



**MARCAÇÃO DO ALELO DE RESISTÊNCIA DO
FEIJÃO COMUM À MANCHA ANGULAR POR
MEIO DE MICROSSATÉLITE E
RAPD**

GILVAN FERREIRA DA SILVA

2003

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

Silva, Gilvan Ferreira da

Marcação do alelo de resistência do feijão comum à mancha angular por meio de microssatélite e RAPD / Gilvan Ferreira da Silva. -- Lavras: UFLA, 2003.
40 p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Feijão. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Microssatélite. 4. RAPD.
5. Alelo de resistência I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65294
-635.65223

GILVAN FERREIRA DA SILVA

**MARCAÇÃO DO ALELO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO COMUM
À MANCHA ANGULAR POR MEIO DE MICROSSATÉLITE E
RAPD**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de 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
2003

GILVAN FERREIRA DA SILVA

**MARCAÇÃO DO ALELO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO COMUM À
MANCHA ANGULAR POR MEIO DE MICROSSATÉLITE E
RAPD**

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

Aprovada em 07 de fevereiro de 2003.

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho UFLA

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

"Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante".

(Charles Chaplin)

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

Dedico

Aos amigos

Elisa, Fábio, Helder, Juliano, Máira, Nelcimar e Patrícia.

*Tudo no início parecia tão distante; estávamos na busca do desconhecido.
No entanto, com o tempo, no decorrer desses anos, conhecemos uns aos outros,
Doamos todo nosso jeito, as melhores e piores partes. Momentos bons e ruins sempre
serão lembrados, com altos e baixos, vencemos a luta do dia-a-dia. Com certeza fica
um pedaço, um traço de cada um na lembrança de cada acontecimento, gesto e fala!
Os caminhos começam a se dividir e o sabor da despedida muda de cor quando a
certeza do encontro permanece em chama viva.
E, por tudo, a saudade há de ficar...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido mais essa vitória.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela orientação, disponibilidade e paciência durante a realização deste trabalho.

Às professoras Giovana Augusta Torres e Dulcinéia de Carvalho pelas valiosas sugestões e críticas apresentadas para o êxito deste trabalho.

Ao professor Eustáquio Souza Dias meus sinceros agradecimentos pelo apoio e ajuda na seleção para o doutorado na UFV; e à sua esposa Cidinha, pelo apoio e companhia durante as várias noites em que trabalhávamos muitas vezes até as 12 horas, e pelas inúmeras caronas até minha casa.

A Silmara de Moraes Pantaleão (minha orientadora da iniciação científica), as amigas Sandra e Andréa, e aos amigos Adnilton, Cleverton, e Rodolfo que, mesmo a distância, sempre mantiveram o contato e apoio.

Ao Lamartine e a Shelen, pela ajuda no laboratório.

Ao Adriano Bruzi, pelo material vegetal utilizado e avaliação de campo.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular, Marcus Wannner e Marinei.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Elaine secretária da Pós-Graduação em Genética de Plantas, pela dedicação e ajuda sempre que precisei.

E a todos que direta ou indiretamente foram importantes para a conclusão desse trabalho meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 A mancha angular do feijoeiro	03
2.2 Distribuição geográfica da mancha angular no mundo	05
2.3 Variabilidade patogênica de <i>P. griseola</i>	06
2.4 Melhoramento visando resistência à doença.	07
2.5 Marcadores moleculares para resistência.	09
2.6 Marcadores RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).	13
2.7 Marcadores microssatélite (<i>SSR - Simple Sequence Repeat</i>).	14
2.8 O método BSA.	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Genitores e cruzamento	20
3.2 Extração de DNA	20
3.3 Obtenção dos <i>bulks</i> segregantes	21
3.4 Análise dos <i>bulks</i> com marcadores RAPD.....	22
3.5 Análise dos <i>bulks</i> com marcadores microssatélite - SSR.....	23
3.6 Análise dos dados.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Controle genético da reação à mancha angular	25
4.2 Identificação de marcadores RAPD e SSR	26
5 CONCLUSÕES.....	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

SILVA, G.F. **Marcação do alelo de resistência do feijão comum à mancha angular por meio de microssatélite e RAPD.** Lavras: UFLA, 2003 (Dissertação-Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*.

A mancha angular do feijoeiro, causada pelo fungo *Phaeisariopsis griseola*, é uma das mais importantes doenças dessa cultura, por ocorrer em todo o Brasil causando grandes perdas. Assim, para auxiliar na seleção de genótipos resistentes o presente trabalho visou identificar o alelo de resistência de origem andina presente na cultivar Jalo, por meio de marcadores RAPD e microssatélite (SSR). Foram utilizados como genitores a linhagem resistente ESAL 550 e a suscetível Carioca MG, e avaliadas 120 plantas F_{2:3}. Com o DNA das dez plantas mais resistentes e das dez mais suscetíveis foram obtidos os *bulks* segregantes. Procedeu-se a reação de RAPD e microssatélite dos *bulks* e foram identificados três marcadores. Um deles é o microssatélite amplificado pelo par de *primer* PV-atct001₂₈₂ com frequência de recombinação de 0,0702 (EP=0.0005; 95%; IC= 0,029-0,11) e dois RAPD, um em fase de acoplamento amplificado pelo *primer* OPP07 (FR= 0,192; EP= 0,04; 95%; IC= 0,11-0,27), e outro em fase de repulsão OPBB04 (FR=0.327; EP=0,08; 95%; IC= 0,16-0,48). O marcador PV-atct001, por estar próximo do alelo de resistência e por apresentar a robustez de uma PCR, constitui um bom marcador para seleção indireta de plantas resistentes à mancha angular em populações segregantes com pequena taxa de erro.

*Orientador: João Bosco dos Santos.

ABSTRACT

SILVA, G.F. **Tagging resistance allele of the common bean to angular leaf spot by microsatellite and RAPD markers.** Lavras: UFLA, 2003 (Dissertation-Magister Science in Genetics and Plant Breeding)*.

Angular leaf spot (*Phaeisariopsis griseola*) is one of the most important diseases of common bean, since it is widespread all over the country in Brazil and causes great losses in grain yield. The objective of this study was to identify the resistant allele from the andean Jalo cultivar, with RAPD and SSR markers, in order to assist selection of resistant genotypes. The resistant line ESAL 550 and the susceptible cultivar Carioca MG were crossed to generate the F₁ and F₂ populations. 120 F_{2;3} plants were evaluated. The DNA of the 10 most resistant plants were bulked, and the same was done with the DNA of the 10 most susceptible, generating two contrasting bulks. Using these two bulks and the F₂ population, two RAPD and one SSR markers were found to be linked to the reaction gene. The SSR marker was amplified by the primer PV-atct001₂₈₂, and the recombination frequency was 0.0702 (SE=0.0005; 95%; CI= 0.029-0.11). This is the most useful marker for the indirect selection of resistant plants in segregating populations because the error in the selection will be small. The RAPD markers were amplified by the primer OPP07 linked in coupling phase and OPBB04 linked in repulsion phase to the resistant allele, respectively, with recombination frequencies of 0.192 and 0.327. Therefore, these RAPD markers are not so useful in assisting selection, because they are too far from the resistant allele.

* Adviser: João Bosco dos Santos.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do feijão representa uma importante fonte de renda e constitui um dos produtos agrícolas de maior significado sócio-econômico. Isso porque ele é a base da alimentação da maioria da população, apresentando uma média de consumo de cerca de 15kg/pessoa/ano (Texeira e Thung, 1994). Entretanto, o consumo per capita no Brasil reduziu mais de 22% nos últimos 25 anos (Santos e Braga, 1998).

As ofertas reduzidas e irregulares, juntamente com preços elevados, estão entre as causas da queda no consumo. Esse quadro pode ser revertido com o aumento na produção. No entanto, enfrenta vários obstáculos, como as doenças, dentre as quais a mancha angular, causada pelo fungo *Phaeisariopsis griseola*, é uma das mais importantes (Santos e Braga, 1998; Paula-Jr. e Zambolim, 1998). Assim, o controle da doença certamente contribuirá para aumentar a produtividade e oferta do produto.

A medida mais eficiente de controle de doenças é o uso de cultivares resistentes (Sartorato e Rava, 1994; Paula-Jr e Zambolim, 1998). Para a obtenção dessas cultivares é importante conhecer o controle genético e as fontes de resistência, bem como a variabilidade nas populações do patógeno.

Embora as informações sobre controle genético e fontes de resistência disponíveis já viabilizem a obtenção de cultivares resistentes, uma dificuldade é a seleção dessas por meio de inoculações artificiais. Os procedimentos para causar a doença artificialmente ainda não são precisos e resultam numa baixa eficiência de seleção. Uma alternativa freqüentemente usada é a seleção sob incidência natural da doença. Essa, no entanto, geralmente ocorre apenas na

safra da seca em grande intensidade, na maioria das regiões produtoras no Brasil (Sartorato e Rava, 1994).

