

ARIADNA FARIA VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE E ESTUDO DE HERANÇA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Demerson Arruda Sanglard

Coorientador: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza

Montes Claros
2015

Vieira, Ariadna Faria.

V657c **Caracterização fenotípica e molecular de feijoeiro-comum**
2015 **quanto à resistência à antracnose e estudo de herança /**
Ariadna Faria Vieira. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências
Agrárias/UFMG, 2015.
76 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade
Federal de Minas Gerais, 2015.

Orientador: Prof. Demerson Arruda Sanglard.

Banca examinadora: Demerson Arruda Sanglard, Fernando
da Silva Rocha, Charles Martins Aguilar, Demerson Arruda
Sanglard.

Inclui bibliografia: f: 62-76.

1. Feijoeiro-comum. 2. Antracnose. I. Sanglard, Demerson
Arruda. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 633.35

ARIADNA FARIA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE FEIJOEIRO-
COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE E ESTUDO DE
HERANÇA**



Demerson Arruda Sanglard
Orientador

Aprovada em 27 de fevereiro em 2015.

Montes Claros
2015

Dedico à minha família, amigos e à universidade.

AGRADECIMENTOS

Mais uma vitória sendo alcançada e, ao meu lado, várias pessoas especiais que acompanharam o término de um capítulo da minha história. Agradeço a Deus, Pai infinito, que sempre me abençoou nesta caminhada, por todo o seu amor ágape e bênçãos derramadas.

Aos meus pais, José Hermes e Carmem Lúcia pelo amor, carinho, incentivo; às minhas irmãs Amanda e Aline; à minha querida avó Ana e todos os tios, tias, primos e primas. Homenageio esta minha vitória ao meu tio Erly (*in memorian*) que sempre me apoiou nesta caminhada e não pode estar em carne me prestigiando, mas sempre esteve e estará em meu coração.

Meus sinceros agradecimentos a todas as minhas amigas e companheiras nesta caminhada: Anarely, Paula Daiana, Karine, Cristiane Gonçalves, Daiana Maria, pela grande amizade e pela ajuda de sempre. Agradeço ao Professor Demerson Arruda Sanglard pela paciência e pelo conhecimento que me deu ao longo da orientação; aos professores do ICA/UFMG e todos aos funcionários por fazerem parte da minha conquista; ao ICA pelo incentivo e concessão de bolsa e aos amigos e colegas do IFNMG.

Agradeço ao Dr. Thiago Lívio pela coorientação, ensino e paciência ao longo de um ano. Agradeço à Embrapa pelo suporte técnico, em especial, aos amigos do Programa de Melhoramento de Feijão e aos colegas e companheiros do Laboratório de Biotecnologia.

Aos amigos de Goiânia pelo apoio, companheirismo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao apoio financeiro da CAPES, pela bolsa de estudo durante estes dois anos.

Agradeço a coordenação da pós-graduação pelo incentivo.

Enfim, toda a vitória até aqui conquistada foi fruto da força de todos vocês. Obrigada!!!

RESUMO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das espécies vegetais de maior importância mundial, porém, o grande número de doenças é um dos fatores que comprometem a produtividade, sendo a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) uma das principais doenças fúngicas relacionadas à cultura do feijoeiro. A ampla variabilidade do patógeno é um desafio para o desenvolvimento de cultivares com resistência de amplo espectro. Para isso, torna-se necessária a identificação, caracterização e uso de distintas fontes de resistência fundamentais para o sucesso dos programas de melhoramento. Dessa forma, os objetivos dos dois ensaios deste trabalho foram: (i) caracterizar o perfil fenotípico e molecular de linhagens e cultivares de feijoeiro-comum quanto à resistência à antracnose e, (ii) estudar a herança desta característica na cultivar 'BRS Cometa'. Os experimentos foram conduzidos no Centro Nacional Pesquisa em Arroz e Feijão, da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (CNPAF-EMBRAPA), em Santo Antônio de Goiás-GO. Para o primeiro experimento, foram realizados ensaio de campo e caracterização molecular. Para o ensaio de campo, 55 genótipos foram plantados em três parcelas de 3 metros de comprimento e espaçamento de 0,5 metros entre si. Os genótipos foram inoculados simultaneamente com as raças 65 (isolado CI 1614); 73 (isolado CI 1143); 81 (isolado CI 1164); 91 (isolado CI 1247); 475 (isolado CI 1322) e 1609 (isolado CI 1294), com uma concentração final $1,2 \times 10^6$ esporos/mL. As notas atribuídas a cada genótipo foi dada em função da porcentagem de folhas e/ou plantas. Para a caracterização molecular, 15 sementes de cada um dos 55 genótipos utilizados foram semeadas em vasos em casa de vegetação. Aos sete dias, após a germinação, discos foliares de dez plântulas foram coletados em *bulk* para a extração de DNA. Foram realizadas reações de amplificação com os marcadores SCAR, previamente identificados, como ligados a genes de resistência à antracnose: *Co-3*⁴ (SF10), *Co-4* (SY20), *Co-4*² (SH18 E SAS13), *Co-5* (SAB3) e *Co-6* (SAZ20). Para o segundo experimento, realizou-se o estudo de herança para a resistência ao *C. lindemuthianum* utilizando o patótipo 91, isolado CI 1247, na cultivar BRS Cometa. Sementes de famílias F_{2:3}, provenientes do cruzamento Rosinha G2 x BRS Cometa, além dos genitores e da testemunha SEL 1308 (*Co-4*²), foram pré-germinadas e plantadas em bandejas de isopor em casa de vegetação. Após sete dias, as plantas individuais foram inoculadas com suspensão de esporos com concentração de $1,2 \times 10^6$ esporos/mL. Para as avaliações da severidade da doença, utilizou-se uma escala de notas, variando de 1 a 9. As frequências fenotípicas observadas (resistência: suscetibilidade) nas populações segregantes foram testadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2). Como resultado do primeiro experimento, 26 genótipos foram resistentes aos patótipos 65, 73, 81, 91, 475 e 1609 de *C. lindemuthianum* e dez destes genótipos foram considerados imunes. Somente o marcador SF10 (*Co-3*⁴) foi inespecífico, ao amplificar outros de resistência conhecidos, como o K23 (*Co-5*), Kaboon (*Co-1*²), Perry Marrow (*Co-1*³), Cornell 49-242 (*Co-2*), Mexico 222 (*Co-3*), SEL 1360 (*Co-5*²), H1 (*Co-7*) e BRS Pitanga (*Co-14*). O marcador SH18 mostrou-se ainda alelo-específico, discriminando *Co-4*² de *Co-4*. Analisando o marcador SF10, 31

genótipos apresentaram marca amplificada, representando 53,44 % do total das amostras. A linhagem K10 apresentou as marcas moleculares SY20, SAB3 e SAZ20, indicando a presença dos genes *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*, respectivamente. Os resultados do segundo experimento indicaram que a razão de segregação para a resistência à antracnose nas famílias F_{2:3} (Rosinha G2 x BRS Cometa) ajustaram -se à proporção esperada de 1:2:1 (RR:Rr:rr), com valor de qui-quadrado de 0,5 e probabilidade de 77,88 %. Este resultado indica a presença de um único gene dominante envolvendo a resistência ao patótipo 91 de *C. lindemuthianum* na cultivar 'BRS Cometa'.

Palavras-Chave: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, estudo de herança, genes de resistência, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important vegetables species worldwide, but the large number of diseases is one of the factors that undermine productivity, being the anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) one of the major fungal diseases related to bean crop. The wide variability of the pathogen is a challenge for the development of cultivars with broad-spectrum resistance. For this, it is necessary to identify, characterize and use of different fundamental sources of resistance to the success of breeding programs. Thus, the objectives of the two trials of this study were: (i) to characterize the phenotypic and molecular profile lines and common bean cultivars for resistance to anthracnose and, (ii) to study the inheritance of this trait in the cultivar 'BRS Cometa'. The experiments were conducted at the Centro Nacional Pesquisa em Arroz e Feijão, da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (CNPAP-EMBRAPA) in Santo Antônio de Goiás - GO. For the first experiment, they were conducted field testing and molecular characterization. For the field trial, 55 genotypes were planted in three installments of 3 meters long and spaced 0.5 meters apart. Genotypes were inoculated simultaneously with the races 65 (isolated CI 1614); 73 (isolated CI 1143); 81 (isolated CI 1164); 91 (isolated CI 1247); 475 (isolated CI 1322) 1609 (isolate CI 1294), with a final concentration of $1,2 \times 10^6$ spores/ml. The marks awarded to each genotype were given according to the percentage of leaves and/or plants. For the molecular characterization, 15 seeds of each of the 55 genotypes used were sown in pots in the greenhouse. At seven days after germination, leaf discs ten seedlings were collected in bulk for DNA extraction. Amplification reactions were performed with the SCAR markers previously identified as linked to anthracnose resistance genes *Co-3⁴* (SF10), *Co-4* (SY20), *Co-4²* (SH18 and SAS13), *Co-5* (SAB3) and *Co-6* (SAZ20). For the second experiment, there was the inheritance study for resistance to *C. lindemuthianum* using the pathotype 91, isolated CI 1247, the 'BRS Cometa'. Families seeds $F_{2:3}$, from the cross Rosinha G2 x BRS Cometa, in addition to parents and witness SEL 1308 (*Co-4²*), were pre-germinated and planted in trays in a greenhouse. After seven days, individual plants were inoculated with a spore suspension with a concentration of $1,2 \times 10^6$ spores / ml. For assessments of disease severity, we used a grading scale ranging from 1 to 9. The observed phenotype frequencies (resistance: susceptibility) in the populations were tested using the chi-square test (χ^2). As a result of the first experiment, 26 genotypes were resistant to the pathotypes 65, 73, 81, 91, 475 and 1609 of *C. lindemuthianum* and ten of these genotypes were considered immune. Only the marker SF10 (*Co-3⁴*) was specific, to amplify other known resistance, such as K23 (*Co-5*), Kaboon (*Co-12*), Perry Marrow (*Co-13*), Cornell 49-242 (*Co-2*), Mexico-222 (*Co-3*), SEL 1360 (*Co-5²*), H1 (*Co-7*) and BRS Pitanga (*Co-14*). The SH18 marker was even allele-specific, discriminating *Co-4²* of *Co-4*. Analyzing the marker SF10, 31 genotypes amplified brand, representing 53.44% of total samples. The K10 strain showed the molecular markers SY20, SAB3 and SAZ20, indicating the presence of the *Co-4* genes *Co-5* and *Co-6*, respectively. The results of the second experiment showed that the segregation ratio for the resistance to the anthracnose $F_{2:3}$ families (Rosinha G2 x BRS Cometa) set is directed to the

expected ratio of 1: 2: 1 (RR:Rr:rr) value of chi-square and 0.5 probability of 77.88%. This result indicates the presence of a single dominant gene involving resistance to pathotype 91 *C. lindemuthianum* the cultivar 'BRS Cometa'.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, inheritance study, resistance genes, molecular markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO- *Food and Agriculture Organization*

CIAT- Centro Internacional de Agricultura Tropical

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

CTAB- Brometo de cetiltrimetil amônio

CNPAF- Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SCAR- *Sequence Characterized Amplified Regions*

BIC- *The Bean Improvement Cooperative*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO

Figura -1 Sintomas de antracnose na parte abaxial foliar.....25

Figura- 2 Sintomas da doença no caule e pecíolos do feijoeiro25

Figura- 3 Sintomas da doença nas vagens de feijão26

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE LINHAGENS E CULTIVARES DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

Figura -1 Número de genótipos (cultivares, linhagens e testemunhas) apresentando os marcadores moleculares SCAR ligados a genes de resistência à antracnose.49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela- 1 Classificação de raça fisiológica de *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da reação das doze variedades diferenciadoras do feijão28

Tabela- 2 Fontes de resistência ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* ...31

Tabela- 3 Marcadores moleculares tipo SCAR identificados como ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro33

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE LINHAGENS E CULTIVARES DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

Tabela- 1 Escala descritiva de notas para avaliação de doenças a campo, baseadas na porcentagem de folhas e/ou plantas infectadas40

Tabela- 2 Marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro-comum42

Tabela- 3 Reação à antracnose das 55 cultivares e linhagens testadas no campo44

Tabela- 4 Perfil molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto à presença de marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose47

CAPÍTULO 3- ESTUDO DE HERANÇA PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE PRESENTE NA CULTIVAR DE FEIJOEIRO-COMUM DO GRUPO CARIOCA 'BRS COMETA'

Tabela- 1 Escala de notas para reação a doenças58

Tabela- 2 Razão de segregação da resistência ao patótipo 91 de *C. lindemuthianum* na população F2:3 (Rosinha G2 x BRS Cometa) utilizada no estudo de herança59

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A cultura do feijoeiro-comum.....	16
2.2 Seleção assistida por marcadores moleculares.....	18
2.3 Melhoramento genético do feijoeiro visando à resistência a doenças	20
2.4. Antracnose	23
2.4.1 Etiologia.....	23
2.4.2 Epidemiologia	23
2.4.3 Sintomatologia.....	24
2.4.4 Medidas de controle	26
2.5 Variabilidade patogênica do <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	27
2.6 Genes de resistência à antracnose no feijoeiro-comum	28
2.7 Marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose.....	32
2.8 Estudo de herança	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE LINHAGENS E CULTIVARES DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Ensaios de campo.....	40
2.2 Extração de DNA.....	41
2.3 Condições de amplificação dos marcadores SCAR	42
2.4 Eletroforese e fotodocumentação	43
2.5 Análise estatística	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Ensaios de campo.....	43
3.2 Caracterização molecular.....	49
4 CONCLUSÃO	52

CAPÍTULO 3- ESTUDO DE HERANÇA PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE PRESENTE NA CULTIVAR DE FEIJOEIRO-COMUM DO GRUPO CARIOCA 'BRS COMETA'	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 Material genético e ensaios.....	56
2.2 Inoculação do patógeno e avaliação da doença.....	57
2.3 Estudo de herança e análise estatística	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie de leguminosa mais cultivada no mundo e com representatividade no mercado nacional, sendo a principal fonte proteica com maior acessibilidade social (AIDAR, 2003). O grão, além de fornecer proteína, é excelente fonte de minerais e de outros nutrientes (SINGH; SINGH,1992). Na safra 2013, a produção total no país foi de 2.564.790 milhões de toneladas e produtividade média de 1.353 kg/ha (SILVA, 2013). A cultura apresenta importância para o país, tanto em relação aos aspectos econômicos quanto sociais.

