois estádios de desenvolvimento, provavelmente os mesmos genes podem estar envolvidos na resistência.

Diferenças entre metodologias de inoculação também foram encontradas por KULL et al. (2003) estudando o patógeno *Slerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, em feijão. Os pesquisadores utilizaram três metodologias de inoculação: inoculação de folhas cotiledonares jovens, inoculação no caule de plantas (inoculação em plantas com seis trifólios) e o método da folha destacada. Os resultados mostraram falhas ao identificar plantas parcialmente resistentes e suscetíveis à doença. Os autores

concluíram, que para esta doença, a melhor metodologia a ser utilizada na detecção de plantas resistentes e susceptíveis é o método de inoculação no caule de plantas.

MAZZOLA et al. (1994) revelaram resultados semelhantes ao estudarem a resistência ao patógeno causador da bruzone em arroz. Analisando a expressão do gene *Xa21*, os autores observaram que este gene só era expresso após 21 dias da germinação estando ausente em estádios primários de desenvolvimento.

No entanto, resultados contrários, demonstrando perda da resistência a doenças foram encontrados por KEMA & SILFHOUT (1997) em trigo onde afirmaram que em geral, as plantas adultas foram mais susceptíveis ao *Mycosphaerella graminicola* do que as plântulas, conclusão esta também obtida por CHONGO & GOSSEN (2001), em grão de bico.

Como a antracnose é uma doença de grande importância no melhoramento da cultura, o presente trabalho prevê identificar os melhores marcadores moleculares do tipo SCAR descritos na literatura para selecionar plantas resistentes à antracnose. Os marcadores selecionados serão avaliados com base no "cálculo da confiança" e o melhor será incorporado como rotina de seleção de plantas resistentes ao programa de melhoramento da instituição. O estudo ainda pretende investigar qual seria o provável gene de maior freqüência na população.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germoplasma de feijoeiro

Foram avaliadas 76 linhagens de feijoeiro resultantes de recombinações genéticas de 42 genitores do programa de melhoramento do Instituto Agronômico (IAC) (Anexo 1). Para validação das raças fisiológicas, foram utilizadas as variedades diferenciadoras adotadas internacionalmente para esta finalidade: Michelite, MRDK, Perry Marron, Kaboon, Cornell 49-242, Widusa, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB 136 e G 2333.

Das 76 linhagens avançadas, 40 encontram-se na geração F_6, 5 na geração F_7 e 30 na geração F_9. As linhagens foram previamente selecionadas em ensaios de competição durante a época da seca nos anos de 2002, 2003 e 2004, nos municípios paulistas de Capão Bonito e Monte Alegre do Sul, baseando-se nos critérios de

produtividade, resistência a doenças no campo e outras características fenotípicas de interesse agronômico como porte de planta e tipo de grão.

3.2 Isolados do patógeno da antracnose

Foram utilizados isolados das raças 31, 65 e 89, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade – IAC, em Campinas – SP.

O isolamento do fungo foi realizado em meio de cultura BDA + antibiótico (batata-dextrose-ágar + tetraciclina a 250 ppm) pelo plaqueamento da suspensão de esporos dos fungos em água estéril. Os fungos foram obtidos a partir de lesões de vagens infectadas e mantidos a 4 ^{o}C pelo método CASTELLANI, modificado por FIGUEIREDO (1967).

Oito sementes de cada acesso e uma testemunha suscetível (Rosinha G_2) foram germinadas em papel Germitest, à temperatura de 25 ^{o}C, por um período de aproximadamente três dias em uma câmara de germinação. Após este período, seis plântulas, com cerca de 2 a 3 cm de comprimento de radícula, foram transplantadas para caixas plásticas contendo vermiculita esterilizada como substrato. Após cinco dias do transplante, as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de 1,2 x 10^6 conídios/mL, com o auxílio de um pulverizador acoplado a uma bomba a vácuo, pulverizando-se o inóculo em ambas as faces das folhas e em toda a superfície das plântulas. A incubação foi realizada em sala climatizada, com temperatura de 20 ^{o}C (± 2 ºC) e umidade relativa de ± 90%, mantida por um nebulizador, separadamente por raça fisiológica de *C. lindemuthianum*, sendo, em seguida, incubadas a 22 ºC (± 2 ºC), por um período de 48 h. Para a produção do inóculo, o patógeno foi cultivado em placas de Petri contendo o meio de Riker modificado (RIKER & RIKER, 1936), com 30 g de aveia, 17 g de ágar e 1.000 mL de água, sendo, posteriormente, incubados a 22 ^{o}C (±1 ^{o}C), no escuro, durante 8 a 10 dias.

As plântulas dos acessos foram classificadas conforme as normas propostas pelo CIAT (1990), utilizando-se de uma escala de notas de 1 (resistentes - sem sintomas) a 9 (suscetíveis – mortas), sete a dez dias após a inoculação. A escala é fixa, ou seja, cada nível específico de sintoma ou de dano corresponde a um número fixo na escala, sendo que as plantas com notas 1, 2 e 3 foram consideradas ‘resistentes’, aquelas com notas 4, 5 e 6 como ‘intermediários’ e aquelas com notas e 7, 8, 9 como ‘suscetíveis’.

3.3 Extração do DNA total das plantas do feijoeiro

Para extração do DNA total, os 42 genitores e as 76 linhagens avançadas foram semeados em vasos em casa de vegetação para posterior coleta de tecido vegetal. A extração foi baseada em protocolo CTAB, adaptado de HOISINGTON et al. (1994). Resumidamente, 0,2 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e depois foram adicionados 800 mL de tampão de extração (pré-aquecidos a 65 ^{o}C com 0,2% de βmercaptoetanol). As amostras foram incubadas por 60 minutos a 65 ^{o}C, agitando-se a cada 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente e então foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) até completar o volume do tubo. As amostram foram agitadas levemente por 1 minuto e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. Após esta etapa, a fase superior foi transferida para um novo tubo e foi adicionado o mesmo volume (do recuperado) de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), agitada levemente por 1 minuto, e a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. A fase superior do tubo foi recuperada em outro tubo e a esta foi adicionado 80% do volume (do recuperado) de isopropanol (gelado). A mistura foi obtida por inversão dos tubos por cerca de 10 minutos, e a seguir, centrifugou-ses por 10 minutos a 5.000 rpm. Após a eliminação do sobrenadante, o DNA total precipitado foi lavado com 300 μL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm e, após a eliminação do sobrenadante, foi deixado para secar na bancada para então suspendê-lo em 200 μL de TE. Os matériais foram tratados com RNAse por 30 minutos em estufa a 37 ^{o}C. Após a extração, a qualidade e o rendimento do DNA total foram visualizados em géis de agarose 1% após eletroforese e tratamento com brometo de etídeo para sua visualização posterior sob luz UV.

O material vegetal (genitores e linhagens avançadas) utilizado para extração foi oriundo de uma única planta, mantida em vaso para a produção de sementes. As sementes produzidas por estas plantas foram guardadas em câmara fria e posteriormente utilizadas no teste com o inóculo.

3.4 Obtenção e visualização dos produtos amplificados a partir dos marcadores SCARs

Os SCARs ligados a *loci* de resistência à antracnose no feijoeiro utilizados no presente estudo encontram-se citados na Tabela 3.

Para obtenção dos amplificados SCARs inicialmente foram testadas as condições experimentais propostas pelos autores dos autores (Tabela 3). Porém, para a maioria dos *loci* estudados foi necessário estabelecer experimentalmente novas condições de reação, tanto para as temperaturas de anelamento como para as concentrações de cada componente da reação de PCR. Para cada reação (25 μL), foram utilizados 75 ng de DNA, 0,02 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl2, 1x Tampão de reação, 1 U da enzima *Taq DNA polymerase* e 5 pmol da cada primer. O termociclador utilizado foi o PTC-100 (MJ Research, Inc).

O marcador molecular SCH20 necessitava, após a amplificação dos fragmentos através da PCR, da digestão do produto de PCR gerado através da enzima DdeI. Os 25 μL obtidos foram então digeridos (0,2 U da enzima DdeI, 1X Tampão de reação). A digestão foi mantida em banho-maria por 3 h e, depois, aplicada em gel de agarose para observação do padrão de digestão.

O volume total da reação de PCR foi disposto num gel de agarose 2% para separação por eletroforese dos produtos amplificados obtidos. Para visualização dos mesmos, o gel foi disposto numa solução contendo brometo de etídeo por 10 min e em seguida iluminado sob luz UV. A imagem obtida dos géis foi digitalizada em fotodocumentador específico e as marcas SCARs interpretadas na forma de presença ou ausência (1 ou 0, respectivamente) para cada *loci* amplificado. Para cada *loci* analisado nas linhagens avançadas, um genótipo controle, portador do gene (resistente), e um não portador do gene (suscetível) foram adicionados para efeito de controle experimental da reação de PCR, assim como uma reação em branco (sem presença de DNA), além de um marcador de peso molecular conhecido.

Para o marcador molecular SCH20, as amostras também foram visualizadas em gel de poliacrilamida a 10%, seguindo metodologia descrita por SANGINATI em 1994.

A combinação dos resultados das análises moleculares e das respostas das inoculações em campo forneceu quatro diferentes respostas: plantas resistentes com presença da marca (R+), plantas resistentes com ausência da marca (R-), plantas

suscetíveis com ausência da marca (S-) e, finalmente, plantas suscetíveis com presença da marca (S+).

Tabela 3: Nome do marcador, *locus*, seqüência, distância do marcador e ao gene, fragmento esperado dos marcadores utilizados, controles positivos utilizados e referências.

SCAR	*Locus*	Seqüência	Distância do marcador ao gene	Fragmento esperado	Controle positivo	Referências
SCH20	*Co-2*	GGG AGA CAT CCA TCA GAC AAC TCC GGG AGA CAT CTT CAT TTG ATA TGC	0,5 cM	450pb	Cornell 49-242	Adam-Blondon, 1994; Geffroy *et al.* 1999
SH18	*Co-4*[2]	CCA GAA GGA GCT GAT AGT ACT CCA CAA C GGT AGG CAC ACT GAT GAA TCT CAT GTT GGG	9,2 cM	1200pb	G 2333	Awale & Kelly., 2001 ; Kelly *et al.* 2003
SAB3	*Co-5*	TGG CGC ACA CAT AAG TTC TCA CGG TGG CGC ACA CCA TCA AAA AAG GTT	5,9 cM	400	TU	Young & Kelly, 1997; Vallejo & Kelly, 2001.
SB12	*Co-9*	CCT TGA CGC ACC TCC ATG TTG ACG CAT GGG TTG GCC	2,9 cM	350pb	BAT 93	Mendez de Vigo *et al.* 2002
SAS13	*Co-4*[2]	CAC GGA CCG AAT AAG CCA CCA ACA CAC GGA CCG AGG ATA CAG TGA AAG	0 cM	950pb	G 2333	Youg *et al.* 1998, Melotto & Kelly, 1998; Kelly *et al.* 2003
SCARY20	*Co-4*	AGC CGT GGA AGG TTG TCA T CCG TGG AAA CAA CAC ACA AT	1,2 cM	830pb	TO	Arruda *et al.* 2000; Queiroz *et al.* 2004
SCARAZ20	*Co-6*	ACC CCT CAT GCA GGT TTT TA CAT AAT CCA TTC ATG CTC ACC	7,1 cM	845pb	AB 136	Alzate-Marin *et al*, 2000; Queiroz *et al.* 2004
SCARZ04	*Co-6*	GGC TGT GCT GAT TAA TTC TGG TCG TCA TTT TAT AAT GGA GAA AAA	2,9 cM	567pb	AB 136	Alzate_Marin *et al.* 1999; Queiroz *et al.* 2004

Para analisar a confiança de cada marcador, assumiu-se como sendo correto os genótipos resistentes com banda e os suscetíveis sem banda e, como erro do marcador, as plantas resistentes sem banda. A ocorrência de plantas resistentes com análise molecular negativa pode ser devido à quebra de ligação entre o gene de resistência e o marcador, por *crossing over*, porém sem causar dano ao gene, o que explicaria a ausência da marca e a resistência aos isolados, inviabilizando, assim, o uso do marcador testado. MOURA (2005) também sugeriu que genótipos resistentes com ausência de fragmentos amplificados provavelmente possuam genes de resistência diferentes dos avaliados.

A confiança de cada marcador foi calculada com base no Esquema 1:

A **Resistente com banda**	**B** **Susceptível sem banda**
C **Resistente sem banda**	**D** **Susceptível com banda**

Confiança = (A + B) / (A + B+ C)

Esquema 1 – Cálculo da confiança do marcador com base nas respostas de comparação entre os testes de inóculo e a análise molecular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das resistências nos genótipos por meio de inoculação do patógeno da antracnose

Para a avaliação dos genótipos quanto à reação de incompatibilidade ou de compatibilidade com as raças 31, 65 e 89 do patógeno da antracnose, seis plântulas de cada genótipo foram infectadas com cada raça do patógeno, seguindo a metodologia de inoculação em plântulas de feijoeiro. As avaliações das reações às raças do patógeno

nos 118 genótipos (42 genitores e suas 76 linhagens) foram realizadas por um único avaliador para diminuir o erro na atribuição das notas, seguindo a metodologia descrita pelo CIAT. Cada análise foi realizada em triplicata para assegurar os resultados obtidos (Anexo 1).

Antes de cada avaliação, as raças fisiológicas 31, 65, 89 foram validadas nas variedades diferenciadoras para certificação das mesmas. Com base nos dados obtidos através da inoculação das plantas, foi observado que 22,0% dos genitores e 48,3% das linhagens foram resistentes ao patógeno da antracnose para a raça 31. Esse resultado indica que o tipo de seleção fenotípica realizado pelo programa de melhoramento do IAC tem sido eficiente em selecionar materiais resistentes a esta raça do patógeno (Figura 1).

Para a raça 65, foi observado que 22,0% dos genitores e 54,2% das linhagens são resistentes ao patógeno da antracnose, mais uma vez indicando que o tipo de seleção fenotípica realizado pelo programa de melhoramento do IAC é eficiente em selecionar materiais resistentes a essa doença (Figura 2).

