



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR RAPD LIGADO AO
ALELO *Co-7* DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO AO
AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE**

MÁRCIA VANUSA DA SILVA

2000

48697

MFN 34314

MÁRCIA VANUSA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR RAPD LIGADO AO ALELO
Co-7 DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO AO AGENTE CAUSAL DA
ANTRACNOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

N.º CI

T.º

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Silva, Márcia Vanusa da

Identificação de marcadores RAPD ligado ao alelo *Co-7* de resistência do feijão
ao agente causal da antracnose / Márcia Vanusa da Silva. -- Lavras : UFLA, 2000.
41 p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. *Colletotrichum lindemuthianum*. 3. Alelo *Co-7* de
resistência. 4. RAPD. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6523

MÁRCIA VANUSA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR RAPD LIGADO AO ALELO
Co-7 DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO AO AGENTE CAUSAL DA
ANTRACNOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 21 de Fevereiro de 2000.

Profª Drª Elaine Aparecida de Souza

UFLA

Profª Drª Dulcinéia de Carvalho

UFLA


Prof. Dr. João Bosco dos Santos
UFLA
(orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

*Aos meus pais, meus irmãos e meus
sobrinhos, por tudo que representam
em minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente, ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização deste curso.

À coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela orientação na condução do trabalho, dedicação e valiosos ensinamentos no decorrer do curso.

As professoras Elaine Aparecida de Souza e Dulcinéia de Carvalho pelas valiosas sugestões apresentadas para o êxito deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular-DBI: Leonardo, Lamartine, Juliano, Viviane, Ana Luiza e Everton pela colaboração e amizade.

Aos professores do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela convivência e amizade.

Ao professor Augusto Schrank, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização de parte desse trabalho e valiosas sugestões.

Aos amigos do Laboratório-205, do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio e amizade, especialmente ao César, Melissa, Ana Paula e Agnes.

Ao Eduardo, pelo seu amor, companherismo, paciência e apoio em todas as etapas de execução desse trabalho.

Aos amigos: Luciana, Léo, Jane, Amanda, Lilian, Luiza, Jair, Gabriela, Elias, Iara, Ana Rita e Rúbia pela convivência e amizade.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Considerações gerais da antracnose do feijoeiro.....	03
2.2 Variação patogênica de <i>C. lindemuthianum</i>	05
2.3 Melhoramento visando resistência à antracnose.....	07
2.4 Marcadores de DNA.....	12
2.4.1 Marcadores PCR e RAPD.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Genitores e cruzamentos.....	17
3.2 Cultivo e inoculação da raça 2047 de <i>C. lindemuthianum</i> na população F ₁ ESAL 696 (G2333 x ESAL 696).....	17
3.3 Extração de DNA.....	18
3.4 Construção e análise de bulks segregantes.....	19
3.5 Análise RAPD.....	19
3.6 Análise dos resultados.....	20
3.7 Purificação de fragmentos de DNA amplificado por RAPD.....	21
3.8 Clonagem do fragmento de RAPD.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo <i>Co-7</i>	22
4.2 Clonagem do fragmento de RAPD OPL04.....	27
5 CONCLUSÕES.....	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

SILVA, M.V da. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo *Co-7* de resistência do feijão ao agente causal da antracnose. Lavras: UFLA, 2000. 41p. (Dissertação- Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)

A antracnose do feijoeiro, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das doenças mais importante por ocorrer em todo o país e causar grandes perdas nessa cultura. A cultivar G2333, portador de três alelos dominantes de resistência, de genes diferentes, *Co-4*², *Co-5* e *Co-7*, é uma conhecida fonte de resistência a 25 raças de *C. lindemuthianum*, identificadas no Brasil, sendo que o alelo *Co-7* ainda não havia sido marcado. Este trabalho teve como objetivo, identificar marcadores moleculares do tipo RAPD, ligados ao alelo *Co-7*, visando auxiliar na seleção de plantas resistentes ao *C. lindemuthianum*. Foi utilizada a população F₁ [ESAL 696 (G 2333 x ESAL 696)], em que a linhagem ESAL 696 é portadora do alelo *Co-5*. A segregação de metade das plantas resistentes e metade suscetíveis, após à inoculação com a raça 2047, confirmou o controle genético devido apenas ao gene *Co-7*. Empregou-se o método dos *bulks* segregantes de DNA, extraído de plantas constituintes da população F₁ de retrocruzamento. Procedeu-se a reação RAPD dos *bulks* e foi identificado o *primer* OPL04, que amplificou um fragmento de DNA, com cerca de 1000 pares de base (pb) ligado ao alelo *Co-7*. Na análise de co-segregação, verificou-se que esse marcador está estreitamente ligado ao alelo de resistência, a uma distância de 0,0 cM, e se constitui em um excelente marcador, para a seleção indireta de plantas portadoras do alelo *Co-7* em populações segregantes.

* Orientador: João Bosco dos Santos- UFLA.

ABSTRACT

SILVA, M.V da. Identification of RAPD marker linked to the common bean *Co-7* allele for resistance to causal agent of anthracnose. Lavras: UFLA, 2000. 41p. (Dissertation- Magister Science in Genetics and Plant Breeding)*

Common bean anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is one of the most important diseases occurring all over the country and causing large losses in the crop. The cultivar G2333, carrier of three dominant resistance alleles of different genes, *Co-4*², *Co-5* and *Co-7*, is a known source of resistance to 25 races of *C. lindemuthianum* identified in Brazil, although the *Co-7* allele has not been marked yet. This work was designed to identify RAPD molecular markers linked to *Co-7* the allele aiming indirectly to select resistant plants in segregating populations. The population F₁ [ESAL 696 (G2333 x ESAL 696)] was utilized in which the line ESAL 696 is the carrier of the *Co-5* allele. The segregation of half resistant plants and half susceptible, after inoculation with race 2047, confirmed the genetic control to be only the *Co-7* gene. The *bulk* segregat procedure extracted DNA from plants constituting the backcross population was employed. The RAPD reaction of the *bulks* was proceeded and the primer OPL04 was identified, which amplified a DNA fragment of about 1000 base pairs (bp), linked to the *Co-7* allele. In the co-segregation analysis, it was found that this marker is closely linked to the resistance allele at a distance of 0,0 cM, and becomes an excellent marker aiming at the indirect selection of plants carrying the *Co-7* allele in a segregating populations.

* Adviser: João Bosco dos Santos.

1 INTRODUÇÃO

Apesar do Brasil ser o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris*), ainda apresenta produtividade média de cerca de 600 kg por hectare (CONAB, 1999). Esta produção é afetada por diversos fatores negativos e dentre eles, destacam-se como principais, a ocorrência de várias doenças, especialmente porque a maioria das cultivares é suscetível. Entre as cultivares utilizados no Brasil e no estado de Minas Gerais, a maioria corresponde àquelas com tipo de grãos semelhantes ao da cultivar Carioca, que é uma das preferidas (Ramalho e Abreu, 1998). A cultivar Carioca tradicional, que ainda é utilizada, é suscetível à maioria dos patógenos importantes.

Entre os patógenos do feijoeiro, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., é uma das doenças mais importantes, por ocorrer em todo o país e causar até perda total da cultura, dependendo das condições ambientais (Rava, Purchio e Sartorato, 1994).

Diversas estratégias são utilizadas para o controle da doença, destacando-se o uso de cultivares resistentes, como uma das mais eficientes, principalmente por não onerar o custo de produção, além de contribuir para evitar o controle químico, o qual, além de caro causa os danos ambientais já conhecidos.

O desenvolvimento de cultivares resistentes é viável porque existem vários genes independentes de resistência e, em cada, um ou mais alelos conferem resistência a várias raças (Rava, Purchio e Sartorato, 1994; Pastor-Corrales et al., 1994; Young e Kelly, 1996). Há, no entanto, o problema da durabilidade de uma cultivar resistente, quando portadora de apenas um alelo de resistência, pelo fato da maioria dos alelos de resistência a antracnose conferir

resistência completa, exercer uma grande pressão de seleção na população de patógeno e favorecer à seleção de nova raça que o vença.

Uma alternativa para aumentar a vida útil dos alelos verticais, de resistência de genes diferentes, é a de construir uma pirâmide de genes, ou seja, a colocação dos mesmos em uma única cultivar, sendo considerada uma estratégia muito eficiente no controle de doenças (Michelmore, 1995; Kelly e Miklas, 1998).

Existe a dificuldade para identificação de uma cultivar, com vários alelos de resistência de genes diferentes, devido à necessidade de um conjunto de raças do patógeno diferenciadoras dos vários alelos e, muitas vezes, tais raças não são disponíveis. Atualmente, é possível a marcação dos diferentes alelos com um marcador molecular como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que tem sido usado com sucesso em várias oportunidades (Michelmore, Paran e Kesseli, 1991; Kelly, 1995; Adam-Blondon, et al., 1994; Young et al., 1998), eliminando-se a necessidade de inoculação, na avaliação e seleção de plantas portadoras de alelos de resistência de um ou mais genes.