Assim, o emprego de marcadores moleculares para a identificação de alelos verticais de resistência representa uma importante contribuição para o melhoramento de feijão. Isso porque permitirá selecionar os genótipos com um ou mais alelos de resistência, em qualquer época, contribuindo assim para aumentar a eficiência do processo.

Já se conhece parcialmente o controle genético da resistência e há indicações de que as fontes de origem andina devem ser mais duráveis, porque a maioria das cultivares usadas no Brasil e, conseqüentemente, das raças que lhes causam doenças, são de origem mesoamericana (Paula-Jr e Zambolim, 1998; Sartorato, 2002). Além disso, tem sido constatada grande variabilidade na população do patógeno (Sartorato e Rava, 1994; Paula-Jr e Zambolim, 1998; Nietzsche, 2000; Sartorato, 2002).

Diante da predominância de raças que vencem os alelos de resistência de origem mesoamericana, o uso de resistência de origem andina, como a proveniente da cultivar Jalo, deverá contribuir para a obtenção de cultivares com resistência, em princípio mais eficaz e durável. A identificação desse alelo por meio de um marcador como RAPD ou microssatélite facilitará ainda mais o melhoramento.

Considerando os aspectos apresentados, o presente trabalho visou marcar o alelo de resistência de origem andina presente na linhagem ESAL 550 por meio de marcador RAPD e microssatélite (SSR).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mancha angular do feijoeiro

O cultivo do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui-se numa das principais explorações agrícolas do país, não apenas pela área semeada e pelo valor da produção mas, principalmente, por ser esta leguminosa, um dos principais componentes da alimentação básica do povo brasileiro. A área plantada é de cerca de 4,5 milhões de hectares com um rendimento médio de 705 kg/ha (IBGE, 2002). Esta atividade agrícola, de primordial importância econômica e social, está sujeita a grandes riscos, entre os quais podem ser citadas as doenças que, muitas vezes, têm sido responsáveis por perdas significativas de produção.

Nas duas últimas décadas, a mancha angular tornou-se um dos principais problemas fitopatológicos desta cultura, afetando, com maior ou menor intensidade, todas as cultivares recomendadas. As perdas no rendimento são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença na cultura, podendo reduzir a produção em até 70% (Sartorato e Rava, 1994).

A mancha angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo fitopatogênico *Phaeisariopsis griseola*, apresenta uma ampla distribuição mundial, sendo principalmente disseminada nos países tropicais. Contudo, sua presença já foi relatada em todos os continentes. Os sintomas aparecem principalmente nas folhas, podendo ocorrer também nas vagens, caule e ramos. Nas folhas, as manchas que se originam na face superior e que estão delimitadas pelas nervuras logo evoluem até converterem-se em lesões cinzas, que mais tarde se tornam castanhas, sem coloração nas bordas. A angularidade das manchas constituem uma característica inequívoca para o diagnóstico dessa

doença. As lesões podem ser tão numerosas que podem causar uma desfolha prematura. No caule, as lesões são alongadas e marrons; já nas vagens, menos freqüentes do que nas folhas, são superficiais e têm margens quase negras com centro marrom (Sartorato e Rava, 1994; COSAVE 2002).

O controle da doença pode ser feito por meio de cultivares resistentes e da pulverização foliar de fungicidas. O desenvolvimento de cultivares resistentes, entretanto, é dificultado pela grande variabilidade patogênica que o fungo apresenta. Conseqüentemente, na maioria das vezes, o produtor não tem outra alternativa a não ser utilizar cultivares suscetíveis, tornando obrigatório o emprego de produtos químicos. Em nosso país, o controle químico desta doença tem sido mais utilizado pelos médios e grandes produtores (Sartorato, 2001).

Inúmeros fungicidas têm sido recomendados para o controle da mancha angular do feijoeiro comum. Embora a indústria tenha desenvolvido novas moléculas, que apresentam maior eficiência e menor grau de toxicidade ao meio ambiente, o uso de cultivares resistentes continua sendo o método mais econômico, eficiente e menos poluente (Sartorato, 2001).

Para se fazer melhoramento visando à obtenção de cultivares resistentes é imprescindível conhecer o controle genético da resistência. Esta tem se revelado, monogênica e dominante nos genótipos AND 277 (Carvalho et al., 1998), MAR-2 (Ferreira et al., 2000), Cornell 49-242 (Nietsche et al., 2000), México-54 (Sartorato et al., 2000) e Ouro Negro (Corrêa et al., 2001).

Caixeta (2002) utilizando a linhagem BAT 332 como uma fonte de resistência à mancha angular, verificou que a herança é monogênica e dominante para a raça 61.41 de *P. griseola*. A autora concluiu que a existência de um único alelo controlando a resistência de BAT 332 à mancha angular facilitará grandemente a transferência dele para cultivares elite, em programas de retrocruzamentos e piramidação. Recomenda ainda que testes de alelismo sejam feitos para verificar se esse alelo de resistência dominante segrega

independentemente de outros já caracterizados, para que ele possa ser incorporado em programas de melhoramento.

O controle genético da resistência da cultivar Jalo foi recentemente estudado por Bruzi e colaboradores (2002), por meio do cruzamento da linhagem resistente ESAL 550, selecionada dentro daquele cultivar, com a suscetível Carioca MG. É importante mencionar que, embora a resistência do Jalo seja, em princípio, mais durável, por ser de origem andina, ela é também mais difícil de ser utilizada no melhoramento. Isso ocorre devido à incompatibilidade dos genótipos andinos de grãos grandes para cruzar com genótipos mesoamericanos de grãos pequenos (Gepts e Bliss, 1985). Entretanto, existem algumas combinações compatíveis como o cruzamento com a cultivar carioca MG, a qual funciona como ponte para transferência do alelo de resistência para outros genótipos típicos mesoamericanos (Vieira et al, 1989; Santos e Gavilanes, 1998).

2.2 Distribuição geográfica da mancha angular no mundo

Dados do Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) revelam que a doença apareceu na Europa na região do mediterrâneo, sendo originalmente reportada na Áustria, em 1905; Ex-União Soviética, em 1912 (Moscou); Israel, Itália, Holanda, em 1920; Iran, Romênia e Iugoslávia, em 1929; Alemanha, em 1932; Espanha, em 1934; Portugal, Polônia e Bulgária, em 1936; Suíça e Turquia, em 1948; França, Hungria, Grécia, em 1965 e Irlanda, em 1966.

Na África, ocorre na área do sul, leste e oeste do continente. Na Ásia está amplamente disseminada. Na Oceania ocorre no leste do país. Na América do Norte ocorre nos Estados Unidos, nas regiões leste e sul e no México. Especialmente, ocorre em toda a América Central e Sul, que

são os locais de origem do feijão e, principalmente, em regiões onde ele é mais cultivado como Argentina, Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela.

2.3 Variabilidade patogênica de *P. griseola*

A coevolução patógeno-hospedeiro entre *P. griseola* e *P. vulgaris* constitui um importante elemento de variabilidade genética e tem sido reportada em vários trabalhos (Nietsche, 2000; Sartorato, 2001; Muhuku et al., 2002). Os isolados de *P. griseola* foram divididos em dois grupos: andino e mesoamericano, que correspondem às subpopulações definidas da espécie *Phaseolus vulgaris*.

Numa caracterização recente de isolados do *P. griseola* africanos, identificou-se, com o uso de marcadores RAPD, um grupo de isolados andinos, mas que podem infectar algumas variedades mesoamericanas. Estes isolados, designados de afro-andinos, foram identificados somente na África (Muhuku et al., 2002). Os autores utilizaram microssatélites, RAPD e digestão da região espaçadora do rDNA com enzimas de restrição, para elucidar a similaridade genética entre os grupos afro-andino, andino e o mesoamericano de *P. griseola*. Encontraram diferenças genéticas significativas entre isolados afro-andinos e andinos da África em relação aos isolados andinos da América Latina, revelando uma diferenciação geográfica significativa dentro da linhagem andina. Os resultados deste estudo mostraram que os isolados afro-andinos não constituem um grupo novo do *P. griseola* e não representam a evolução a longo prazo do genoma do patógeno. Mais provavelmente são originados de mutações de ponto nos genes para a patogenicidade. Esses resultados têm implicações significativas na recomendação de genótipos resistentes do feijão.