A cultura apresenta baixa capacidade produtiva e diversos são os fatores que justificam essa situação, como a ocorrência de pragas e doenças. São mais de 45 tipos de doenças que incidem sobre o feijoeiro-comum, podendo restringir à sua produção (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 1998). Entre as doenças de maior importância que acometem a cultura, destaca-se a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. (BIANCHINI *et al.*, 1997). Podem ser observados até 100% de perdas em locais onde há condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (SINGH; SCHWARTZ, 2010). Com isso, é importante a adoção de métodos integrados de controle da doença, como a utilização de sementes sadias, rotação de culturas, eliminação de restos culturais e, principalmente, a adoção de cultivares resistentes, considerada uma estratégia eficiente e acessível aos produtores (DILLARD; COBB, 1993; SUTTON, 1992).

Em programas de melhoramento genético, que visam a resistência a doenças, a obtenção de cultivares resistentes se torna um dos objetivos primordiais, uma vez que o patógeno que provoca a doença apresenta alta variabilidade patogênica. Para tal, a utilização de marcadores moleculares, para a identificação de alelos de resistência, possibilita a seleção em várias etapas no melhoramento de plantas.

O desenvolvimento de marcadores moleculares possibilita a classificação de grupos de interesses aos programas de melhoramento (EICHENBERG *et al.*, 2000). É importante no mapeamento de genes relacionados com as principais doenças, observando a ligação entre os alelos de resistência e os marcadores, podendo ser utilizados na seleção assistida (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). Assim, um dos marcadores moleculares utilizados na seleção assistida são os SCAR, dentre os quais permitem estabelecer o perfil molecular das linhagens utilizadas no melhoramento. Após a caracterização desses genes de resistência, a maior combinação dos alelos, em uma mesma cultivar, pode resultar em resistência efetiva e durável à doença.

Concomitantemente, a determinação do número de genes e quais estão envolvidos no controle desse caráter se torna necessário, uma vez que fornecem informações, para identificar os cruzamentos e combinações alélicas mais vantajosas, com o objetivo de aumentar o espectro de resistência (VIANA, 2000). Assim, o estudo de herança determina o padrão de herança mendeliana, envolvido no caráter estudado, resultante de cruzamentos entre uma fonte suscetível e outra resistente.

Com isso, a caracterização molecular e o estudo de herança visam obter informações relevantes, que podem garantir a eficácia e rapidez na seleção de genótipos superiores, para aumentar o espectro de resistência do feijoeiro-comum à antracnose. É importante salientar que, com tais medidas, pode haver o aumento da produtividade da cultura, aumentando, assim, sua maior produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do feijoeiro-comum

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie de grande interesse agrônômico, pois representa um dos alimentos mais importantes na dieta alimentar (ANGIOI *et al.*, 2010). Representa 1% da comercialização de grãos e as espécies do gênero *Phaseolus* são as mais cultivadas no mundo, englobando 55 espécies, das quais somente cinco são cultivadas (AIDAR, 2003).

O feijoeiro é originário das Américas e foi domesticado por povos indígenas (MENSACK *et al.*, 2010). Há dois centros primários de diversidade genética ou *pools* gênicos - Andino e Mesoamericano, sugeridos por SINGH *et al.* (1991). No centro primário Andino (A região do Sul dos Andes abrange o Norte do Peru até as províncias do Noroeste da Argentina, e Norte dos Andes, abrangendo a Colômbia, Venezuela até ao Norte do Peru), os feijões apresentam como características a grande diversidade de cores, formatos e grãos de tamanho grande, similar à cultivar Jalo (VIEIRA *et al.*, 2006). No *pool* gênico Mesoamericano (localizada região do Sudeste dos Estados Unidos até ao Panamá) os feijões apresentam sementes pequenas, a exemplo de a cultivar carioca (SINGH *et al.*, 1991).

Apesar do Brasil não ser um centro primário de diversidade genética, estudos com marcadores moleculares indicam que há uma ampla variabilidade genética da espécie no país, que pode ser justificada pela domesticação da cultura no período anterior e posterior à colonização europeia. Com isso, BURLE *et al.* (2010) sugerem que o país deve ser considerado um centro secundário de diversidade da espécie.

O feijoeiro é uma leguminosa que pertence à família *Fabaceae*, diploide ($2n = 2x = 22$), autógama, mas pode ocorrer também até 5% de taxa de fecundação cruzada (CIAT, 1974; SINGH, 2001; BURLE *et al.*, 2010). É uma planta herbácea, trepadeira, cujo ciclo de vida varia de 65 a 120 dias conforme as características das cultivares e das condições da época de cultivo. Apresenta dois tipos de hábito de crescimento: determinado ou

indeterminado. Há variação na forma das sementes (arredondada, elíptica ou reniforme) e nos tamanhos, e possuem uma ampla variabilidade de cores dependendo de a cultivar (ALMEIDA; CANÉCHIO FILHO, 1987; VIEIRA *et al.*, 2001). Possui bom conteúdo de minerais e de nutrientes com aproximadamente 25 a 35% de proteínas. Essa taxa é variável nos grãos pela influência dos diversos tratos culturais e das várias cultivares da espécie (AIDAR, 2003; SGARBIERI, 1996; SINGH; SINGH, 1992).

Os principais produtores mundiais de feijoeiro-comum são o Myanmar, Índia, Brasil e a China (FAO, 2014). No Brasil, o estado do Paraná se destaca por ser o maior produtor de feijão do país; em 2013, o estado produziu 690.836 mil toneladas em áreas estimadas de 485.703 mil hectares, com rendimento de 1.422 kg/ha. O estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor, produzindo 564.295 toneladas em 391.753 mil hectares, com uma produtividade média de 1.440 kg/ha (SILVA, 2013).

O plantio consorciado da cultura é responsável por 50 a 70% da produção brasileira, por ser pouco competitiva com outras culturas e por ser de ciclo curto, além de possuir boa tolerância à competição por ser semeada em diferentes épocas do ano (VIEIRA, 2008). O feijoeiro apresenta aproximadamente 20% de uso de sementes não melhoradas e são os pequenos produtores responsáveis pela manutenção da diversidade genética, uma vez que conservam variedades crioulas e, assim, mantêm a variabilidade genética, o que pode contribuir para o aprimoramento dos programas de melhoramento (ANUÁRIO ABRASEM, 2003, COELHO *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2009).

De acordo com BONETT *et al.* (2006), praticamente todos os estados são produtores de feijão, sob diversas condições edafoclimáticas e épocas de semeadura. Geralmente é cultivado em três safras: feijão das “águas” (plantio de outubro a novembro); feijão da “seca” (plantio de fevereiro a março) e feijão de “inverno” (plantio de maio a junho, utilizando irrigação), por meio dos diversos sistemas de produção (ARAÚJO *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2006).

Nos últimos 20 anos, houve uma crescente evolução tecnológica da cultura com adoção de várias práticas de manejo para o maior aumento do potencial produtivo, principalmente pela utilização de novas cultivares que

apresentam características de estabilidade e adaptabilidade às questões fitossanitárias e ambientais (GUARNIEI *et al.*, 2009). No Brasil, há ampla variabilidade de genótipos cultivados, desenvolvidos de métodos de melhoramento vegetal que permitiram a fixação de características favoráveis para o aumento do potencial produtivo (DOMINGUEZ *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2002). Entretanto, fatores limitantes como o clima, a dificuldade de comercialização do produto e a dificuldade em tecnificação dos processos produtivos faz com que haja perdas expressivas, o que leva a baixa produtividade (ARAÚJO *et al.*, 1996). Outro fator crucial são as questões fitossanitárias, como a incidência de pragas e de doenças. São contabilizadas mais de 45 doenças que acometem o feijoeiro-comum, restringindo a sua maior produção (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 1998). Segundo Ripado (1992), uma das principais doenças que atacam a cultura é a antracnose (*Colletotrichum spp.*), que provoca diversos danos que afetam expressivamente a sua produtividade.

2.2 Seleção assistida por marcadores moleculares

Nos programas de melhoramento convencional, a seleção de genótipos é feita com base nas informações fenotípicas. Contudo, com o advento dos marcadores moleculares, foi possível a sua utilização como ferramentas auxiliares na seleção de genótipos superiores, cujo método é conhecido como Seleção Assistida por Marcadores (SAM). A SAM é um método que permite inferir a presença de um gene pela presença de uma sequência de nucleotídeos específica, em que este gene está estreitamente ligado a ele. Assim, a SAM consiste em integrar a genética molecular com a seleção fenotípica, pela da identificação de genes ou alelos desejáveis aos objetivos dos programas de melhoramento, por meio da utilização dos marcadores moleculares (KUMAR, 1999). À medida que se identificam mais marcadores associados a genes de resistência, seu uso na seleção assistida se torna mais viável (MILACH; CRUZ, 1997).

A utilização dos marcadores moleculares iniciou a partir da década de 1980 e podem ser definidos como segmentos de DNA, identificadores de

locos, os quais possuem genes que expressam as características dos indivíduos. O potencial dos marcadores, em programas de melhoramento genético, é pelo fato de serem ilimitados e altamente fáceis de serem detectados (SOLLER; BECKMANN, 1983).

O desenvolvimento da biologia molecular colaborou com mapeamento de genes que estão relacionados com as principais doenças (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta que permite a comparação genética entre indivíduos, possibilitando a classificação de grupos de interesses, ou seja, grupo de materiais com características inerentes aos objetivos dos programas de melhoramento de plantas (EICHENBERG *et al.*, 2000).

Os programas de melhoramento genético do feijoeiro dispõem de várias estratégias para o desenvolvimento de genótipos resistentes a diversos patótipos de uma doença. O *C. lindemuthianum* possui amplo espectro de variabilidade e a piramidação de distintos alelos de resistência em uma mesma cultivar tem sido recomendada, visando à obtenção de resistência ampla e durável (RAGAGNIN *et al.*, 2009). Há desafios que comprometem a eficiência na avaliação das reações dos patógenos, como as interações epistáticas entre os diferentes genes de resistência. Por isso, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a piramidação de genes e, além disso, são pouco influenciados por fatores ambientais e nem por possíveis interações com os genes de resistência. (MICHELMORE, 1995; BIGIRIMANA; HOFTE, 2001; SINGH, 2001).

O uso das técnicas convencionais, para o melhoramento, reflete-se nos ganhos em produtividade, ao longo dos anos, porém as novas alternativas, para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, podem ser empregadas, reduzindo tempo e custo (MATOS, 2005). Como características ideais, os marcadores moleculares ou genéticos devem possuir alto grau de polimorfismo, herança mendeliana, ausência de efeitos ambientais, simplicidade na identificação e análise, herança codominante e detecção nas primeiras fases do desenvolvimento da planta (JUNGHANS *et al.*, 2003).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), nem todos os genes têm segregação independente e isso é fundamental para a utilização dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas. Além disso, quanto maior a proximidade do marcador ao gene de interesse, maior será a eficiência de seleção dos indivíduos desejáveis e mais úteis serão esses marcadores no processo de melhoramento genético.

Os marcadores moleculares possuem ampla utilização: construção de mapas genéticos, *fingerprinting* molecular, similaridade genética, escolha de genitores para cruzamentos, identificação de progênies, estudos de caracteres quantitativos (MILACH, 1998). Segundo Borém (2001), a seleção para a resistência a doenças apresenta inúmeros desafios em comparação à seleção de outros caracteres agrônômicos, uma vez que o melhorista precisa entender dois sistemas biológicos e normalmente são utilizados vários patógenos e diferentes raças, requerendo inúmeras inoculações.

A detecção de polimorfismos de DNA pode ser feita por meio de hibridização do DNA com sondas ou na amplificação de sequências de DNA via PCR. Os marcadores que estão baseados em hibridização são os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). No entanto, entre aqueles cujo polimorfismo é identificado por amplificação de DNA via PCR destacam-se os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Sequence Simple Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (BORÉM; CAIXETA, 2009).

2.3 Melhoramento genético do feijoeiro visando a resistência a doenças

O feijão é um dos alimentos que constitui a base da dieta dos brasileiros, por ser a fonte proteica mais acessível. A maioria das cultivares utilizadas é do tipo de grão carioca e, apesar das tecnologias disponíveis, a produtividade média brasileira é baixa. Somente os produtores que utilizam dessas tecnologias, como irrigação controlada e controle de pragas e

doenças, conseguem atingir produtividades de aproximadamente 3000 kg/ha (BORÉM; CARNEIRO, 2006). Como a demanda é grande, existem vários fatores que contribuem para o aumento da produtividade, destacando o melhoramento genético (VENCOVSKY; RAMALHO, 2000).

O melhoramento genético é uma estratégia para o incremento de características desejáveis em uma espécie vegetal. De acordo com Moose e Mumm (2008), o melhoramento é constituído de métodos que envolvem a criação ou seleção de genótipos adaptados de acordo com os critérios dos agricultores e consumidores. Desse modo, o avanço na genética e genômica, nos últimos anos, vem integrando o conhecimento para viabilizar o desenvolvimento de genótipos superiores (VARSHNEY *et al.*, 2006).

O melhoramento genético do feijoeiro no Brasil é conduzido principalmente por empresas públicas, localizadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Podem-se destacar alguns objetivos comuns inerentes aos programas, como a qualidade comercial dos grãos, resistência a doenças, alta produtividade e porte ereto das plantas (CARNEIRO, 2002; VIEIRA *et al.* 1999).

Para autógamas e alógamas, existem vários métodos de melhoramento de plantas (RAMALHO *et al.*, 1993; BORÉM, 1999). Uma das categorias principais e mais frequentemente utilizadas é a variabilidade por meio da hibridação entre genitores, visando reunir os fenótipos de interesse em uma linhagem superior.

No caso de caracteres de herança qualitativa, ou seja, controlados por poucos genes e pouco influenciados pelo ambiente, como o controle genético de grande parte das doenças, a escolha de genitores é facilitada, pois a hibridação pode ser realizada com um dos genitores que contém o alelo de interesse com outro que apresente características agrônomicas importantes. Nos programas de melhoramento que visam ao melhoramento, para características quantitativas, é necessário considerar as diferenças entre as capacidades produtivas dos genitores, interações genótipo x ambiente e a baixa capacidade de combinação entre os genitores (SINGH, 2001).