Vários alelos de resistência ao *C. lindemuthianum* já foram marcados (Adam-Blondon et al., 1994; Alzate-Marin et al., 1997; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Young et al., 1998; Castanheira et al., 1999). Entretanto, um dos alelos mais importantes é o *Co-7*, presente na cultivar G2333 (Young et al., 1998), por conferir resistência a todas as raças identificadas no Brasil (Rava, Purchio e Sartorato, 1994), ainda não foi marcado.

Diante dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi a marcação do alelo *Co-7* de resistência da linhagem G2333, com marcadores RAPD e estimar a distância entre os marcadores e o alelo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais da antracnose do feijoeiro

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams - Scrib, é uma das doenças mais graves e economicamente importante do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), afetando em todo mundo as cultivares suscetíveis e estabelecendo-se, preferencialmente, em regiões de temperaturas moderada a fria e com alta umidade ambiental, como as zonas temperadas e subtropicais (Chaves, 1980; Pastor-Corrales et al., 1995; Tu, 1992; Schwartz, 1991).

As perdas ocasionadas pela antracnose podem chegar a 100%, principalmente quando são empregadas sementes infectadas de cultivares suscetíveis. Além de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto, por ocasionar manchas no grão, tornando-o indesejável para o consumo (Chaves, 1980; Rava, Purchio e Sartorato, 1994).

Essa doença possui distribuição ampla e já foi constatada em vários países da Europa, África, Austrália, Ásia e Américas. No Brasil, a antracnose é prevalescente nos principais estados produtores (Rava, Purchio e Sartorato, 1994) como: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Góias, Bahia e Pernambuco, sendo importante ainda nos estados do Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba.

O Estado de Minas Gerais é responsável por cerca de 12% da produção nacional de feijão, sendo o segundo estado maior produtor do Brasil, com uma área plantada de, aproximadamente, 439.700 ha (Anuário da Agricultura Brasileira, 1999). Entretanto, a produtividade média da cultura neste estado está estacionada ao redor de 620 kg/ha. Em Minas Gerais, a antracnose causa perdas

consideráveis, particularmente, nas regiões Sul e Zona da Mata, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento do fungo (Vieira, 1988).

O fungo *C. lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Lams - Scrib., agente etiológico da antracnose, pertence à divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, sendo essa fase assexual (Webster, 1974 ; Smith, 1979). Em sua fase sexual, esse fungo é denominado *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et V. Schrenk f. sp. *phaseoli* Kimati (Kimati e Galli, 1970), classificado dentro da divisão *Eumycota*, subdivisão *Ascomycotina*. Nessa fase, o aparecimento de novas raças, entre os diversos mecanismos, pode ser proporcionado pela recombinação sexual (Batista e Chaves, 1982; Roca, 1997).

A infecção do feijoeiro comum, pelo *C. lindemuthianum*, pode provocar sintomas em toda a parte aérea da planta (Crispín, Sifuentes e Ávila, 1976; Chaves, 1980). Surgem lesões de tamanhos variados em folhas, hastes, vagens e sementes. Quando a fonte da infecção é a semente, verificam-se lesões necróticas (primeiros sintomas) nas folhas cotiledonares. As lesões foliares ocorrem, principalmente, nas nervuras principais, de cor vermelho-alaranjada à púrpura, tornando-se, posteriormente, de cor escura. A infecção pode também ocorrer na haste da folha, onde em casos severos, enfraquece a tal ponto, que a folha se dobra no sítio da lesão. Nas vagens, as lesões apresentam-se como cancrios deprimidos, de forma arredondadas, com margens ligeiramente proeminentes, delimitadas por um anel preto, com borda laranja-avermelhada (Pastor-Corrales e Tu, 1989). Quando as condições ambientais são favoráveis, forma-se uma massa de esporos, de coloração rosada no centro das lesões. Vagens novas chegam a murchar e secar se a infecção for severa. A partir das vagens, o fungo pode atingir os cotilédones e o tegumento da semente em desenvolvimento. As sementes infectadas apresentam-se freqüentemente descoloridas e com lesões na forma de cancrios ligeiramente deprimidos (Balmer e Galli, 1978; Mohan, Bianchini e Menezes, 1989).

Diversas estratégias estão sendo estudadas no Brasil e em outros países, procurando meios eficazes de combate à antracnose. O uso de sementes livres do patógeno é uma das práticas culturais mais importantes para o controle da doença. A rotação de culturas, com plantas não hospedeiras, por 2 a 3 anos, como cereais e milho, pode reduzir a quantidade de inóculo inicial, de restos culturais infectados (Zaumeyer e Thomas, 1957). Pio-Ribeiro e Chaves (1975) sugeriram o uso de cultivares resistentes e o plantio de sementes sadias, como métodos de controle mais eficientes da antracnose. Isso porque, praticamente, não onera o custo de produção, além de contribuir para evitar o controle químico, o qual torna o feijão mais caro e causa os danos já conhecidos devido a poluição.

2.2 Variação patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *C. lindemuthianum* possui ampla variabilidade em relação à capacidade de causar doença em várias cultivares. Tal variabilidade é identificada como diferentes raças fisiológicas (Rava, Purchio e Sartorato, 1994).

Inicialmente, a variação patogênica de *C. lindemuthianum* foi observada por Barrus, desde 1911 e relatou, em 1918, ao constatar que cultivares de feijão, quando inoculadas com isolados, de diferentes procedências, tinham comportamentos diferenciados, indicando a existência de duas raças distintas do patógeno - as raças Alfa e Beta.

A variabilidade patogênica do fungo *C. lindemuthianum*, na América Latina, é maior do que a encontrada na África, Europa, Austrália, nos EUA e no Canadá, sendo os isolados latino-americanos, os mais virulentos (Pastor-Corrales, 1992 a).

No Brasil, Kimati e Galli (1970) relataram a ocorrência das raças Alfa e Mexicano II e uma nova raça, que poderia ser a raça Delta. Oliveira, Antunes e Costa (1973) relataram, pela primeira vez, as raças: Gama, Mexicano I e Brasileiro I, além de Alfa e Beta. Oliari, Vieira e Wilkison (1973) relataram, em Minas Gerais, as raças BA -1,2 (Alfa), BA -3 (Brasileiro II = Alfa), BA -4, 5 (Brasileiro I) e BA -6, 7, 8 (Mexicano II). Menezes et al. (1982) identificou as raças Alfa, Delta, Epsilon, Lambda, Capa, Zeta, Eta, Teta e MU, utilizando materiais provenientes de 16 estados brasileiros.

Diante da utilização de diferentes conjuntos de cultivares diferenciadores, para a classificação das raças, decidiu-se, no *Primer Taller de Antracnose del Frijol en América Latina*, CIAT, Cali (1988), pela adoção universal de um conjunto de cultivares diferenciadores e uma nova metodologia para a nomenclatura de raças do patógeno da antracnose. Essa nova nomenclatura é baseada num "Sistema Binário", usando 12 cultivares diferenciadores de feijão (d), que são identificados pelos números de 1 a 12. A designação de um dada raça é obtida pela soma dos valores numéricos (2^{d-1}), de cada cultivar diferenciador, que é suscetível a essa raça (tabela 1).

No trabalho de Rava, Purchio e Sartorato (1994), utilizando esse novo procedimento de identificação, foram classificados no Brasil, 25 raças diferentes, pertencentes aos grupos Alfa, Delta, Gama, Mexicano I, Mexicano II e Brasileiro I.

TABELA 1. Cultivares diferenciadores de *Phaseolus vulgaris*, utilizados para a classificação de raças de *C. lindemuthianum* pelo sistema binário (Pastor - Corrales, 1992 b).

Cultivares Diferenciadores	Valor Numérico (2^{d-1})
1. Michelite	1
2. MDRK	2
3. Perry Marrow	4
4. Cornell 49242	8
5. Widusa	16
6. Kaboon	32
7. Mexico 222	64
8. PI 207262	128
9. TO	256
10. TU	512
11. AB 136	1024
12. G2333	2048

2.3 Melhoramento visando resistência à antracnose

O método de controle mais prático e econômico é a utilização de cultivares resistentes e tem sido amplamente utilizado em diversos países. Há, no entanto, o problema da durabilidade de uma cultivar resistente, quando portadora de apenas um alelo de resistência. Provavelmente, cultivares com vários alelos de resistência de genes diferentes, sejam mais duradouras (Kelly e Miklas, 1998). O entrave maior, no uso dessa estratégia, dá-se pela ampla variabilidade do patógeno. É proposto que se realize um monitoramento constante da variabilidade do patógeno *C. lindemuthianum*, tendo em vista que

novas raças têm apresentado capacidade para vencer a resistência de cultivares do feijoeiro (Rava, Purchio e Sartorato, 1994).

Desde 1991 até 1994, inúmeros trabalhos foram realizados para caracterizar fontes de resistência à antracnose (Tabela 2).