A grande dificuldade no desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido a ampla variabilidade do *P. griseola*. No Brasil, vários estudos utilizando os métodos convencionais e moleculares têm demonstrado a amplitude desta variabilidade (Nietsche, 2000; Sartorato, 2001). A resistência devida a todos os alelos presentes nas cultivares diferenciadoras, já foi quebrada pela raça 63.63. Tais alelos de resistência podem ser de genes diferentes e também de um mesmo gene, como ocorre em relação à resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose (Basset, 1996). Isto indica que a procura de novas fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro comum deve ser contínua.

2.4 Melhoramento visando resistência a doenças

Várias estratégias de melhoramento estão sendo utilizadas para incorporar resistência a uma série de patógenos que atacam a cultura do feijão. Entre elas, a piramidação, que consiste na combinação ou introdução de diferentes alelos de resistência em uma única cultivar, é uma estratégia de melhoramento genético que tem sido adotada para aumentar a durabilidade e o espectro de resistência a doenças (Young e Kelly, 1996). Uma ferramenta importante que tem sido adotada para auxiliar neste processo é o uso de marcadores moleculares monitorando a introgressão dos alelos de resistência, bem como no auxílio do entendimento das relações alélicas entre as fontes de resistência.

Em geral, as fontes de resistência não são adequadas e no processo de introdução dos alelos de resistência é necessário o emprego do método de retrocruzamento para se associar os alelos favoráveis do genitor recorrente com o alelo de resistência do doador (Fher, 1987). Ragagnin (2001), avaliando 13 marcadores para utilizar no processo de piramidação, verificou que os marcadores com mais de 7,1cM perderam sua associação com o alelo de

resistência durante o processo de recuperação do genótipo do genitor recorrente, na realização dos vários ciclos de retrocruzamento. Essa ausência da marca se deve à ocorrência de permuta genética entre o alelo de resistência e o marcador molecular.

Evidentemente, isso ocorre porque o retrocruzamento é o processo que mais favorece a ocorrência de permuta. No entanto, se o número de retrocruzamentos é de até dois ou três, há boas chances de o marcador não segregar, pois com cinco retrocruzamentos, a probabilidade de separação de um marcador que se recombina com a frequência de 10% é de 47% e de um marcador que se recombina com 20% é de 74% (Fehr, 1987).

Pereira (2003) constatou que um marcador RAPD, que se recombina a uma frequência de 11,5% com o alelo de resistência, não se separou após um retrocruzamento, a partir da avaliação de 16 linhagens descendentes. Ainda segundo Ragagnin (2001), marcadores intimamente ligados aos alelos de resistência apresentam grande facilidade e precisão na seleção de indivíduos resistentes, podendo viabilizar projetos que, por meio de procedimentos clássicos, não seria possível.

No feijoeiro comum, com o advento dos marcadores moleculares, os estudos visando o mapeamento de diferentes alelos de resistência (**R**) aumentaram consideravelmente nos últimos anos (Kelly e Miklas, 1998). Em programas de melhoramento que visam à piramidação de alelos R, o uso de marcadores na fase de intercruzamento é de vital importância. Isso porque, adotando-se estratégias convencionais de melhoramento, este processo torna-se mais difícil, necessitando de inoculações múltiplas, podendo levar a erros na avaliação dos sintomas das doenças, além de gastar um tempo consideravelmente maior. Entretanto, a principal contribuição dos marcadores na piramidação é quando não se dispõe de todas as raças para a identificação dos genótipos das pirâmides. Nesse caso, o único meio rápido de identificação de

tais genótipos é por meio dos marcadores, procedendo a seleção das plantas resistentes de forma indireta.

Um fator que afeta a eficiência da seleção indireta é a utilização de marcadores ligados em repulsão ou acoplamento (atração) com o alelo de resistência. Marcador em fase de repulsão é aquele ligado ao alelo que confere suscetibilidade e em acoplamento é aquele ligado ao alelo de resistência. A seleção utilizando marcador RAPD em fase de repulsão identifica uma maior proporção de genótipos homozigotos resistentes e menor proporção de indivíduos segregantes e homozigotos suscetíveis, quando comparados a marcadores em fase de acoplamento (Haley et al., 1994). Uma situação ainda mais favorável para o melhorista é quando se dispõe de dois marcadores ligados, um em fase de repulsão e outro em atração. O uso de ambos, mesmo dominantes, prediz um efeito de um marcador co-dominante, que permitindo identificar os genótipos resistentes homozigotos e heterozigotos, assim como os suscetíveis.

2.5 Marcadores moleculares para resistência

Os marcadores moleculares têm alcançado uma elevada importância na seleção assistida, por facilitar a introdução de genes de resistência em material de elevado valor no melhoramento. A identificação de alelos $Co-4^2$ de resistência à antracnose em feijão foi realizada com sucesso por meio de RAPD. Verificou-se que esse marcador está estritamente ligado ao alelo de resistência a uma distância de 0,0 cM (Silva e Santos, 2001). A seleção de resistência a nematóide em batata tem uma longa tradição e, tanto resistência monogênica quanto poligênica têm sido detectadas por marcadores moleculares (Jung et al., 1998). A seleção assistida por marcadores tem um elevado potencial também para auxiliar no melhoramento visando o controle de doenças (Kumar, 1999).

Rommens e Kishore (2000) ressaltaram que programas de melhoramento, visando resistência à doença, têm sido otimizados em virtude da incorporação de marcadores moleculares e outras biotecnologias. Estima-se que, nos próximos cinco anos, vários resultados serão obtidos, como o lançamento de novas cultivares resistentes a doenças. Programas baseados em alelos de resistência ganharão muito com o suporte do melhoramento molecular. Isto porque alelos de resistência serão transferidos mais rapidamente para germoplasma elite. Os alelos de resistência serão identificados com maior velocidade por métodos não convencionais, permitindo, entre outras coisas, sua localização no genoma, mapeamento e seqüenciamento.

O uso de transgênicos é uma outra possibilidade de resistência herdável por meio de engenharia genética. Esse é um outro precedente que tem sido aberto com a identificação de alelos de resistência por meio de marcadores moleculares. Em adição a esses progressos que têm sido feitos na área vegetal, o conhecimento das estratégias genéticas dos mecanismos patogênicos e dos genes envolvidos na patogenicidade abre um novo horizonte no cultivo e proteção de plantas. A interação baseada na combinação do conhecimento do sistema de defesa usado pela planta e sistema de ataque dos patógenos permitirá conceber o desenvolvimento de novos alelos de resistência a doenças (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Jung et al., 1998; Rommens e Kishore, 2000).

Outro fator que deve ser levado em consideração é que a introgressão de alelos resistentes em cultivares elites via melhoramento tradicional pode levar de 10 a 25 anos. Esse processo pode ser consideravelmente acelerado com o uso de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Essas técnicas tornam possível a triagem molecular de populações segregantes para o fenótipo resistência a doenças (Michelmore et al., 1991), o que levaria muito tempo e

trabalho intensivo via método tradicional. Com o programa de melhoramento assistido por marcadores estima-se que há uma redução de tempo de 50% a 70% (Rommens e Kishore, 2000).

A habilidade para isolar e transferir alelos de resistência elimina a questão de retenção de alelos indesejáveis geneticamente ligados aos de resistência, um importante problema associado ao melhoramento clássico, visto que, além do alelo de interesse, são transferidos outros alelos de efeito pouco desejável. Dessa forma, novas técnicas na transferência de longos fragmentos de DNA podem ser usadas para transferir alelos de resistência de múltiplos genes simultaneamente, o que permite aumentar a durabilidade da resistência e garante a transferência somente dos alelos de interesse (Rommens e Kishore, 2000).

Experimentos de seqüenciamento e mapeamento genético mostram que genes de reação a patógenos estão geralmente organizados em agrupamentos muito próximos chamados de *clusters* ou blocos gênicos. Os alelos de resistência desses genes possuem regiões similares e essas regiões de consenso indicam que esses genes são parte de um sistema de transdução de sinal. A maioria dos genes de resistência apresenta ainda uma região rica em leucina, que estaria ligada à evolução do gene (Hammond-kosack e Jones, 1997; Geffroy et al., 1998; Michelmore e Meyers, 1998).

A seleção assistida por marcadores tem sido prioridade em programas de melhoramento de trigo. O primeiro relato de marcador baseado em DNA, ligado a alelos de resistência a *Septoria nodorum* por meio do método da análise de *bulk* segregante utilizando marcador RAPD, foi feito por Cal et al. (2001). Eles identificaram duas marcas designadas de UBC512 e RC37 com aproximadamente 15 e 13,1 cM de distância do alelo smbTM respectivamente, sendo desenvolvido um SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) para ser usado no programa de melhoramento.

No caso do feijoeiro-comum, com o advento dos marcadores moleculares, os estudos visando o mapeamento de diferentes alelos R, aumentaram muito nos últimos anos e os marcadores RAPD têm exercido um papel importante na contribuição para a resistência a doenças (Kelly e Miklas, 1998).