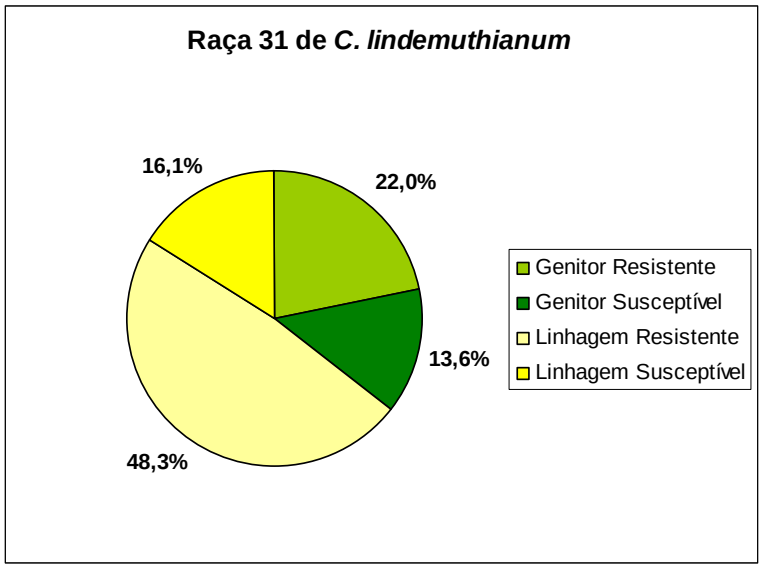

Figura 1: Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 31 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*).

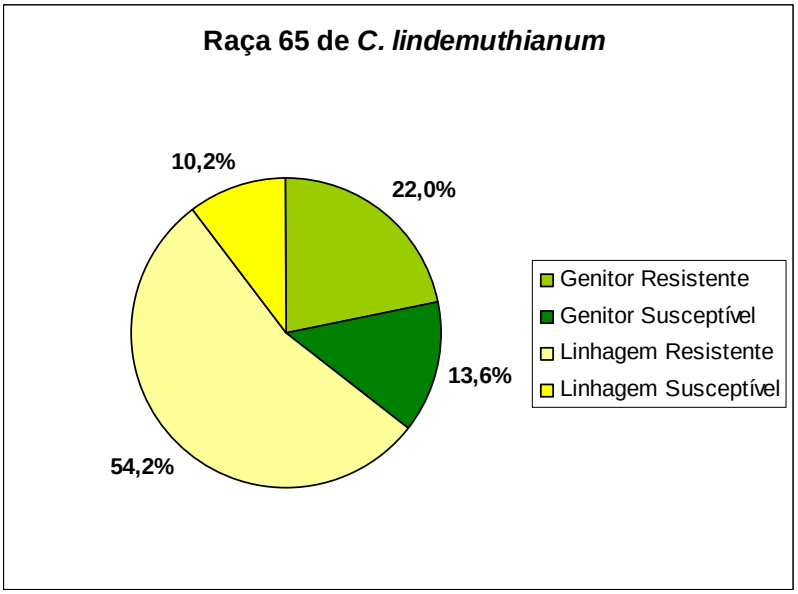

Figura 2: Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 65 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*).

Para a raça 89, foi observado que 18,6% dos genitores e 48,3% das linhagens são resistentes ao patógeno da antracnose (Figura 3).

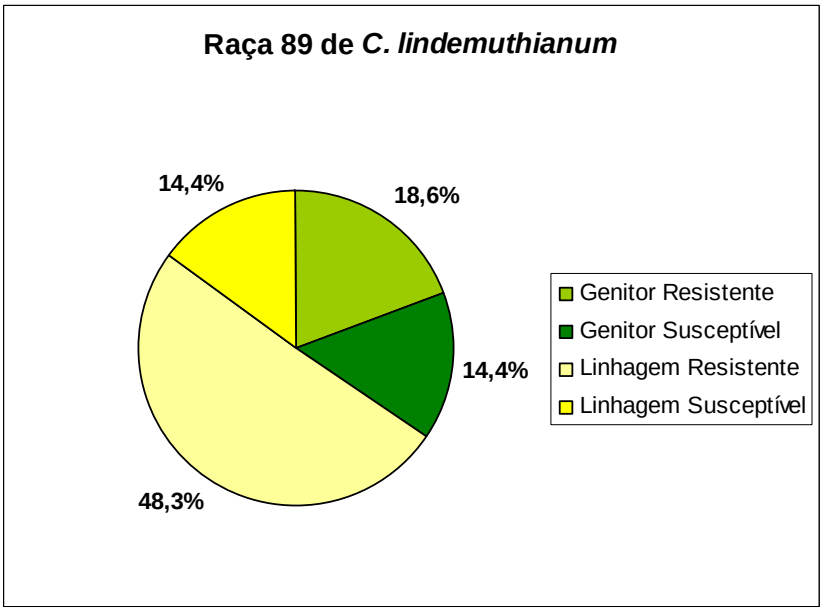

Figura 3: Resposta de plântulas de feijoeiro (linhagens e cultivares empregados como genitores) submetidos a inoculações com a raça 89 do patógeno da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*).

Com esses resultados, pode-se inferir que a raça 31 é a de maior ocorrência em relação aos materiais do estudo, infectando 16,1% das linhagens analisadas (Figura 1), contra 14,4% para a raça 89 (Figura 3) e 10,2 % para a raça 65 (Figura 2). Já a raça 89 é a raça mais agressiva para os genitores, infectando 14,4% dos materiais analisados (Figura 3), contra 13,6% para as raças 31 (Figura 1) e 65 (Figura 2). Resultados semelhantes demonstrando a maior agressividade da raça 89 do *C. lindemuthianum* também foram descritos por CARBORNELL et al. (1999), CHIORATO (2004) CARBONELL et al. (2005) e MOURA (2005), CHIORATO et al. (2006). O baixo número de indivíduos susceptíveis é um resultado positivo da seleção fenotípica realizada pelo programa de melhoramento da Instituição, que tem como objetivo a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno da antracnose. Neste caso pode-se afirmar que a metodologia da inoculação com as três raças do patógeno do presente estudo foi eficaz na seleção e na identificação de genótipos resistentes e susceptíveis, contrariando os resultados obtidos por BIGIRIMANA & HÖFTE (2001) que afirmam que esta metodologia é pouco eficaz em selecionar genótipos resistentes à antracnose.

A Figura 4 apresenta diferentes padrões de resposta às raças 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum* dos genótipos de feijoeiro do estudo. Com base nessa figura, assim como no Anexo 1, pode-se concluir que a maioria dos genótipos é resistente às três raças de *C. lindemuthianum*, sendo 45 linhagens e 17 genitores (AND 277, Cal 143, Chileno, G 2338, G 5686, IAC-Carioca Akytã, IAC- Carioca Aruã, IAC-Carioca Eté, IAC-Carioca Pyatã, IAC- Maravilha, IAC- Una, IAC- Carioca Tybatã, Jalinho Itararé, L317-1, Pompadour, Vax 1, Jabola). Resultados semelhantes também foram obtidos por CARBONELL *et al.* (2005), tendo as cultivares IAC-UNA, IAC-Maravilha, IAC-Aruã, IAC- Akytã, IAC-Pyatã, IAC- Tybatã, IAC- Eté, G5686, IAPAR-14, Chileno e Jabola, apresentado resistência para as três raças do patógeno causador da antracnose. Estes resultados justificam a utilização desses genótipos como genitores doadores de genes do programa de melhoramento de feijoeiro da Instituição.

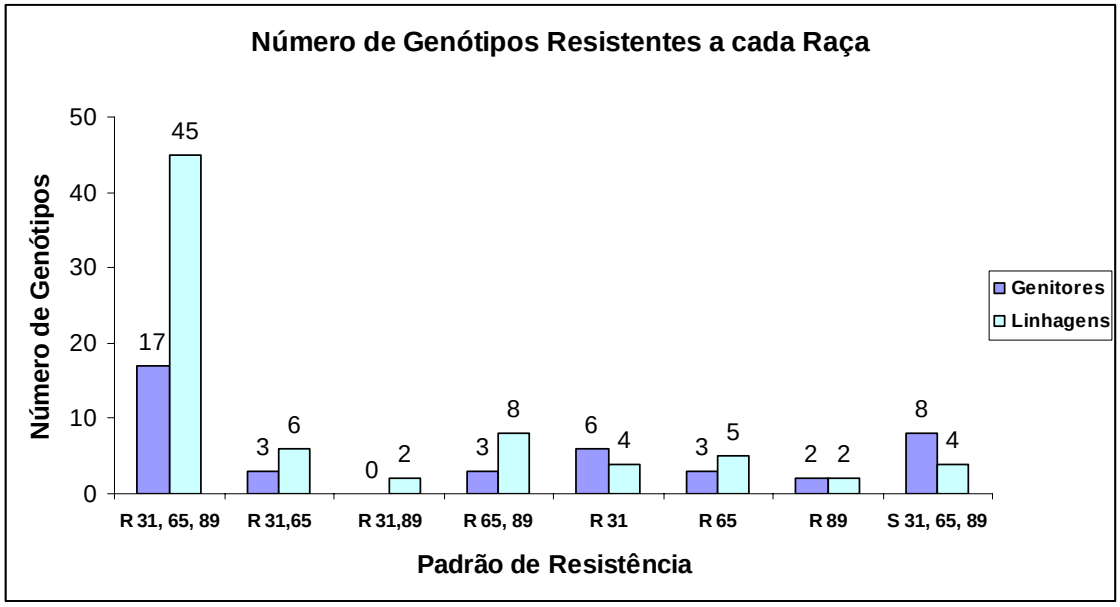

Figura 4: Diferentes padrões de resposta em plântulas de feijoeiro às raças 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum*, onde R são genótipos resistentes e S genótipos susceptíveis.

Existem ainda quatro linhagens e oito genitores susceptíveis às três raças da doença, porém vale ressaltar que a resistência à antracnose não é o único fator de seleção utilizado no programa. Desta forma, estes genótipos devem apresentar outras características agronômicas de interesse comercial. Também se pode observar um baixo número de genótipos resistentes somente à raça 89 (dois genitores e duas linhagens), à raça 65 (três genitores e cinco linhagens) e à raça 31 (seis genitores e quatro linhagens). Estes resultados podem ser explicados pela grande presença dos chamados "genes maiores", que conferem resistência a diversas raças do patógeno, diminuindo, assim, o número de genótipos resistentes a apenas uma raça fisiológica.

4.2 Detecção de genes candidatos de resistência às raças fisiológicas 31, 65 e 89 de *C. lindemuthianum* nos genótipos do IAC

Para o presente estudo foram selecionados oito marcadores moleculares do tipo SCAR, citados em literatura, com base na importância dos genes a eles ligados ao programa de melhoramento do IAC (Tabela 2). A análise da confiança dos mesmos teve por finalidade saber qual seria o potencial desses marcadores em trabalhos futuros de seleção assistida de linhagens resistentes às raças 31, 65 e 89 do patógeno da antracnose. Outra utilização desta técnica seria o uso, como rotina, em linhagens

avançadas para a identificação e seleção de quais e quantos genes de resistência foram incorporados na recombinação de genitores doadores de genes de resistência.

Desta forma, os oito marcadores foram testados em 42 genitores e 76 linhagens derivadas da recombinação entre esses genitores. De uma forma geral, os marcadores moleculares mostraram-se eficientes no estudo. Uma das principais vantagens desta técnica é a facilidade na obtenção e na avaliação dos dados, uma vez que a análise é feita através da observação da presença ou da ausência do fragmento único amplificado pelo marcador. Apesar disso, alguns marcadores foram mais eficientes do que outros, produzindo amplificados de melhor visualização.

4.3 Marcadores Inespecíficos

SCH20

O marcador SCH20 flanqueia o gene *Co-2*. A amplificação teve como controle positivo, isto é, a fonte de resistência do gene, a cultivar Cornell 49-242 e, como controle negativo, a cultivar Rosinha G_2, altamente susceptível. Este marcador, diferentemente dos demais, necessitava, para a diferenciação dos materiais resistentes dos susceptíveis, da realização de digestão do fragmento de 450 pb amplificado via PCR (Figura 5a) com a enzima de restrição *DdeI*, resultando em dois fragmentos, de 314 e 136 pb. Apesar da digestão com a enzima indicada, não foi possível identificar diferenças entre o padrão de digestão do controle positivo e do controle negativo (Figura 5b).

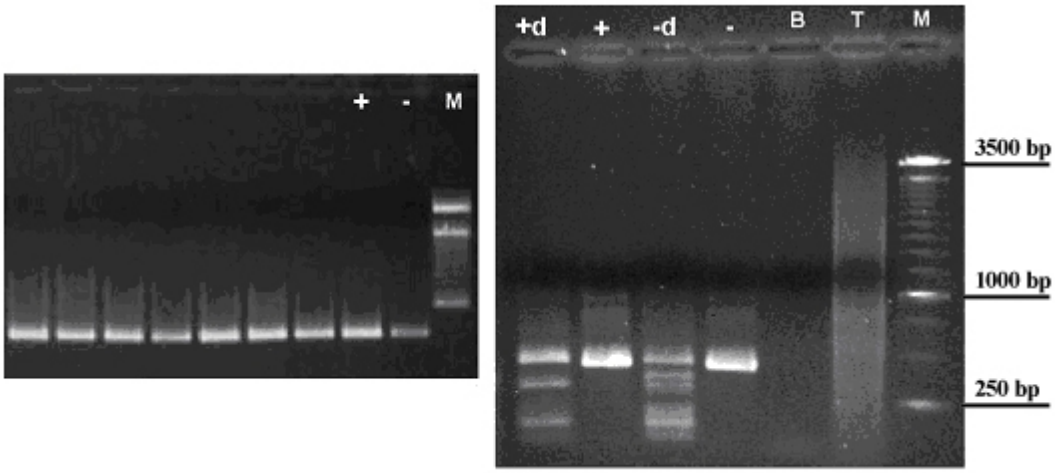

Figura 5a: Gel de agarose (1,5%) para visualização da reação de amplificação sem a distinção dos genótipos Resistentes e Susceptíveis. **Figura 5b**: Visualização após digestão com a enzima *DdeI*, sem a distinção das amostras portadoras ou não da marca, destacando-se o controle positivo (Cornell 49-242, +), o controle positivo digerido com *DdeI* (Cornell 49-242, +d), o controle negativo (Rosinha G_2, -), o controle negativo digerido com *DdeI* (Rosinha G_2, -d), e o marcador de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen, M) em feijoeiro.

O marcador apresentou os mesmos resultados obtidos por GEFFROY et al. (1999), que constataram que duas cultivares susceptíveis (BAT 93 e TO) apresentaram a banda associada à resistência. Os autores constataram que após a digestão com a enzima *Dde I* e também com outras enzimas não houve diferenciação entre os genótipos resistentes e susceptíveis. Todos os genótipos apresentavam o mesmo padrão de digestão, incluindo a banda de 136 pb, demonstrando assim a ineficiência desse marcador ao diferenciar os genótipos resistentes dos susceptíveis.