TABELA 2. Alelos de resistência do feijoeiro de diferentes genes, contra diferentes raças de *C. lindemuthianum*, identificados desde 1991 até 1994 (Alzate-Marin, 1996 e Basset, 1996).

Raças	Alelos de resistência à antracnose
Alfa	Alelos Dominantes: A ,B , Are, Mex I, II, III e alelos X e Y, que atuam como complementares
Beta	Alelos Dominantes: Are e B ₂ (duplicados) e C e D (complementares); Mex I
Delta	Alelos Dominantes Are, M, N e P e mais complementares; Alelos de genes independentes : Are, R, N e P (complementares) e T, U e V (complementares e recessivos); Alelos dominantes : Are, M, A, N e P, sendo N e P complementares
Capa	Alelos Dominantes Q, O e R e complementares
Gama	Alelos Dominantes e independentes: Are, G e H e pelos sistemas complementares: I-J e K-L
Ba -5	Alelos envolvidos de 6 genes: Are (dominante), br e s (duplicados recessivos e com ação epistática sobre Are em condição de dominância), q, z e w (complementares recessivos)
Epsilon	Alelo dominante Are
Lambda	Alelo dominante Are

Constata-se, na Tabela 2, que alguns alelos, como o Are, por exemplo, que confere resistência a um grande número de raças e, por isso, dificulta a identificação de cultivares ou linhagens, que são portadores do mesmo. Para isso, seria necessário utilizar-se de raças específicas para a identificação da

presença desses alelos, em um dado genótipo de feijão, as quais nem sempre são disponíveis.

Além disso, nota-se também na Tabela 2, uma multiplicidade de símbolos, para identificar os genes de resistência. Visando simplificar essa situação, Basset (1996) apresenta uma nova nomenclatura, para designar os genes de resistência do feijoeiro, usando o símbolo Co (de *Colletotrichum*). Foram denominados, até o momento, os seguintes alelos: Co-1 (A), encontrado na cultivar andino, Michigan Dark Red Kidney; Co-2 (Are), encontrado nas diferentes cultivares mesoamericanas, como Cornell 49242; Co-3 (Mex.I), encontrado na linhagem mesoamericana México 222; Co-3², um alelo alternativo para o loco Co-3, encontrado na linhagem mesoamericana México 227; Co-4 (Mex.II), encontrado na cultivar diferenciador TO; Co-4², um alelo alternativo para o loco Co-4, encontrado na cultivar G2333 e identificado por Young et al. (1998); Co-5 (Mex.III), encontrado nas cultivares mesoamericanas TU, G2333 e seleção 1360; Co-6, identificados por Schwartz, Pastor-Corrales e Singh (1982), encontrado na cultivar diferenciador mesoamericano AB 136; Co-7, identificado por Pastor-Corrales et al. (1994), encontrado na cultivar diferenciador G2333; e co-8, encontrado na cultivar AB 136, identificado por Alzate-Marin (1996).

O programa de melhoramento de feijoeiro do CIAT recomenda quatro estratégias, para o desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose: identificação e seleção de diferentes fontes parentais; recombinação de duas ou mais fontes; reunião de diversos mecanismos de resistência e sua transferência para genótipos adaptados às diversas regiões (Singh et al., 1992).

Como já mencionado, o controle da antracnose via resistência é amplamente viável, porque existem vários genes independentes no feijão e, em cada, um ou mais alelos conferem resistência a várias raças (Rava, Purchio e Sartorato, 1994; Pastor-Corrales et al., 1994; Young e Kelly, 1996; Basset 1996;

Alzate-Marin et al., 1997; Young e Kelly, 1997; Geffroy et al., 1998; Young et al., 1998).

Em função da pequena durabilidade das cultivares resistentes, com apenas um alelo, uma alternativa para aumentar a vida útil dos alelos verticais, de resistência de genes diferentes, é a colocação dos mesmos em uma única cultivar, isto é, construir uma pirâmide de genes (Pedersen e Leath, 1988; Mundt, 1990 e 1991, Singh et al., 1992; Young e Kelly, 1996; Miklas, Johnson e Stone, 1996; Young e Kelly, 1997; Alzate-Marin et al., 1999).

Para construção de uma pirâmide de genes existem duas dificuldades principais: a primeira é conseguir vários alelos verticais de resistência e eficientes para o controle do patógeno, nas principais regiões produtoras. Para se determinar quais alelos verticais são eficientes para o controle da doença, em uma dada região, é necessário fazer um levantamento da população do patógeno e identificar quais raças são predominantes, como realizado por Rava, Purchio e Sartorato (1994), nas principais regiões brasileiras produtoras de feijão.

A segunda dificuldade para a construção de uma pirâmide de genes é identificar a presença de dois ou mais alelos de resistência em um único genótipo (Tabela 2). Especificamente, para o controle do *C. lindemuthianum*, em que os principais alelos conferem resistência a um grande número de raças, é então necessário um conjunto de raças diferenciadoras dos alelos em apreço, para que eles possam ser identificados em um único genótipo. Como todas as raças não são disponíveis, para serem usadas como diferenciadoras de genes e algumas nem foram identificadas, é impossível se ter a certeza de forma rápida, que dois ou mais alelos ocorrem em um único genótipo, utilizando os procedimentos normais de genética por meio da inoculação (Young et al., 1998).

Uma possível alternativa para a solução desse problema é a marcação dos diferentes alelos, com um marcador molecular como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que tem sido usado com sucesso, em programas

de melhoramento do feijoeiro, visando resistência às principais doenças, como antracnose, ferrugem e vírus do mosaico comum. Tais marcadores permitem a seleção indireta dos mesmos para, posteriormente, serem piramidados numa só cultivar (Michelmore, Paran e Kesseli, 1991; Vallejos, Sakiyama e Chase, 1992; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Adam-Blondon et al., 1994; Michelmore, 1995; Kelly e Miklas, 1998).

Cultivares melhorados para a resistência à antracnose, ainda representam uma das principais contribuições dos programas de melhoramento de feijoeiro. O melhoramento assistido por marcadores, comparado aos métodos convencionais, oferece maior eficiência e rapidez, principalmente, se forem utilizados marcadores genéticos estreitamente ligados e flanqueando o alelo de interesse, reduzindo o número dos exaustivos testes de patogenicidade e, principalmente, viabilizando a construção de pirâmides (Young e Tanksley, 1989; Kelly e Miklas, 1998).

Uma das doze cultivares diferenciadoras para a antracnose é a cultivar G2333, que é resistente a todas as raças e possui três alelos de resistência contra o patógeno, Co-4², Co-5 e Co-7, dos quais, os dois primeiros já foram identificados por marcadores moleculares ligados a eles (Young e Kelly, 1997; Young et al., 1998; Castanheira, et al., 1999). Porém, ela é uma linhagem de hábito de crescimento IV, sensível ao fotoperíodo e com grãos vermelhos e brilhantes, portanto, inaceitável para uso como cultivar. Assim, um eficiente aproveitamento dessa fonte de resistência é por meio do seu cruzamento com um genitor com boas características agrônômicas, o qual deve ser empregado como genitor recorrente em um programa de retrocruzamento.

2.4 Marcadores de DNA

Marcadores moleculares de DNA diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Os distintos tipos de marcadores, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada, para revelar variabilidade a nível de DNA. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada, para identificá-los: hibridação ou amplificação de DNA.

Entre os identificados por hibridação estão os marcadores RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e minissatélites ou locos VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: PCR ("Polymerase Chain Reaction"); RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"); SCAR ("Sequence Characterized Amplified Regions"); Microsatélites e AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") (Milach, 1998).

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados com diversas finalidades, como na construção de mapas genéticos, na seleção de germoplasma em programas de melhoramento, permitindo à caracterização de diferentes genótipos (fingerprinting); no estabelecimento de filogenias; na clonagem de genes baseada em mapa ("positional cloning" ou "map-based cloning") e, principalmente, na identificação de alelos de efeitos principais e a seleção indireta dos indivíduos portadores dos mesmos (Sterling, Eden e Aitken, 1995; Painting, 1996).

2.4.1 Marcadores PCR e RAPD

A técnica PCR foi desenvolvida em 1984, por Kary Mullis (Mullis e Falloona, 1987; Saiki et al., 1985) e consiste na amplificação, *in vitro*, de

fragmentos de DNA, usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese do DNA- alvo, em ciclos repetidos (Mullis, 1990; Vas, 1985).

Cada ciclo de amplificação, na técnica de PCR, compreende três etapas: (1) desnaturação da molécula da DNA, com temperatura entre 91 - 94° C, (2) pareamento (anelamento) dos *primers* às regiões complementares no DNA e (3) extensão dos *primers* pela DNA polimerase. Estas etapas são realizadas em um termociclador, que fornece as temperaturas e respectivos tempos adequados, para desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão do DNA em cada ciclo de replicação, durante 25 a 40 ciclos (Passos - Bueno e Zatz, 1995).