A análise da segregação da resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular em várias populações revelou diferentes modos de herança para a resistência a cada uma das raças fisiológicas. Verificou-se que os alelos de resistência às raças fisiológicas 32, 47, 49, 52 e 56 de *Uromyces appendiculatus* estão proximamente ligados. Tal ligação também é verificada para os genes de resistência às raças fisiológicas 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum* e às raças fisiológicas 31.55 e 63.31 de *P. griseola* (Corrêa, 1999). O agrupamento de genes de reação de plantas já foi relatado em diversas plantas. O exemplo típico é o loco M de resistência à ferrugem do linho. Neste loco, arranjos *in tandem* de alelos R relacionados com diferentes especificidades são encontrados no genoma da planta.

A evolução de tais genes fortemente relacionados pode ter sido o resultado de eventos raros de duplicação, fornecendo a oportunidade de amplificação rápida por meio de permuta genética desigual entre seqüências similares situadas em localizações não homólogas. A ocorrência desses pareamentos desiguais de cromossomos homólogos na meiose, seguidos de permuta, leva ao desenvolvimento de famílias multigênicas por duplicação do segmento contendo o gene ancestral (Pryor e Ellis, 1993; Hammond-Kosack e Jones, 1997).

2.6 Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Originalmente, foi desenvolvida a tecnologia da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que amplifica um fragmento específico de DNA. No entanto, esse procedimento apresenta uma limitação quanto ao seu uso em larga escala, por requerer o conhecimento das seqüências de nucleotídeos que compõem as duas extremidades da seqüência de DNA que se deseja amplificar (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esse conhecimento é necessário para se obter seqüências de DNA complementares a essas extremidades, os primers a partir dos quais a *Taq* DNA polimerase processa a amplificação do fragmento de interesse. Os marcadores RAPD contornam esse problema do conhecimento prévio das extremidades da seqüência de DNA que se deseja amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos onde nenhum conhecimento de seqüência de DNA existia.

A modificação que levou ao desenvolvimento da técnica RAPD por Williams e colaboradores em 1990, baseia-se na utilização de apenas um *primer* (decâmero) de seqüência aleatória na reação de PCR, alterando também as condições específicas de amplificação da reação. Esta variação possibilita que ocorra amplificação ao acaso de segmentos de DNA no genoma. A amplificação é função da probabilidade de, após a desnaturação da molécula de DNA, existir no genoma uma seqüência complementar ao mesmo *primer* em uma das fitas e, a uma distância que possa ser percorrida pela *Taq* DNA polimerase, uma outra seqüência complementar ao *primer* na fita oposta. Portanto, a reação de RAPD ocorre devido ao anelamento do *primer* único em pontos próximos do genoma, geralmente distantes de 500 a 2000 pares de base (pb), delimitando a região que será amplificada (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.7 Microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeat)

Os microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*), são regiões no genoma eucarioto que possuem repetições em *tandem* de mono-, tri-, tetra-, penta ou até mesmo hexanucleotídeos, que se repetem de 10 a 60 vezes ou mais raramente até milhares de vezes. As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a confecção de *primers* específicos que as amplificam, via PCR (Powell et al., 1996; Fisher et al., 1996; Hite et al., 1996; Primmer et al., 1997; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Tóth et al., 2000; Hayden e Sharp, 2001).

Os genomas cloroplástico e mitocondrial também possuem SSR, mas em geral, tratam-se de repetições mononucleotídicas (Powell et al., 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Em plantas, esses marcadores já foram descritos em milho, soja, arroz, trigo, cevada e, mais recentemente, em feijão por Yu e colaboradores (2000), Gaitán-Solís et al., (2002) e Caxeita (2002). No melhoramento de plantas, a utilidade dos microssatélites resulta de dois fatores muito importantes, que são o alto grau de informação contido em cada alelo e sua fácil genotipagem via PCR (Powell et al., 1996). Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementar a seqüências únicas que os flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é uma consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do SSR.

A variabilidade dos microssatélites pode ser originada de permuta desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação, conhecida como

pareamento desigual devido a um fenômeno denominado de deslizamento ou *slippage* (Charlesworth et al., 1994; Tóth et al., 2000). Segundo Brown e colaboradores (1996), variações no número das repetições em *tandem* acumulam mais rapidamente na população do que mutações de ponto e eventos de inserções ou deleções, responsáveis pelo polimorfismo de outros marcadores moleculares (Brown et al., 1996). Dessa maneira, cada microsatélite, independente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Assim, a variação no comprimento do produto gerado pela PCR é uma função do número de unidades de SSR e cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco. Dessa forma, os polimorfismos surgem quando há número diferente de repetições de um dado motivo.

Tendo em vista as vantagens apresentadas pelos microsatélites, eles têm sido usados como marcadores genéticos por sua grande distribuição no genoma eucarioto, pelo seu alto polimorfismo. Apresentam ainda a vantagem de serem co-dominantes, têm sido utilizados em estudos evolutivos, para *fingerprinting*, teste de paternidade, em mapas de ligação e em estudos de genética de população e ainda em estudo de estabilidade genômica em câncer (Hite et al., 1996; Primmer et al., 1997; Hayden e Sharp 2001).

Os primeiros marcadores microsatélites foram desenvolvidos em humanos e, mais recentemente, têm recebido grande atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas. Vários estudos têm demonstrado que os microsatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores (Powell et al., 1996). Em genoma de plantas, é encontrado um SSR a cada 6-7 kb (Cardle et al., 2000). A classe de SSR contendo dinucleotídeo mais encontrada no genoma de plantas é AT/TA, seguida por AG/TC e a que contém trinucleotídeos é TAT, seguida por TCT. Esses dados observados demonstram que a frequência das classes de SSR em plantas difere das espécies animais, em que as repetições de

AC/TG são as mais abundantes e AT/TA as mais raras. Tem sido observado ainda que a frequência das diferentes classes de SSR diminui à medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva, ou seja, quanto maior o número de nucleotídeos na unidade repetitiva do SSR, menor é a sua frequência dentro do genoma (Powell et al., 1996; Tóth et al., 2000).

Para Ferreira e Grattapaglia (1998), os microssatélites constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível hoje. Panaud et al. (1996) demonstraram que marcadores SSR em arroz são quase duas vezes mais informativos do que os marcadores RFLP. Relatos recentes em soja têm descrito locos microssatélites com até 26 alelos. Esse alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados (Akkaya et al., 1995), além de distinguir germoplasma intimamente relacionados (Panaud et al., 1996). Segundo Morgante e Olivieri (1993), essa hipervariabilidade dos SSR e, conseqüentemente, a possibilidade de utilizá-los em qualquer população segregante, os tornam marcadores ideais para estudo de ligação e de genética de população, bem como para mapeamento genético. Tal fato é especialmente importante para a marcação de alelos de resistência a patógenos, porque um mesmo gene pode estar representado por diferentes alelos de resistência. Assim, há possibilidade de todos os alelos serem mais facilmente marcados pelo SSR.

A escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética, mas sim visando à população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites também apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados em PCR, como o RAPD, porque são co-dominantes e facilmente reprodutíveis. A co-dominância torna esses marcadores mais informativos para análise de ligação (YU et al., 1999). Além dessas

características, os SSR parecem ter uma distribuição frequente e aleatória, permitindo uma cobertura completa do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Essas características fazem desses marcadores ferramentas eficientes para mapeamento genômico, estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de cultivares, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTL), análise de *pedigree*, seleção assistida por marcadores e análise de bibliotecas para clonagem de genes. Apesar das vantagens apresentadas, relativamente poucos marcadores microssatélites estão disponíveis para plantas (Chen et al., 1997; McCouch et al., 1997).

A principal limitação ao uso dos marcadores SSR está no desenvolvimento desses marcadores, pois envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo (Hayden e Sharp 2001). No entanto, essa desvantagem é compensada pela facilidade e eficiência do uso desses marcadores pela comunidade. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com a facilidade e a rapidez típica da técnica de PCR.

A estratégia de desenvolvimento de microssatélite envolve construção de biblioteca genômica, hibridização com sondas contendo SSR e seqüenciamento dos clones hibridizados positivamente (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Devido ao alto custo e do trabalho empregado por essa técnica, têm sido sugeridas outras metodologias alternativas. Uma delas é a análise de seqüências dos bancos de dados, utilizando recursos computacionais (McCouch et al., 1997). A grande limitação desta metodologia reside na falta de seqüências disponíveis nos bancos (Cardle et al., 2000).