Para o controle de doenças, podem ser utilizados vários métodos de controle como práticas culturais e controle químico. Porém, o método de

controle mais eficiente e econômico é a utilização de genótipos resistentes. O melhoramento genético visando a resistência a doenças é uma estratégia viável economicamente, pois a ampla variabilidade fisiológica dos patógenos é um dos obstáculos aos programas para obter genótipos com resistência de amplo espectro e durável (RAGAGNIN, 2001).

De acordo com Cordeiro e Sá (1999), a interação planta-patógeno pode ser dividida em interação compatível que resulta em suscetibilidade e interação incompatível, resultando em resistência. Essa interação, quanto ao mecanismo das doenças, pode ser explicada pela teoria gene-a-gene, proposta por Flor (1955). Esse mecanismo é específico, uma vez que uma planta pode reconhecer uma determinada raça A e não reconhecer a raça B de um mesmo patógeno. Assim, os genes R, que conferem resistência raça-específica, atuam conforme o genótipo do patógeno e se enquadram na teoria gene a gene (CORDEIRO; SÁ, 1999).

A introgressão de genes estabiliza as cultivares, em relação ao rendimento entre as safras, provocadas por maior ou menor intensidade dos ataques de fitopatógenos (VIEIRA *et al.*, 1999). Assim, a resistência vertical para piramidação de genes é uma das estratégias, para aumentar o espectro de resistência a doenças, uma vez que pode ser estabelecida com a incorporação de genes de efeitos principais e secundários. Porém, a introgressão de muitos genes em um único cultivar, com a manutenção de outras características, é um processo complexo e demorado, assim, os métodos tradicionais de melhoramento de plantas em autógamias são recomendados na incorporação de resistência.

O feijoeiro-comum é uma cultura propensa ao ataque de vários patógenos que limitam a produção e reduzem a qualidade do produto. Mais de 45 tipos de doenças, que podem ser de menor ou maior importância, são causadas por fungos, bactérias e vírus. No Brasil, as doenças mais presentes são a mancha angular, a ferrugem, o mofo branco, a murcha de fusarium, o mosaico dourado, crestamento bacteriano e a antracnose. O conhecimento das doenças e das condições favoráveis ao seu desenvolvimento é necessário para que sejam adotadas medidas de controle adequadas (ROSOLEM; MARYBAYASHI, 1994).

2.4. Antracnose

2.4.1- Etiologia

Inicialmente, a antracnose foi descrita por Saccardo & Magnus, em 1878, como *Gloeosporium lindemuthianum* e posteriormente, por notar a presença de setas nos conídios. Scribner modificou o gênero para *Colletotrichum*, sendo o agente etiológico conhecido como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib (ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

A antracnose do feijoeiro-comum pertence à classe dos Deuteromicetos, ordem Melanconiales, família Melanconiaceae e apresenta fases reprodutivas distintas: uma fase assexuada e outra sexuada (KIMATI *et al.*, 1997; RAVA *et al.*, 1994). A fase mitospórica ou assexuada é caracterizada pela produção de conídios. O fungo produz micélio ramificado e septado, com coloração hialina que escurece no processo de envelhecimento. Como características, os conídios são unicelulares de formato oblongo ou cilíndrico. São formados no interior de acérvulos e sobre conidióforos eretos e sem ramificações, com comprimento de 40 a 60 µm e envolvidos por uma massa gelatinosa rósea, agregados de 30 a 50 conidióforos por acérvulo (SUTTON, 1992; BIANCHINI *et al.*, 1997).

Na fase sexuada ou perfeita, pertence à classe dos Ascomicetos, conhecido como *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Esta produz ascos e peritécios os quais originam conídios denominados ascósporos, dificilmente encontrados na natureza (KIMATI; GALLI, 1970; KIMATI *et al.*, 1997; TU, 1992; ROCA *et al.*, 2003; GUARRO *et al.*, 1998).

2.4.2 Epidemiologia

O fungo é um patógeno necrotrófico, sobrevivendo no interior das sementes na forma de micélio em restos culturais entre as estações de cultivo do feijão. Além disso, sementes infestadas com diversos patótipos também são responsáveis pela disseminação da doença a longas distâncias. Entre outras formas de disseminação, a água da chuva também é responsável por uma maior disseminação, uma vez que é um veículo que dissolve a biotina que envolve os esporos, projetando-os a certa distância. O

homem pode ser uma fonte de inóculo, ao disseminar os esporos, quando opera máquinas agrícolas com resíduos culturais e sementes (KIMATI, 1980).

A doença desenvolve-se sob temperaturas amenas, que variam de 18 a 22°C, e com umidade relativa acima de 91%, em que há um ótimo desenvolvimento fúngico. Assim, temperaturas superiores a 30 °C ou inferiores a 13 °C limitam o crescimento (CHAVES, 1980; KELLY *et al.*, 1994). Com condições favoráveis, a infecção ocorre de 6 a 9 horas após a germinação dos conídios. A penetração ocorre pela formação da hifa desenvolvida com base no apressório, formando micélio primário e, posteriormente, secundário. Os sintomas são imperceptíveis a olho nu de 2 a 4 dias pós - infecção, sendo visíveis a partir dos 6 dias da infecção (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; BIANCHINI *et al.*, 1997).

2.4.3 Sintomatologia

Nas folhas, os sintomas apresentam-se, principalmente, na parte abaxial, com manchas de coloração marrom escura nas nervuras, podendo ocorrer necrose nas áreas adjacentes (FIG- 1). Nos caules e nos pecíolos os sintomas apresentam-se como manchas necróticas de coloração marrom escura e com bordas avermelhadas, alongadas e deprimidas (FIG- 2). Nas vagens, onde os sintomas são mais típicos, ocorrem lesões deprimidas, de cor escura, de tamanho variável e em condições de elevada umidade relativa do ar, desenvolve-se uma massa rósea de esporos de cor marrom-escuro à avermelhada (FIG-3). Nos cotilédones, os sintomas aparecem em lesões deprimidas. As sementes infectadas podem apresentar lesões de cor marrom com bordas escurecidas, levemente deprimidas (KIMATI *et al.*, 1997; SCHWARTZ, 1994).



Figura 1- Sintomas de antracnose na parte abaxial foliar
Foto: Adrienne Wendland



Figura 2- Sintomas de antracnose no caule e pecíolos do feijoeiro
Foto: Adrienne Wendland



Figura 3- Sintomas da doença nas vagens de feijão

Foto: Adrienne Wendland

Fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CO NT000gvwk5em102wx7ha0g934vg3trxyh6.html>

2.4.4 Medidas de controle

O controle da doença se torna difícil pela capacidade de sobrevivência do *C. lindemuthianum* no solo e em restos culturais infectados, em virtude da formação dos escleródios e transmissão de sementes infestadas. A variabilidade do patógeno e a grande quantidade de espécies hospedeiras fazem com que ocorram vários patossistemas, necessitando de métodos integrados para controle efetivo da doença (DILLARD; COBB, 1993; SUTTON, 1992).

Dessa forma, é importante salientar que medidas integradas de controle como: i) tratamento químico das sementes com fungicidas sistêmicos ou protetores ii) eliminação dos restos culturais e, iii) rotação de culturas com espécies não hospedeiras podem apresentar resultados satisfatórios (RAVA *et al.*, 1993; CHAVES, 1980; BIANCHINI *et al.*, 1997). Nos programas de melhoramento genético, a incorporação de genes de resistência é o método com maior eficiência para o controle da doença, pois é vantajosa do ponto de vista econômico, da menor utilização de defensivos

químicos na cultura, resistência mais durável, buscando obter cultivares com maior espectro de resistência (KELLY *et al.*, 1994; YOUNG; KELLY, 1996).

2.5 Variabilidade patogênica do *Colletotrichum lindemuthianum*

Os primeiros relatos da variabilidade patogênica foram realizados por Barrus, em 1911 e 1918, o qual identificou as raças alfa e beta a partir das cultivares diferenciadoras 'Michelite, Perry Marrow e Michigan Dark Red Kidney', pois estas cultivares apresentavam comportamento diferenciado quando inoculadas com isolados de diferentes procedências. Em estudo de Burkholder (1923) foi descrita a raça gama e Andrus e Wade (1942) identificaram a raça denominada delta.

Outros trabalhos realizados foram desenvolvidos para a identificação de raças de *C. lindemuthianum*. Inicialmente, a identificação dessas raças era associada aos locais de origem e a nomenclatura tinha por base o alfabeto grego: alfa, beta, gama, delta, épsilon, eta, teta, lambda, capa, um, zeta, alfa-brasil, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro I, Brasileiro II (GOTH; ZAUMEYER, 1965; BANNEROT, 1965; AYONOADU, 1974; FOUILLOUX, 1979; BALARDIN *et al.*, 1990; RAVA *et al.*, 1994; TALAMINI *et al.*, 2004; SANSIGOLO *et al.*, 2008). No Brasil, identificaram-se as raças alfa, beta, gama, épsilon, lambda, alfa-Brasil, teta, eta e zeta (KIMATI, 1966; OLIVEIRA *et al.* 1973; BALARDIN *et al.* 1990).

A dificuldade na identificação de raças por comparação de resultados entre diversos pesquisadores resultou na necessidade de um sistema padronizado de identificação. Assim, Pastor-Corrales (1992) propôs um conjunto diferenciador com base em 12 variedades recomendadas pelo CIAT (1990), no qual a nomenclatura obedecia a um sistema binário proposto por Habgood (1970). A nova nomenclatura tinha por base a posição da cultivar na série diferenciadora, facilitando a identificação das raças e padronização das nomenclaturas. Essas cultivares possuem diferentes respostas causadas pelas raças ou patótipos (CARBONELL *et al.*, 1999). Cada cultivar recebeu um valor binário e o valor 2 (dois) equivale à reação das classes, consideradas resistentes ou suscetíveis, e dn é em função da ordem do

conjunto diferenciador. Conforme Young *et al.* (1998), a raça fisiológica do patógeno é determinada pela soma dos valores binários, por meio da reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras de cada isolado inoculado (TAB-1).

TABELA 1

Classificação de raça fisiológica de *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da reação das doze variedades diferenciadoras do feijão

Ordem	Variabilidade Diferenciadora	Série Binomial	Valor Binário (2^{dn-1})
1	Michelite	2^0	1
2	MDRK	2^1	2
3	Perry Marrow	2^2	4
4	Cornell 49242	2^3	8
5	Widusa	2^4	16
6	Kaboon	2^5	32
7	México 222	2^6	64
8	PI 207262	2^7	128
9	TO	2^8	256
10	TU	2^9	512
11	AB 136	2^{10}	1024
12	G 2333	2^{11}	2048

Fonte: Pastor-Corrales (1992)

Já foram identificadas mais de 100 raças do patógeno no mundo desde a adoção do sistema de identificação de raças (BALARDIN *et al.*, 1997; MAHUKU; RIASCOS, 2004). No Brasil, identificaram-se 50 raças, sendo os patótipos 65, 73, 81 e 87 os mais frequentes nos estados do Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (ANDRADE *et al.* 1999; THOMAZELLA *et al.* 2000; ALZATE-MARIN; SARTORATO, 2004).

2.6 Genes de resistência à antracnose no feijoeiro-comum

Foram identificados doze genes que condicionam resistência à antracnose no feijoeiro-comum, de *Co-1* a *Co-14*, conforme nomenclatura proposta por Kelly e Young (1996). Quatro séries alélicas foram identificadas para esses locos: *Co-1*: $Co-1^1$, $Co-1^2$, $Co-1^3$, $Co-1^4$ e $Co-1^5$; *Co-3*: $Co-3^2$, $Co-3^3$ e $Co-3^4$; *Co-4*: $Co-4^2$ e $Co-4^3$ e *Co-5*: $Co-5^2$ (BIC, 2014a). Para onze deles, são dominantes e somente o gene *co-8* é recessivo. *Co-1*, *Co-12* e *Co-13* são de origem Andina e os demais são de origem Mesoamericana. Já foram

mapeados oito locos de resistência entre os 11 cromossomos (B1-B11) do feijoeiro: *Co-1* (B1), *Co-2* (B11), *Co-3* (B4), *Co-4* (B8), *Co-5* (B7), *Co-6* (B7), *Co-10* (B4) e *Co-13* (B3) (KELLY *et al.*, 2003; SINGH; SHWARTZ, 2010; LACANALLO *et al.*, 2010).

O gene *Co-1* foi o primeiro gene a ser identificado, presente no cultivar Michigan Dark Red Kidney, em estudos realizados por McRostie (1919), e possuía a nomenclatura de gene A (KELLY; VALLEJO, 2004). Nas cultivares Kaboon e Perry Marrow foram encontrados alelos do *Co-1*, denominados *Co-1²* e *Co-1³*, respectivamente (MELOTTO; KELLY, 2000). Em estudos de Alzate-Marin *et al.* (2003a), foi identificado o alelo *Co-1⁴* no cultivar AND 277.

O gene *Co-2* (gene *Are*) foi identificado no cultivar Cornell 49-242, por Mastenbroek em 1960 (KELLY; VALLEJO, 2004). A cultivar possui resistência a várias raças do patógeno e estudos de Adam-Blondon *et al.* (1994) identificaram um marcador RAPD, ligado ao gene de resistência, o qual foi convertido em marcador SCAR (marcador SCH20).

Bannerot, em 1965, descreveu o gene *Co-3*, presente no cultivar México 222, conhecido antigamente por Mexique 1. Posteriormente, Fouilloux (1979) descreveu o alelo desse gene (*Co-3²*) na variedade México 227.

O gene *Co-4*, antigamente nomeado por Mexique 2, foi descrito por Fouilloux (1979) no genótipo TO. O alelo deste gene, denominado *Co-4²*, foi observado no cultivar SEL 1308 e, no cultivar PI 207262, foi encontrado o alelo *Co-4³* (KELLY; VALLEJO, 2004; ALZATE-MARIN *et al.* 2007). A cultivar TO é muito importante no melhoramento, uma vez que é resistente a 44 das 50 raças de antracnose descritas no país (ARRUDA *et al.*, 2000).