A partir do PCR foram desenvolvidos outras classes de marcadores moleculares, como, por exemplo, a dos marcadores RAPD (" Random Amplified Polymorphic DNA") (Williams et al., 1990). Diferentemente do PCR, os marcadores moleculares do tipo RAPD utilizam um único *primer* de sequência arbitrária, usualmente de oito a dez nucleotídeos.

Os produtos de amplificação do RAPD são separados por eletroforese, sendo desconhecida a identidade das seqüências amplificadas. Constituem-se em amostras de fragmentos de DNA, da espécie utilizada, havendo a chance de se reproduzir alguns milhares por espécie (Ramalho, Santos e Pinto, 2000). Assim, existe a possibilidade de serem encontrados alguns próximos (ligados) ao alelo de interesse. Esses marcadores não requerem sondas ou preparação de filtro de hibridação, para isolar bandas de DNA, requerem pequenas quantidades de DNA, menores custos e tempo requerido, na obtenção de resultados (Williams et al., 1990; Edwards, Johnstone e Thompson, 1991; Kesseli, Paran e Michelmore, 1992; Afanador, Haley e Kelly, 1993).

Auxiliando os programas de melhoramento, os marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados na identificação de polimorfismos e de genes de

resistência a doenças em feijoeiro (Nodari et al., 1993; Adam-Blondon et al., 1994; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Kelly, 1995; Miklas, Johnson e Stone, 1996; Young e Kelly, 1996; Castanheira, Santos e Melo, 1996; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Alzate-Marin et al., 1997; Young e Kelly, 1997; Kelly e Miklas, 1998; Young et al., 1998; Arruda, 1998 ; Castanheira et al., 1999), alface (Paran e Michelmore, 1993) e tomate (Martin, Williams e Tanksley, 1991); na virulência e diversidade genética em *C. lindemuthianum* (Otoya et al., 1993; Vilarinhos et al., 1995; Mesquita, 1997; Alzate-Marin et al., 1999); na identificação de híbridos verdadeiros em feijoeiro (Alzate-Marin et al., 1996).

A eficiência da seleção, assistida por marcadores moleculares do tipo RAPD, pode ser aumentada pelo uso simultâneo de marcadores em acoplamento e em repulsão, fortemente ligados e flanqueando o alelo de interesse. Se esse alelo for dominante, os marcadores RAPD em repulsão, estarão presentes nos indivíduos homozigotos recessivos ou heterozigotos. (Alzate-Marin et al., 1997; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Young e Kelly, 1997).

Os problemas iniciais de repetibilidade entre laboratórios, motivados pela sensibilidade do RAPD às condições da reação de amplificação, podem ser superados por meio da padronização da técnica (Yu et al, 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1995; Painting, 1996; Williams, Rafalski e Tingey, 1993). Atualmente, é possível aumentar a repetibilidade de um marcador RAPD de interesse mais específico, denominado SCAR- Sequence Characterized Amplified Regions (Melotto, Afanador e Kelly, 1996), que consiste em isolar o fragmento de RAPD de interesse, seqüenciá-lo e construir um par de *primers* com cerca de 20-25 bases que amplificam o fragmento em apreço. Portanto, consiste na transformação do RAPD em PCR.

Quando o interesse do melhorista é apenas identificar alelos de interesse de efeitos principais, por meio de marcador, um procedimento altamente

eficiente, envolve a análise de misturas de DNA de indivíduos, com o mesmo genótipo, para o loco de interesse obtido de uma população segregante. Essa estratégia foi inicialmente proposta por Arnheim, Starng e Erlich, (1985) e modificado por Michelmore, Paran e Kesseli (1991) que propuseram seu uso para a rápida identificação de marcadores, em regiões específicas do genoma, utilizando populações segregantes, sendo a técnica denominada de "BSA-Bulked Segregant Analysis". A técnica vem sendo empregada com marcadores RAPD e diversos outros marcadores de DNA em vista da sua grande eficiência para identificar alelos de interesse. Após a identificação dos marcadores em uma população segregante, geralmente F₂ ou retrocruzamento, é também possível estimar a distância entre o marcador e o alelo de interesse.

O BSA tem sido utilizado com sucesso na identificação de marcadores ligados a características de herança simples, como o caso da maioria dos genes verticais de resistência a doenças, como a identificação de marcadores RAPD e RFLP associados à resistência do míldio (*Bremia lactuca*), um importante patógeno de alface (*Lactuca sativa*) (Michelmore, Paran e Michelmore, 1991; Paran e Michelmore, 1993); a *Pseudomonas syringae*, em tomate (Martin, Williams e Tanskley, 1991); a *Puccinia graminis*, em aveia (*Avena sativa*) (Penner et al., 1993); a *Uromyces phaseoli*, em feijão (Miklas, Stavely e Kelly, 1993; Haley, Afanador e Kelly, 1994); a *Leptosphaeria maculans*, em colza (Ferreira, 1993); a *Rhynchosporium secalis*, em cevada (Barua et al., 1993); *Cronartium ribicola*, em *Pinus lambertiana* (Devey et al., 1995); a *Phaeoisariopsis griseola*, em feijão comum (Ferreira, 1998). Especificamente em relação ao *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão comum, vários marcadores ligados a alelos de interesse já foram identificados (Tabela 3; Adam-Blondon et al., 1994; Castanheira, Santos e Melo, 1996; Young e Kelly, 1996; Alzate-Marin, 1996; Santos e Ferreira, 1996; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Young e Kelly, 1997; Young et al., 1998; Arruda, 1998; Castanheira et al., 1999).

TABELA 3. Marcadores RAPD ligados a genes de resistência à antracnose

Gene de Resistência	Fonte	Origem	Marcador RAPD e SCAR, e distância em cM (Cis=C e Trans=T)
Co-1	Michigan Dark Red Kidney	Andina	OF10 _{530t} (1,9cM)
Co-2	Cornell 49242	Mesoamericana	OQ4 _{1440c} (2,0 cM) OH20 ₄₅₀ B355 _{1000c} (5,4 cM)
Co-3	Mexico 222	Mesoamericana	Sem relato
Co-3 ²	Mexico 227	Mesoamericana	Sem relato
Co-4	TO, P45	Mesoamericana	ANT-TO1 _{830c} (0,0 cM) OC08 _{1059c} (13,3 cM)
Co-4 ²	G2333	Mesoamericana	OAL9 _{740c} (3,1 cM) OAS13 _{950c} (0,0 cM) SAS13
Co-5	TU, G2333, Sel. 1360, Ouro	Mesoamericana	OAB3 _{450c} (5,9 cM) OF10 _{912c} (11,5 cM) OR03 _{1112c} (36,3 cM)
Co-6	AB136 e Sel. 1308	Mesoamericana	OAH1 _{780c} (12,3 cM) OAK20 _{890t} (7,3 cM) OPZ09 _{950c} (20,4 cM) OPZ04 _{560c} (2,8 cM)
Co-7	G2333 e Sel. 1308	Mesoamericana	Sem relato
co-8	AB-136	Mesoamericana	Sem relato

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Genitores e cruzamentos

Foram utilizadas a fonte de resistência G2333 e a linhagem ESAL 696. A G2333 é uma das 12 cultivares diferenciadores para a antracnose, sendo portadora de três alelos dominantes de resistência de genes independentes, *Co-4²*, *Co-5* e *Co-7*, que conferem resistência a todas as raças de *C. lindemuthianum* identificadas no Brasil. Entretanto, ela possui grãos vermelhos, hábito de crescimento tipo IV, sensibilidade ao fotoperíodo, sendo totalmente inadequada para o cultivo na região. A linhagem ESAL 696 possui o alelo *Co-5* de resistência ao patógeno, grãos do tipo Carioca, hábito de crescimento tipo II e excelente potencial de produção de grãos.

Inicialmente, foi realizado o cruzamento G2333 x ESAL 696 e, posteriormente, o retrocruzamento (RC₁) ESAL 696 (G2333 x ESAL 696), sendo obtidas 78 plantas F₁.

3.2 Cultivo e inoculação da raça 2047 de *C. lindemuthianum* na população F₁ ESAL 696(G2333 x ESAL 696)

A raça de *C. lindemuthianum* utilizada para inoculação da população F₁RC₁ foi a 2047, proveniente de uma cultura monospórica, que foi incubada em meio M3 (Junqueira et al., 1984) sob condições assépticas, em câmara de crescimento à temperatura em torno de 20°C, por um período de 10 dias. A partir dessa cultura, foi preparada uma suspensão de esporos, contendo cerca de $1,2 \times 10^6$ conídios por mililitro.

As plantas da população F₁RC₁ foram crescidas em vasos, de cerca de 15 kg de solo. A inoculação foi realizada cerca de 10 (dez) dias após a

emergência, quando as plantas apresentaram as folhas primárias abertas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob condições de 100% de umidade relativa, durante cinco dias. Todas plantas que exibiram os sintomas típicos de necrose das nervuras foliares ou morte foram consideradas suscetíveis.