Uma outra possibilidade é o uso de *primers* desenhados para outras culturas, ou seja, *primers* heterólogos (Brown et al., 1996). Segundo Cregan et al. (1999), marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos também a partir de bibliotecas de cromossomos específicos, com o objetivo de obter marcadores

em regiões específicas do genoma. Clones BAC (*bacterial artificial chromosomes*) e clones YAC (*yeast artificial chromosomes*) também têm sido utilizados como fonte de DNA com a mesma finalidade. Chen et al. (1997) e McCouch et al. (1997) mencionaram que a construção de mapas saturados com microssatélites será mais eficiente se esses marcadores forem desenvolvidos complementarmente pela análise de bancos de dados e análise de diferentes tipos de bibliotecas, incluindo bibliotecas de pequenos ou grandes insertos, biblioteca com insertos digeridos com enzimas de restrição ou com corte mecânico, biblioteca genômica ou de cDNA e biblioteca enriquecida.

Apesar do valor e da utilização dos marcadores microssatélites em diferentes espécies de plantas, em feijão, poucos marcadores foram identificados e disponibilizados para os pesquisadores. Nessa espécie, apenas 37 microssatélites potenciais foram identificados por Yu et al. (2000) partindo de dados do *GenBank*; 21 por Caixeta (2002) por meio de clones BAC e 68 foram desenvolvidos por Gaitáin-Solis et al. (2002). Nesses trabalhos, microssatélites com repetições AT/TA foram os mais freqüentes, seguidos por aqueles com a repetição CT/AG. A distribuição de repetições com di-, tri- e tetranucleotídeos encontrada foi semelhante ao já encontrado previamente, onde: (1) todas as repetições com dinucleotídeos foram encontradas apenas em regiões não codificadoras 5' e 3' e íntrons; (2) os trinucleotídeos foram identificados principalmente nas regiões codificadoras; e (3) a maioria dos tetranucleotídeos foi observada em regiões não codificadoras.

Embora os microssatélites e outros marcadores possam ser úteis no melhoramento para auxiliar em várias etapas durante o desenvolvimento de um programa, a identificação de alelos de efeito principal, como os alelos verticais de resistência a doenças, constitui-se em uma das principais contribuições para auxiliarem na seleção assistida pelos marcadores. Nesse contexto, um dos procedimentos de identificação desses alelos mais eficientes é o *bulk* segregante,

também conhecido por BSA (*Bulked Segregant Analysis*), sugerido por Michelmore e colaboradores (1991).

2.8- O método BSA

O método do *bulk* segregante (BSA) foi proposto para associar características fenotípicas com marcadores de DNA. Para isso, é necessário inicialmente obter uma população segregante para o caráter de interesse, proveniente de um cruzamento biparental, como F₂, populações de retrocruzamento ou mesmo populações de linhagens obtidas após sucessivas autofecundações. Tais populações devem, então, ser avaliadas para o caráter de interesse. Em seguida, os indivíduos são então divididos em dois grupos, com base na expressão dos fenótipos contrastantes na população segregante.

De posse dos *bulks*, o objetivo é detectar diferenças entre eles em um ou mais fragmentos de DNA. Os *bulks* são constituídos ao se misturarem quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica, por exemplo, um grupo resistente e outro suscetível. Polimorfismos ocorrerão somente onde há o contraste de interesse; as demais regiões apresentarão um padrão de bandas monomórficas. Assim, tal marcador polimórfico estará fisicamente ligado ao alelo de interesse e pode-se estimar a frequência de recombinação dos marcadores com o alelo de interesse, analisando-se com o mesmo marcador todos os indivíduos da população segregante.

O BSA tem sido usado também para avaliação de caracteres quantitativos (QTL), utilizando, como população segregante, retrocruzamento (RC) ou F₂. O tamanho mínimo de amostras para constituir o *bulk* é geralmente determinado pela frequência com que esses locos não ligados poderiam ser

detectados como polimórficos entre os dois *bulks*. Esse número mínimo dependerá do tipo de população segregante, RC ou F₂, e do tipo de marcador, dominante ou co-dominante (Mackay e Caligari 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Genitores e cruzamento

Foi realizado o cruzamento ESAL 550 x Carioca MG e obtidas as gerações F₁ e F₂. A linhagem ESAL 550 foi selecionada dentro da cultivar Jalo, que possui grãos amarelos e grandes (cerca de 50g por 100 grãos), resistência à mancha angular e é incompatível com a maioria das cultivares de origem mesoamericana de grão pequenos. A cultivar Carioca MG possui grãos semelhantes aos da cultivar Carioca, ligeiramente mais escuros e menores (cerca de 20g por 100 grãos), é altamente suscetível à mancha angular, porém, é compatível para se cruzar com a ESAL 550.

Foram utilizadas 120 plantas F_{2:3} cujos fenótipos foram identificados sob as condições de incidência natural da doença (Bruzi et al., 2002).

3.2 Extração de DNA total

A extração do DNA foi feita de 120 plantas F₂, utilizando o procedimento modificado de Rogers e Bendich (1988). Aproximadamente 2g de folhas jovens de cada planta foram macerados com areia esterilizada, juntamente com 10mL de tampão de extração pré-aquecido a 65°C [0,2g de brometo de cetiltrimetil-amônia (CTAB), 1mL de Tris 1M; 0,4mL de EDTA 0,5M; 0,82 de

NaCl; 0,1g de polivinilpirrolidona 40.000; 8,6mL de água pura] e 20µL de 2-β-mercaptoetanol. O macerado foi mantido em banho-maria por 30 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10mL da solução 24 clorofórmio para 1 álcool isoamil, seguido da homogeneização e centrifugação durante 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30mL da solução, 6 álcool 95% para 1 acetato de amônio 7,5 M e mantido no freezer (-20°C) por cerca de uma hora, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300µL de TE (Tris 1mM e EDTA 0,1mM, pH 7,7). Os ácidos nucleicos dissolvidos foram submetidos a uma segunda extração com clorofórmio álcool-isoamil. O sobrenadante foi coletado sendo adicionado o triplo de seu volume de 20 álcool 95% para 1 de acetato de sódio 3M, e mantido em freezer por no mínimo uma hora. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada, o DNA dissolvido em 300µL de TE e quantificando, utilizando-se um fluorímetro (Hoffer Scientific, San Francisco, CA USA). Para isso, foram utilizados 2µL da solução de DNA em 2mL de tampão (Tris 10mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1µL/mL do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE para uma concentração de 10ng/µL, para as reações de amplificação.

3.3 Obtenção dos *bulks* segregantes

O DNA das 10 plantas mais resistente e das 10 plantas mais suscetível foi misturado equitativamente para constituírem os dois *bulks* contrastantes, um resistente e outro suscetível (Michelmore et al., 1991; Mackay e Caligari, 2000).

3.4 Análise dos *bulks* com marcadores RAPD

Os *bulks* foram avaliados com 1080 primers de 10 nucleotídeos (Operon Technologies Inc., Alameda, Ca, EUA). Cada reação foi realizada misturando-se reagentes com as seguintes concentrações: 200 μ M dNTP (mistura equitativa de ATP, GTP, CTP e TTP); 0,6 unidades de *Taq* DNA polimerase, 0,4 μ M de primer, tampão de reação (50mM tris; 2,0 mM MgCl₂; 20mM KCl; 250 μ g/mL de albumina soro bovino; 1% de ficoll 400; 1mM de tartrazine) 30ng do DNA genômico, e água pura até o volume de 16 μ L.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331, programação para 39 ciclos, subdividida em dois programas: 1) nos dois primeiros ciclos sendo a desnaturação do DNA feita a 94^oC por 2 minutos, o anelamento a 37^oC por 15 segundos e a elongação a 72^oC por um minuto; 2) adicionalmente mais 38 ciclos que diferiam apenas no tempo de desnaturação que foi de 15 segundos. Após os 39 ciclos foi feita uma etapa de extensão final por 2 minutos a 72^oC. Os fragmentos de DNA foram analisados em gel de ágar a 2%. Com os primers que produziram polimorfismo nos *bulks* procedeu-se a abertura dos mesmos, isto é, as reações individuais com os componentes dos *bulks*. Os mesmos primers foram também utilizados nas reações individuais das 120 plantas F₂ para se determinar a co-segregação da banda polimórfica nos *bulks* com a reação das mesmas à doença. Nessas reações, utilizou-se gel de agarose a 1% preparado com TBE 1X (0,045M Tris-borato e 2,0 mM EDTA). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X a voltagem constante de 75V, durante um período variável de 4 a 5 horas. A visualização e análise do gel foram efetuadas sobre luz UV.

3.5 Análise dos *bulks* com marcadores microssatélites – SSR

Foram testados 32 pares de primers de microssatélites (SSR) desenhados para *Phaseolus vulgaris* segundo YU e colaboradores (2000). As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram efetuadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331. As reações foram constituídas de 20ng de DNA; 200µM dNTP; 0,6 unidades de *Taq* DNA polimerase; 0,2µM de cada *primer*, tampão de reação (50mM Tris; 2,0 mM MgCl₂; 20mM KCl; 250µg/mL de albumina soro bovino; 1% de ficoll 400; 1mM de tartrazine) e água pura até o volume de 18,5µL.