O gene *Co-5*, anteriormente nomeado como Mexique 3, foi descrito na cultivar TU, originária do cruzamento entre Tenderette x México. Este gene também está presente nas cultivares SEL 1360 e G 2333. Estudos de Alzate-Marin *et al.* (2001) identificaram o marcador RAPD OPB03_{450b} como ligado ao gene *Co-5* a uma distância de 15,4 cM, observada também na cultivar G2338. Porém, como o marcador possuía dificuldade de amplificação, o mesmo foi convertido a marcador SCAR, denominado SAB3, presentes nos genótipos TU, SEL 1360, G2333 e G2338 (VALLEJO; KELLY, 2001).

Conforme Kelly e Vallejo (2004), o gene *Co-6*, presente na cultivar AB136, foi identificado pela primeira vez por Schwartz *et al.* (1982), umas das principais fontes de resistência à antracnose.

O gene *Co-7* foi identificado como terceiro gene independente da cultivar G 2333. Pastor-Corrales *et al.* (1994) identificaram os genes de resistência, utilizando a raça 521 de antracnose, porém foram com os estudos de Young *et al.* (1998) que confirmaram a presença de três genes independentes (*Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) na cultivar.

Alzate-Marin *et al.* (2001) identificaram, em seus estudos, o gene recessivo *co-8*, em cruzamentos com as cultivares AB136 (resistente) e Rudá (suscetível), inoculados com 18 patótipos de antracnose. No experimento observou-se, em uma das linhas, o padrão de herança e era de 1:3 (resistente: suscetível), indicando a presença de um gene recessivo.

O gene *Co-9*, atualmente denominado *Co-3*³ (BIC, 2014a), foi descrito por Geffroy *et al.* (1999) na cultivar BAT 93. Estudos de Kelly e Vallejo (2004) confirmaram que o gene presente na cultivar BAT 93 era proveniente do seu genitor PI 207262, uma vez que por estudos de alelismo, realizado por Alzate-Marin *et al.* (2007), demonstraram que a cultivar PI 207262 possuía os genes *Co-4*³ e *Co-9*; este último gene provém de um dos seus genitores, o BAT 93.

O gene *Co-10*, atualmente denominado *Co-3*⁴ (BIC, 2014a), foi caracterizado na cultivar Ouro Negro por estudos de alelismo com os genes *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*, realizados por Alzate-Marin *et al.* (2007), cujos resultados indicavam que o gene presente na cultivar segregava independentemente dos outros.

O gene *Co-11* foi identificado na cultivar mesoamericana Michelite, pelo estudo de herança à resistência, realizado por Gonçalves-Vidigal *et al.* (2007). No trabalho, a cultivar Michelite foi cruzada com as cultivares diferenciadores resistentes à raça 64 (MDRK, Kaboon, Perry Marrow, AND 277, Widusa, Cornell 49-242, TO, TU, AB 136, BAT 93, Ouro Negro, PI 207262) e com a cultivar México 222, suscetível à raça 64. Por meio dos testes de alelismo pode-se observar a presença de genes dominantes independentes, ou seja, cada uma das cultivares possui um gene de

resistência dominante e independente. Como resultado, a cultivar apresentou um gene independente dos já caracterizados. Os autores nomearam esse gene por *Co-11*, gene no qual é encontrado na cultivar Michelite.

O gene *Co-12*, identificado no cultivar andino Jalo Vermelho, foi descrito por Gonçalves-Vidigal (2008).

Atualmente, são três genes que identificam resistência à antracnose em cultivares andinas: o gene *Co-13* foi identificado por Gonçalves-Vidigal *et al.* (2009), na cultivar andina Jalo Listras Pretas; o gene *Co-14* foi identificado no cultivar Pitanga (MEIRELLES *et al.*, 2010); o gene *Co-15*, encontrado no cultivar 'Corinthiano', descrito por Gonçalves *et al.* (2010), no qual deverá ser inserido na lista oficial de genes de resistência à doença.

O gene *Co-16* foi recentemente identificado por Coelho *et al.* (2013) na cultivar mesoamericana 'Crioulo 159', que também deverá ser inserido na próxima versão oficial da lista de genes de resistência à doença (TAB-2).

TABELA 2
Fontes de resistência ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*

Linagem	Gene	Sinônimo	Pool gênico	GL ^c
MDRK ^a	<i>Co-1</i>	A		
Kaboon ^a	<i>Co-1</i> ²			
Perry Marrow ^a	<i>Co-1</i> ³		Andino	B1
AND 277	<i>Co-1</i> ⁴			
Widusa ^a	<i>Co-1</i> ⁵			
Cornell 49-242 ^a	<i>Co-2</i>	Are	Mesoamericano	B11
Mexico 222 ^a	<i>Co-3</i>	Mexique 1	Mesoamericano	B4
BAT 93	<i>Co-3</i> ³	Co-9		
TO ^a	<i>Co-4</i>	Mexique 2		
SEL1308	<i>Co-4</i> ²		Mesoamericano	B8
PI 207262 ^a	<i>Co-4</i> ³ e <i>Co-9</i>	Co=9=Co-3 ³		B8 e B4
G 2333 ^a	<i>Co-4</i> ² , <i>Co-5</i> e <i>Co-7</i>			B8, B7 e ND
TU ^a	<i>Co-5</i>	Mexique 3	Mesoamericano	B7
SEL1360	<i>Co-5</i> ²			
AB 136 ^a	<i>Co-6</i> e <i>co-8</i>	Co-6=Q	Mesoamericano	B7 e ND
H1	<i>Co-7</i>	ND ^b	Mesoamericano	ND
Ouro Negro	<i>Co-10</i>	Co-10=Co-3 ⁴	Mesoamericano	B4
Michelite ^a	<i>Co-11</i>	ND	Mesoamericano	ND
Jalo Vermelho	<i>Co-12</i>	ND	Andino	ND
Jalo Listras Pretas	<i>Co-13</i>	ND	Andino	B3
Pitanga	<i>Co-14</i>	ND	Andino	ND
Corinthiano	<i>Co-15</i> ^d	ND	Andino	ND
Crioulo 159	<i>Co-16</i> ^d	ND	Mesoamericano	ND

^aVariedade diferenciadora, ^bND: informação não disponível, ^cGL: grupo de ligação: cromossomo

^dGenes que deverão ser inseridos na próxima lista oficial de genes resistência à antracnose.

Fonte: BIC (<http://www.css.msu.edu/bic.cfm>)

2.7- Marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose

Existem inúmeros marcadores utilizados no melhoramento de plantas, entre eles os marcadores SCAR. Os SCARs foram desenvolvidos, com base nos marcadores RAPD e estes apresentavam baixa reprodutibilidade (JUN *et al.*, 2002).

Como características, possuem temperatura de anelamento mais específicas, evitando fragmentos múltiplos de ampliações; podem ser de natureza codominante, altamente específicos por serem mais longos (17 a 30 bases) para a amplificação da região selecionada (HERNANDEZ, 1999; NIETSCHE *et al.*, 2000). Conforme MIKLAS (2006), existem 42 marcadores SCAR ligados a locos e resistência a doenças e, dentre estas, podem-se citar, para a antracnose, os marcadores SAS13, SH18, SBB14, SAB3, SB12, SCARY20, SCARC08, SCARAZ20, SCARZ04, SF10. Houve o desenvolvimento de novos marcadores, associados aos locos de interesse, encontrando aproximadamente 15 marcadores SCAR ligados aos genes de interesse de *C. lindemuthianum* (TAB-4).

Um grande número de marcadores moleculares está disponível para a cultura do feijoeiro visando a resistência a doenças, utilizados por universidades, empresas públicas e privadas na seleção assistida (BARROS; SOUZA, 2012).

TABELA 3

Marcadores moleculares tipo SCAR identificados como ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro

Marcador	Gene	GL	Primer (5' 3')	Produto (pb)	Distância (cM)	Fase de Ligação	T (°C) ^a	Referência
SE _{ACT} /M _{CCA}	Co-1 ²	1	F: AATTCACTTATAAAAAATAAAAT R: AACCATAACTGTTATCAGACC	108/107	9,9	Co-dominante	52	Vallejo; Kelly (2008)
TAG1.1	Co-1 ⁴	1	F: CAGAGGATGCTTCTCACGGT R: AAGCCATGGATCCCATTG	570	1,3	Acoplamento	50	McClellan <i>et al.</i> (2010); Gonçalves-Vidigal <i>et al.</i> (2011)
CV542014	Co-1 ⁴	1	F: GGGAGACATCCATCAGACAACCTCC R: GCACAAGGACAAGTGGTCTGG	450	0,7	Acoplamento	50	McClellan <i>et al.</i> (2010); Gonçalves-Vidigal <i>et al.</i> (2011)
SH20/SCA _{reoli}	Co-2	11	F: GGGAGACATCCATCAGACAACCTCC R: GGGAGACATCTTCATTTGATATGC	1300/1000	0,0	Co-dominante	65	Adam-Blodon <i>et al.</i> (1994); Geffroy <i>et al.</i> (1998)
SW12	Co-3/Co-9	4	F: TGGGCAGAAGTTCTAGCATGTGGC R: TGGGCAGAAGCACAGTATGATTG	700	1,5	Acoplamento	70	Rodriguez-Suárez <i>et al.</i> (2008)
SC08	Co-4	8*	F: AGAATGCCTTTAGCTGTTGG R: CAGAGAGGCTAGGCTTATCG	910	7,8	Acoplamento	65	Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SY20	Co-4	8*	F: AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R: CAGAGACCCTAGGCTTATCG	830	1,2	Acoplamento	65	Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SBB14	Co-4 ²	8*	F: GTGGGACCTGTTCAAGAATAATAC R: GTGGGACCTGGGTAGTGTAGAAAT	1150/1050	5,9	Co-dominante	67	Kelly <i>et al.</i> (2003)
SH18	Co-4 ²	8*	F: CCAGAAGGAGCTGATAGTAGTCCACAAC R: GGTAGGCACACTGATGAATCTCATGTTGGG	1100	4,3	Acoplamento	62	Kelly <i>et al.</i> (2003)
SAS13	Co-4 ²	8*	F: CACGGACCGAATAAGCCACCAACA R: CACGGACCAGGATACAGTGAAAG	950	0,0	Acoplamento	72	Young <i>et al.</i> (1998); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SAB3	Co-5	7	F: TGGCGCACACATAAGTTCTCACGG R: TGGCGCACACCATCAAAAAAGGTT	400	12,9	Acoplamento	67	Vallejo; Kelly (2001); Campa <i>et al.</i> (2005)
SAZ20	Co-6	7*	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	845	7,1	Acoplamento	60	Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SZ04	Co-6	7*	F: GGCTGTGCTGATTAATTCTGG R: TGCTCATTTATAATGGAGAAAAA	567	2,9	Repulsão	45	Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SB12	Co-9	4	F: CCTTGACGCACCTCCATG R: TTGACGATGGGTTGGCC	350	2,9	Acoplamento	68	Mendez de Vigo <i>et al.</i> (2002)
SF10	Co-10	4	F: GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA R: GGAAGCTTGGCTATGATGTT	1072	6,0	Acoplamento	65	Corrêa <i>et al.</i> (2000); Alzate-Marin <i>et al.</i> (2003b)

^aTemperatura de anelamento dos primersFonte: *PhaseolusGenes* (<http://phaseolusgenes.bioinformatics.ucdavis.edu>)

2.8 Estudo de herança

A obtenção de informações do controle genético dos caracteres é importante para tomada de decisão para a obtenção de procedimentos de melhoramento mais adequados a serem adotados, com o propósito de maiores ganhos por seleção (SILVA *et al.*, 2000; VIANA, 2000).

Nos programas de melhoramento que visam à piramidação de genes, a determinação do número de genes e quais estão envolvidos no controle do caráter estudado são de grande importância, pois fornecem informações para que os melhoristas identifiquem quais os cruzamentos e, conseqüentemente, quais combinações alélicas possíveis e mais vantajosas, de posse dos objetivos do programa (VIANA, 2000).

Para uma determinada doença, a inferência de quantos genes e quais determinam o fenótipo para uma determinada doença (característica de resistência: suscetibilidade) consiste nos estudos de herança e teste de alelismo. Nos estudos de herança, avaliam-se as populações segregantes obtidas dos cruzamentos entre uma fonte suscetível e uma fonte de resistência. O padrão de segregação determinará o número de genes envolvidos no caráter estudado. O primeiro estudo de herança, para a antracnose, foi realizado por Burkholder (1918), o qual identificou a presença de um gene dominante que induzia a resistência à doença, presente na cultivar Wells Red Kidney, denominado gene A.

Foram identificados mais dois novos genes com estudo de herança, o Co-15 e o Co-16, presentes, respectivamente, nas cultivares 'Corinthiano' e 'Crioulo 159' de feijoeiro-comum (GONÇALVES *et al.*, 2010; COELHO *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização fenotípica e molecular de linhagens e cultivares de feijoeiro-comum, quanto à resistência à antracnose, além de estudar a herança para a resistência à antracnose na cultivar 'BRS Cometa'.

3.1 Objetivos Específicos

- Inocular linhagens e cultivares com os principais patótipos de *C. lindemuthianum* que ocorrem no Brasil, os quais serão selecionados com base nos critérios de virulência e prevalência.
- Comparar o espectro de resistência apresentado pela cultivares e linhagens testadas de feijoeiro-comum, visando aferir a presença de genes em comparação a outros previamente identificados em cultivares do tipo carioca.
- Amplificar o DNA de todas as cultivares e linhagens testadas com marcadores moleculares do tipo SCAR, previamente identificados como ligados a genes de resistência à antracnose.
- Comparar o perfil molecular das fontes de resistência, visando identificar evidências adicionais para a presença/ausência de alelos de resistência à antracnose nas linhagens e cultivares de feijoeiro-comum.
- Estudar a herança da resistência à antracnose na cultivar 'BRS Cometa', utilizando a população F_{2:3} (Rosinha G2 x BRS Cometa).

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE LINHAGENS E CULTIVARES DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

RESUMO

O feijoeiro-comum é a leguminosa mais consumida no Brasil. O potencial produtivo da cultura é baixo, principalmente, em virtude da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Assim, a identificação de fontes de resistência é uma das alternativas mais viáveis para o maior controle efetivo da doença. Objetivou-se, neste trabalho, fazer a caracterização fenotípica e molecular de 55 genótipos de feijoeiro-comum (cultivares e linhagens) quanto a resistência à antracnose com marcadores SCAR ligados aos genes *Co-3⁴*, *Co-4*, *Co-4²*, *Co-5* e *Co-6*. Para a caracterização fenotípica, o experimento foi conduzido no campo e delineado em blocos casualizados (DBC), com três repetições e cada parcela constituiu-se de uma linha de 3 metros. Para a caracterização molecular, os genótipos foram semeados em casa de vegetação e discos foliares de dez plântulas foram coletados para extração de DNA. Posteriormente, foram feitas reações de PCR para amplificação e a genotipagem por ausência (0) ou presença (1) de marca molecular em comparação a um marcador de massa molecular conhecido. Dos 55 genótipos testados, 26 foram considerados resistentes e dentre eles dez considerados imunes. Exceto para o marcador SF10 e SY20, houve especificidade dos marcadores. A linhagem K10 apresentou marcas moleculares para os marcadores SY20, SAB3 e SAZ20, o que indica a presença dos genes *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*, respectivamente.