Além disso, os autores afirmaram que o marcador SCH20 pode se ligar em genótipos mesoamericanos que não possuem o gene *Co-2,* e desta forma, os autores assumem que este marcador é eficaz apenas para identificar genótipos originários de germoplasma Andino, inviabilizando ainda mais seu uso no programa de melhoramento do IAC, pois os genótipos utilizados no presente estudo possuem, em sua maioria, base genética Mesoamericana.

Outro ponto negativo observado no marcador é a utilização de enzimas de restrição, o que inviabiliza o marcador como uso rotineiro no programa devido ao elevado custo para a aplicação da técnica como rotina de seleção de genótipos resistentes.

Como não foi possível diferenciar os genótipos resistentes e susceptíveis em géis de agarose, os mesmos foram migrados em géis de poliacrilamida a 10% (SANGINATI, 1994) e também não foi encontrado nenhuma diferenciação (Figura 6) entre os genótipos. Desta forma, este marcador foi excluído da análise e por ser um gene de importância ao melhoramento da cultura, novos marcadores deverão ser desenvolvidos e testados em trabalhos futuros. O ideal seria encontrar um marcador próximo ao gene nos Mesoamericanos.

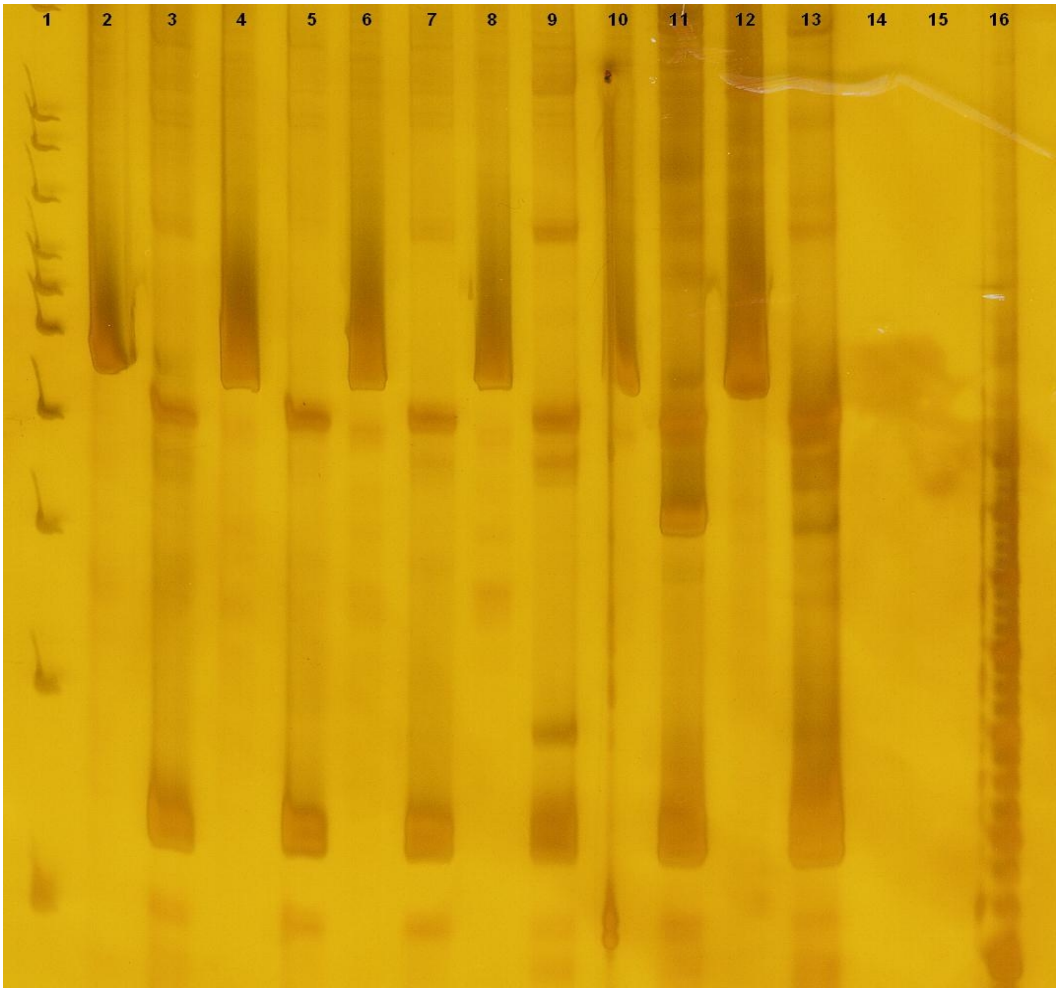

Figura 6: Gel de acrilamida (10%) da reação de amplificação via PCR e visualização após digestão com a enzima *DdeI*, sem a distinção das amostras portadoras ou não da marca. Destacando: nas canaletas 1 e16 os marcadores de peso molecular de 100 e 10 pb (New England e Invitrogen, respectivamente); nas canaletas 1, 4, 6, 8, 10 e 12, as reações de PCR não digeridas dos genótipos Cornell 49-242, IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Aruã (controles positivos do gene), Rosinha G_2, A 300 e TO (controles negativos do gene); nas canaletas 3, 5, 7, o perfil de digestão dos genótipos (Cornell 49-242, IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Aruã, controles positivos respectivamente) e 9, 11, 13 (Rosinha G_2, A 300 e TO, controles negativos respectivamente) e na canaleta 14, reação de PCR em branco e na canaleta 15, reação de digestão em branco.

SCARZ04

O marcador SCARZ04 flanqueia o gene *Co-6*. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar fonte de resistência desse gene AB 136, e como controle negativo a cultivar Rosinha G_2, altamente susceptível. ALZATE-MARIN et al. (1999) relataram que o marcador RAPD, que originou o marcador SCAR, apresentou uma confiança de 95% em selecionar genótipos resistentes e susceptíveis. Porém, ALZATE-MARIN *et al.* (2000) confirmaram em cruzamentos realizados entre as cultivares Rudá (S) e AB 136 (R), que o marcador RAPD $OPZ04_{560}$ não foi polimórfico entre os genitores, e desta forma, não pôde ser utilizado.

Durante as amplificações efetuadas em laboratório, foi possível observar que assim como o marcador RAPD $OPZ04_{560}$, o marcador dele derivado (SCARZ04) também não foi polimórfico entre o padrão de amplificação dos genótipos resistentes dos susceptíveis, mesmo após a otimização das reações (Figura 7). Este fato pode explicar a ineficiência desse marcador ao selecionar genótipos resistentes e susceptíveis encontrada no presente estudo. Desta forma, este marcador também foi excluído das análises do programa de melhoramento do IAC.

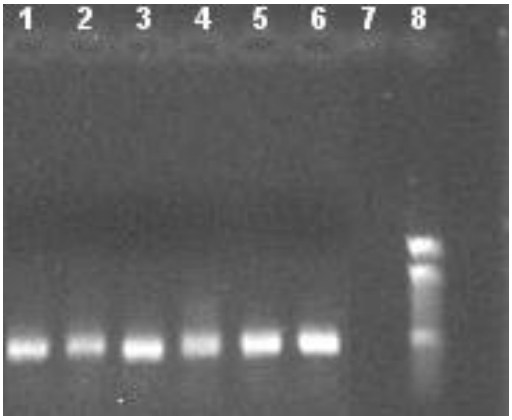

Figura 7: Resultado da amplificação do marcador SCARZ04 em gel de agarose (1,5%), demonstrando a inespecificidade das marcas, destacando-se, o controle positivo na canaleta 5 (AB 136 +), o controle negativo na canaleta 6 (Rosinha G_2, -) e a reação em branco na canaleta 7 e na canaleta 8, e o marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder, New England Biolabs, M) em feijoeiro.

Para ambos marcadores, uma alternativa de diferenciação dos genótipos resistentes dos susceptíveis poderia ser a visualização em géis de acrilamida no lugar de géis de agarose, uma vez que o primeiro é mais eficiente em separarem amplificados. Entretanto, o objetivo principal do presente estudo é a introdução da utilização dos SCARs na seleção de genótipos resistentes à antracnose como rotina de trabalho e a utilização de enzimas na diferenciação dos fragmentos e na separação dos mesmos em géis de acrilamida, elevariam os custos em programas de melhoramento.

4.4 Marcadores avaliados para a raça 31 de *C. lindemuthianum*

Para selecionar genótipos resistentes e susceptíveis à raça 31, foram utilizados os marcadores moleculares SCARs: SH18, SAB3, SB12, SAS13, SCARY20, SCARAZ20, descritos na Tabela 3.

Os cálculos de confiança do marcador foram feitos de acordo com o Esquema 1, que foi baseado no trabalho de BIGIRIMANA & HÖFTE (2001), onde assumiu-se que as plântulas susceptíveis, porém, com a banda do marcador, deveriam ser excluídas das análises, uma vez que não se pode afirmar se realmente são susceptíveis quando adultas. MOURA (2005) afirmou que as plantas susceptíveis que amplificaram marcadores ligados a genes de resistência indicam que, apesar da existência de algum gene de resistência, este não seja suficiente para condicionar resistência à doença, ressaltando que poderia ocorrer uma interação gênica do tipo "raça-específico". Nos genótipos susceptíveis com banda também pode ter ocorrido uma mutação espontânea no gene, que apesar de apresentar o fragmento amplificado, não conferiu resistência ao gene, ou seja, tornando o gene não funcional. Da mesma forma, nos genótipos resistentes sem amplificação poderia ter ocorrido mutações, levando à perda ou à quebra da seqüência do marcador, porém, sem causar dano ao gene.

Outra hipótese para explicar a ocorrência de genótipos susceptíveis, porém, com analise molecular positiva é explicado por SUDUPAK et al. (1993), onde os autores afirmam que os loci de resistência que possuem alelos com seqüências duplicadas capazes de despareamento e recombinação podem sofrer instabilidade meiótica, levando a ausência de eventos intracromossomais com desigual troca das cromátides irmãs ou ainda, recombinação entre as cromátides, o que levaria a uma perda da seqüência duplicada.

Marcador SH18

O marcador SH18 flanqueia o gene *Co-4*^{2}. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar fonte de resistência G 2333, e como controle negativo, uma cultivar do programa de melhoramento, altamente susceptível (Rosinha G_2). Este marcador mostrou-se pouco eficiente ao selecionar indivíduos portadores ou não da resistência à antracnose nos genótipos estudados (Figura 8), com confiança de 40,5% nos genitores e 36,8% nas linhagens (Figura 15).

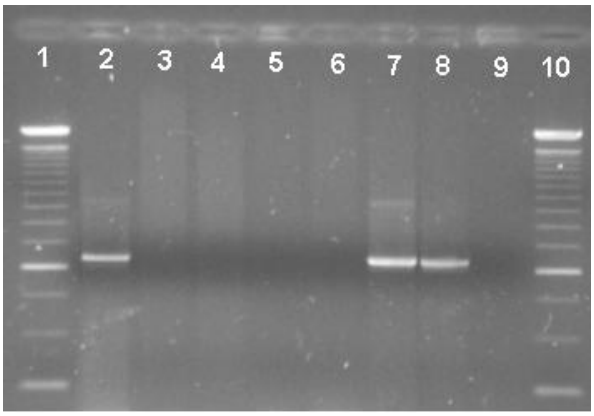

Figura 8: Gel de agarose (1,5%) para visualização do amplificado de 1100 pb oriundo do marcador SH18, destacando-se nas canaletas 1 e 10 o marcador de peso molecular (250pb DNA Ladder, New England Biolabs, M), na canaleta 2 um genótipo resistente portador da marca (Gen96A13 P3-6-1B-2), nas canaletas 3 – 6 amostras susceptíveis com ausência da marca (A300, Pérola, G 916 e Leg Pintado, respectivamente), na canaleta 7 um genótipo susceptível ao inoculo, porém com análise molecular positiva (Gen96A13 P2-1-1B-1) e o controle positivo do marcador(G 2333), na canaleta 8 e na canaleta 9, a reação em branco em feijoeiro.

Marcador SAB3

O marcador SAB3 flanqueia o gene *Co-5*. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar fonte de resistência desse gene, a cultivar TU, e como controle negativo foi utilizado a cultivar altamente susceptível Rosinha G_2. Este marcador mostrou uma confiança de 62,2% nos genitores e de 49,3% nas linhagens (Figura 15), ao identificar os genótipos portadores da resistência (Figura 9), apesar de apresentar amplificados de menor intensidade. Genótipos contendo bandas de menor intensidade foram avaliados novamente quanto à resistência ao inoculo, e tendo sido

confirmada a resistência dessas plantas. Desta forma, as bandas de menor intensidade também devem ser associadas à marca.

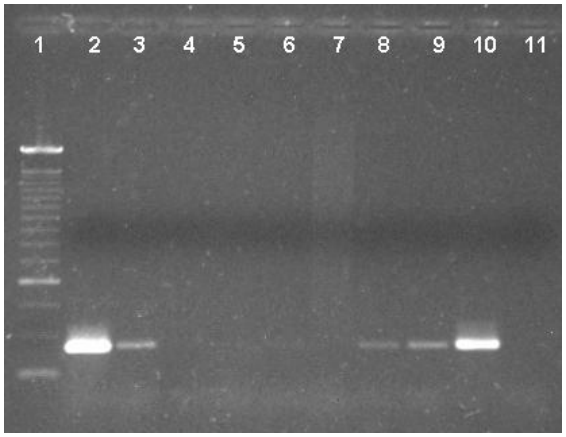

Figura 9: Gel de agarose (1,5%) para visualização da banda de 400 pb do marcador SCAR SAB3. Canaleta 1, marcador de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen, M); canaletas 2 e 3, genótipos resistentes portadores da marca (G 2338 e Vax 1); canaletas 4-7, genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300, Carioca Precoce, Rosa 700 e Carioca Comum); canaletas 8 e 9, genótipos susceptíveis com presença da marca (G 916 e Pérola); canaleta 10, controle positivo (TU); canaleta 11, reação em branco.

Marcador SB12

O marcador SB12 flanqueia o gene *Co-9*. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar fonte de resistência desse gene, BAT 93 e, como controle negativo a cultivar Rosinha G_2, altamente susceptível. Este marcador apresentou confiança de 50% nos genitores e de 65,8% nas linhagens (Figura 10) na seleção de genótipos resistentes ao patógeno da antracnose (Figura 15).