3.3 Extração do DNA

Foram utilizadas as plantas F₁RC₁. Antes de se proceder a inoculação (item 3.2) foi coletada uma das folhas primárias de cada planta, para a extração de DNA, utilizando-se o procedimento modificado de Rogers e Bendich (1988). As folhas foram maceradas com areia, juntamente com 10 ml de um tampão de extração [0,2 g de brometo de cetiltrimetil-amônio (CTAB); 1 ml de TRIS 1M; 0,4 ml de EDTA 0,5 M; 0,82 g de NaCl; 0,1 g de polivinilpirrolidona 40.000; 8,6 ml de água pura], pré-aquecido a 65°C e 20µl de 2-β- mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-Maria a 65°C, por cerca de 30 minutos, agitando-o a cada 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 ml da solução, de 24 clorofórmio : 1 álcool isoamil, homogeneizou-se levemente e centrifugou-se durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e misturado com 30 ml da solução, de 6 álcool 95° : 1 acetato de amônio 7,5 M, mantendo-o no freezer (- 20°C) por cerca de 1 hora, no mínimo. Em seguida, coletou-se o ácido nucléico (DNA) e adicionou-se 300µl da solução TRIS 1mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7 (TE). Após o DNA ter se dissolvido, procedeu-se uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil. O sobrenadante foi coletado e adicionado o triplo do seu volume, com a solução de 20 álcool 95° : 1 acetato de sódio 3M, mantendo-o no freezer, por pelo menos uma hora, ou até ocorrer a precipitação do DNA. A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA foi dissolvido em 300µl de TE. A operação seguinte consistiu em quantificar a concentração do DNA em fluorímetro (Hoefler

Scientific). Para isso foi usado 2 μ l da solução de DNA em 2 ml de tampão (TRIS 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1 μ g/ml do corante H32258. Logo após, o DNA foi diluído com TE para a concentração de 10 ng/ μ l.

3.4 Construção e análise de *bulks* segregantes

Após extraído o DNA de folhas de plantas F₁RC₁, previamente avaliadas quanto a sua resistência/suscetibilidade à raça 2047 de *C. lindemuthianum* (Michelmores et al., 1991), os DNA's das 40 plantas resistentes foram misturados equitativamente e, igualmente, foram misturados os DNA's das 38 plantas suscetíveis. As duas misturas (*bulks*) de DNA foram amplificadas com 700 *primers* de 10 nucleotídeos (Operon Technologies Inc., Alameda, Ca, EUA) visando identificar polimorfismos entre os *bulks*.

3.5 Análise RAPD

Cada reação RAPD foi realizada misturando-se os seguintes ingredientes com as respectivas concentrações (Skroch, Santos e Nienhuis 1992; Santos et al. 1994) : 200 μ M dNTP's, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 0,4 μ M de primer, tampão de reação (50 mM tris; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 250 μ g/ml de albumina de soro bovino; 1% de ficoll 400; 1 mM de tartrazina), 20 ng do DNA genômico e água pura até o volume de 10 μ l. O dNTP corresponde a uma mistura equitativa de ATP, GTP, CTP e TTP. Os primers são de 10 nucleotídeos. A reação assim preparada foi carregada em tubos capilares de vidro, de 10 cm de comprimento, próprio para o volume de 10 μ l e suas extremidades foram seladas em chama.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology). Foram usados os seguintes programas: a) o primeiro por dois ciclos, sendo a desnaturação do DNA a 91°C por 60 segundos, o anelamento do *primer* a 42°C por 7 segundos e o alongamento da cadeia de DNA a 72°C por 70 segundos; b) o segundo foi programado por 38 ciclos diferindo do primeiro apenas no tempo de desnaturação que é de apenas 1 segundo; c) o terceiro foi de 4 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (TRIS, Ácido Bórico e EDTA) em corrente elétrica de 55 V, por aproximadamente quatro horas. Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com brometo de etídio (0,5µg/ml) por 30 minutos e lavado o excesso de corante, por 30 minutos, com água destilada. Como padrão de tamanho de bandas de DNA, utilizou-se o DNA do fago X-174-RF digerido com a enzima de restrição Hae III. Em seguida, o gel foi fotografado em luz ultravioleta com filme polaroide 667.

O *primer* que amplificou o marcador RAPD detectado nos *bulks* segregantes, foi utilizado em todos os indivíduos constituintes de cada *bulk*.

3.6 Análise dos resultados

Procedeu-se a análise χ^2 dos resultados observados, tanto da reação da população F₁RC₁ ao patógeno, quanto da segregação do marcador RAPD. Posteriormente, foi realizada a análise de ligação considerando-se, simultaneamente, os resultados de reação e do marcador. Nesta análise empregou-se o programa MAPMAKER/EXP (Lander, Green e Abrahamson, 1987), versão 3.0b, com LOD score mínimo de 3,0. Este valor indica que a região genômica que apresentar o valor de LOD igual ou maior que três, será



considerada como marcadora do gene de interesse. Em geral, o valor de LOD é estipulado entre um limite de 2 a 3 (Milach, 1998).

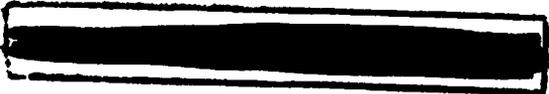
3.7 Purificação de fragmento de DNA amplificado por RAPD

A purificação e a clonagem do fragmento de DNA, amplificado pelo primer OPL04, foram realizados no Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O fragmento de DNA, amplificado por RAPD identificado como OPL04, ligado ao alelo *Co-7*, com aproximadamente 1 kb, foi purificado do gel de agarose (0,8%) utilizando o kit "Concert TM Nucleic Acid Purification system (GIBCO BRL).

3.8 Clonagem do fragmento de RAPD

O fragmento de DNA- OPL04 de RAPD, de aproximadamente 1 kb foi clonado no plasmídio próprio, para fragmento de PCR pGEM^R T Vector (PROMEGA). A clonagem foi realizada seguindo o protocolo do fabricante, onde foi usado 1µl do vetor (50 ng/µl); 1µl de T₄ DNA ligase (3 U/µl); 5µl de tampão T₄ DNA ligase; 3µl do fragmento purificado (50 ng/µl); 1µl de água mili Q e incubado por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, o plasmídio com o inserto foi eletroporado para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* (linhagem DH α), em equipamento próprio para eletroporação utilizando 2,5 volts por 5 segundos. Após a eletroporação, as bactérias foram crescidas em meio líquido Soc (2g de Bacto tryptona; 0,5g de bacto yeast extrat; 0,059g de NaCl; 0,0187g de KCl; 0,92 de MgSO₄; 0,36g de glicose e 100 ml de água bidestilada). Após 24 horas, as bactérias foram plaqueadas em meio LB, acrescido de 4µl de IPTG, 40µl de X-GAL e 7µl de amplicilina (40 mg/ml).



Foram obtidas colônias de bactérias transformadas, das quais será feita extração plasmidial e, posteriormente o clone será seqüenciado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo *Co-7*

A situação mais favorável para se marcar um alelo é quando a herança do caráter é monogênica. Este é o caso da reação do feijão à raça 2047, como pode ser notado na Tabela 4, pela segregação de metade de plantas resistentes e metade suscetíveis, na geração F_1 do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696). Embora tenha sido feita avaliação da reação ao patógeno em plantas individuais, as condições foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, produzindo um resultado muito próximo do esperado (Young et al., 1998).

A análise dos *bulks* segregantes, por meio do RAPD, identificou um potencial marcador na fase de acoplamento, amplificado pelo *primer* OPL04 (5'GACTGCACA3'), que amplificou uma banda de aproximadamente 1000 pares de bases (pb). Tal marcador também ocorreu no genitor resistente (Figura 1). Quando o *primer* OPL04 foi utilizado para amplificar os DNA dos indivíduos componentes do *bulk* resistente, o produto amplificado de 1000 pb esteve presente em todos os indivíduos (Figura 2) e ausente em todos os indivíduos do *bulk* suscetível (Figura 3). Esse resultado sugere que o marcador está intimamente ligado ao alelo de resistência.

Um marcador ideal deve mostrar herança monogênica. Isso foi comprovado pelos resultados de segregação da presença ou ausência da banda identificada nas plantas da geração F_1 do retrocruzamento (Tabela 4). À

semelhança dos resultados da reação ao patógeno, notou-se uma proporção de plantas com ou sem a banda muito próxima do esperado.

Tanto os resultados de reação, quanto os da presença ou ausência da banda, podem ser considerados confiáveis, pois a população foi de tamanho superior a ideal, porque seriam necessárias 7 plantas do retrocruzamento, para comprovar os presentes resultados com 99% de probabilidade (Ramalho, Santos e Pinto, 2000).