Palavras-chave: marcadores SCAR, biotecnologia, genes de resistência.

CHAPTER 2 - CHARACTERISTICS AND MOLECULAR PHENOTYPIC LINES AND CULTIVARS OF COMMON BEAN FOR ANTHRACNOSE RESISTANCE

ABSTRACT

The common bean is the most widely consumed legume in Brazil. The crop production potential is low, primarily because of the anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Thus, the identification of sources of resistance is one of the most viable alternatives to the most effective control of the disease. The objective of this work was to make the phenotypic and molecular characterization of 55 common bean genotypes (cultivars and lines) in relation of the resistance to anthracnose with SCAR markers linked to genes *Co-3⁴*, *Co-4*, *Co-4²*, *Co-5* and *Co-6*. For phenotypic characterization, the experiment was conducted in the field and in a randomized block design (RBD), with three replications and each plot consisted of a line of 3 meters. For the molecular characterization, the genotypes were grown in the greenhouse and leaf discs ten seedlings were collected for DNA extraction. Subsequently, PCR reactions were performed for amplification and genotyping by absence (0) or presence (1) molecular tag compared to a known molecular weight marker. Of the 55 genotypes tested, 26 were considered resistant and among them ten considered immune. Except for the marker SF10 and SY20, there were specific markers. The K10 strain showed molecular markers for SY20 markers, SAB3 and SAZ20, which indicates the presence of the *Co-4*, *Co-5* and *Co-6* genes, respectively.

Keywords: SCAR markers, biotechnology, resistance genes.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das principais fontes de proteína vegetal. É principalmente consumido na maioria dos países da América Latina e da África e em distintas regiões e estações do ano. É cultivada tanto por pequenos agricultores quanto por empresários rurais que detêm tecnologia moderna. Nesse contexto, é importante o investimento em pesquisas para o aumento da produção, uma vez que a produtividade média nacional ainda é baixa, quando comparada ao potencial produtivo, o qual supera 4.000 kg/ha (DEL PELOSO; MELO, 2005).

Um dos fatores que explicam essa situação é o elevado número de doenças que afetam a cultura. Uma das principais doenças fúngicas que afetam a cultura é a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. (BIANCHINI *et al.*, 2005). Essa doença se desenvolve bem em locais cujas temperaturas são moderadas a frias e com alta umidade relativa do ar. Pode ocasionar até 100% de perdas na produção (KIMATI *et al.*, 1997). No país já foram identificadas 50 raças fisiológicas ou patótipos de antracnose (ALZATE-MARIN; SARTORATO, 2004; RAVA *et al.*, 1994; BALARDIN, 1997; CARBONELL *et al.*, 1999).

Já foram identificados e caracterizados 12 genes (*Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *co-8*, *Co-11*, *Co-12*, *Co-13* e *Co-14*; *Co-9=Co-3³* e *Co-10=Co-3⁴*) e quatro séries alélicas para resistência à antracnose (BIC, 2014a). Gonçalves-Vidigal *et al.* (2010), também, descreveram um gene adicional presente na cultivar 'Corinthiano' (*Co-15*) e Coelho *et al.* (2013) descreveram o gene *Co-16*, presente na cultivar 'Crioulo 159', os quais deverão ser incluídos na próxima versão da lista oficial de genes de resistência à doença, periodicamente publicada pela BIC (<http://bic.css.msu.edu/>). Com isso, tornam-se essenciais os estudos visando a um melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro no intuito de viabilizar o controle efetivo da doença por meio de cultivares resistentes.

No manejo integrado de doenças, as medidas comumente empregadas incluem o controle químico, práticas culturais e a resistência genética. A adoção de cultivares resistentes é uma medida

considerada efetiva para o controle de doenças e de maior facilidade de adoção pelos agricultores. Nesse contexto, a introgressão de genes de resistência é uma estratégia que vem sendo utilizada para o desenvolvimento de cultivares com resistência ampla (CORRÊA *et al.*, 2000, MIKLAS *et al.*, 1993).

Os marcadores moleculares são utilizados como ferramentas auxiliares na seleção indireta de genes R, possibilitando a identificação e caracterização de fontes de resistência pela seleção de genótipos que contenham marcas associadas à resistência ou marcas específicas de interesse, pois, geralmente, os genótipos que vieram dos processos de melhoramento tendem a ser semelhantes fenotipicamente (BERALDO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, os marcadores SCAR são marcadores utilizados na seleção assistida e foram desenvolvidos a partir de marcadores RAPD. O polimorfismo pode ser detectado pela ausência ou presença da banda amplificada (PARAN; MICHELMORE, 1993; HERNANDEZ, 1999, NIETSCHE *et al.*, 2000). Atualmente, existem cerca de 59 marcadores SCAR ligados a genes de resistência a várias doenças do feijão e para a antracnose já foram identificados aproximadamente 15 marcadores (BIC, 2014b).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização fenotípica e molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto a resistência à antracnose, com base na genotipagem destas, usando marcadores SCAR previamente identificados como ligados aos genes *Co-3*⁴ (SF10), *Co-4* (SY20), *Co-4*² (SH18 E SAS13), *Co-5* (SAB3) e *Co-6* (SAZ20).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaios de campo

O experimento foi conduzido no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAP-EMBRAPA), localizado no município de Santo Antônio de Goiás-GO. Foram obtidos 55 genótipos de feijoeiro-comum (cultivares, linhagens elites e testemunhas). O ensaio a campo foi conduzido, durante o inverno de 2014, em delineamento em blocos casualizados (DBC) com três repetições. Cada parcela possuía uma linha de 3 m de comprimento, com espaçamento de 0,5 m entre si. No campo, os genótipos foram inoculados simultaneamente com as raças 65 (isolado *CI* 1614); 73 (isolado *CI* 1143); 81 (isolado *CI* 1164); 91 (isolado *CI* 1247); 475 (isolado *CI* 1322) e 1609 (isolado *CI* 1294). A concentração final da suspensão de esporos foi $1,2 \times 10^6$ esporos/mL. As notas atribuídas a cada genótipo foram dadas em função da porcentagem de folhas e/ou plantas infectadas (TAB-1).

TABELA 1

Escala descritiva de notas para avaliação de doenças a campo, baseadas na porcentagem de folhas e/ou plantas infectadas

Grau (nota)	% de infecção em folhas e/ou % de plantas infectadas
1	0
2	1
3	5
4	10
5	20
6	40
7	60
8	80
9	100

Fonte: Procedimentos para condução de experimentos de valor de cultivo e uso em feijoeiro-comum (MELO, 2009).

Amostras foliares de cada um dos genótipos foram coletadas em *bulks* (dez indivíduos de cada acesso), sendo cada amostra formada por folhas do último trifólio e acondicionada em papel alumínio. Os *bulks* foram armazenados em um freezer a -20 °C, até o momento da extração de DNA.

2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada, conforme o protocolo CTAB, proposto por Doyle e Doyle (1987), com adaptações de Ferreira e Grattapaglia (1998). Para isto, cerca de 50 mg dos *bulks* foliares foram macerados na presença de 700 μ L de tampão de extração [(Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, β - Mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2 % (p/v)] em microtubos de 2,0 mL. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 $^{\circ}$ C, por 1 hora.

Após o procedimento de incubação, foram adicionados 600 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA 24:1) e centrifugadas em microcentrífuga *Eppendorf* 5415C (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) por 15 minutos a velocidade de 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados, ao sobrenadante, 800 μ L de etanol absoluto gelado (PA: 99,5 %) e os tubos foram armazenados em freezer -20 $^{\circ}$ C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente por 15 minutos a 13000 rpm para formação do DNA precipitado (*pellet*) e o etanol descartado para a adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. Após o descarte do etanol 70%, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto, repetindo o mesmo processo da centrifugação anterior. Após o descarte do etanol, o precipitado foi seco ao ar, por 15 minutos e ressuspenso em 50 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubado a 37 $^{\circ}$ C em banho-maria, por 1 hora, com RNase à concentração final de 20 μ g/mL.

A concentração do DNA foi quantificada em espectrofotômetro (Nanodrop, modelo 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), por relação de absorbância a 260/280 nm, no qual indica a concentração de ácido nucleico presente por μ L de amostra. Posteriormente, a concentração das amostras foi ajustada para 50 ng/ μ L.

2.3 Condições de amplificação dos marcadores SCAR

As amostras de DNA dos genótipos foram amplificadas, utilizando os *primers* SCAR (TAB- 2), com as respectivas temperaturas de anelamento.

TABELA 2
Marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro-comum

SCAR	Gene	Fonte	Primer 5'-- > 3'	T(°C) ^a	Referências
SF10	Co-3 ⁴	Ouro Negro	F: GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA R: GGAAGCTTGGCTATGATGGT	65	Corrêa <i>et al.</i> (2000); Alzate-Marin <i>et al.</i> (2003b) Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SY20	Co-4	TO	F: AGCCGTGGAAGTTGTCAT R: CAGAGACCCTAGGCTTATCG	60	Young <i>et al.</i> (1998); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SAS13	Co-4 ²	SEL1308	F: CACGGACCGAATAAGCCACCAACA R: CACGGACCGAGGATACAGTGAAAG	72	Young <i>et al.</i> (1998); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SH18	Co-4 ²	SEL1308	F: CCAGAAGGAGCTGATAGTAGTCCACAAC R: GGTAGGCACACTGATGAATCTCATGTTGGG	60	Awale; Kelly (2001); Kelly <i>et al.</i> (2003)
SAB03	Co-5	TU	F: TGGCGCACACATAAGTTCTCACGG R: TGGCGCACACCATCAAAAAAGGTT	54	Vallejo; Kelly (2001); Campa <i>et al.</i> (2005)
SAZ20	Co-6	AB136	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	60	Queiroz <i>et al.</i> (2004); Kelly <i>et al.</i> (2003)

^aTemperatura de anelamento
Fonte: <http://www.css.msu.edu>

Nas reações de amplificação foi utilizado o volume final de 5,0 µL, sendo 1,0 µL de DNA (50 ng/µL), 0,5 µL de *Q- Solution* (Qiagen, Hilden, Alemanha), 2,5 µL da enzima *GoTaq* (Promega, Madison, EUA) e 1,0 µL de cada *primer* à concentração de 10 mM. As reações foram conduzidas em termocicladores modelos Robocycler programados para uma fase inicial de 95 °C por 15 minutos; seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperaturas de anelamento de 54 °C (SAB3), 60 °C (SY20, SH18 e SAZ20) e 72 °C (SAS13) e por 1 minuto e 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; seguidos de uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

2.4 Eletroforese e Fotodocumentação

Aos produtos de amplificação, adicionaram-se 3 µL de corante azul de bromofenol, os quais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % em TBE 1x (Tris-ácidobórico-EDTA), por 2 horas a 100 volts. Para a visualização destes produtos, os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídeo, por 20 minutos e, em seguida, visualizados em luz ultravioleta. As imagens obtidas foram fotodigitalizadas e as marcas amplificadas interpretadas na forma de ausência (0) ou presença de banda (1). Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados foram aferidos por comparação a um marcador de massa molecular conhecida.

2.5- Análise estatística

Os dados das avaliações a campo foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias de Scott e Knott, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de campo

Os genótipos foram agrupados de acordo com o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (TAB-3).

TABELA 3

Reação à antracnose das 55 cultivares e linhagens testadas no campo

Genótipos	Gene R	*Notas
AB 136	Co-6 e co-8	1,00 a
BRS Esteio		1,00 a
BRS Realce		1,00 a
BRS Sublime		1,00 a
CNFC 10729		1,00 a
K10	Co-4 ² , Co-5, Co-6 e Co-10	1,00 a
K13	Co-4 ²	1,00 a
Ouro Negro	Co-3 ¹	1,00 a
SEL 1308	Co-4 ²	1,00 a
TO	Co-4	1,00 a
BRS Embaixador		1,33 a
BRS Estilo		1,33 a
G 2333	Co-4 ² , Co-5 e Co-7	1,33 a
Jalo Vermelho	Co-12	1,33 a
Kaboon	Co-1 ²	1,33 a
BRS Radiante		1,67 b
Jalo Listras Pretas	Co-13	1,67 b
PI 207262	Co-4 ³ e Co-9	1,67 b
AND 277	Co-1 ⁴	2,00 b
BRS Supremo		2,00 b
MDRK	Co-1	2,00 b
Perry Marrow	Co-1 ³	2,00 b
TU	Co-5	2,00 b
Widusa	Co-1 ⁵	2,00 b
BRS Executivo		2,33 b
BRS Notável		2,33 b
Mexico 222	Co-3	3,00 c
K23	Co-5	3,33 c
BRS Esplendor		4,67 d
CNFP 10120		4,67 d
IAC Alvorada		4,67 d
Pérola		5,00 d
CNFP 15330		5,33 d
Jalo Precoce		5,33 d
CNFP 10794		5,67 d
H1	Co-7	5,67 d
Rudá		5,67 d
SEL 1360	Co-5 ²	5,67 d
BRS Requite		6,00 d
BRSMG Majestoso		6,00 d
BRS Grafite		6,33 e
IPR Uirapuru		6,33 e
BRS Agreste		6,67 e
BRS Pitanga	Co-14	6,67 e
BRS Valente		7,00 e
BRSMG Talismã		7,00 e
CNFC 15874		7,00 e
BRS Campeiro		7,33 e
CNFC 15873		7,33 e
Cornell 49-242	Co-2	7,33 e
Michelite	Co-11	7,33 e
BAT 93	Co-3 ³	7,67 f
BRSMG Madrepérola		8,00 f
CNFC 15875		8,00 f
Rosinha G2		9,00 f

Fonte: Da autora

Notas: *Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

Os genótipos que pertencem ao grupo “a e b” apresentaram maior espectro de resistência à doença (26 genótipos), destacando-se os genótipos: AB 136, BRS Esteio, BRS Realce, BRS Sublime, CNFC 10729, K10, K13, Ouro Negro, SEL 1308, TO (imunes) (TAB-3). O menor número de indivíduos suscetíveis é um resultado satisfatório da seleção fenotípica, realizada por programas de melhoramento, que objetivam a obtenção de cultivares resistentes aos patótipos de antracnose (BERALDO, 2007). Esses resultados confrontam com os resultados obtidos por Bigirimana e Hofte (2001), afirmando que essa metodologia de seleção fenotípica é pouco eficaz em selecionar genótipos resistentes à antracnose.