A reação de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 95°C, por dois minutos, seguida por nove ciclos com desnaturação a 94°C, anelamento a 68°C e alongação a 72°C por 20 segundos cada, com mais 25 ciclos com desnaturação a 94°C, anelamento a 60°C e alongação a 72°C por 20 segundos cada, com etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos de microssatélite foram separados em gel de agarose preparados com TBE 1X (0,045M Tris-borato e 2,0 mM EDTA), com a concentração de 3% para análise dos *bulks*. Com o *primer* que identificou polimorfismo nos *bulks* utilizou-se um gel a 2,5% para avaliação das 120 plantas F₂. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X a voltagem constante de 80V, durante um período variável de 4 a 5 horas. A visualização do gel foi efetuada sobre luz UV e registrada por câmara fotográfica Polaroid, carregada com filme instantâneo preto e branco tipo 667.

3.6 Análise dos dados

Procedeu-se a análise de χ^2 dos resultados observados, tanto da reação da população F₂ ao patógeno, quanto da segregação dos marcadores RAPD e SSR. Para confirmar se os marcadores estavam ligados aos alelos de resistência à mancha angular, foi feita a análise de co-segregação do marcador com o alelo de resistência ou suscetibilidade e também utilizando os marcadores dois a dois, admitindo distribuição independente. Na análise de ligação empregaram-se as fórmulas e tabelas para cálculo da frequência de recombinação, apresentadas por Allard (1956) e também o aplicativo computacional GQMOL versão 0.1.0 (Cruz e Schuster, 2001). Nessas análises o procedimento estatístico utilizado para estimativa da frequência de recombinação foi o da máxima verossimilhança (Allard, 1965; Simões, 2001). Para cada estimativa de frequência de recombinação foram estimados também o erro padrão, o intervalo de confiança e o LOD score (*log of the odds*).

As frequências de recombinação entre os marcadores e o loco de resistência, foram transformadas em unidades de mapa (cM), utilizando a função de Haldane, de acordo com o estabelecido por Schuster (2002), em que **r** representa a frequência de recombinação:

$$m = [- \ln (1 - 2r)] / 2$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle genético da reação à mancha angular

A análise fenotípica das 120 plantas F_{2:3} do cruzamento ESAL 550 x Carioca MG apresentou uma segregação de 90 plantas resistentes e 30 suscetíveis, portanto, exatamente três resistentes para uma suscetível ($\chi^2 = 0$, P=100%), demonstrando herança monogênica.

O controle genético da resistência é semelhante aos obtidos em trabalhos anteriores que indicam a presença de um alelo dominante controlando a resistência à mancha angular na cultivar Cornell 49-242 e MAR-2 (Nietsche 2000, Ferreira1997). A linhagem BAT 332 também é uma fonte de resistência para mancha angular com herança monogênica, sendo o alelo dominante também responsável pela resistência à raça 61.41 de *P. griseola* (Caixeta, 2002). É importante enfatizar que todas essas fontes de resistência são de origem mesoamericana, enquanto que o alelo de resistência da linhagem ESAL 550 tem, a princípio, maior importância para o melhoramento no Brasil, porque ele é de origem andina. Essa maior importância se deve ao fato de que no Brasil a grande maioria das cultivares utilizadas, é de origem mesoamericana e as raças predominantes do patógeno certamente foram adaptadas para vencer os alelos de resistência dessa origem (Van der plank, 1963). A cultivar Jalo é uma das poucas de origem andina utilizadas no Brasil e vem demonstrando resistência quase completa ao patógeno há mais de 30 anos.

4.2 Identificação de marcadores RAPD e SSR

Os dois marcadores RAPD e um SSR apresentaram segregações em F₂ que confirmam a herança monogênica dominante (Tabela 1). Esse resultado é importante porque indica que esses fragmentos de DNA são herdáveis, qualificando-os como marcadores genéticos.

Dos dois marcadores RAPD, um está em fase de acoplamento e outro em repulsão, foram amplificados pelos *primers* OPP07 e OPBB04, respectivamente (Figura 1).

TABELA 1. Análise de segregação dos marcadores RAPD OPP07, OPBB04 e SSR PV-atct 001 na geração F₂ do cruzamento ESAL 550 x Carioca MG.

Loco	Frequência observada	Razão esperada	χ^2	Probabilidade (%)
OPP07	96:24	3:1	1,6	20,5903
OPBB04	84:36	3:1	1,6	20,5903
PV-atct 001	94:26	3:1	0,711	39,9075

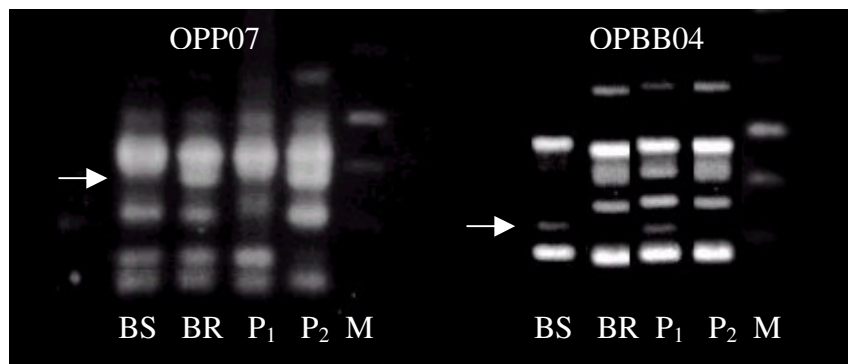


FIGURA 1. Análise eletroforética dos produtos amplificados pelos *primers* OPP07 e OPBB04. **BR** corresponde ao *bulk* resistente; **BS**, ao *bulk* suscetível, **P₁** corresponde ao genitor resistente ESAL 550, **P₂** ao genitor suscetível Carioca MG. A seta indica os marcadores OPP07 e OPBB04. M representa o marcador de tamanho de fragmento 100pb da Promega.

O terceiro marcador é o de microssatélite em fase de acoplamento amplificado pelo par de *primers* PV-atct001 de seqüência: 5'CAATTA AAACTCAACCAACCCAAATA3' e 5'TTTCCCGCCATAGA ATATGTGAGA3' e que amplificou um fragmento de 282 pb (Figura 2).

A maioria dos marcadores microssatélites reportados na literatura apresenta um padrão de herança co-dominante (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Contudo, o marcador microssatélite amplificado pelo *primer* PV-atct 001 ligado ao alelo de resistência à mancha angular avaliado no presente estudo, apresentou uma herança dominante, visto que foi detectado somente nos resistentes e a população F₂ segrega na proporção 3:1 (R:S) para presença e ausência da banda resistente. Liu et al., (2001) também identificou marcadores microssatélites dominantes e uma possível explicação para esse fato seria a alteração das regiões de reconhecimento do *primer* nas plantas suscetíveis. Essas alterações devem-se a mutações de ponto, inserções, deleções ou inversões que levam ao não anelamento do *primer* e conseqüente ausência da banda.

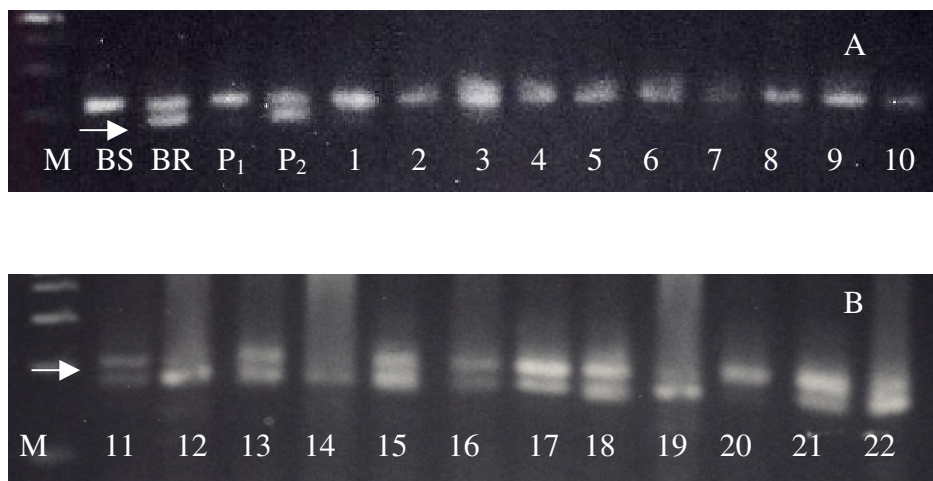


FIGURA 2. Análise eletroforética dos produtos amplificados pelo *primer* SSR PV-atct001. **BR** corresponde ao *bulk* resistente; **BS**, ao *bulk* suscetível; **P₁** é o genitor resistente ESAL 550, **P₂** é o genitor suscetível Carioca MG; em **A** de 1-10 estão as plantas F₂ suscetíveis; em **B**, plantas F₂ de 11-22 resistentes. A seta indica o marcador PV-atct001. **M** corresponde ao DNA marcador de tamanho de fragmento de 100pb da Promega.