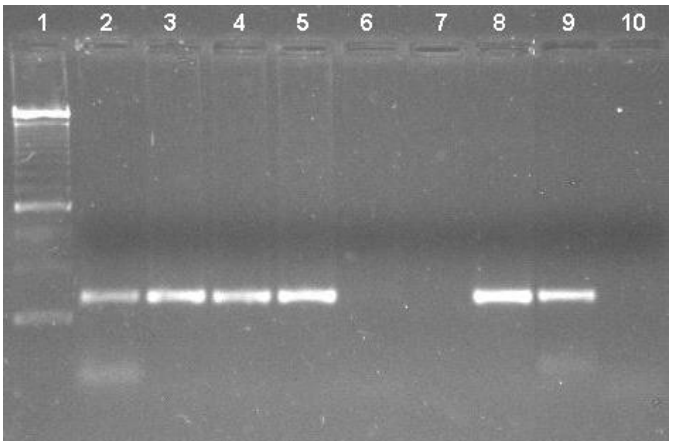

Figura 10: Amplificação com o marcador SB12, visualizando amplificado de 350 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas. Canaleta 1, marcador de de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen, M); canaletas 2 – 5, genótipos resistentes portadores da marca (IAC Carioca Aruã, Mar. 2, Pompadour e Vax 1); canaletas 6 e 7, genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300 e Carioca Precoce); canaleta 8, genótipo susceptível com presença da marca (G 916);canaleta 9, o controle positivo (BAT93); canaleta 10, a reação em branco.

Marcador SAS13

Para o marcador do gene *Co-4*^{2}, a reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar G 2333, fonte original de resistência desse gene, e Rosinha G_2 como controle negativo em função da sua alta susceptibilidade. Este marcador teve confiança de 82,8% nos genitores e de 73% nas linhagens (Figura 15), ao selecionar genótipos resistentes à raça 31 da antracnose (Figura 11).

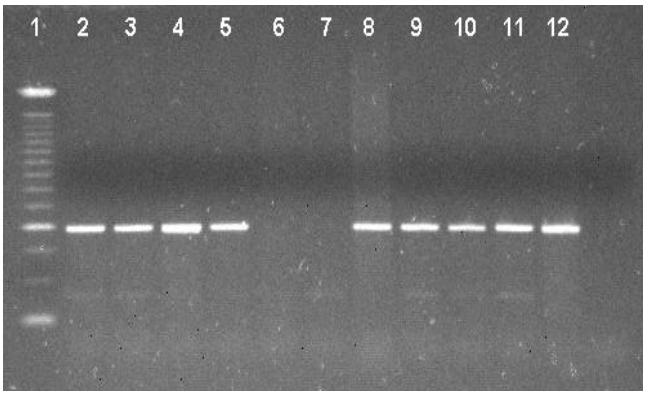

Figura 11: Amplificação com o marcador SAS13 visualizando amplificado de 950 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando-se na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen, M), nas canaletas 2 – 5, genótipos resistentes portadores da marca (AND 277, Chileno, G 2338 e IAC Carioca Akytã, respectivamente), nas canaletas 6 e 7, genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300 e Rosa 700), na canaleta 8-11, genótipos susceptíveis com presença da marca (Carioca Comum, Carioca precoce, G 916 e Pérola), na canaleta 12, o controle positivo (G 2333), e na última canaleta, a reação em branco.

Marcador SCARY20

O marcador SCARY20 flanqueia o gene *Co-4*. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar TO, resistente e, a cultivar Rosinha G_2, susceptível, como controle negativo (Figura 12). Por marcar o gene *Co-4*, que é pouco freqüente no programa de melhoramento do feijoeiro do IAC, a confiança do marcador foi baixa, de 40,5% nos genitores e de 25% nas linhagens (Figura 15).

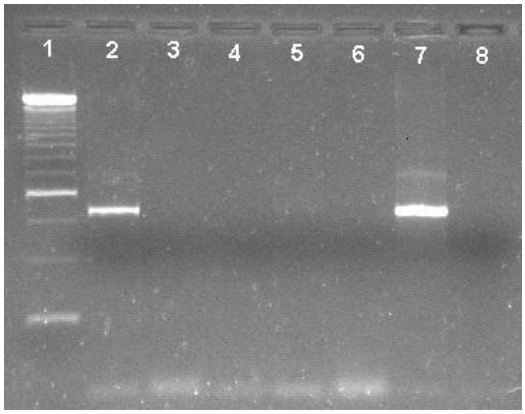

Figura 12: Amplificação com o marcador SCARY20 visualizando amplificado de 830 pb em gel de agarose (1,5%). Canaleta 1; marcador de de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen); canaleta 2, genótipo resistente portador da marca (G 2338); canaletas 3-6, genótipos susceptíveis com ausência da marca (A 300, Bataav, Carioca precoce e G916); canaleta 7, controle positivo (TO); canaleta 8, a reação em branco.

Marcador SCARAZ20

O marcador SCARAZ20 flanqueia o gene *Co-6*. A reação de amplificação teve como controle positivo a cultivar fonte de resistência AB 136 e, como controle negativo, a cultivar altamente susceptível Rosinha G_2. De todos os marcadores utilizados para selecionar genótipos resistentes à raça 31 da antracnose (Figura 13), este foi o marcador que apresentou melhor confiança, sendo de 88,9% nos genitores e de 76,7% nas linhagens (Figura 14).

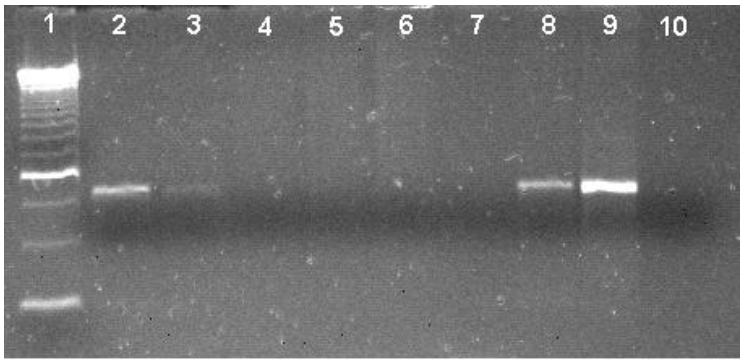

Figura 13: Amplificação com o marcador SCARAZ20 visualizando amplificado de 845 pb em gel de agarose (1,5%) para amostras positivas, destacando-se na canaleta 1 o marcador de de peso molecular (250 pb DNA Ladder, Invitrogen, M), na canaleta 2 e 3, genótipos resistentes portadores da marca (AND 277 e G 2338), nas canaletas 4-7, genótipos susceptíveis com ausência da marca (Gen99TG48-37-1, Gen96A46 51-1-1-1-52, Carioca comum e Rosa 700), na canaleta 8, genótipo susceptível com presença da marca (G 916) na canaleta 9, o controle positivo (AB 136) e, na canaleta 10, a reação em branco.

Com base nos dados de amplificação dos marcadores (Anexo 2) e nas respostas das inoculações realizadas nas plântulas foi possível calcular a confiança dos marcadores utilizando a fórmula sugerida (Esquema 1). Desta forma, para padronizar a seleção assistida por marcadores moleculares visando selecionar cultivares resistentes à antracnose, elegeu-se como sendo os mais indicados para a raça 31 os marcadores SCARAZ20 (*Co-6*) e o SAS13 ($Co\text{-}4^2$), com mais de 80% de confiança cada um (Figura 15).

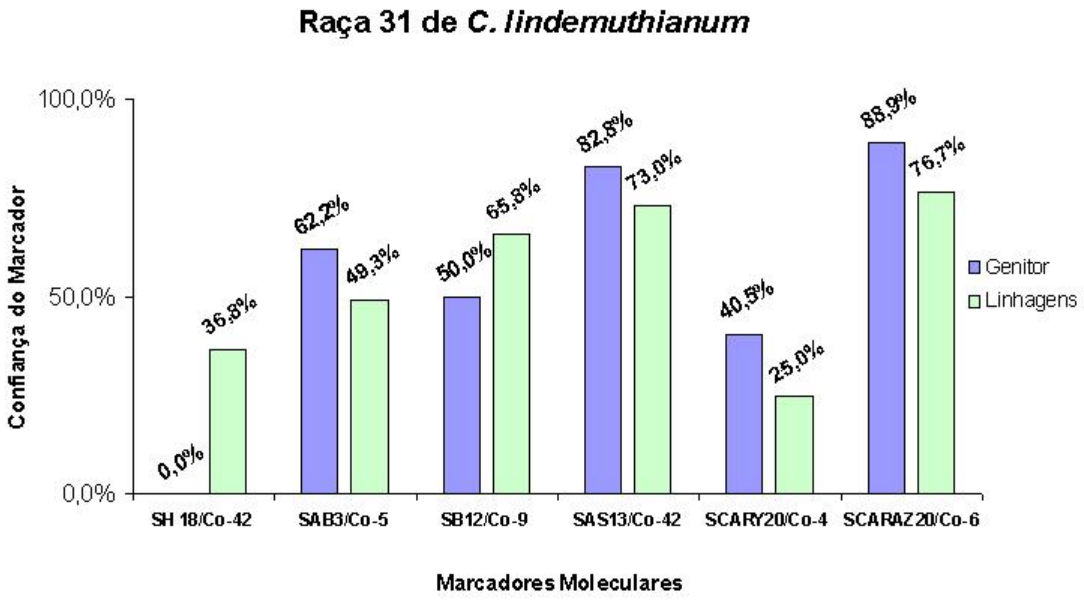

Figura 14: Histogramas representando a confiança (em porcentagem) de marcadores SCARs em relação à raça 31 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro.

4.5 Marcadores avaliados para a raça 65 de *C. lindemuthianum*

Foram utilizados os marcadores moleculares SCARs: SH18, SAB3, SB12, SAS13, SCARY20, SCARAZ20 (Tabela 3), para selecionar genótipos resistentes e susceptíveis a raça 65. Para o cálculo de confiança dos mesmos foi adotado o mesmo critério apresentado para a raça 31. O perfil de amplificação de cada marcador foi o mesmo encontrado para a raça 31 (Anexo 3).

Da mesma forma que para a raça 31, a confiança do marcador SCARAZ20 foi a mais alta, seguido também pelo marcador SAS13. Desta forma, os marcadores de melhor desempenho para a raça 65 são os mesmos selecionados para a raça 31, ou seja, SCARAZ20 (*Co-6*) e o SAS13 (*Co-4*^{2}), com confiança de aproximadamente 94% e 83%, respectivamente (Figura 15).

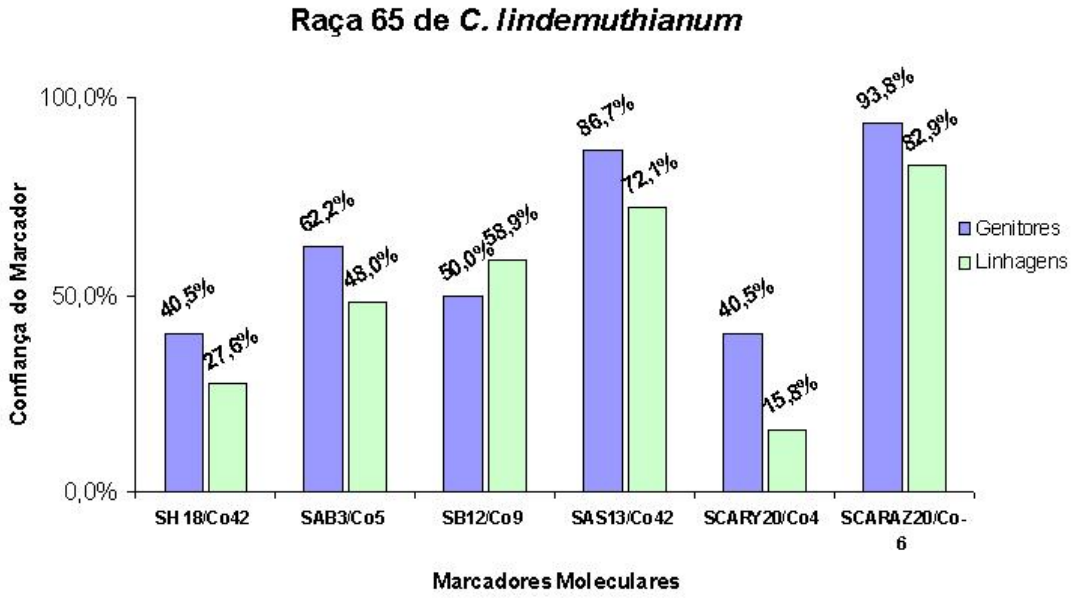

Figura 15: Histogramas representando a confiança (em porcentagem) de marcadores SCARs em relação à raça 65 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro.

4.6 Marcadores avaliados para a raça 89 de *C. lindemuthianum*

Para selecionar genótipos resistentes e susceptíveis à raça 89 foram utilizados os marcadores SCARs: SH18, SAB3, SB12, SAS13, SCARY20, SCARAZ20 (Tabela 3). O cálculo de eficiência foi o mesmo adotado para os demais marcadores, da mesma forma que o padrão de amplificação de cada marcador foi o mesmo descrito para a raça 31 (Anexo 2).

De forma análoga ao que ocorreu com as raças 31 e 65, o marcador SCARAZ20 apresentou maior eficiência, seguido do marcador SAS13. Assim, os marcadores de melhor desempenho para a raça 89 são os mesmos selecionados para a raça 31 e 65, ou seja, SCARZ20 (*Co-6*) e o SAS13 (*Co-4*^{2}), com confiança de aproximadamente 96% e 81% respectivamente (Figura 16).