Dos 55 genótipos caracterizados, 29 foram considerados suscetíveis à antracnose, quando inoculados com os patótipos 65, 73, 81, 91, 475 e 1609 (notas $\geq 3,0$), os quais foram enquadrados nos grupos “b, c, d, e, f”, entre eles as cultivares diferenciadoras Cornell 49-242 (*Co-2*), BAT 93 (*Co-3³*), SEL 1360 (*Co-5²*), H1 (*Co-7*) e Michelite (*Co-11*). Segundo Alzate-Marin *et al.* (2004), a cultivar Cornell 49-242 possui resistência a 44 raças de antracnose, incluindo as raças 65 e 91. A cultivar BAT 93 possui outros genes de resistência ou apresenta fatores complementares, sendo utilizado como genitor nos programas de melhoramento (ALZATE-MARÍN *et al.*, 2007). Resultado do genótipo H1, que apresentou alta suscetibilidade frente ao patótipos, corrobora com os estudos de Kelly e Vallejo (2004). Segundo esses autores, o gene *Co-7* não apresenta grande importância nos programas de melhoramento, pois esse gene possui baixo espectro de resistência à doença e nenhum marcador molecular foi associado a ele. Assim, amplo espectro de resistência da maioria dessas cultivares demonstra a importância para os programas de melhoramento.

Houve testemunhas utilizadas para a caracterização molecular, as quais contêm genes de resistência já caracterizados, que se mostraram resistentes em campo: Ouro Negro (*Co-3⁴*), TO (*Co-4*), TU (*Co-5*), SEL 1308 (*Co-4²*) e AB 136 (*Co-6* e *co-8*). Essas linhagens devem receber maior atenção nos programas de melhoramento. O genótipo AB136 é resistente a, pelo menos, 50 raças identificadas no Brasil (BALARDIN; PASTOR-

CORRALES, 1990, ALZATE-MARIN; SARTORATO, 2004). Desses, apenas o genótipo TU apresentou nota de reação igual a 2,0, enquanto demais testemunhas foram imunes. A alta variabilidade do patógeno, bem como as variações ambientais, tem influência na mudança de comportamento dos genótipos e isso pode levar ao descarte de um genótipo que possa apresentar boa performance em um ambiente diferente daquele utilizado para a seleção (DENIS; GOWER, 1996).

TABELA 4

Perfil molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto à presença de marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose.

Genótipos	Gene R	Marcadores Moleculares					
		SF10 ₁₀₇₂ Co-3 ^f	SY20 ₈₃₀ Co-4	SH18 ₁₁₀₀ Co-4 ^e	SAS13 ₉₅₀ Co-4 ^e	SAB3 ₄₀₀ Co-5	SAZ20 ₈₄₅ Co-6
BRS Agreste		1	0	0	0	0	0
BRS Campeiro		1	0	0	0	1	0
BRS Embaixador		0	0	0	0	0	0
BRS Esplendor		1	0	0	0	1	0
BRS Esteio		1	0	0	0	0	0
BRS Estilo		1	0	0	0	0	0
BRS Executivo		0	0	0	0	0	0
BRS Grafite		1	0	0	0	0	0
BRS Notável		0	0	0	0	0	0
BRS Radiante		1	0	0	0	0	0
BRS Realce		1	0	0	0	0	0
BRS Requite		0	0	0	0	0	0
BRS Sublime		1	0	0	0	0	0
BRS Supremo		1	0	0	0	1	0
BRSMG Madrepérola		0	0	0	0	0	0
BRSMG Majestoso		1	0	0	0	0	0
BRSMG Talismã		1	0	0	0	0	0
CNFC 10729		1	0	0	0	0	0
CNFC 15873		0	0	0	0	0	0
CNFC 15874		0	0	0	0	0	0
CNFC 15875		0	0	0	0	1	0
CNFP 10120		1	0	0	0	0	0
CNFP 10794		0	0	0	0	0	0
CNFP 15330		0	0	0	0	0	0
IAC Alvorada		1	0	0	0	0	0
IPR Uirapuru		1	0	0	0	0	0
Jalo Precoce		0	0	0	0	0	0
Pérola		0	0	0	0	0	0
Rudá		0	0	0	0	0	0
BRS Valente		1	0	0	0	0	0

Genótipos	Gene R	Marcadores Moleculares					
		SF10 ₁₀₇₂ Co-3 ¹	SY20 ₈₃₀ Co-4	SH18 ₁₁₀₀ Co-4 ²	SAS13 ₃₅₀ Co-4 ³	SAB3 ₄₀₀ Co-5	SAZ20 ₈₄₅ Co-6
MDRK	Co-1	0	0	0	0	0	0
Kaboon	Co-1 ²	1	0	0	0	0	0
Perry Marrow	Co-1 ³	1	0	0	0	0	0
AND 277	Co-1 ⁴	0	0	0	0	0	0
Widusa	Co-1 ⁵	0	0	0	0	0	0
Cornell 49-242	Co-2	1	0	0	0	0	0
Mexico 222	Co-3	1	0	0	0	0	0
BAT 93	Co-3 ³	1	0	0	0	0	0
PI 207262	Co-4 ³ e Co-9	1	1	0	1	0	0
G 2333	Co-4 ² , Co-5 e Co-7	0	1	0	0	1	0
K10	Co-4 ² , Co-5, Co-6 e Co-10	1	1	0	1	1	1
K13	Co-4 ²	0	1	0	1	0	0
K23	Co-5	1	0	0	0	1	0
SEL 1360	Co-5 ²	1	0	0	0	1	0
H1	Co-7	1	0	0	0	0	0
Michelite	Co-11	0	0	0	0	0	0
Jalo Vermelho	Co-12	0	0	0	0	0	0
Jalo Listras Pretas	Co-13	0	0	0	0	0	0
BRS Pitanga	Co-14	1	0	0	0	0	0
Rosinha G2 ^a		0	0	0	0	0	0
Ouro Negro ^b	Co-3 ¹	1	0	0	0	0	0
TO ^b	Co-4	0	1	0	0	0	0
SEL 1308 ^b	Co-4 ²	0	1	1	1	0	0
TU ^b	Co-5	1	0	0	0	1	0
AB 136 ^b	Co-6 e co-8	1	0	0	0	0	1

^a Testemunha suscetível à antracnose ^b Testemunhas resistentes à antracnose

Fonte: Da autora

3.2 Caracterização molecular

Observando os resultados apresentados pelas testemunhas resistentes, nota-se que os marcadores testados foram específicos para os locos de resistência a que estão ligados, exceto o marcador SF10, que amplificou fragmentos de DNA para as testemunhas 'Ouro Negro' (Co-3⁴), 'TU' (Co-5) e 'AB136' (Co-6 e co-8) e outros genótipos com genes ou alelos de resistência conhecidos, como o 'K 23' (Co-5), 'Kaboon' (Co-1²), 'Perry Marrow' (Co-1³), 'Cornell 49-242' (Co-2), 'Mexico 222' (Co-3), 'SEL 1360' (Co-5²), 'H1' (Co-7) e 'BRS Pitanga' (Co-14).

Dos 55 genótipos testados, 31 apresentaram marca amplificada para o marcador SF10, representando 53,44 % dos genótipos trabalhados. Destes, 28 cultivares e linhagens e três testemunhas (FIG- 1).

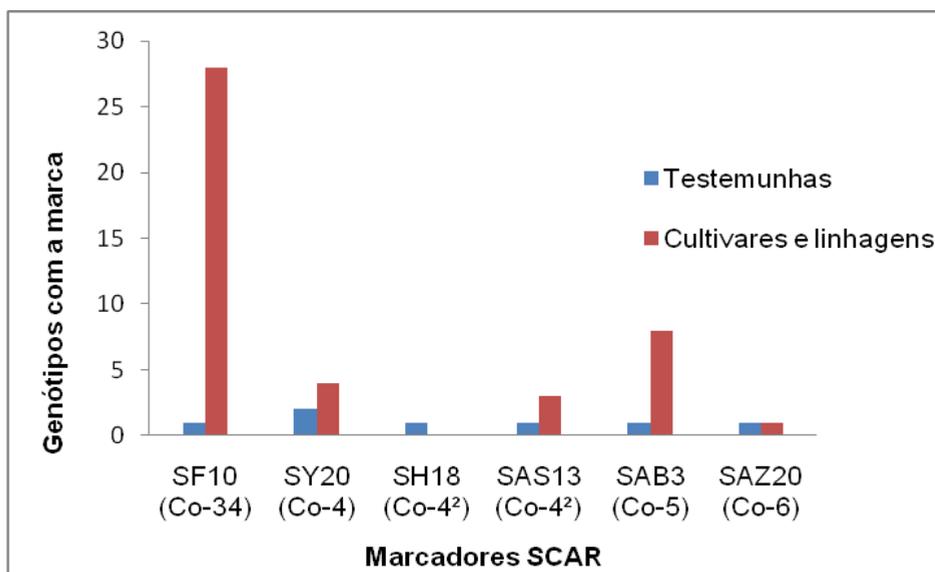


Figura- 1: Número de genótipos (cultivares, linhagens e testemunhas) apresentando os marcadores moleculares SCAR ligados a genes de resistência à antracnose.

Fonte: Da autora

O marcador SY20 foi específico para o loco Co-4, contudo, este marcador não discriminou os diferentes alelos, pois amplificou fragmentos de DNA apenas para as testemunhas 'TO' (Co-4) e 'SEL 1308' (Co-4²) e para as

linhagens 'K10' (Co-4², Co-5, Co-6 e Co-10), 'K13' (Co-4²), 'PI 207262' (Co-4³ e Co-9) e 'G 2333' (Co-4², Co-5 e Co-7). Esse resultado não corrobora com os dados obtidos por Beraldo (2009), ao analisar esse marcador com 42 genitores e 76 linhagens de feijoeiro, constatou que somente o genótipo 'G 2338' amplificou DNA associado à resistência esperada.

No caso do marcador SH18, este foi eficiente em discriminar o alelo Co-4 do Co-4² nas testemunhas, linhagens e cultivares, uma vez que apenas 'SEL 1308' apresentou a marca SH18. Awale e Kelly (2001) desenvolveram o marcador SH18 ligado ao alelo Co-4² e verificaram que este é preciso, uma vez que amplifica somente esse alelo.

O marcador SAS 13, que amplifica também o alelo Co-4² foi específico, mas não se mostrou alelo-específico ao amplificar o alelo Co-4³ presente na cultivar 'PI 207262', além de amplificar DNA nas linhagens 'K10' (Co-4², Co-5, Co-6 e Co-10) e 'K13' (Co-4²). Conforme AWALE e KELLY, (2001) e ALZATE-MARIN *et al* (2007), o marcador SAS13 amplifica diferentes alelos do Co-4, inclusive, o alelo gene Co-4³ presente na cultivar 'PI 207262'. Porém isso não inviabiliza o seu uso nos programas de melhoramento, mas, para detectar o alelo Co-4² seria ideal a utilização do marcador SH18

Oito genótipos apresentaram o marcador SAB3: 'BRS Campeiro', 'BRS Esplendor', 'BRS Supremo', 'CNFC 15875', 'K10' (Co-4², Co-5, Co-6 e Co-10), 'K23' (Co-5), 'G 2333' (Co-4², Co-5 e Co-7) e 'SEL 1360' (Co-5²), além da sua testemunha (TU), indicando a presença do gene Co-5. Contudo, ele não discriminou os alelos desse loco.

Somente a linhagem 'K10' apresentou o marcador molecular SAZ20, ligado ao gene Co-6 e o seu positivo (AB136). Estudos de Alzate Marin e Sartorato (2004) relataram que as cultivares que possuem o gene Co-4, Co-5 e Co-6 e seus alelos, individualmente ou em associação com outros genes, são aqueles que possuem maior espectro de resistência à antracnose no Brasil.

Três linhagens elite se destacaram na caracterização molecular. A linhagem 'K10' (Co-4², Co-5, Co-6 e Co-10) apresentou marcas amplificadas para os marcadores SF10, SY20, SAS 13, SAB 3 e SAZ20; o 'K13' (Co-4²)

aos marcadores SY20 e SAS 13; o 'K23' (Co-5) aos marcadores SF10 e SAB3. No campo, esses genótipos mostraram-se resistentes à doença, destaque para o 'K10' que apresentou um amplo espectro de resistência frente aos patótipos pelo número de genes no seu *background*. Conforme Kelly *et al.* (2003), quanto maior o número de genes, maior a durabilidade e eficiência na resistência a um determinado patógeno. A presença do gene Co-6 somente nessa pode ser ao uso da cultivar 'AB136' como genitor, pois este confere resistência a inúmeros patótipos de antracnose. AB136 é resistente a 50 patótipos de *C. lindemuthianum* descritas (ALZATE MARIN *et al.* 1999), além disso, a superioridade desse gene foi relatado por Alzate Marin e Sartorato (2004) e Moura (2005), no qual encontraram a marca amplificada em 64 dos 248 acessos estudados. Os marcadores SCAR são eficientes ao detectar genes em gerações avançadas de feijoeiro, podendo ser utilizados como ferramentas para a seleção de linhagens superiores (BERALDO, 2009).

Onze das doze cultivares diferenciadoras apresentaram ao menos um marcador, com exceção da 'Michelite' que não amplificou nenhuma marca genética. Estudos de Alzate-Marin e Sartorato (2004) descreveram que os genótipos 'Michelite', 'MDRK', 'Perry Marrow', 'Cornell 49-242', 'Widusa', 'Kaboon', 'México 222', 'PI 207262', 'TO', 'TU', 'AB 136' e 'G 2333', são utilizados nos programas de melhoramento genético que visa a resistência a doenças. Nesse caso, essas cultivares são resistentes a 7, 31, 26, 29, 27, 35, 9, 45, 44, 49, 50 e 50 raças da antracnose descritas no Brasil. Os resultados comprovam, então, a importância dos genótipos 'G 2333' (Co-4², Co-5 e Co-7), 'PI 207262' (Co-4³ e Co-3³), 'TO' (Co-4), 'AB 136' (Co-6 e co-8) e 'TU' (Co-5) como fontes de resistência.