Para confirmar se o marcador estava, de fato, ligado ao alelo *Co-7*, foi feita a análise de co-segregação entre o marcador e o alelo de resistência. O elevado valor do χ^2 obtido, refutam a hipótese de independência (1:1:1:1), confirmando a hipótese de ligação entre o marcador e o alelo *Co-7* (Tabela 5). Nota-se que não ocorreu nenhum recombinante, indicando ligação completa, nessa população de 78 indivíduos. Este tamanho de população pode ser questionado, entretanto de acordo com Ramalho, Santos e Pinto (2000) o número mínimo de plantas necessárias para serem observados os 4 fenótipos na população F_1RC_1 seriam de 16 plantas, com 99% de probabilidade, admitindo distribuição independente. Portanto, lembrando que trata-se de uma população F_1RC_1 , espera-se, que com dois locos ocorram $2^n = 2^2 = 4$ combinações genotípicas. Comparando com a geração F_2 , que é também freqüentemente utilizada na identificação de marcadores ligados a alelos, necessita-se neste caso 4^n combinações genotípicas na população, portanto, teoricamente, 16 combinações quando são utilizados dois locos. Considerando agora a população de 78 indivíduos utilizada, correspondente a 2^n , nota-se que n equivale a 6,285. Se em vez de utilizar retrocruzamento tivesse sido usada uma F_2 , teoricamente ela deveria ter o tamanho $4^{6,285} = 6080,6$ indivíduos, para ser equivalente ao tamanho da população de retrocruzamento utilizada. Portanto, pode-se considerar que o tamanho usado foi maior do que os que têm sido normalmente

utilizados em outros estudos (Young et al., 1998; Arruda 1998; Castanheira et al., 1999).

TABELA 4: Análise de segregação do marcador RAPD, amplificado pelo primer OPL04 e do gene *Co-7*, na população F₁ do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696)

Locos testados	Geração	Frequências observadas	Frequências esperadas	χ^2
<i>Co-7</i>	F ₁ RC ₁	40R:38S	39R:39S ^a	0,05128
OPL04	F ₁ RC ₁	40P:38A	39P:39A ^b	0,05128

^a 39:39 (R = resistente; S = suscetível).

^b 39:39 (P = presença de banda; A = ausência de banda).

TABELA 5: Análise de co-segregação do gene de reação ao patógeno e do loco do marcador RAPD, amplificado pelo primer OPL04, na população F₁ do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696).

Locos Testados	Frequências observadas ^a	Frequências esperadas ^a	χ^2
<i>Co-7</i> /OPL04	AB:Ab:aB:ab 40:0:0:38	AB:Ab:aB:ab 19,5:19,5:19,5:19,5	78,1

^a AB (presença do alelo e do marcador); Ab (presença do alelo e ausência do marcador); aB (ausência do alelo e presença do marcador); ab (ausência do alelo e do marcador).

TABELA 6: Disposição do marcador RAPD OPL04 e do alelo *Co-7*, identificados na população de retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696), pelo programa MAPMAKER/EXP

Ordem	Marcador	Distância	LOD Score
1	<i>Co-7</i>	0,0 cM	...
2	OPL04	0,0 cM	23,48

Verificou-se na Tabela 6 que a frequência de recombinação entre o alelo e o marcador foi de 0,0% e a distância entre eles, de 0,0 cM, com um LOD score calculado de 23,48 (Lander, Green e Abrahamson, 1987). Trata-se portanto, de um excelente marcador do alelo *Co-7*, que deve ser altamente eficiente para se utilizar na seleção indireta de plantas resistentes em populações segregantes, dispensando-se a inoculação (Tankley 1983; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Castanheira et al., 1999).

Vários marcadores RAPD foram identificados, próximos de alelos do feijão, que conferem resistência ao *C. lindemuthianum* (Tabela 3). Entre eles, alguns são importantes nos programas de melhoramento de feijão, que vêm sendo conduzidos em algumas instituições de pesquisa brasileiras. Ao alelo *Co-5* presente na cultivar diferenciadora G2333, foi identificado um fragmento de DNA, amplificado pelo *primer* OAB3 unido em fase de acoplamento (5,9 cM), confirmando a presença desse alelo nas cultivares diferenciadoras de raças TU, G 2333 (Young e Kelly, 1996). Além desse, Castanheira et al. (1999), estudando as populações F₂, provenientes dos cruzamentos Carioca 300V x Ouro (provavelmente portador do alelo *Co-5*) e também P24 x Ouro, identificaram um fragmento de DNA, amplificado pelo *primer* OPF10 com cerca de 912 pb ligado ao alelo *Co-5*. A mesma autora identificou um segundo marcador, também ligado ao alelo *Co-5*, a partir da análise da população F₂ do cruzamento P24 x Ouro, resultante da amplificação pelo *primer* OPR03, que possui cerca de 1112 pb. Constatou-se que esses dois marcadores estão flanqueando o alelo *Co-5*.

Arruda (1998) identificou um fragmento de DNA, amplificado pelo *primer* ANT-TO1, com cerca de 830 pares de bases estreitamente ligado ao alelo *Co-4* (0,0 cM) em populações obtidas do cruzamento entre Rudá x TO (portador do alelo *Co-4*). Em estudos conduzidos por Castanheira et al. (1999), com a população F₂ do cruzamento Carioca 300V x P45 (portador do alelo *Co-4*), foi

identificado também o *primer* OPC08, que amplificou um fragmento de DNA com cerca de 1059 pb, ligado ao alelo *Co-4*.

Um alelo *Co-4²*, presente na cultivar G2333, foi identificado com o auxílio dos marcadores RAPD, utilizando os *primers* OAL9 e OAS13 e este último foi convertido no marcador SCAR SAS13.24XP e SAS13.24RP (Young et al., 1998). Esses autores observaram que no cruzamento TO/SEL 1308 não ocorreu segregação, sugerindo que o alelo dominante em SEL 1308 está localizado no mesmo loco que o alelo *Co-4* de TO. Em estudos anteriores, Young e Kelly (1996 a) haviam mostrado que a raça 2047 de *C. lindemuthianum* era virulenta para a cultivar TO, mas avirulenta para o genótipo SEL 1308, sugerindo que a resistência em SEL 1308 é conferida por um alelo diferente de *Co-4*, sendo denominado de *Co-4²*.

Ainda há algumas controvérsias na literatura sobre o alelo de resistência *Co-4²*, do gene *Co-4* e o alelo *Co-7*. Conforme comentado por Young et al. (1998), eles são alelos de genes diferentes. Além disso, Pastor-Corrales et al. (1994), estudando a resistência ao patógeno conferida pela cultivar G2333, quando inoculado com a raça 521, que vence a resistência conferida pelo alelo *Co-5*, presente na cultivar diferenciadora TU, constataram a ocorrência de dois alelos dominantes de genes diferentes, portanto, concordantes com os alelos *Co-4²* e *Co-7*. Entretanto, Kelly (informação pessoal, 1999) acredita que *Co-4²* e *Co-7* sejam o mesmo alelo, embora discorde dos resultados mencionados da literatura. Vale salientar que, independente da existência do alelo *Co-7*, o marcador identificador pelo *primer* OPL04, ainda não havia sido encontrado, e constitui-se em uma alternativa a mais, que os melhoristas e geneticistas terão para auxiliar na seleção de plantas resistentes ao *C. lindemuthianum*.

4.2 Clonagem do fragmento de RAPD – OPL04

Marcadores mais específicos baseados em PCR, conhecido como *Sequence characterized amplified region* (SCAR), vem sendo utilizado (Adam-Blondon, et al., 1994; Meloto, Afanador e Kelly, 1996; Young, et al., 1998). Como esses *primers* são mais extensos do que os usados em RAPD, com cerca de 20 a 25 nucleotídeos, eles amplificam especificamente, o fragmento de interesse. Por essa razão, pode-se usar alta estridência nas reações, como maior temperatura de anelamento, nas reações de amplificação de fragmentos de DNA, prevenindo anelamentos com outras seqüências com baixa homologia e, por isso, o resultado é muito mais garantido do que RAPD.

O fragmento purificado com cerca de 1000 pb é mostrado na figura 4. Para que seja obtida a seqüência das duas extremidades do fragmento de DNA-OPL04, este fragmento purificado foi clonado em plasmídeo (Figura 6) para, posteriormente, ser seqüenciado. Com as seqüências obtidas poder-se-á desenhar *primers* específicos para essa região e, utilizar-se o procedimento SCAR em vez do RAPD, para seleção indireta do alelo.

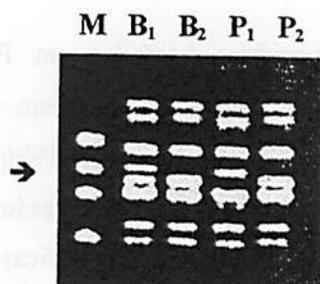


Figura 1: Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} dos *bulks* resistente e suscetível (B₁ e B₂, respectivamente) e dos genitores G2333 e ESAL 696 (P₁ e P₂, respectivamente). A seta indica a banda \cong 1000 pb, ligada ao alelo *Co-7*, presente em B₁ e P₁. M = corresponde ao DNA do fago X-174-RF digerido com a enzima de restrição Hae III.