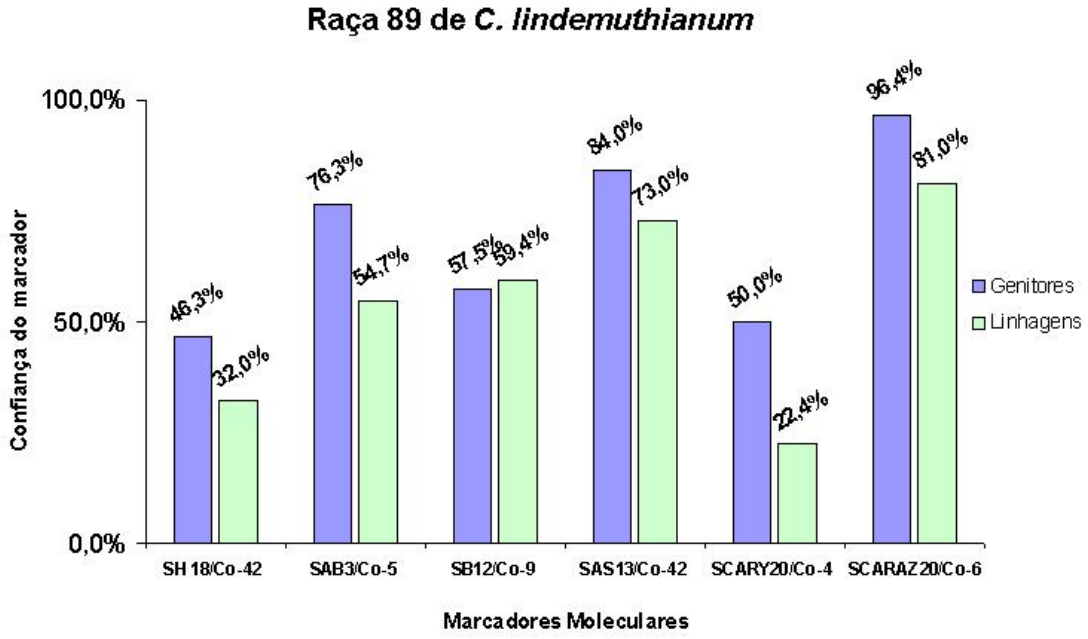

Figura 16: Histogramas representando a confiança (em porcentagem de marcadores SCARs em relação à raça 89 de *C. lindemuthianum* em genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro.

Na introdução da prática da seleção assistida por marcadores para identificação de linhagens resistentes às três raças do patógeno da antracnose (31, 65 e 89), em substituição aos procedimentos de inoculação do patógeno, os marcadores SCARs: SCARZ20, SAS13 e o SAB3 seriam os mais apropriados para implementação no programa de melhoramento de feijoeiros do IAC.

Os marcadores SAS13 e SH18 marcam o gene *Co-4*^{2}, o primeiro apresentou uma melhor confiança, porém, AWALE & KELLY (2001) afirmaram que o marcador SH18 é mais preciso uma vez que, segundo os autores, o marcador SAS13 amplifica diferentes alelos do *Co-4,* inclusive o gene *Co-4*^{3} presente na cultivar PI 207262 (ALZATE-MARIN et al. 2007). Isto não inviabiliza o uso deste marcador no programa, mas se desejar-se detectar apenas genótipos portadores do gene *Co-4*^{2}, o marcador ideal seria o SH18.

Quanto mais próximo estiver o marcador do gene ao qual encontra-se ligado mais eficiente será a seleção por meio do mesmo, tendo em vista a possibilidade de quebra de ligação entre ambos. No caso dos marcadores SCARAZ20 e SAB3, cujas distâncias de ligação ao gene são de 7,1 e 5,9 cM, respectivamente, apesar da confiança desses marcadores, ocorreu um elevado índice de marcas inesperadas (Tabela 4), sendo tal valor maior para o marcador mais distante do gene, conforme esperado. Porém, o

marcador SAS13, cuja distância de ligação é de 0 cM (Tabela 4), também apresentou um número relativamente grande de marcas inesperadas, ou seja, plantas susceptíveis com banda. De acordo com BIGIRIMANA & HÖFTE (2001), plântulas susceptíveis podem se tornar resistentes quando adultas devido à expressão tardia de genes de resistência da planta. Assim, a exclusão das observações de plantas suscetíveis com marcas de resistência foi correta para fins de cálculo da confiança.

Tabela 4: Nome do marcador, *locus*, distância do marcador do gene, confianças do marcador para as três raças de *C. lindemuthianum.*

SCAR[a]	Gene	Dist[b]	Raça 31		Raça 65		Raça 89[c]	
			C[c] G / L	Inesp[d] G / L	C[c] G / L	Inesp[d] G / L	C[c] G / L	Inesp[d] G / L
SH18	*Co-4²*	9,2	40,5 / 36,8	0 /0	40,5 / 27,6	0 / 0	46,3 / 32,0	1 / 1
SAB3	*Co-5*	5,9	62,2 / 49,3	5 / 5	62,2 / 48,0	5 / 1	76,3 / 54,7	4 / 1
SB12	*Co-9*	2,9	50,0 / 65,8	2 / 3	50,0 / 58,9	2 / 3	57,5 / 59,4	2 / 6
SAS13	*Co-4²*	0	82,8 / 73,0	13 /13	86,7 / 72,1	12 / 8	84,0 / 73,0	16 / 11
SCARY20	*Co-4*	0	40,5 / 25,0	0 /0	40,5 / 15,8	0 / 0	50,0 / 22,4	0 / 0
SCARAZ20	*Co-6*	7,1	88,9 / 76,7	15 / 16	93,8 / 82,9	10 / 6	96,4 / 81,0	14 / 11

[a]Marcador molecular do tipo SCAR;
[b]Distância do marcador ao gene, em cM;
[c]Confiança do marcador nos genitores (G) e linhagens (L), em %;
[d]Dado inesperado: genitores (G) e linhagens (L) susceptíveis ao inóculo com o patógeno *C. lindemuthianum*, com resultado positivo na análise molecular.

Os marcadores moleculares SCARs também podem ser utilizados com eficácia na seleção de genótipos contendo genes específicos de interesse. Neste caso, cada marcador está relacionado a uma raça específica e deve ser utilizado então como rotina no programa de melhoramento do IAC. Além disso, isolinhas contendo diferentes genes de resistência podem ser criadas, com o auxílio dos marcadores moleculares, que selecionarão apenas as linhagens contendo os genes de interesse, facilitando, assim, o trabalho do melhorista e reduzindo os gastos no campo e o tempo, a exemplo do sucesso obtido com esta prática por vários autores (MELOTTO & KELLY , 1998, ARRUDA et al., 2000, VALLEJO & KELLY, 2001, AWALE & KELLY, 2001 e ALZATE-MARIN et al., 2002).

4.7 Identificação de genes de resistência

Com base nos dados obtidos por meio dos marcadores moleculares (Anexo 2), observou-se que a maioria dos genitores do programa de melhoramento do IAC possui ao menos três genes de resistência em um único genótipo (Figura 17). Quatro foi o maior número de genes associados aos genitores, encontrado em três cultivares (G 2338, Pompadour, Vax 1), enquanto que, para as linhagens, nove apresentaram quatro genes de resistência, com destaque para as linhagens Gen96A5 P1-1, Gen99TG 35-29, Gen99TG 47-38-2, Gen96A98 12-1-51-1, de grão carioca, Gen96A3 P4-1-1 de grão preto e Gen96A100 6-1-53-1 de grão rosinha, a outras linhagens, Gen99TG 36-9, Gen96A14 7-3-153V-2, Gen99TG 50-47 de grãos mulatinho, vermelho e rajado respectivamente (Anexo 3). Estas linhagens poderão ser indicadas para lançamento como cultivar ou serem incluídas em futuros blocos de cruzamento.

Outros nove genitores (A 300, Carioca Precoce, G 916, Irai, Leg Pintado, Pérola, Quarenteno, Rosa 700 e Carioca Comum) (Figura 17) e vinte e cinco linhagens não apresentaram nenhum gene de resistência. Porém, isso não é um dado alarmante, uma vez que não se utilizou marcador para todos os genes. Além disso, esses genótipos são utilizados nos cruzamentos dirigidos para fornecerem outras características de interesse agronômico, além da resistência à antracnose.

Assim, pode-se afirmar que os marcadores moleculares, além de serem eficientes na seleção assistida de genótipos resistentes em gerações precoces, também podem ser utilizados para seleção assistida em retrocruzamentos e cruzamentos múltiplos, pois também foi possível identificar a presença da marca/resistência nos genitores.

Outra estratégia para a utilização dos marcadores moleculares é o uso em gerações avançadas (linhagens), para a verificação da presença dos genes de resistência. Essa característica pode ser utilizada pelos melhoristas como fator de seleção de linhagens superiores e passíveis de se tornarem novas cultivares de feijoeiro, desde que seja aliado a outras características de interesse agronômico, tecnológico e nutricional. Isto é importante, pois, teoricamente, quanto maior for o número de genes envolvidos na resistência a um determinado patógeno em uma linhagem determinada, mais duradoura e eficiente será a sua resistência.

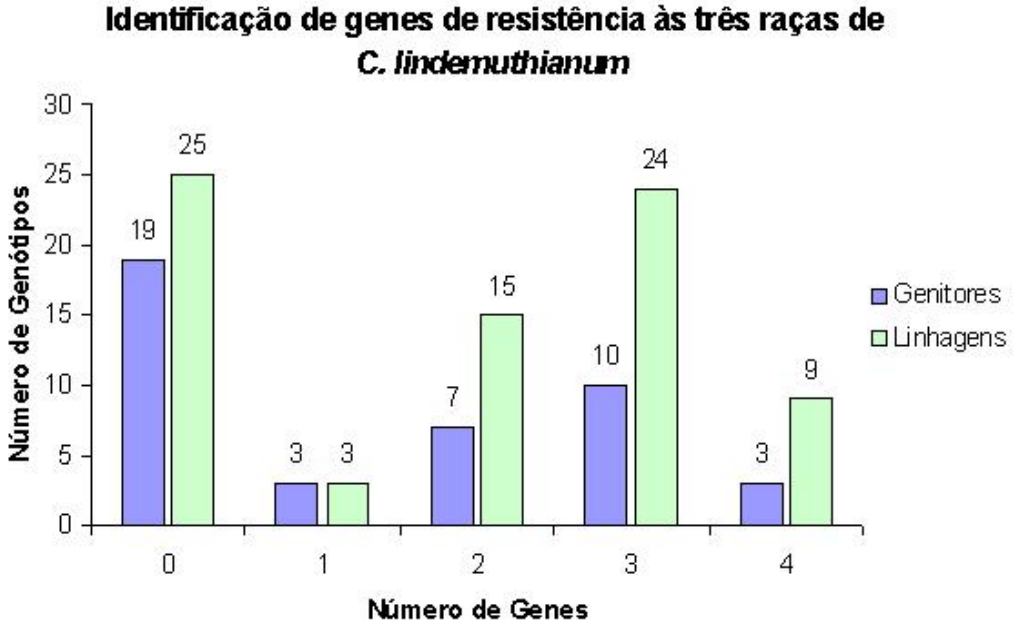

Figura 17: Número de genes de resistência à antracnose presentes em genitores e linhagens de feijoeiro estimados a partir da presença de marcadores SCARs ligados aos mesmos.

4.8 Distribuição dos genes de resistência nos genótipos do programa de melhoramento do IAC

Através dos marcadores moleculares SCARs (Anexo 2) foi possível observar qual o gene mais freqüente entre os genótipos estudados. Para a raça 31, 65 e 89 (Figuras 18, 19 e 20), o gene de maior destaque foi o *Co-6*, proveniente da cultivar AB 136 (marcador SCARZ20), seguido pelo gene *Co-4*^{2}, proveniente da cultivar G 2333 (marcador SAS13), e pelo gene *Co-9,* proveniente da cultivar BAT 93 (marcador SAS13).

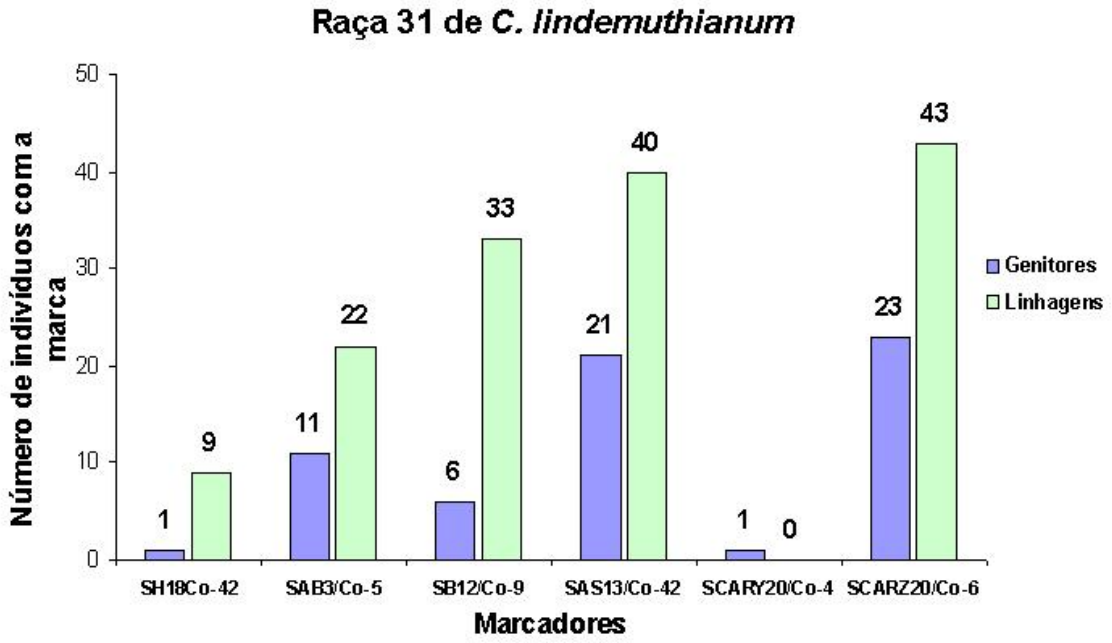

Figura 18: Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 31 de *C. lindemuthianum*.

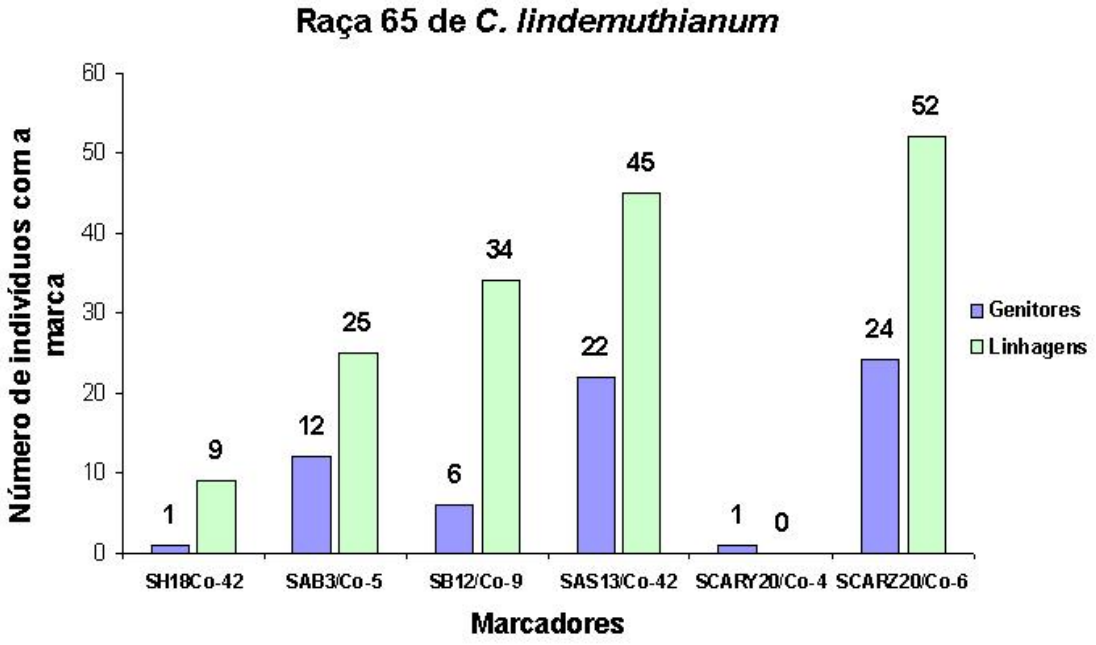

Figura 19: Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 65 de *C. lindemuthianum*.