4 CONCLUSÃO

Nos ensaios de campo, 26 genótipos foram resistentes (nota < 3,0) aos patótipos de *C. lindemuthianum* e dez genótipos foram considerados imunes (nota = 1,0). Todas as testemunhas (Ouro Negro, TO, SEL 1308, TU e AB 136) foram resistentes e a cultivar Rosinha G2 foi suscetível (nota = 9,0).

Na caracterização molecular das cultivares e linhagens de feijoeiro-comum, os marcadores SH18 (*Co-4*²), SAS 13 (*Co-4*²), SAB3(*Co-5*) e SAZ20 (*Co-6*) se mostraram específicos, para os seus locos, porém não discriminaram os alelos. Somente o marcador SH18 mostrou-se, ainda, alelo-específico, discriminando *Co-4*² de *Co-4* e *Co-4*³.

Dos 55 genótipos, 31 apresentaram o marcador SF10, incluindo cultivares, linhagens e testemunhas, o que representou 53,44% dos genótipos testados.

A linhagem K10 apresentou os marcadores moleculares SY20, SAB3 e SAZ20, indicando a presença dos genes *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*, respectivamente. Entre as cultivares, apenas o gene *Co-5* foi amplificado nos genótipos BRS Campeiro, BRS Esplendor e BRS Supremo.

CAPÍTULO 3- ESTUDO DE HERANÇA PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE PRESENTE NA CULTIVAR DE FEIJOEIRO-COMUM DO GRUPO CARIOCA 'BRS COMETA'

RESUMO

A cultivar de feijoeiro-comum 'BRS Cometa' possui características agronômicas relevantes como alto potencial produtivo, precocidade e resistência à antracnose em campo e sob inoculação artificial. Visando à utilização dessa fonte como genitor nos programas de melhoramento genético, este trabalho foi realizado com o objetivo de definir o padrão de herança de resistência da cultivar 'BRS Cometa'. O ensaio foi conduzido em câmara de nebulização com temperatura controlada ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade (80 % UR). Famílias $F_{2:3}$, obtidas do cruzamento entre 'Rosinha G2' e 'BRS Cometa', foram plantadas em linhas em bandejas em casa de vegetação, além da testemunha que contém o alelo *Co-4²* (SEL 1308) e dos genitores. Aos sete dias, foram inoculadas todas as plantas na face abaxial e adaxial, com uma suspensão de $1,2 \times 10^6$ esporos/mL de *C. lindemuthianum*, patótipo 91, isolado *Cl* 1247, sendo mantidas na câmara de nebulização por sete dias até a avaliação. A reação à antracnose das plantas foi avaliada usando uma escala de notas de 1 a 9. A avaliação dos sintomas da doença demonstrou que a resistência da cultivar BRS Cometa à raça 91 é governada por um gene dominante, sendo o padrão de segregação de 1:2:1 nas famílias $F_{2:3}$, com valor de qui-quadrado de 0,5 e probabilidade de 77,88%.

Palavras-chave: Estudo de herança, antracnose, segregação mendeliana.

CHAPTER 3 - STUDY OF HERITAGE FOR RESISTANCE TO ANTHRACNOSE PRESENT THE COMMON BEAN CULTIVAR OF THE 'BRS COMETA' CARIOCA GROUP

ABSTRACT

The common bean cultivar 'BRS Cometa' has relevant agronomic traits such as high yield potential, earliness and resistance to anthracnose in the field and under artificial inoculation. Aiming to use this source as parent in breeding programs, this work was carried out in order to set the standard for the resistance inheritance of the 'BRS Cometa' cultivar. The test was conducted in a mist chamber with controlled temperature (21 ± 2 ° C) and humidity (80% RH). Families $F_{2:3}$, obtained from the cross between 'Rosinha G2' and 'BRS Cometa', were planted in rows in trays in a greenhouse, and a control containing the *Co-4²* allele (SEL 1308) and parents. Seven days, all plants were inoculated in abaxial and adaxial face, with a suspension of $1,2 \times 10^6$ spores/mL of *C. lindemuthianum*, pathotype 91, isolated CI 1247, being held in the mist chamber for seven days until the evaluation. The reaction anthracnose of plants was evaluated using a rating scale of 1 to 9. The assessment of disease symptoms demonstrated that the resistance of the 'BRS Cometa' race 91 is governed by a single dominant gene segregation pattern being 1:2:1 in the $F_{2:3}$ families, with chi-squared value of 0.5 and the probability of 77.88%.

Keywords: Inheritance study, anthracnose, mendelian segregation.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é cultivado em três safras. A cultura é produzida por pequenos agricultores, os quais aplicam baixa tecnologia para produção e por grandes agricultores, que detêm uma tecnologia mais avançada que reflete na produtividade da cultura (VIEIRA *et al.*, 2006). O rendimento médio da cultura no ano de 2013 foi de, aproximadamente, 1300 kg/ha (SILVA, 2013).

Vários são os fatores que são responsáveis pela menor produtividade das lavouras, como o grande número de organismos fitopatogênicos que acometem a cultura. A incidência de doenças contribui para o desequilíbrio da produtividade. É difícil estimar as perdas decorrentes de uma doença específica, uma vez que geralmente as culturas são atacadas por mais de um agente etiológico ao mesmo tempo (BORÉM, 2001).

Dentre as diversas doenças que incidem sobre a cultura, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scribner. No Brasil, a antracnose ocorre principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco e, ainda, tem relevância nos estados do Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba (RAVA *et al.*, 1994). A doença ocorre durante as três safras de cultivo (safra das águas, seca e a de inverno) e possui elevada variabilidade patogênica, fazendo com que ocorram perdas de até 100% de produção (KIMATI *et al.*, 1997).

A ampla variabilidade patogênica do *C. lindemuthianum* é um desafio de programas de melhoramento de feijoeiro, pois o aparecimento de novos patótipos induz à quebra da resistência, dificultando a obtenção de uma cultivar que apresente ampla resistência às raças do fungo (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1995).

Nos programas de melhoramento que visam obter genótipos com superiores, a determinação do número de genes, que estão envolvidos no controle do caráter estudado, é de grande importância, pois fornecem

informações para que os melhoristas identifiquem quais as combinações alélicas possíveis e mais vantajosas. Assim, nos estudos de herança, avaliam-se as populações segregantes entre uma fonte suscetível e uma resistente, nas quais pelo padrão de segregação determinará o número de genes envolvido no caráter (SILVA *et al.*, 2000; VIANA, 2000).

A cultivar 'BRS Cometa' possui ciclo precoce, arquitetura ereta e é resistente às raças 55, 95 e 453 de antracnose (CARVALHO; ALBRECHT, 2007). É um cultivar com alto potencial produtivo, que pode ser usado como genitor nos programas de melhoramento genético, uma vez que apresenta características agrônômicas favoráveis que podem ser introgrididas para outros materiais com alto potencial produtivo (FARIA *et al.*, 2008).

Diante do exposto, este artigo teve por objetivo determinar o padrão de herança de resistência do cultivar BRS Cometa ao *C.lindemuthianum*, em cruzamento com a cultivar Rosinha G2, por meio de inoculações com o patótipo 91, isolado CI 1247, da coleção de fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético e ensaios

As sementes da cultivar 'BRS Cometa', da linhagem 'SEL 1308' que possui o gene *Co-4²*, e da testemunha 'Rosinha G2' foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão, que se encontram disponíveis na coleção de trabalho do programa de melhoramento genético do feijoeiro.

Foi realizado o cruzamento artificial dos genótipos, com uma fonte suscetível e outra resistente (Rosinha G2 x BRS Cometa). As sementes da geração F₁ foram cultivadas em vasos e foram fenotipicamente identificadas (cor da flor) para propiciar a obtenção das sementes F₂. As progênies F₂ foram pré-germinadas, por três dias, em papel germitest, na câmara de germinação do laboratório de sementes da Embrapa. Posteriormente, as sementes germinadas foram plantadas em copos plásticos contendo substrato comercial. Aos sete dias, houve o transplântio dos materiais em

vaso no telado, para obter famílias F_{2.3}. Com 75 dias após o transplante, as plantas individuais foram colhidas, trilhadas e plantadas em bandejas de isopor em casa de vegetação. Foram plantadas 8 famílias por bandeja e cada família possuía 16 plantas.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação por sete dias, até antes do momento das inoculações. Foram preparados dois ensaios: foram plantadas 152 famílias para primeiro ensaio e 148 famílias para o segundo ensaio, além dos genitores e testemunha.

2.2 Inoculação do patógeno e avaliação da doença

Seguindo o critério de virulência e prevalência, selecionou-se o patótipo 91, isolado CI 1247 de *C. lindemuthianum*, da coleção de fitopatógenos da Embrapa. O inóculo foi produzido, mediante repicagem do fungo em tubos de ensaio, contendo uma vagem esterilizada, imersa em meio ágar-água. Dez dias após a repicagem, a suspensão foi preparada, mergulhando as vagens em água destilada e filtrando a solução em pano de malha fina. Foi feita a estimativa de esporos na solução por meio da contagem ao microscópio, utilizando a Câmara de Neubauer. Após a contagem, a suspensão do inóculo foi ajustada para concentração de $1,2 \times 10^6$ esporos/ml.

Para a aplicação da suspensão do inóculo, as bandejas foram levadas para a câmara de inoculação, duas horas antes para aclimação das plantas, com temperatura entre 19°C e 20°C e 80% de umidade relativa. Após esse período, para cada planta, foi aplicada a suspensão nas faces abaxial e adaxial das folhas primárias, com auxílio de um pulverizador manual. A severidade da doença foi avaliada, sete dias após a inoculação, utilizando uma escala de notas com nove graus de severidade, proposta por Pastor-Corrales e Jala (1995) em que:

TABELA 1
Escala de notas para reação a doenças

Grau (nota)	% de infecção em folhas
1	Plantas com nenhum sintoma foliar
2	presença de até 3% de lesões foliares
3	presença de até 5% de lesões foliares, sem ocorrência de esporulação do patógeno;
4	presença de 10% de lesões foliares, com presença de lesões esporuladas
5	presença de 10-15% de lesões foliares, com lesões esporuladas entre 2 e 3 mm;
6	presença de 15-20% de lesões foliares, com lesões esporuladas maiores que 3 mm continuação...
7	presença de 20-25% de lesões foliares, com lesões esporuladas maiores que 3 mm
8	presença de 25-30% de lesões foliares, com lesões esporuladas maiores que 3 mm
9	sintomas severos da doença, resultando em queda das folhas e morte da planta

Fonte: Pastor-Corrales e Jara (1995)

2.3 Estudo de Herança e análise estatística

As frequências fenotípicas, que é a relação entre as plantas resistentes e suscetíveis, observadas nas populações segregantes, foram testadas por meio do teste de qui-quadrado (χ^2), com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do estudo de herança da resistência à antracnose apresentada para a cultivar de grãos carioca 'BRS Cometa' são mostrados na Tabela 3.

TABELA 2

Razão de segregação da resistência ao patótipo 91 de *C. lindemuthianum* na população F_{2:3} (Rosinha G2 x BRS Cometa) utilizada no estudo de herança

Progênes	Razão	Segregação esperada*			Segregação Observada			χ ²	P %
		RR**	Rr**	rr*	RR	Rr	rr		
Rosinha G2	0:1	0	0	32	0	0	32	-	-
BRS Cometa	1:0	32	0	0	32	0	0	-	-
SEL 1308	1:0	32	0	0	32	0	0	-	-
F _{2:3} (RG2 x BRS Cometa)	1:2:1	75	150	75	75	155	70	0,5	77,88% ^{ns}

Fonte: Da autora

Notas: *R= resistente, S= suscetível

**RR= Famílias com todas as plantas resistentes, Rr= famílias com plantas resistentes e suscetíveis, rr= famílias com todas as plantas suscetíveis

^{ns} Não significativo, indicando que a frequência observada de plantas R e S não difere estatisticamente da frequência esperada para a herança monogênia em uma população F_{2:3} (1RR:2Rr:1rr), pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade.

A segregação observada para a população F_{2:3} obtida do cruzamento de 'Rosinha G2' com a cultivar resistente 'BRS Cometa' ajustou-se à razão esperada de 1:2:1 (RR:Rr:rr), com valor de qui-quadrado de 0,5 e probabilidade de 77,88 %. Este resultado indica que a resistência de 'BRS Cometa' ao patótipo 91 de *C. lindemuthianum* (isolado CI 1247), é determinada por um único gene dominante (TAB-3).

De acordo com Alzate-Marin *et al.* (2005), algumas das principais doenças fúngicas que incidem sobre o feijão possui herança simples para resistência, ou seja, governada por um ou poucos genes. O estudo de herança tem por finalidade demonstrar o número de genes que atuam na reação de resistência da cultivar 'BRS Cometa' ao patógeno de *C. lindemuthianum*. Para tal, a escolha dos parentais é importante, tendo sido utilizada a cultivar 'Rosinha G2', umas das fontes mais suscetíveis à antracnose e outras doenças. A raça 91 foi escolhida para esse ensaio pela resistência que a cultivar 'BRS Cometa' apresenta em relação ao patótipo.

O primeiro estudo de herança de resistência ao *C. lindemuthianum* foi feito em 1918, no qual Burkholder, por meio de estudo de herança, mostrou que um gene dominante governava a resistência presente na cultivar MDRK.

Estudo de herança de Gonçalves-Vidigal *et al.* (2001) com a cultivar mesoamericana 'AB136' (Co-6 e co-8) confirmaram a resistência da mesma frente aos patótipos 31 e 69 de *C. lindemuthianum*, indicando a herança monogênica dominante. Esse padrão de herança a estas raças foi relatado primeiramente em estudos por Gonçalves-Vidigal (1994), Gonçalves-Vidigal *et al.* 1997 e Poletine (1997). Ainda, esse genótipo possui dois genes independentes que determinam a resistência à doença, sendo um dominante (Co-6) e outro recessivo (co-8).