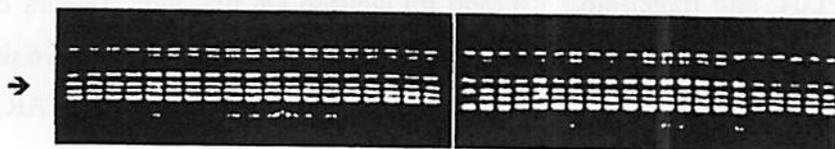


Figura 2: Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} dos indivíduos do *bulk* resistente. A seta indica a banda \cong 1000 pb, ligada ao alelo *Co-7*, presente em todos os componentes do *bulk*.

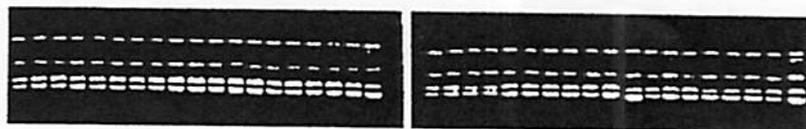


Figura 3: Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} dos indivíduos do *bulk* suscetível, com a ausência da banda em todos os componentes do *bulk*.

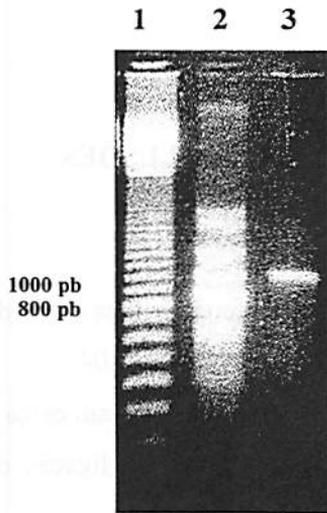


Figura 4: Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} do genitor G2333 e o fragmento purificado (linhas 2 e 3, respectivamente). Banda \cong 1000 pb, ligada ao alelo *Co-7*. A linha 1 corresponde ao marcador de tamanho de fragmentos de DNA.

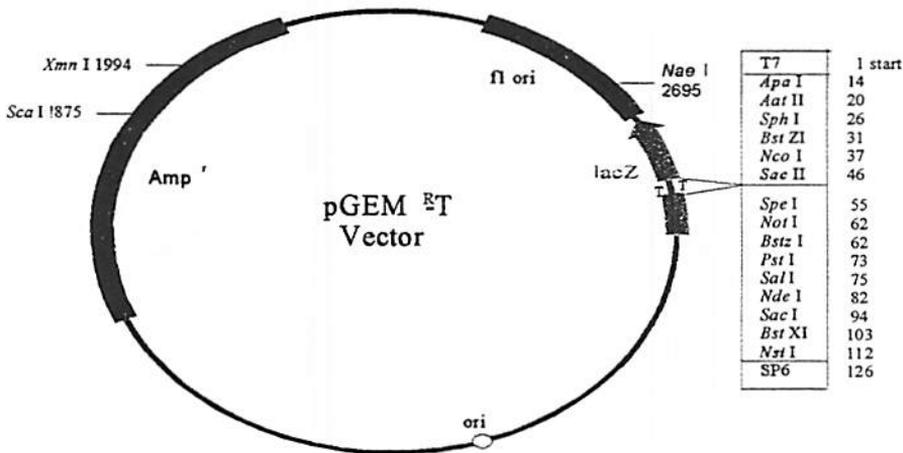


Figura 5: Mapa circular do plasmídio pGEM^R-T Vector (PROMEGA), utilizado para clonagem do fragmento purificado.

5 CONCLUSÕES

O alelo de resistência do feijão à raça 2047 de *C. lindemuthianum* foi marcado por meio do RAPD pelo *primer* OPL04.

O fragmento de DNA amplificado possui cerca de 1000 pb e constitui-se em um excelente marcador por ocorrer em ligação completa com o alelo de resistência.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *ARE*, a simple gene conferring resistance to *C. lindemuthianum*, the causal agent of antracnose in French bean. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v.88, n.6-7, p.865-870, Aug. 1994.
- AFANADOR, L.K.; HALEY, S.D.; KELLY, J.D. Adoption of a "mini-prep" DNA extration method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annual Reporter Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.36, p.10-11, 1993.
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; MARTINS FILHO, S.; PAULA JR., T.J.; SEDYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.19, n.4, p.621-623, dec. 1996.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology*, St. Paul, v.89, n.4, p.281-285, Apr. 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L. Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança de resistência e identificação de marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 1996, 65p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ALZATE-MARIN, A.L.; PAULA JR., T.J.; MENARIN, H.; BARROS, E.G.; MOREIRA, MA. Use of RAPD markers to understand the dominant nature of antracnose resistance genes present in common bean cultivar AB- 136. *Annual Reporter Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.40, p.132-133, 1997.
- ANUÁRIO da Agricultura Brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 1999. p.319-324.

- ARNHEIM, N.; STARNGE, C.; ERLICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v.82, n.22, p.6970-6974, Nov. 1985.
- ARRUDA, M.C.C. Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene C0-4 no cultivar Rudã. Viçosa:UFV, 1998, 101p. (Dissertação -Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).
- BALMER, E.; GALLI, F. Classificação das doenças segundo a interferência em processos fisiológicos da planta. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.) *Manual de Fitopatologia*. 2.ed. São Paulo: Ceres, 1978, v.1, p.269-288.
- BARRUS, M.F. Variation of varieties beans in their susceptibility to antracnose. *Phytopathology*, St. Paul, v.1, p.190-199, 1911.
- BARRUS, M.F. Varietal susceptibility of beans to strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) B e C. *Phytopathology*, St. Paul, v.8, p.589-614, 1918.
- BARUA, U.M.; CHALMERS, K.J.; HACKETT, C.A.; THOMAS, W.T.B.; POWELL, W.; WANGH, R. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus bulked segregant analysis. *Heredity*, Edinburgh, v.71, n.22, p.171-184, Dec. 1993.
- BASSET, M.J. List of genes. *Annual Reporter Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.39, p.1-19, 1996.
- BATISTA, U.G.; CHAVES, G.M Patogenicidade de culturas monoasospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.7, n.2, p.285-293, jun. 1982.
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F.; MELO, L.C. Identification of common bean alleles resistant to antracnose using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.565-569, dec. 1999.

- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B dos; MELO, L.C.** Uso do RAPD na identificação de genótipos de feijoeiro resistentes à antracnose. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.328, set. 1996. Suplemento.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT.** Informe Annual 1986: programa de frijol. Cali, 1986. p.339.
- CHAVES, G.** La Antracnosis. In: **SCHWARTZ, H.F.; GALVÉZ, G.E (eds.).** Problemas de producción de frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIAT, 1980. p.37-54.
- CRIPÍN, M.A.; SIFUENTES, J.A.; AVILA, J.C.** Enfermedades y plagas del frijol en México. México: INIA, 1976. 42p. (INIA. Folleto de Divulgación, 39).
- DEVEY, M.E.; DELFINOMIX, A.; KINLOCH, B.B.; NEALE, D.B.** Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blist rust in sugar pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.92, n.12, p.2066-2070, Jun.1995.
- EDWARDS, K.C.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C.A.** Simple and rapid method for preparation of plants genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n.6, p.1349, Mar. 1991.
- FERREIRA, C.F.** Herança da resistência do feijoeiro à mancha-angular e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. Viçosa: UFV, 1998, 37p. (Dissertação -Mestrado em Genética e Melhoramento).
- FERREIRA, M.E.** Linkage mapping of molecular markers and loci associated with flower induction and disease resistance in *Brassica napus*. University of Wisconsin: USA, Madison, 156p. 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D.** Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA, 1995. 220p.

- GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SEVIGNAC, M.; ADAM-BLONDON, A.F.; BANNEROT, H.; GETS, P.; DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potencial use in markers-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.96, n.3-4, p.494-502, Mar. 1998.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Science*, Madison, v.34, n.4, p. 1061-1066, Jul- Aug. 1994.
- INDICADORES DA AGROPECUÁRIA. Brasília: CONAB, v.8, n.10, p.5-6, out. 1999.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIN, L.; ROMEIRO, R.S.; GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. *Revista Ceres*, Viçosa, v.31, n.177, p.322-331, set. 1984.
- KELLY, J.D.: (kellyj@pilot.msu.edu), (02, Dec., 1999). Information about *Co-4* and *Co-7* allele. João Bosco dos Santos, jbsantos@ufia.br.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding*, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-11, Jan. 1998.
- KELLY, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *HortScience*, Alexandria, v.30, n.3, p.461-465, Jun. 1995.
- KESSELI, R.V.; PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and theses regions with reable PCR-based genetic markers. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, n.1, 1992, Minneapolis. *Proceedings...* Minneapolis: Joint Plant Breeding Symposia, p.31-36, 1992.
- KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et V. Scherenk f. sp. Fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Piracicaba: ESALQ, v.27, p. 411-437, 1970.

- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, Austin, v.1, n.1, p.174-181, Jan. 1987.
- MARTIN, G.B.; WILLIAMS, J.G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v.88, n.6, p.2336-2340, Mar. 1991.
- MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the gene in common bean. *Genome*, Ottawa, v.39, n.6, p.1216-1219, Dec. 1996.
- MENEZES, J.R.; MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., no Estado do Paraná. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1, 1982, Goiânia. Anais... Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1982. p.197-229. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 1).
- MESQUITA, A.G.G. Caracterização de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores moleculares RAPD. Viçosa: UFV, 1997. 53p. (Dissertação - Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.33, p. 393-427, 1995.
- MICHELMORE, R.H.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant populations (RAPD/RFLP). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v.88, n.11, p.9828-9832, Nov. 1991.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science*, Madison, v.36, n.5, p.1344-1351, Sept. - Oct. 1996.

- MIKLAS, P. N.; STAVELY, J.R.; KELLY, J. D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, n.6-7, p.745-749, May. 1993.
- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.17-28.
- MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, J.R. de. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná: Guia para identificação e controle**. 3.ed. Londrina: IAPAR, 1989. 56p.
- MULLIS, K.B.; FALLOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, [s.l.], v.55, p.335-350, 1987.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, v.262, n.4, p.36-43, Apr. 1990.
- MUNDT, C.C. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, n.3, p.221-223, Mar. 1990.
- NODARI, R.O; TSAI, S.M.; GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Austin, v. 134, n.2, p.341-350, Feb. 1993.
- OLARI, L.; VIEIRA, C.; WILKINSON, R.E. Physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* in the state of Minas gerais, Brazil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.57, n.10, p.870-872, Oct. 1973.
- OLIVEIRA, E.A.; ANTUNES, I.F.; COSTA, J.G.C. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina de 1968 a 1972. Pelotas:IPEAS, 1973. 5p.
- OTOYA, M.; MAYA, M.; PASTOR-CORRALES, M.; MAYER, J.E. Evolution of virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaeoisariopsis griseola* revealed by RAPD analysis. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF THE *Phaseolus* BEANS ADVANCED RESEARCH NETWORK, 1993, Cali. **Resumos ... Cali: CIAT**, 1993. 85p.

- PAINTING, K.** Measuring genetic variation using molecular markers. International Plant genetic Resource. Roma: Brain Ford-Lloyd, 1996. 82p.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W.** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.85, n.8 p.985-993, Sept. 1993.
- PASSOS-BUENO, M.R.; ZATZ, M.A.** A técnica de PCR e suas aplicações em doenças genéticas humanas. IN: LARA, F.J.S (org.). *Hibridação de ácidos nucléicos*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p. 72-88.
- PASTOR-CORRALES, M.A. (ed.)**. La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, em América latina. Cali: CIAT, 1992 a. p.212-239. (Doc. de Trabajo, 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A. (ed.)**. La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, em América Latina. Cali:CIAT, 1992b. p.240-251. (Doc. de Trabajo, 113).
- PASTOR-CORRALES, MA.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P.** Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. *Plant Disease*, Washington, v.78, n.10, p.959-962, Oct. 1994.
- PASTOR-CORRALES, MA.; OTOYA, M.M.; MOLINA, A.; SINGH, S.P.** Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Disease*, Washington, v.79, n.1, p.63-67, Jan. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.** Anthracnose. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.). *Bean production problems in the tropics*. 2.ed. Cali: CIAT, 1989. p.77-104.
- PEDERSON, W.L.; LEATH, S.** Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Phytopathology*, St. Paul, v.26, n.3, p.369-378, Mar. 1988.
- PENNER, G.A.; CHONG, J.; WIGHT, S.P.; MOLNAR, S.J; FEDAK,G.** identification of an RAPD marker for crown rust resistance gene *Pc68*in oats. *Genome*, Ottawa, v.36, n.5, p.818-820, Oct. 1993.

- PIO-RIBEIRO, G.; CHAVES, G.M. Estudos sobre a variabilidade de isolados e culturas monospóricas de *Colletotrium lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. *Experientiae*, Viçosa, v.19, n.4, p.59-71, fev. 1975.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JR, T.J.; BORÉM, A. (ed). *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas*, Viçosa:UFV, 1998, 435-449p.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos.; PINTO, C.A.B.P. *Genética na Agropecuária*. 6ª Edição, São Paulo: Globo, 2000, 550p.
- RAVA, C.A.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorre em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, n.2, p.167-172, jun. 1994.
- ROCA-MAGALLANES, M.G. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenck f. sp. *Phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*) (Sacc. & Magn) Scribner. Lavras: UFLA, 1997, 82p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extration of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual A6*, [s.l.],v.6, p.1-10, 1988.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington, v.230, n.4732, p.1350-1354, Dec. 1985.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington v.74, n.10, p. 5463-5467, Ouc. 1977.
- SANTOS, J.B. dos; CASTANHEIRA, A.L.M.; MELO, L.C. Emprego de marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a antracnose no feijão. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia, Resumos ...Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 1996, v.1, p.263-264.

- SANTOS, J.B dos.; FERREIRA, D.F. Identificação do alelo *mex-2* de resistência à antracnose e do alelo para halo escuro em feijão através de marcador RAPD. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.328, set. 1996. Suplemento.
- SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J.; SKROCH, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determinig genetic similarity among *Brassica oleracea* L. Genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, n.8, p.909-915, June 1994.
- SCHWARTZ, H.F. Antracnose. In: HALL R. (ed.). **Compendium of bean diseases**, St. Paul: APS , 1991. p.16-17.
- SCHUWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris*). **Euphytica**, Wageningen, v.31, n.3, p.741-754, Mar. 1982.
- SINGH, S.P.; PASTOR-CORRALES, M.A.; MOLINA, A.; OTOYA, M. Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: PASTOR-CORRALES, M. (ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, em America latina**. Cali: CIAT, 1992. p.198-211. (Doc. de Trabajo,113).
- SKROCH, P.W.; SANTOS, J.B dos.; NIENHUIS, J. Genetics relationships among *Phaseolusvulgaris* genotypes based on RAPD markers data. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.35, p.23-24, 1992.
- SMITH, G.M. **Botânica Criptogâmica**. 3.ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 1979.
- STERLING, G.R.; EDEN, L.; AITKEN, E. The role of molecular biology in developing biological controls for parasitic nematodes. In: GUNASSEKARAN, M., WEBER, D.J (eds.). **Molecular biology of the biological control of pest and diseases of plants**. Boca Raton: CRC, 1995. p.71-89.
- TANKSLEY, S.D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, Amsterdam, v.1, n.1, p.3-8, Jan. 1983.

- TU, J.C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean. Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance. In: BAILEY J.A; JEGER, M.J (eds.) *Colletotrichum* biology, pathology and control. Wallingford:CAB, 1992 p.203-224.
- VALLEJOS, E.; SAKIYAMA, N.; CHASE, C.A. Molecular marker-based linkage map of *Colletotrichum lindemuthianum* L. *Genetics*, Austin, v. 131, n.3, p.733-740, Nov. 1992.
- VAS, A. Polymerase chain reaction and other gene techniques in pharmacogenetics: an introduction and review. *Acta Physiologica Hungarica*, v.230, p.1350-1354, 1985.
- VIEIRA, C. *Doenças e pragas do feijoeiro*. Viçosa:UFV, 1988. 231p.
- VILARINHOS, A.; VIDIGAL, M.C.; BARROS, E.G.; PAULA JR., T.J.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A. RAPD_PCR characterization of varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) used to identify races of antracnose fungus (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.18, n.2, p.275-280, jun. 1995
- WEBSTER, J. *Introduction to fungi*. London: Cambridge University, 1974. 424p.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are use useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.22 p. 6531-6535, Nov.1990.
- WILLIAMS, J.G.; RAFALSKI, A.R.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods Enzymology*, [s.l.], v.218, p.704-740, 1993.
- YOUNG, N.; MELOTTO, M.; NODARI, R. O ; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G2333. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.96, n.1, p.87-94, Jan. 1998.
- YOUNG, N.; TANKSLEY, S.D. Analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.77, n.3, p.353-359, Aug. 1989.

- YOUNG, R.; KELLY, J.D.** Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.6, p.650-654, Jun. 1996.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D.** Gene pyramiding using markers assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.39, p.57-58, 1996.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D.** RAPD markers linked to tree major anthracnose resistance gene in common bean. **Crop Science**, Madison, v.37, n.3, p. 940-946, May-Jun. 1997.
- YU, K.F.; DEYNZE, A.V.; PAULS, K.P.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: **Methods in plant molecular biology and biotechnology**, [s.l.]: CRC , p.287-301, 1993.
- ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R.** A monographic study of bean diseases and methods for their control. Washigton:USDA, 1957. 255p. (USDA. Technical Bulletin, 868).