Vários marcadores RAPD foram identificados por outros autores próximos aos alelos do feijão que conferem resistência a *Phaeisariopsis griseola*. Contudo, nenhum deles mostrou amplificação no cruzamento ESAL 550 x Carioca MG utilizado no presente trabalho, o que sugere a existência de vários alelos de resistência de genes diferentes contra o *P. griseola* no feijão. Por exemplo, Nietsche (2000) encontrou dois marcadores RAPD para resistência à mancha angular no cultivar Cornell 49-242, amplificados pelos primers OPN02₈₉₀ e OPE04₆₅₀ distantes do alelo de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente. Já Ferreira (1997) encontrou com o *primer* OPE04 um marcador de cerca de 500pb a 5,8 cM do alelo de resistência na cultivar MAR-2. Caixeta (2002) estudando a herança da resistência de BAT 332, identificou também um alelo dominante responsável pela resistência por meio de dois marcadores moleculares do tipo

RAPD, OPAA07₉₅₀ e OPAO12₉₅₀, ligados em fase de acoplamento a esse alelo a uma distância de 5,10 e 5,83 cM, respectivamente.

Na análise de co-segregação entre os marcadores e o alelo de resistência, observou-se que o OPP07 e o microssatélite PV-atct001 estão ligados ao alelo de resistência e ligados entre si. Já o OPBB04 apresentou distribuição independente com χ^2 não significativo ($P \geq 0,05$) tanto para o alelo de resistência quando para os dois marcadores (Tabela 2).

Assim, o fragmento polimórfico nos *bulks* e amplificado pelo *primer* OPBB04 deveria ser descartado. No entanto, comparando-se as frequências observadas com as esperadas correspondentes, ou seja, 67,5 AB, 22,5 Ab, 22,5 aB, 7,5 ab (Tabela 2), nota-se uma deficiência das classes fenotípicas em repulsão, sugerindo a ligação do marcador ao alelo de suscetibilidade.

TABELA 2. Análise de χ^2 das frequências observadas (FO) e esperadas (FE), admitindo distribuição independente entre cada marcador e o alelo de resistência (R) e entre os marcadores dois a dois na geração F₂.

Locos testados	FO	FE	χ^2	Prob.
	AB:Ab:aB:ab	AB:Ab:aB:ab		(%)
OPP07/Alelo R	83: 7: 13: 17	9: 3: 3: 1 ^a	30,2 ^{**}	0,00
OPBB04/Alelo R	58: 32: 26: 4	9: 3: 3: 1 ^a	7,5	5,68
PV-atct 001/Alelo R	88: 2: 6: 24	9: 3: 3: 1 ^a	73,3 ^{**}	0,00
OPP07/OPBB04	66: 30: 17: 7	9: 3: 3: 1 ^b	3,9	27,12
OPP07/ PV-atct 001	86: 8: 10: 16	9: 3: 3: 1 ^b	30,9 ^{**}	0,00
OPBB04/PV-atct 001	62: 32: 21: 5	9: 3: 3: 1 ^b	5,3	14,52

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

^b AB (presença da banda nos dois marcadores); Ab (presença da banda no primeiro e ausência no segundo); aB (ausência da banda no primeiro e presença no segundo); ab (ausência da banda nos dois marcadores).

As distâncias genéticas e respectivos LOD *scores*, seus erros padrões e intervalos de confiança estão na Tabela 3. Um LOD *score* indica essencialmente o quanto é mais provável uma ligação entre dois locos do que nenhuma. Considerando 5% de erro, o ponto de corte do LOD *score* é de 0,83 como sugerido por Lander e Botstein (1989), quando somente um marcador genético é testado. Assim, realmente se verifica que os três marcadores estão ligados ao gene de reação. Porém, como previsto pelo teste de χ^2 entre os marcadores, OPP07/OPBB04 (LOD= 0,02) e OPBB04/ PV-atct 001 (LOD= 0,54) são independentes.

Como já previsto, o gene de reação ao patógeno está flanqueado pelo marcador OPBB04 de um lado e os outros dois do outro lado, cujas posições relativas estão ilustradas na Figura 4. Entre os três marcadores, o microssatélite é o mais útil para o melhoramento, por estar mais próximo do alelo de resistência (Tabela 3).

TABELA 3. Estimativas das frequências de recombinação entre os alelos de resistência ou suscetibilidade e os marcadores RAPD e SSR dois a dois com respectivos LOD *score* erro padrão e intervalo de confiança, relativos a geração F₂ do cruzamento ESAL 550 x Carioca MG.

Loco	Distância ^a (cM)	r ^b	LOD Score	Erro padrão	Intervalo de confiança	
					LI	LS
OPP07/ Alelo R	24,4	19,20	6,33	0,04	0,11	0,27
OPBB04/ Alelo R	53	32,70	1,26	0,08	0,16	0,48
PV-atct 001/ Alelo R	7,6	7,02	16,21	0,0005	0,03	0,11
OPP07/OPBB04	149,6	47,49	0,02	0,07	0,33	0,61
OPP07/PV-atct 001	21,9	17,71	6,82	0,03	0,10	0,25
OPBB04/ PV-atct 0013	73,9	38,65	0,54	0,07	0,23	0,53

^a distância em cM (Haldane); ^b frequência de recombinação.

A frequência de recombinação relativamente baixa entre eles o caracteriza como um marcador de grande utilidade para a seleção indireta. Isso porque a porcentagem de plantas com marcador, selecionada erroneamente em uma população segregante é pequena. Por exemplo, a frequência esperada de plantas suscetíveis selecionadas como resistentes, em uma população F_2 , é de 4,5% (Tabela 4). Além disso, os marcadores microssatélites, por serem obtidos por meio de uma reação de PCR, com *primers* maiores, são mais específicos e reproduzíveis do que o marcador RAPD.

O uso do marcador RAPD amplificado pelo *primer* OPP07, que se recombina com o alelo R com uma frequência de 19,20%, resultará na seleção de 11,56% de plantas suscetíveis como se fossem resistentes, em uma geração F_2 (Tabela 4). Portanto, quase três vezes menos eficiente do que o marcador microssatélite. Em razão da menor repetibilidade e maior distância desse marcador em relação ao alelo de resistência, deve-se dar preferência ao microssatélite para auxiliar a seleção.

O marcador RAPD amplificado pelo *primer* OPBB04, caso estivesse mais próximo ao alelo r, seria de grande utilidade para ser usado juntamente com o marcador microssatélite, pois permitiria a identificação de plantas resistentes homozigóticas e heterozigóticas nas populações segregantes, como sugerido por Haley e colaboradores (1994). No entanto, devido à sua alta frequência de recombinação, ele se torna inútil para auxiliar na seleção.

Finalmente, é importante salientar o grande auxílio que o marcador microssatélite deve oferecer para se realizar a seleção indireta. Isso porque na maioria dos programas de melhoramento, visando resistência à mancha angular, pratica-se a seleção direta com ocorrência natural da doença, na safra das secas, uma única vez ao ano. Geralmente, vem sendo adotado esse procedimento porque existe grande dificuldade em causar artificialmente a doença. Com o emprego desse marcador será possível praticar a seleção indireta em qualquer

época durante o ano, bastando apenas germinar as sementes, para extração de DNA e proceder à reação de PCR. Portanto, esse marcador viabilizará a seleção de plantas resistentes nas três safras normalmente exploradas com o feijoeiro, agilizando consideravelmente os programas de melhoramento.

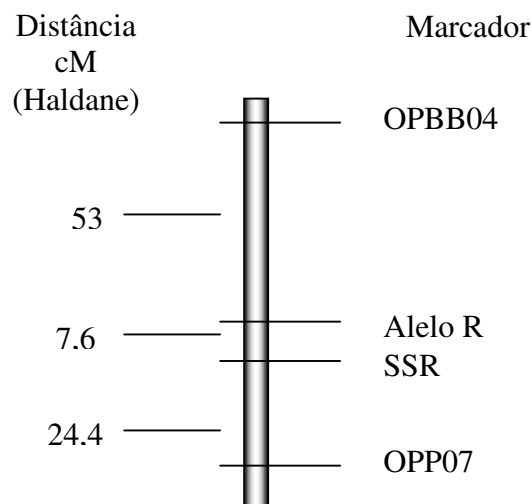


FIGURA 3. Mapa genético parcial mostrando o gene de reação à mancha angular e os três marcadores identificados na população $F_{2,3}$ do cruzamento ESAL 550 x Carioca MG.