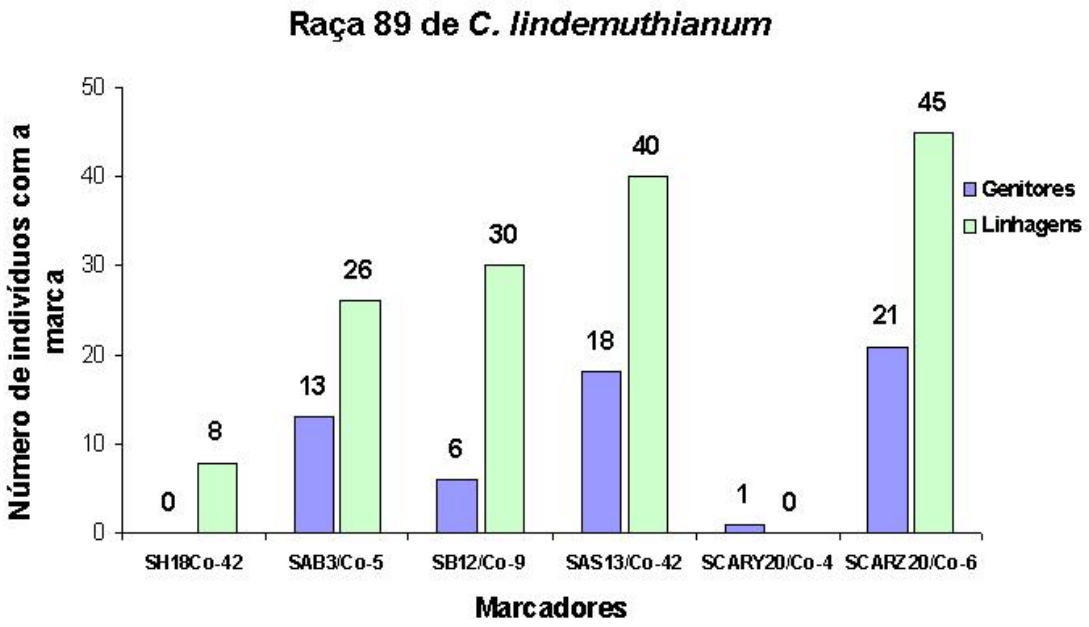

Figura 20: Número de genótipos (genitores e linhagens) de feijoeiro contendo marcas SCARs ligadas a genes de resistência à raça 89 de *C. lindemuthianum*.

A presença do gene *Co-6* nestas linhagens do IAC deve-se ao uso da cultivar AB 136 como genitor, pois esta confere resistência a inúmeras raças do patógeno da antracnose. Desta forma, é considerado um importante gene para o melhoramento da cultura e muito utilizado no programa do IAC. ALZATE-MARIN et al. (1999) também confirmou a importância desta fonte de resistência AB 136, por ser resistente a 50 patótipos de *C. lindemuthianum* descritos no Brasil. A superioridade do gene *Co-6* também foi relatada por ALZATE-MARIN & SARTORATO (2004) e por MOURA (2005), que encontraram a marca de resistência em 64 de 248 acessos estudados.

O elevado número de linhagens que amplificaram o marcador ligado ao gene *Co-4*^{2} oriundo da cultivar G 2333, também deve-se ao uso como genitor no programa de melhoramento no IAC, tanto pelo uso direto como doador ou por participação na constituição de linhagens/cultivares já melhoradas. Este gene é considerado de extrema importância no melhoramento da cultura uma vez que a cultivar é uma das mais resistentes à antracnose (ALZATE-MARIN et al. 2001).

O marcador SCARY20, proveniente da cultivar TO, apresentou baixa confiança, pois somente esta cultivar amplificou a banda esperada, uma vez ser ela a doadora desse gene (Figuras 14, 15 e 16), pois esta cultivar é pouco utilizada no programa de

melhoramento no IAC. Apesar disso, este marcador é de extrema confiança ao selecionar o gene *Co-4,* pois ele se mostrou altamente específico.

Alguns genótipos apresentaram apenas um candidato a gene de resistência revelado pelo marcador molecular, como foi o caso da cultivar IAC Maravilha (*Co-6*) e das linhagens Gen99TG 36-10 (*Co-4*^{2}), Gen96A98 5-1-51-1 (*Co-9*), Gen99TG 36-10 (*Co-4*^{2}), Gen96A98 5-1-51-1 (*Co-9*), Gen96A98 5-1-1-55 (*Co-9*). Porém, estes genótipos apresentaram resistência de campo às três raças inoculadas. Uma hipótese para explicar tal resultado seria a ocorrência de outros processos metabólicos e de constituição da planta que auxiliam nesta resistência genética, promovendo uma resistência mais ampla.

5 CONCLUSÕES

a) Através da inoculação em laboratório com o patógeno da antracnose, foram identificados 17 genitores e 45 linhagens resistentes às três raças da antracnose estudadas, três genitores e seis linhagens resistentes às raças 31 e 65, duas linhagens resistentes às raças 31 e 89, três genitores e oito linhagens resistentes às raças 65 e 89, seis genitores e quatro linhagens resistentes à raça 31, três genitores e cinco linhagens resistentes à raça 65, dois genitores e duas linhagens resistentes à raça 89 e oito genitores e quatro linhagens susceptíveis às três raças;

b) Os melhores marcadores para serem utilizados em procedimentos de seleção assistida por marcadores moleculares no programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico de Campinas são SCARZ20, SAS13 e o SAB3;

c) Utilizando marcadores SCARs, foram identificados genes de resistência à antracnose em 76 linhagens e 42 genitores. Foi possível inferir quais e quantos genes estão presentes em cada genótipo através dos marcadores moleculares, com destaque para cultivares com quatro marcas (G 2338, Pompadour, Vax 1) e linhagens com quatro genes de resistência (Gen96A5 P1-1, Gen99TG 35-29, Gen99TG 47-38-2, Gen96A98 12-1-51-1, de grão carioca, Gen96A3 P4-1-1 de grão preto e Gen96A100 6-1-53-1 de grão rosinha, a outras linhagens, Gen99TG 36-9, Gen96A14 7-3-153V-2, Gen99TG 50-47 de grãos mulatinho, vermelho e rajado respectivamente). E de acordo com os resultados observados, pode-se concluir que os genes *Co-6*, seguido por *Co-4*^{2}, *Co-9*, *Co-5* e *Co-4*, respectivamente são os de maior ocorrência nos genótipos avaliados.

PERSPECTIVAS

Após selecionar os melhores marcadores para a antracnose, espera-se incluir esta metodologia como rotina no programa de melhoramento do feijoeiro do IAC, em duas etapas: nas primeiras gerações de seleção, excluindo as inoculações com o patógeno em laboratório de fitopatologia, reduzindo assim o tempo e o custo do programa na seleção de genótipos resistentes às três principais raças da doença (31, 65 e 89); e, nas gerações tardias, na identificação do gene e do número de genes de resistência presentes em cada genótipo estudado, auxiliando assim na seleção e na indicação das melhores linhagens para lançamento como futuras cultivares.

Além disso, a confiança e a facilidade de obtenção dos dados através dos marcadores SCARs permitirão que esse tipo de marcador possa vir a ser utilizado para outras doenças como, por exemplo, a ferrugem. Desta forma, a inclusão de novos marcadores SCARs para outras doenças poderá ser uma ferramenta de grande auxílio para o melhorista. À medida que novos marcadores para diversas características forem descritos, estes poderão ser incorporados ao Programa de Melhoramento do feijoeiro do IAC.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON, A.F.; SÉVIGNAC, H.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to dominant gene (ARE) confering resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 865-870, 1994.

ALZATE-MARIN, AL.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.M.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4*^{3} and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262), **Euphytica**, v. 154, p. 1-8, 2007.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30(4), p.333-342, 2005.

ALZATE-MARIN, A.L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 47, p. 241-242, 2004.

ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistence genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 46, p. 173-174, 2003 (a).

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; MENARIM, H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Herança da resistência à Antracnose na Cultivar de Feijoeiro Comum Cornell 49-242. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28(3), p. 302-306, 2003 (b).

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

ALZATE-MARIN, A.L.; SILVA, M.M.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Validation of RAPD markers linked to *Co-4* anthracnose resistance alleles in common bean cultivar PI 207. 262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 45, p. 114-115, 2002.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; BAÍA, G.S.; PAULA Jr, T.J.; de SOUZA, K.A.; da COSTA, M.R.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of a anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4*^{2} gene. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 259-264, 2001.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CHAGAS, J.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistant gene in common bean cultivar AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23 n. 3, p. 633-637, 2000.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIN, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA, J.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.89, n.4. p. 281-285, 1999.

ANDRADE, E.M.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões brasileiras. In: Embrapa Arroz e Feijão (Ed.). Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão-RENAFE Anais-Salvador. Embrapa Arroz e Feijão, Documento 99. p. 242-244, 1999.

ARAYA, C.M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno em frijol común. **Fitopatologia Brasileira**. V. 28, p. 221-228. 2003.

ARRUDA, M.C.C.; ALZATE-MARIN, A.L.; CHAGAS, J.M.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 758-761. 2000.

ARRUDA, K.M.A.; MELO, C.L.P.; SOUZA, T.L.P.O.; CARNEIRO, J.E.S.; MOUREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Caracterização fenotípica de linhagens de feijão tipo "carioca"quanto a resistência a patógenos. CONAFE, p. 153-157, 2005.

AWALE, H. E.; KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to *Co-4*^{2} gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 44, p. 119-120, 2001.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, v.87, p.1184-1191, 1997.

BANNEROT, H. Résults de l`infection d`une collection de haricots par six races physiologiques d`anthracnose. Annales Amelioration Plantes, Paris, v.15, p.201-222, 1965.

BANNEROT, H.; DEIEUX, M.; FOUILLOUX, G. Mise en evidence d'un second gene de resistance totale a l'anthracnose chez le haricot. Annales Amelioration de Plantes, Paris, v.21, p.83-85, 1971.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Bean anthracnose : Inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **J. Phytopatology**, v. 149, p. 403-408, 2001.

BURKHOLDER, W.H. The production of an anthracnose-resistant White Marrow bean. **Phytopathology**, v. 8, n.7, p. 353-359, 1918.

BULISAMI, E.A. O feijão na alimentação do brasileiro. ANAIS do 19º dia de campo de feijão, v. 71. Capão Bonito, 2003.

CARBONELL, S.M.; ITO, M.F.; CHIORATO, A.F.; MOURA, R.R. Avaliação do germoplasma de feijoeiro do IAC quanto à resistência a três raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathol**. v. 31, n. 1, p. 41-45, 2005.

CARBONELL, S.M.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A.L.L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n.1, p. 60-65, 1999.

CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos.; FERREIRA, D.F.; MELO, L.C. Identification on common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 565-569, 1999.

CIAT. Bean production Systems. Cali, Colombia, Centro internacional de agricultura Tropical, p.112-151, 1974.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Research constraints provisionally identified by CIAT. In: WORKSHOP ON ADVANCED *Phaseolus* BEAN RESEARCH NETWORK, p.30 , 1990.

CHIORATO, A.F. Análise da divergência genética de acessos de feijoeiro (Phaseolus vulgaris) do Banco de germoplasma do Instituto Agronômico- IAC. Dissertação (Mestrado), Instituto Agronômico-IAC, Campinas, SP, p. 81, 2004.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.M.; MOURA, R.R.; ITO, M.F.; COLOMBO, C.A. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, v.65, n.3, p. 381-388, 2006.

CHONGO, G.; GOSSEN, B.D. Effect of plant age on resistance to Ascochyta rabiei in chickpea. Can. Journal of plant Pathology, v. 23, p. 358-363, 2001.

CONAB COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3levsaf.pdf, (12 dezembro 2006).

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

DAVIDE, L.M.C. Comprovação da variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, p.59, 2006.

FIGUEIREDO, M. B. Aplicação do método Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **Biológico**, v. 33, p. 9-13. 1967.

FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequence on our breeding programs. In. International Symposium Diseases Tropical Food Crops. Université Catholique de Louvainla-Neuve, Belgium, p. 221-235, 1979.

FREYRE, R..; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLODON, A.F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA, P.A.; TSAI, S.-M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**,. Gent, v. 97, p. 847-856, 1998.

GEFFRROY, V.; SÉVIGNAC, M.; De OLIVEIRA, J.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; THOQUET, P.; GEPTS, P.; LNGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevulution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microb**. **Interact**, v. 12, p. 774-782, 1999.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SILVA, C.R.; VIDIGAL-FILHO, P.S . Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Michelite. In: VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, Goiânia, GO. Anais/CONAFE, III Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Goiânia : Embrapa Arroz e Feijão, v. 1, p. 490-492, 2005.

HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, A.; DORADO, G. Development of SCAR by direct sequencing of RAPD products: a pratical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 245-253, 1999.

HOISINGTON D, KHAIRALLAH M, GONZÁLEZ-DE-LEÓN D. (1994). Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory 2nd edn. CIMMYT, México, DF.

HONG, J.K.; HWANG, B.K. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, v. 82, n. 10, p. 1079-1083, 1998.

JUN, J.H.; CHUNG, K.H.; JEONG, S.B.; LEE, H.J. Identification of RAPD and SCAR markers linked to the flesh adhesion gene F in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Journal of Horticultural Science & Biotechology**, v. 77 n. 5, p. 598-603, 2002.

KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of molecular markers in breeding for qualitative and quantitative traits of common bean. Anais. Taller de Mejoramiento de Frijol para el siglo XXI: Bases para uma estrategia para América Latina. Ed.: Shree P. Singh y Oswaldo Voysest. Cali, Colômbia. p. 262-279, 1996.

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

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

KELLY, J.D.; VALLEJO, A. V. A comprehensive review of the major genes conditions resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004.

KEMA, G.H.J.; van SILFHOUT, C. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem III. Comparative seedling and adulp plant experiments. **Phytopathology**, v. 87, n. 03, p. 266-272, 1997.

KIM, Y.J.; HWANG, B.K.; PARK, K.W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*.**Plant Disease**, p. 745-747, 1989.

KULL, L.S.; VUONG, T.D.; POWERS, K.S.; ESKRIDGE, K.M.; STEADMAN, J.R.; HARTMAN, G.L. Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, p. 1471-1476, 2003.

LIU, J.; LIU, D.; TAO.W.; LI, W.; WANG, S.; CHEN, P.; CHENG, S.; GAO, D. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. **Plant Breeding**, v. 119, p. 21-24, 2000.

MAHUKU, S.G.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.253-263, 2004.

MASTENBROEK, C. A breeding program for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 137-148, 1960.

MAZZOLA, M.; LEACH, J.E.; NELSON, R.; WHITE, F.F. Analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* and the rice cultivars IR24 and IRBB21. **Phytopathology**, v. 84, n. 4, p. 392-397, 1994.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, v. 116, p. 143-149, 2000.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. SCAR marker linked to major disease resistance genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. Coop, v. 41, p. 64-65, 1998.

MÉNDEZ DE VIGO, B.; RODRÍGUEZ. C.; PAÑEDA. A.; GIRALDEZ. R.; FERREIRA. J.J. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 45, p. 116-117, 2002.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR. M.W. Common bean breeding for resistance agaist biotic and abiotic stress: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, p. 105-131, 2006.

MIKLAS, P.N. 2006. Listing of SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/3848/PDF/Scartable3.pdf, acessado em abril de 2007.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; STORNE, V.; DALY, M.J.; STAVELY, J.R.; STEADMAN, J.R.; BASSETT, M.J.; BEAVER, J.S. Bacterial fungal, virus disease loci mapped in a recombinant inbred common bean population (´Dorado / XAN176´). **Journal of American Society. Hort**, v. 125, p. 476-481, 2000.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v.3, p. 87-103, 1997.

MOURA, R.R. Associação de marcadores RAPD a *locis* de resistência em feijoeiro a *Colletotrichum lindemuthianum*. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico de Campinas, 100p, 2005.

NIETSCHE, S.; BORÉM, A; CARVALHO, G.A.; OCHA, R.C.; PAULA, Jr, T.J.; BARROS de, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to gene confering resistance to Angular Leaf Spot in Common Bean. **Journal Phytopathology**, v. 148, p.117-121, 2000.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v. 78, p. 959-962, 1994.

QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLAD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.

Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Reports of Bean Improvment Cooperative** v.47, p. 249-250, 2004.

RAGAGNIN, V.A.; ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; ARRUDA, K.M.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Avaliação de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum, Uromyces appendiculatus e Phaeoisariopsis griseola.* **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 591-596, 2003.

RAVA, C.A.; PURCHIO, A.F. & SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindendemuthianum* que ocorreram em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**. v. 19, p.167-173, 1994.

RIKER, A.J.; RIKER, R.S. Introduction to Research on Plant Diseases. St. Louis, John S. Swift.1936.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p. 914-921, 1994.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.R.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento IN: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. Viçosa, MG, p. 374p, 2006.

SUDUPAK, M.A.; BENNETZEN, J.L.; HULBERT, S.H. Unequal exchange and meiotic instability of disease-ressitance genes in the *Rp 1* region of maize. **Genetics**, v. 133, p. 199-125, 1993.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D.; OLIVEIRA, F.A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytophatologica**, v. 30, p. 371-375, 2004.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDA, J. B.; VIDIGAL FILHO, P. S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvment Cooperative**, v. 43, p. 82-83, 2000.

TORRES, J.P.; MARINGONI, A.C. Métodos de inoculação, estádios de desenvolvimento fenológico da planta e reação de cultivares de feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 124-129, 1999.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the *Co-5 locus* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. Coop, v. 44, p. 121-122, 2001.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. The use of AFLP analysis to tag the *Co-1*^{2} gene conditioning resistance to bean anthracnose. In: Proceedings of the X Conference on Plant and Animal Genome, 2002.

YOUNG, R.; MELOTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of tho oligogenic anthracnose resistence in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87-94, 1998.

YOUNG, R.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance gene in common bean. **Crop Science**., v. 37, p.940-946, 1997.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. RAPD markers flanking the ARE gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of American Society. Hort**, v. 121, p. 37-41, 1996.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Doenças do feijoeiro e seu controle. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.(4), p.50-63, 1978.

7- ANEXOS

Anexo 1: Cruzamentos artificiais simples e múltiplos realizados pelo programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico – IAC e notas referentes à reação de incompatibilidade e compatibilidade quando inoculados com as raças 31, 65, 89 de *C. lindemuthianum*. Em verde, destacam-se os materiais resistentes, em azul, os materiais susceptíveis e, em branco, os materiais não avaliados (Continua).

Linhagens	Genealogia	Nota da Raça		
		31	65	89
AND277		1	1	1
Cal 143		1	1	1
Chileno		1	1	1
G 2338		1	1	2
G 5686		1	1	1
IAC – Carioca Akytã		1	1	1
IAC – Carioca Aruã		1	1	1
IAC – Carioca Eté		1	1	1
IAC – Carioca Pyatã		1	1	1
IAC – Maravilha		1	1	1
IAC – Una		1	1	1
Jalinho Itararé		1	1	1
L317-1		1	1	1
Pompadour		1	1	1
Vax 1		1	1	1
IAC – Carioca Tybatã		1	1	1
Jabola		1	1	2
Gen99TG 36-9	Bolinha x IAC – Carioca Aruã	1	1	1
Gen99TGR 34-16	Jabola x (Jabola . IAC - Carioca Tybatã)	1	1	1
Gen99TGR 31-14-1	Jabola x (Jabola . IAC - Una)	1	1	1
Gen99TG 8-83	Pompadour x IAC - Carioca Eté	1	1	1
Gen99TG 34-50	Jabola x IAC - Carioca Tybatã	1	1	2
Gen99TG 52-88	Rosa 700 x IAC - Una	1	1	1
Gen99TG 44-87	Quarenteno x IAC- Una	1	1	1
Gen99TG 43-86-1	Quarenteno x IAC - Carioca Eté	1	1	1
Gen99TG 46-39-2	Carioca Precoce x IAC - Carioca Eté	1	1	1
Gen99TG 47-38-1	Carioca Precoce x IAC - Carioca Aruã	1	1	1
Gen99TG 35-29	Bolinha x IAC - Carioca Eté	1	1	1

Continua...

Linhagens	Genealogia	Nota da Raça		
		31	65	89
Gen99TG 39-3	Bataav x (Bataav . IAC Carioca Eté)	1	1	1
Gen99TG 2-41	Chileno x IAC - Una	1	1	2
Gen99TG 9-84	Pompador x IAC - Una	1	1	1
Gen99TGR 31-14-2	Jabola x (Jabola . IAC - Una)	1	1	2
Gen99TG 57-22-2	Bolinha Manteiga x IAC - Carioca Aruã	1	1	2
Gen99TG 67-1	Bagajó x Pérola	1	1	1
Gen99TG 13-78	Leg Pintado x IAC - Carioca Aruã	1	2	2
Gen99TG 65-44-1	Chinês II x IAC - Carioca Aruã	1	1	1
Gen99TG 43-86-2	Quarenteno x IAC - Carioca Eté	1	1	1
Gen99TG 47-38-2	Carioca Precoce x IAC - Carioca Aruã	1	1	2
Gen96A100 6-1-53-1	{(IAC - Carioca Aruã . G5686) .[(Xan251 . IAC - Carioca Akytã) . (IAC - Carioca Pyatã . Mar1)]} x L317-1	1	1	1
Gen96A13 P3-6-3-1B-2	(IAC - Carioca Aruã . Xan251) x (IAC Maravilha . GNNsel1-27)	1	2	2
Gen96A104 P4-2-1-1	{(Cal143 . IAC - Una) . [(IAC - Carioca Pyatã . Mar1) . (IAC – Carioca Akytã . IAPAR14)]} x Xan251	1	1	1
Gen96A102 5-1-52-1A	{(IAC - Carioca Aruã . G5686) . [(Xan251 . IAC – Carioca Akytã) . (IAC – Carioca Pyatã . Mar1)]} x Pérola	1	1	2
Gen96A13 P1-1B-1	(IAC - Carioca Aruã .Xan251) x (IAC Maravilha . GNNsel1-27)	1	1	1
Gen96A11 P1-1-1	(IAC - Carioca Aruã . Mar1) x (IAC Maravilha . Cal143)	1	1	1
Gen96A3 P2-1-1	(IAC – Una . A300) x (IAC Maravilha . G2338)	1	1	2
Gen96A3 P7-1-1	(IAC – Una . A300) x (IAC Maravilha . G2338)	1	1	1
Gen96A3 P4-1-1	(IAC - Una . A300) x (IAC Maravilha . G2338)	1	1	1
Gen96A98 5-1-51-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	1	1	1
Gen96A98 15-2-51-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	1	2	2
Gen96A55 1-1-4-1-53	{(IAC Maravilha . Cal143) . (IAC – Carioca Pyatã . Mar2)} x [(Xan251 . IAC – Carioca Akytã) x (IAC – Carioca Pyatã . Mar1)]	1	1	1
Gen96A98 15-3-52-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]}x L317-1	1	1	1
Gen96A14 7-3-153V-2	(IAC- Carioca Akytã . Xan 251) x (IAC- Carioca Pyatã . Mar1)	1	1	1
Gen96A98 12-1-51-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	1	1	1
Gen96A45 3-51-52-1	[(IAC – Carioca Pyatã . Mar1) . (IAC – Carioca Akytã . IAPAR14)] x [(IAC Maravilha . Mar1) x (IAC – Una . A300)]	1	1	1
Gen96A98 5-1-1-55	(IAC – Carioca Pyatã . A686) . (IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277) x L317-1	1	2	1

Continua...

Linhagens	Genealogia	Nota da Raça		
		31	65	89
Gen96A51 P1-2-1-1-1	[(IAC – Carioca Aruã . Mar1) . (IAC Maravilha . GNN27)] x [(IAC – Carioca Pyatã . G916) . Vac32]	1	1	1
Gen96A101 1-2-51-1	{(IAC – Carioca Aruã . G5686) x [(Xan251 . IAC – Carioca Akytã) . (IAC – Carioca Pyatã . Mar1)]} x IAC – Carioca Aruã	1	1	2
Gen96A98 12-1-53-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	1	2	1
Gen96A98 15-5-52-1	{(IAC – Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	1	2	2
Gen96A5 P 1-1	(IAC Maravilha . Mar2) x (IAC – Una . A300)	1	1	1
Gen99TGR1-10	Chileno Branco x (Chileno . IAC - Carioca Eté)	1	1	1
Gen99TG36-10	Bolinha x IAC - Carioca Aruã	2	1	1
GNN sel1-27		1	2	#
Mar.2		1	1	9
Vac 32		2	1	7
Gen99TG 46-39-3	Carioca Precoce x IAC - Carioca Eté	1	3	9
Gen99TG 65-44-2	Chinês II x IAC - Carioca Aruã	1	1	#
Gen96A56 9-3-2-51-1	[(IAC Maravilha . Mar2) . (IAC - Una . A300)] x [(IAC - Carioca Pyatã . G916) . (IAC Maravilha . Mar1)]	2	3	9
Gen96A13 P2-1-1B-1	(IAC - Carioca Aruã . Xan251) x (IAC Maravilha . GNNsel1-27)	1	1	9
Gen96A101 4-1-54-1	{(IAC - Carioca Aruã . G5686) . [(Xan251 . IAC – Carioca Akytã) . - (IAC – Carioca Pyatã . Mar1)]} x IAC – Carioca Aruã	1	1	#
Gen96A28 P2-51-1	[(Vax1 . IAC - Carioca Aruã) . (IAC – Carioca Akytã . IAPAR14)] x A686	1	2	9
Gen96A13 P3-3-2-1B-2	(IAC – Carioca Aruã . Xan251) x (IAC Maravilha . GNNsel1-27)	1	#	1
Gen99TG 20-23-4	Jalo Precoce x Pérola	1	9	2
Bolinha		9	1	1
Cal 153		9	1	1
IAPAR14		9	1	1
Gen99TGR 28-68	Jalo Itararé x IAC - Carioca Eté	9	1	1
Gen99TGR 60-9	Cal 153 x IAC - Carioca Aruã	9	1	1
Gen99TGRM-4	Branco Argentino x (Chileno . IAC - Una)	6	1	1
Gen99TG 58	Jalinho Itararé x Pérola	5	1	2
Gen99TGR 5-1	Bagajó x (Bagajó . IAC - Carioca Aruã)	6	1	3
Gen99TG 64-55	Jalinho Itararé x IAC - Carioca Akytã	5	1	1
Gen96A46 7-1-1-1-51	[(IAC – Una . A300) . (IAC Maravilha . G2338)] x [(IAC – Carioca Pyatã . G916) . (IAC Maravilha . Mar1)]	9	1	2
Gen99TGRM-4	Branco Argentino x (Chileno . IAC - Una)	6	1	1
A686		1	9	9
Chinês II		2	9	8

Continua...