TABELA 4. Estimativa das freqüências esperadas de plantas suscetíveis, selecionadas como resistentes em F_2 , por meio do marcador (FPSS).

Primer marcador	Seqüência de bases	r(%)	FPSS (%)
OPP07 ^a	5'GTCCATGCCA3'	19.20	11,56
PV-atct 001 ^b	5'CAATTAAACTCAACCAACCCAAATA3' 5'TTCCCGCCATAGAATATGTGAGA3'	7.02	4,5

^a Marcador RAPD ^b Marcador SSR

5 CONCLUSÕES

O alelo de resistência a *Phaeisariopsis griseola* na linhagem ESAL 550 foi marcado por meio de RAPD, pelos *primer* OPP07 e OPBB04 e pelo microssatélite PV-atct001.

O fragmento gerado pelo microssatélite se constitui um bom marcador para ser utilizado em programas de melhoramento, na seleção indireta de plantas com o alelo de resistência, por recombinar-se com uma frequência de 7,02%. Os marcadores RAPD são menos úteis por estarem mais distantes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M. S.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 5, p. 1439-1445, Sept./Oct. 1995.

ALLARD, R. W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. **Hilgardia**, Berkeley, v. 24, n. 10, p. 235-278, Jan. 1956.

BASSET, M. J. List of genes. **Annual Reporter Ben Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 1-19, 1996.

BROWN, S. M.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E. SENIOR, M. L.; WANG, T. Y.; DUNCAN, R. R.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 190-198, July 1996.

BRUZI, A. T.; SILVA, F. B.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. F. B. Melhoramento visando a resistência à mancha-angular utilizando cultivares de raças andinas e mesoamericanas de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV/DFT, 2002. p. 207-208.

CAIXETA, E. T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microsatélite para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. 2002. 74 p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAL, W.; HUGHES, G. R.; DONG H. M. Identification of molecular for resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n4, p. 551-554, Dec. 2001.

CARVALHO, G. A.; PAULA-JÚNIOR, T. J.; ALZATE-MARIN, A. L. NIETSCH, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 482-485, dez. 1998.

CARDLE, L.; RAMSAY, L.; MILBOURNE, D. MACAULAY, M.; MARSHALL, D.; WAUGH, R. Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics, Baltimore**, v. 156, n. 2, p. 847-854, Oct. 2000.

CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKY, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 215-220, Sept. 1994.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; McCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics, Berlin**, v. 95, n. 4, p. 553-567, Sept. 1997.

CORRÊA, R. X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. 1999. 115 p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; OLIVEIRA, M. L. P.; NIETSCHÉ, S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 27-32, mar. 2001.

COSAVE. **Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul**. Disponível em: <<http://www.cosave.org.py/cosave0.htm>>. Acesso em: 2002

CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L. F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R. C.; MATTHEWS, B. F.; JARVIK, T.; YOUNG, N. D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 6/7, p. 919-928, May 1999.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. 2001.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: MacMillan Publishing Company, 1987. 536p, 1987. (Theory and Technique, v. 1).

FERREIRA, C. F. **Herança da resistência do feijoeiro à mancha-angular e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência.** 1997. 36 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FERREIRA, C. F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G. A. NIETSCHÉ, S.; PAULA-JR, T. J.; A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 4, p. 1130-1133, July/Aug. 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPACERNAGEN, 1998. 220 p.

FISHER, P. J.; GARDNER, R. C.; RICHARDSON, T. E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 21, p. 4369-4371, Nov. 1996.

GAINTÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, K. J.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeat in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus ssp.* **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, Nov./Dec. 2002.

GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SÉVIGNAC, M.; ADAM-BLONDON, A. F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 3/4, p. 494-502, Mar. 1998.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. F₁ hybrid weakness in the common bean. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 447-450, Dec. 1985.

HALEY, S. D.; AFANADOR, L. K.; KELLY, J. D. Selection for monogenic resistance traits with coupling- and repulsion phase RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 1061-1066, July/Aug. 1994.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 575-607, 1997.

HAYDEN M. J.; SHARP, P. J. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 8, 2001.

HITE, J. M.; ECKERT, K. A.; CHENG, K. C. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_n d(G-T)_n microsatellite repeats. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 2429-2434, 1996.

IBGE. **Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias.** <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2002.

JUNG, C.; CAI, D.; KLEINE, M. Engineering nematode resistance in crop species. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 7, p. 266-271, July 1998.

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

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, n. 2/3, p. 143-182, Sept. 1999.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Berlin, v. 121, n. 1, p. 185-199, Jan. 1989.

LIU, X. M.; SMITH, C. M.; GILL, B. S.; TOLMAY, V. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 504-510, Dec. 2001.

MACKAY, I. J.; CALIGARI, P. D. S. Efficiencies de F₂ and backcross generation for bulked segregant analysis using dominant markers. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 3, p. 626-631, May/June 2000.

McCOUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 89-99, Sept. 1997.

MICHELMORE, R. W.; MEYERS, B. C. Clusters of resistance in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Research**, Plainview, v. 8, n. 11, pg. 1113-1130, Nov. 1998.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, V. Identification de markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 88, n. 11, p. 928-932, Nov. 1991.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 175-182, Jan. 1993.

MUHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the afro-andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, June 2002.

NIETSCHÉ, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. 2000. 55 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NIETSCHÉ, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G. A.; ROCHA, R. C.; PAULA-JR, T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 2, p. 117-121, Feb. 2000.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S. R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, New York, v. 252, n. 5, p. 597-607, Oct. 1996.

PAULA-JR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIERIA, C.; PAULA-JR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 375-433.

PEREIRA, H. **Seleção de linhagens tipo carioca com pirâmide de alelos**. 2003. 83 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Planta) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1, n. 7, p. 215-222, July 1996.

PRIMMER, C. R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARRY, B. P.; MOLLER, A. P.; ELLEGREN H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, Plainview, v. 7, n. 5, p. 471-482, May 1997.

PRYOR, T.; ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, New York, v. 10, p. 281-305, 1993.

RAGAGNIN, V. A. **Seleção, caracterização e comportamento de isolinhas de feijoeiro-comum resistance à ferrugem, antracnose e mancha angular**. 2001. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extration of DNA from plant tissues. *Planta Molecular Biology Manual A6*, [s. 1], v. 6, p. 1-10, 1988.

ROMMENS, C. M.; KISHORE, G. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. **Current Opinion in Plant Biotechnology**, London, v. 11, n. 2, p. 120-125, Apr. 2000.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L M. J. Aspectos econômicos. In: VIERIA, C.; PAULAJR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, Editora UFV, 1998. p. 55-81.

SANTOS, M. L.; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos. In: VIERIA, C.; PAULAJR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, Editora UFV, 1998. p.10-53.

SARTORATO, A. Resistência do feijoeiro comum à mancha angular. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV/DFT, 2002. p. 117-118.

SARTORATO, A. Variabilidade de *Phaeisariopsis griseola* no feijoeiro comum. In: CONGRESSO RASILEIRO DE MELHORAMENTO, 1., 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001.

SARTORATO, A.; NIETSCHKE, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 637-642, dez. 2000.

SARTORADO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 300 p.

- SCHUSTER, I. Método da Máxima verossimilhança: a base para o mapeamento genético.
<<http://www.bioagro.ufv.br/labs/biomol/seminarios/Veross/veross.htm>>.
Acesso em: 2002.
- SILVA, M. V.; SANTOS, J. B. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo Co-4² de resistência do feijão ao agente causal da antracnose. **Ciências e Agrotecnologia**. Lavras, V. 25, n. 5, p. 1097-1104. 2001
- SIMÕES, A. L. Ligação Gênica (Linkage).
<<http://rge.fmrp.usp.br/cursos/med1/linkage.doc>>. Acesso em: 2002.
- TEXEIRA, S. M.; THUNG, M. D. T. (Ed.) **Sócio-economia e tecnologia de produção: o caso das culturas melhoradas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Brasília: EMBRAPA/SPDS, 1994. 186 p.
- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellite in different eukaryotic genome survey and analysis. **Genome Research**, Plainview, v. 10, n. 7, p. 967-981, July 2000.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.
- VIEIRA, A. L.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 169-171, Mar. 1989.
- YOUNG, R. A.; KELLY, J. D. Gene pyramiding using marker assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 57-58, 1996.
- YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 27-34, Feb. 1999.
- YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Intregation of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **The Journal of Heredity**, Cary, v. 91, n. 6, p. 429-434, Nov./Dec. 2000.