Linhagens	Genealogia	Nota da Raça		
		31	65	89
Jalo Itararé		1	7	7
Rosa 700		1	9	9
Bataav		1	9	9
Xan 251		1	9	#
Gen99TG 46-39-1	Carioca Precoce x IAC - Carioca Eté	1	9	9
Gen99TG 48-37-1	Carioca Precoce x IAC - Carioca Akytã	2	9	9
Gen99TG 57-22-1	Bolinha Manteiga x IAC - Carioca Aruã	1	7	4
Gen96A98 13-1-52-1	{(IAC Carioca Pyatã . A686) . [(IAC Maravilha . G2338) . (IAC Maravilha . And277)]} x L317-1	3	8	9
Bolinha Manteiga		9	1	7
Branco Argentino		9	3	7
Jalo Precoce		9	3	9
Gen96A3 P1-1-1	(IAC – Una . A300) x (IAC Maravilha . G2338)	4	3	4
Gen96A46 51-1-1-1-52	[(IAC – Una . A300) . (IAC Maravilha . G2338)] . [(IAC – Carioca Pyatã . G916) x (IAC Maravilha . Mar1)]	5	2	9
Gen99TG 20-23-2	Jalo Precoce x Pérola	9	4	9
Gen99TG 7-10-2	Bagajó x Pérola	9	3	9
Gen99TG 7-10-1	Bagajó x Pérola	9	2	9
Bagajó		9	9	2
Mar.1		5	5	2
Ge99TG 50-47	Iraí x IAC - Carioca Aruã	5	6	3
Gen99TG 20-23-1	Jalo Precoce x Pérola	9	4	1
A300		9	8	8
Carioca Precoce		7	7	9
G 916		7	7	4
Iraí		9	9	6
Leg Pintado		9	9	9
Pérola		9	9	9
Quarenteno		5	9	9
Gen99TG 62-33	Cal 153 x Pérola	4	9	9
Gen99TG 48-37-2	Carioca Precoce x IAC - Carioca Akytã	4	9	9
Gen99TG 20-23-3	Jalo Precoce x Pérola	8	6	9
Gen99TGR 43-24	Quarenteno x (Quarenteno . IAC - Carioca Eté)	5	4	9

Anexo 2: Resposta de amplificação dos marcadores para as raças 31, 65 e 89 do patógeno da antracnose *C. lindemuthianum* (R, resistente; S, susceptível; +, presença da marca molecular; -, ausência da marca molecular) (Continua).

Linhagens	**Marcador Molecular / *Locus***																	
	SH 18 / *Co-4²*			**SAB3 / *Co-5***			**SB12 / *Co-9***			**SAS 13 / *Co-4²***			**SCARY20 / *Co-4***			**SCARAZ20 / *Co-6***		
	31	**65**	**89**	**31**	**65**	**89**	**31**	**65**	**89**	**31**	**65**	**89**	**31**	**65**	**89**	**31**	**65**	**89**
A300	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+
A686	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R-	S-	S-
AND277	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Bagajó	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S+	S+	R+	S-	S-	R-	S+	S+	R+
Bataav	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S-	S-
Bolinha	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Cal 143	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Cal153	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Carioca Precoce	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S-	S-
Chileno	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Chinês II	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R+	S+	S+
G2338	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+
G5686	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
G916	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
GNNsel1-27	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R+	R+	S+
IAC – Carioca Akytã	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
IAC – Carioca Aruã	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
IAC – Carioca Eté	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R-	R+
IAC – Carioca Pyatã	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
IAC – Maravilha	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Mar.1	S-	S-	R-	S+	S+	R+	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S+	S+	R+
Mar.2	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	R+	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R+	R+	S+
IAC – Una	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
IAPAR14	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Iraí	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
Jalinho Itararé	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Jalo Itararé	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R+	S+	S+
L317-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R-	R-
Leg Pintado	S-	S-	S-	S-	R-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Pérola	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S-	S-
Pompadour	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Quarenteno	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
Rosa700	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-
Vac32	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	S-	R+	S+	R-	R-	S-	R+	R+	S+
Vax1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Xan251	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R+	S+	S+
Bolinha Manteiga	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S+	R+	S+
Branco Argentino	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S+	R+	S+
IAC – Carioca Tybatã	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Jalo Precoce	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+
Gen99TG20-23-1	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S+	S-	R-
Gen99TG 36-9	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TGR 28-68	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Gen99TGR 60-9	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-
Gen99TGR 34-16	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Gen99TGR 31-14-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TGRM 4	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Gen99TG 8-83	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen99TG 34-50	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen99TG 62-33	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S-	S-
Gen99TG 52-88	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 44-87	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 43-86-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 46-39-3	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R+	R+	S-
Gen99TG 46-39-2	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 46-39-1	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R-	S-	S-
Gen99TG 47-38-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen99TG 48-37-2	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
Gen99TG 48-37-1	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-
Gen99TG 20-23-2	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
Gen99TG 58	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Gen99TGR 43-24	S-	S-	S-	S-	S-	S-	R-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
Gen99TGR 5-1	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Gen99TG 7-10-2	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S+	R+	S+
Gen99TG 7-10-1	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S+	R+	S+
Gen99TG 35-29	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 39-3	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 2-41	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 9-84	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TGR 31-14-2	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 57-22-2	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 57-22-1	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R+	S+	S+
Gen99TG 64-55	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Gen99TG 67-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 13-78	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 65-44-2	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 65-44-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Gen99TG43-86-2	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 47-38-2	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen99TG 20-23-4	R-	S-	R-	R-	S-	R.	R-	S-	R-	R+	S+	R+	R-	S-	R-	R+	S+	R+
Gen99TG 20-23-3	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S+	S+	S+
Gen99TG36-10	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen96A56 9-3-2-51-1	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	S+
Gen96A100 6-1-53-1	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A3 P1-1-1	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+	R+	S+
Gen96A98 13-1-52-1	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S+	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S+
Gen96A13 P3-6-3-1B-2	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A13 P2-1-1B-1	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R-	R-	R+	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R+	R+	S+
Gen96A101 4-1-54-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A104 P4-2-1-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A102 5-1-52-1A	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A13 P1-1B-1	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A11 P1-1-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4*^{2}			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4*^{2}			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Gen96A3 P2-1-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A3 P7-1-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A3 P4-1-1	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A28 P2-51-1	R-	R-	S-	R-	R-	S-	R+	R+	S+	R+	R+	S+	R-	R-	S-	R-	R+	S+
Gen96A98 5-1-51-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen96A46 51-1-1-1-52	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R+	S+	S-	R-	S-	S-	R-	S-	S-	R-	S-
Gen96A98 15-2-51-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen96A55 1-1-4-1-53	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A98 15-3-52-1	R-	R-	R-	R-	R-	S-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A14 7-3-153V-2	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A98 12-1-51-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A45 3-51-52-1	R-	R-	R-	R-	R-	S-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A98 5-1-1-55	R-	R-	R-	R-	R-	S-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	S-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen96A51 P1-2-1-1-1	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A101 1-2-51-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	S-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A46 7-1-1-1-51	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S-	R-	R-	S+	R+	R+

Continua...

Linhagens	Marcador Molecular / *Locus*																	
	SH 18 / *Co-4²*			SAB3 / *Co-5*			SB12 / *Co-9*			SAS 13 / *Co-4²*			SCARY20 / *Co-4*			SCARAZ20 / *Co-6*		
	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89	31	65	89
Gen96A98 12-1-53-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A98 15-5-52-1	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R-	R-
Gen96A13 P3-3-2-1B-2	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Gen96A5 1-1	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Ge99TG 50-47	S-	S-	R-	S+	S+	R+	S+	S+	R+	S+	S+	R+	S-	S-	R-	S+	S+	R+
Gen99TGR1-10	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+
Jabola	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R+	R+	R+	R-	R-	R-	R-	R+	R+
Gen99TGR1-40	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+	S-	R-	R-	S+	R+	R+
Carioca Comum	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S+	S+	S+	S-	S-	S-	S-	S-	S-

Anexo 3 – Genes e número de genes encontrados nos genótipos avaliados através dos marcadores moleculares SCARs para as raças 31, 65 e 89 do *C. lindemuthianum* onde os X representam os genes encontrados e os ? representam os materiais que apresentaram amplificados porém, foram susceptíveis (Continua).

Genótipos	Tipo de grão	SH 18 *Co-4²*	SAB3 *Co-5*	SB12 *Co-9*	SAS13 *Co-4²*	SCARY20 *Co-4*	SCARAZ0 *Co-6*	N. de Marcas observadas
Gen96A100 6-1-53-1	Rosinha	X	X	X	X		X	5
Gen96A14 7-3-153V-2	Vermelho	X	X	X	X		X	5
Gen96A5 P 1-1	Carioca	X	X	X	X		X	5
G 2338	Preto		X		X	X	X	4
Pompadour	Rajado		X	X	X		X	4
Vax1	Creme		X	X	X		X	4
Gen99TG 36-9	Mulatinho		X	X	X		X	4
Gen99TG 35-29	Carioca		X	X	X		X	4
Gen99TG 47-38-2	Carioca		X	X	X		X	4
Gen96A3 P4-1-1	Preto	X	X	X			X	4
Gen96A98 12-1-51-1	Carioca		X	X	X		X	4
Ge99TG 50-47	Rajado		X	X	X		X	4
Gen99TG 13-78	Carioca	X		X	X		X	4
Gen96A13 P3-6-3-1B-2	Branco	X		X	X		X	4
Gen96A13 P1-1B-1	Branco	X		X	X		X	4
Gen96A13 P3-3-2-1B-2	Branco	X		X	X		X	4
Cal 143	Rajado			X	X		X	3
G5686	Mulatinho		X		X		X	3
IAC – Carioca Akytã	Carioca		X		X		X	3
IAC – Carioca Aruã	Carioca		X	X			X	3
IAC – Carioca Eté	Carioca		X		X		X	3
IAC – Carioca Pyatã	Carioca		X		X		X	3
IAC – Una	Preto		X		X		X	3
IAPAR14	Preto			X	X		X	3
IAC – Carioca Tybatã	Carioca		X		X		X	3
Jabola	Esverdeado		X		X		X	3
Gen99TGR 28-68	Bolinha		X		X		X	3
Gen99TG 44-87	Preto		X		X		X	3
Gen99TG 43-86-1	Preto		X		X		X	3
Gen99TG 46-39-2	Carioca		X		X		X	3
Gen99TG 47-38-1	Carioca		X	X	X			3
Gen99TG 39-3	Carioca		X		X		X	3
Gen99TG 9-84	Preto		X		X		X	3
Gen99TG 57-22-2	Carioca			X	X		X	3
Gen99TG 64-55	Branco		X		X		X	3
Gen99TG 67-1	Carioca		X		X		X	3
Gen99TG 43-86-2	Preto		X		X		X	3
Gen96A104 P4-2-1-1	Carioca			X	X		X	3
Gen96A102 5-1-52-1A	Carioca			X	X		X	3
Gen96A55 1-1-4-1-53	Carioca		X		X		X	3

Continua...

Genótipos	Tipo de grão	SH 18 *Co-4²*	SAB3 *Co-5*	SB12 *Co-9*	SAS13 *Co-4²*	SCARY20 *Co-4*	SCARAZ0 *Co-6*	N. de Marcas observadas
Gen96A98 15-3-52-1	Carioca			X	X		X	3
Gen96A45 3-51-52-1	Carioca			X	X		X	3
Gen96A51 P1-2-1-1-1	Branco		X	X			X	3
Gen96A98 12-1-53-1	Carioca			X	X		X	3
Gen99TGR1-10	Branco		X		X		X	3
Gen99TGR1-40	Carioca		X		X		X	3
AND277	Vermelha				X		X	2
Bagajó	Rajado				X		X	2
Bolinha	Bolinha				X		X	2
Cal153	Rajado				X		X	2
Chileno	Branco				X		X	2
Mar.1	Mulatinho		X				X	2
Jalinho Itararé	Jalo				X		X	2
Gen99TGR 31-14-1	Jabola				X		X	2
Gen99TGRM 4	Branco				X		X	2
Gen99TG 52-88	Preto		X				X	2
Gen99TG 58	Carioca				X		X	2
Gen99TGR 5-1	Branco				X		X	2
Gen99TG 2-41	Preto		X				X	2
Gen99TGR 31-14-2	Jabola				X		X	2
Gen99TG 20-23-4	Mulatinho				X		X	2
Gen96A11 P1-1-1	Preto			X			X	2
Gen96A3 P2-1-1	Preto			X			X	2
Gen96A3 P7-1-1	Preto			X			X	2
Gen96A98 15-2-51-1	Carioca			X	X			2
Gen96A101 1-2-51-1	Mulatinho			X			X	2
Gen96A46 7-1-1-1-51	Preto			X			X	2
Gen96A98 15-5-52-1	Carioca			X	X			2
IAC – Maravilha	Preto						X	1
Mar.2	Carioca			X	?		?	1
L317-1	Carioca		X					1
Gen99TG36-10	Carioca				X			1
Gen96A98 5-1-51-1	Preto			X				1
Gen96A98 5-1-1-55	Preto			X				1
A300	Mulatinho						?	0
A686	Carioca			?	?			0
Bataav	Branco							0
Carioca Precoce	Carioca				?			0
Chinês II	Preto				?		?	0
G916	Amarelo rajado		?	?	?		?	0
GNNsel1-27	Branco	?			?		?	0
Iraí	Rajado		?		?		?	0
Jalo Itararé	Jalo				?		?	0
Leg Pintado	Rajado				?		?	0
Pérola	Carioca		?		?			0
Quarenteno	Preto		?		?		?	0
Rosa700	Rosinha							0
Vac32	Mulatinho				?		?	0

Continua...

Genótipos	Tipo de grão	SH 18 *Co-4²*	SAB3 *Co-5*	SB12 *Co-9*	SAS13 *Co-4²*	SCARY20 *Co-4*	SCARAZ0 *Co-6*	N. de Marcas observadas
Xan251	Vermelho				?		?	0
Bolinha Manteiga	Bolinha				?		?	0
Branco Argentino	Branco				?		?	0
Jalo Precoce	Jalo						?	0
Gen99TG20-23-1	Mulatinho							0
Gen99TGR 60-9	Rajado							0
Gen99TGR 34-16	Jabola							0
Gen99TG 8-83	Rajado							0
Gen99TG 34-50	Jabola							0
Gen99TG 62-33	Mulatinho				?			0
Gen99TG 46-39-3	Carioca				?			0
Gen99TG 49-39-1	Carioca				?			0
Gen99TG 48-37-2	Carioca							0
Gen99TG 48-37-1	Carioca							0
Gen99TG 20-23-2	Carioca				?		?	0
Gen99TGR 43-24	Preto				?		?	0
Gen99TG 7-10-2	Carioca		?		?		?	0
Gen99TG 7-10-1	Carioca				?		?	0
Gen99TG 57-22-1	Carioca			?	?		?	0
Gen99TG 65-44-2	Carioca							0
Gen99TG 65-44-1	Carioca							0
Gen99TG 20-23-3	Carioca				?		?	0
Gen96A56 9-3-2-51-1	Preto			?			?	0
Gen96A3 P1-1-1	Preto			?			?	0
Gen96A98 13-1-52-1	Carioca			?			?	0
Gen96A13 P2-1-1B-1	Branco	?			?		?	0
Gen96A101 4-1-54-1	Carioca							0
Gen96A28 P2-51-1	Carioca			?	?		?	0
Gen96A46 51-1-1-1-52	Preto			?				0
Carioca Comum	Carioca				?			0