. O genótipo 'Ouro Negro', de grão preto, é governado por um gene dominante de resistente e foi caracterizado por Co-10 e atualmente recodificado por Co-3⁴. Além disso, mostrou resistência efetiva a 19 patótipos de antracnose entre 21 testados (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003b).

Estudos de herança de resistência à antracnose na cultivar Michelite, que contém o gene Co-11, revelaram que a cultivar apresentou herança monogênica dominante, ou seja, um padrão de segregação de 1 RR:2 Rr:1 rr (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2011). No país, essa cultivar tem apresentado resistência aos patótipos 8, 64, 72 e 102 de antracnose (RAVA *et al.*, 1994).

Conforme Gonçalves-Vidigal *et al.* (2009), a cultivar 'Jalo Listras Pretas', por meio de estudo de herança realizado, quando cruzado com a cultivar 'Cornell 49-242', indicou a presença de um único gene dominante presente na cultivar 'Jalo Listras Pretas'.

É importante salientar que a caracterização do gene ou alelos que conferem resistência à raça 91 deve ser efetuada, pois é importante nos programas de melhoramento genético que visa a resistência a doenças. O conhecimento de novas fontes de resistência propicia trabalhos de piramidação de genes andinos e mesoamericanos, que pode conferir resistência a distintas raças do *C. lindemuthianum*. Segundo Young e Kelly (1996), a utilização de cultivares que contenham genes de maior efeito atenua o surgimento de novas raças do patógeno.

Assim, são necessários outros passos para complementar o trabalho. Testes de alelismo, para aferir qual gene está presente em 'BRS Cometa', deverão ser conduzidos, além da identificação de marcadores moleculares, possivelmente SNPs, ligados ao gene de resistência em 'BRS Cometa'.

4 CONCLUSÃO

A resistência ao patótipo 91 de *C. lindemuthianum* apresentada pela cultivar 'BRS Cometa' é governada por um único gene, com interação intra-alélica de dominância completa, com probabilidade de 77,88 %.

REFERÊNCIAS

ADAM-BLONDON, A., SEVIGNAC, M., BANNEROT, H., DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers tightly linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**. v.8, p. 865-870, 1994.

AIDAR, H. **Cultivo do Feijoeiro Comum**. 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em: 26 out. 2014.

ALMEIDA, T.C; CANÉCHIO FILHO, V. **Principais culturas**. Campinas: Ed. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987.

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

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

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

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; BAÍA, G.S.; PAULA Jr, T.J.; de SOUZA, K.A.; da COSTA, M.R.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of a anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 259-264, 2001.

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

ALZATE-MARIN, AL.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.M.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4³* and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262), **Euphytica**, v. 154, p. 1-8, 2007.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIN, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA, J.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum*

lindemuthianum in common bean. **Phytopathology**, v.89, n.4. p. 281-285, 1999.

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

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

ANDRUS, C.F.; WADE, B.L. **The factorial interpretation of anthracnose resistance in beans**. Washington: U.S.D.A., p.1-29, 1942.

ANGIOI, S.A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, V.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.829-843, 2010.

ANUÁRIO ABRASEM. Brasília, DF: **Associação Brasileira de Sementes e Mudanças**, 164 p, 2003.

ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, p.1-21, 1996.

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

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

AYONOADU, U.W.U. **Races of bean anthracnose in Malawi**. Turrialba, v.24, p. 311-314, 1974.

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

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 243-245, 1990.

BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'antracnose. **Annual de Amélioré des Plantes**, v.15, p. 201-222, 1965.

BARROS, E.G., SOUZA, T.L.P.O. Biotecnologia na cultura do feijoeiro. In: CANÇADO, G. M.A.; LONDE, L. N. (Eds.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Caldas: EPAMIG, p. 351-370. 2012.

BARRUS, M.F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, v.1, p.190-199, 1911.

BARRUS, M.F. Varietal susceptibility of beans to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Briosi & Cavara. **Phytopathology**, v. 8, p. 589-614, 1918.

BIC- **List of Genes - *Phaseolus vulgaris* L** (2014A)http://bic.css.msu.edu/_pdf/Bean_Genes_List_2014.pdf. Acesso em junho de 2014

BIC- **SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*)** (2014b)
http://bic.css.msu.edu/_pdf/SCAR_Markers_2010.pdf. Acesso em junho de 2014

BERALDO, A.L.A. **Utilização de SCARS para avaliação de genes de resistência à antracnose em feijoeiro**. Dissertação de mestrado. Campinas, 2007.

BERALDO, A.L.A.; COLOMBO, C.A.; CHIORATO, A.F.; ITO, M.F.; CARBONELL, S.A.M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. **Bragantia**, v.68, n.1, p.53-61, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. **Doenças do Feijoeiro**. In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres: 3 ed, p.376-99, 1997.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2. p.333-349. 2005.

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

- BONETT, L. P. et al. Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 04, p. 547-560, 2006.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 300p, 2001.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 532p., 2009.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2.ed. Viçosa: UFV, p.13-18. 2006
- BOREM, A. (Org.) **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2. ed. Viçosa: EDITORA UFV, 546 p. 1999.
- BURKHOLDER, W.H. The gamma strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Brit. et Cav. **Phytopathology**, v. 13, p. 316-323, 1923.
- BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, v.121, p.801-813, 2010.
- CAMPA, A., RODRIGUEZ SUÁREZ, C., PAÑEDA, A., GIRALDEZ, R., FERREIRA, J.J. The bean anthracnose resistance gene *Co-5* is located in linkage group B7. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 48, p. 68-69, 2005.
- CARBONELL, S.M.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A.L.L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n.1, p. 60-65, 1999.
- CARNEIRO, J. E. de S. **Alternativas para obtenção e escolha de populações segregantes no feijoeiro**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 134 p., 2002.
- CARVALHO, W.P., ALBRECHT, J.C. **BRS Cometa: nova cultivar de feijoeiro comum com grão do tipo comercial carioca para a região do Distrito Federal**. Planaltina, DF (Brazil). 3 p. no. 139. 2007
- CIAT- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, **Annual Reported of Bean Program**. Cali: CIAT, p. 70-125, 1990.
- CHAVES, G. LA ANTRACNOSIS. IN : SCWARTZ, H. F.; GALVES, G.E. Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones

edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. **Cali**, Colombia: CIAT, p. 37-53, 1980.

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

COELHO, C. M. M.; COIMBRA, J. L. M.; SOUZA, C. A.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F. Diversidade Genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1241-1247, 2007.

COELHO, R. T., GONÇALVES-VIDIGAL, M. C., VIDIGAL FILHO, P. S., LACANALLO, G. F, DARBEN, L. M., SILVA, C. R. Characterization of the anthracnose resistance gene in the Mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 56, p. 43-44, 2013.

CORDEIRO, M.C.R., SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Revista Biotecnologia**, v.10, p. 34-39, 1999.

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

CRUZ, C.D. **Programa GENES: biometria**. Viçosa: UFV, 382p., 2006.

DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C. **Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 131p., 2005.

DENIS, J.B.; GOWER, J.C. Asymptotic confidence regions for biadditive models: interpreting genotype-environment interactions. **Applied Statistics**, v.45, p.479-493, 1996.

DILLARD, H.R.,COBB, A.C. Survival of *Colletotricum lindemuthianum* in bean debrin em New York State. **Plant disease**. v.77: p. 1233-1238, 1993.

DOMINGUEZ, O.; PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; BAUDET, L. **Sistema informal de sementes: causas, conseqüências e alternativas**. Pelotas: UFPel, 207p, 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EICHENBERG, K.; GUGERLI, F.; SCHNELLER, J. J. Morphological and molecular diversity of swiss common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) and their origin. **Botanica Helvetica**, Basel, v.110, n.1, p.61-67, 2000.

FAO- Faostat. Disponível em <https://www.fao.org.br/> Acesso em 22 de junho de 2014.

FARIA, L. C., DEL PELOSO, M.J., MELO, L.C., COSTA, J.G.C., RAVA, C. A, CARNEIRO., G.E.S, DÍAZ., J.L.C., FARIA JC, SILVA, H.T., SARTORATO, A, BASSINELLO, P.Z, TROVO, J.B.F. BRS Cometa: a carioca common bean cultivar with erect growth habit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p.167-169, 2008.

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

FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust- its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p. 680-685, 1955.

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

GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., SEVIGNAC, 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**, v. 96, p. 494-502. 1998.

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

GONÇALVES VIDIGAL, M.C., VIDIGAL FILHO, P.S., MEDEIROS, A.F., PASTOR CORRALES. Common bean landrace Jalo Listras Pretas in the source of a new Andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**. V. 49, p.133-138, 2009.

GONÇALVES, A.M.O.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; POLETINE, J.P.; LACANALLO, G.F.; COIMBRA, G.K. Characterization of the anthracnose resistance gene in andean common bean Corinthiano cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p.220-221, 2010.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL, P.S. A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'Jalo Vermelho'. **Plant Breeding**, v. 127, p. 592-596, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C., SARAIVA, L.S. Inheritance of anthracnose resistance in common bean genotypes P.I. 207262 and AB 136. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 59-62. 1997.

GONÇALVES-VIDIGAL-, M.C.; SAKIYAMA, N.S.; FILHO-VIDIGAL, P.S.; JÚNIOR AMARAL, A.T.; POLETINE, J.P.; OLIVEIRA, V.R. Resistance of Common Bean Cultivar AB 136 to Races 31 and 69 de *Colletotrichum lindemuthianum*: the Co-6 Locus. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, n.2, p. 99- 104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SILVA, C.R.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M.V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, Co-11. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 589-593, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO; P.S. A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Jalo Vermelho. **Plant Breeding**, v. 127, p. 592-596, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.E.; PASTORCORRALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, v. 49, p.133-138, 2009.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C; CRUZ, A.S, GARCIA, A., KAMI, J., VIDIGAL FILHO, P.S., SOUSA, L.L., MCCLEAN, P., GEPTS, P., PASTOR-CORRALES, M.A. Linkage mapping of the Phg-1 and Co-14 genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. **Theoretical and Applied Genetics**. v.122, p. 893-903. 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Herança da resistência às raças alfa, delta e capa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). D.S.Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994.

GOTH, R.W.; ZAUMEYER, W.J. Reaction of bean varieties to four races of anthracnose. **Plant Disease Reporter**, v. 49, p.815-818, 1965.

GUARNIEI, C.C.O.; LEMOS, L.B; FARINELLI, R. **Desempenho Produtivo, Nutricional e Tecnológico de Genótipos de Feijão Cultivados na época de inverno-primavera em Jaboticaba (SP)**. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009, Rio Preto. Jaboticabal: UNESP, 2009.

GUARRO, J.; SVIDZINSKI, T. E.; ZAROR, L.; FORJAZ, M. H.; GENÉ, J.; FISCHMAN, O. Subcutaneous hyalohyphomycosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 37, p. 4170-1473, 1998.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. *Nature*, v. 227, p. 1267-1269, 1970.

HERNANDEZ, P., MARTIN A., DORADO, G.. 1999. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Molecular Breeding* v. 5, p. 245-253, 1999.

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

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 108, p. 175-180, 2003.

KELLY, J.D., YOUNG R.A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*. V. 39, p. 20-24, 1996.

KELLY, J.D.; AFANADOR, L., CAMERON, L.S. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Michigan and implications in dry bean resistance breeding. *Plant Disease*. v. 78, p. 892-894, 1994.

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

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

KIMATI, H. Algumas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. que ocorrem no Estado de São Paulo. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz*. USP. v. 23, p. 411-437, 1966.

KIMATI, H. **Doenças do feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GALLI, F. (Coord.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Agrônômica Ceres**, . v.2, cap.19, p.297-318, 1980.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. In: **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, 2ª edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo/SP, v. 2, p. 383-385, 1997.

KIMATI, H; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld Et v. Scherenk. f sp. Phaseoli n. f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.27, p. 411-437, 1970.

KUMAR, L.S. DNA markes in plant improvement: na overview. **Biotechnology Advances**, v. 17, p.143-182, 1999.

LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KAMI, J.; GONELA, A. Mapping of andean gene for resistance to anthracnose in the landrace Jalo Listras Petras. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p. 96- 97, 2010.

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

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

MATOS, J. W. de. **Análise crítica do programa de melhoramento genético do feijoeiro da UFLA no período de 1974 a 2004**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 116 p, 2005.

McCLEAN, P.E., MAMIDI, S., Mc CONNELL, M., CHIKARA, S., LEE, R. Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. **BMC Genomics** v. 11, p.184-193, 2010.

McROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, v. 9, p. 141-148, 1919.

MEIRELLES, A.C.S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; POLETINE, J.P.; SOUSA, L.L.; CRUZ, A.S.; LACANALLO, G.F. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Pitanga cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p. 40-41, 2010.

MELO, L.C. **Procedimentos para condução de experimentos de Valor de Cultivo e Uso em feijoeiro comum** – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão,– (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, 239) 104 p., 2009.

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

MÉNDEZ-VIGO, B., RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C., PAÑEDA, A., FERREIRA, J.J., GIRALDEZ R. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, v. 141, p.237-245. 2005.

MENSACK, M.M.; FITZGERALD, V.K.; RYAN, E.P.; LEWIS, M.R.; THOMPSON, H.J.; BRICK, M.A. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using comics technologies. **BMC Genomics**, v.11, p.1-33, 2010.

MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 15, p. 393-427.1995.

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**, v. 85, p.745-749, 1993.

MIKLAS, P.N. 2006. **Listing of SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean.** <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/3848/PDF/Scartable3.pdf>, acessado em dezembro de 2014.

MILACH, S.C.K; CRUZ, R.P. Piramidação de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v.27, p.685-689, 1997.

MILACH, Sandra Cristina Kothe. **Principais tipos de marcadores moleculares e suas características.** In: MILACH, S. C. K. (Ed.). Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: [s.n.], 1998.

MOOSE S.P., MUMM R.H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant Physiology** , v.47, p.969-977. 2008.

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

NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., OCHA, R.C., PAULA JR, T.J., BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to gene conferring resistance to Angular Leaf Spot in Common Bean. **Journal Phytopathology**, Vol.148, pp.117-121. 2000.

OLIVEIRA, E. A.; ANTUNES, I. F.; COSTA, J. G. C. Da. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas no Rio Grande do Sul e em

Santa Catarina de 1968 à 1972. **Comunicado Técnico, Nº 8**. Instituto de Pesquisa Agrônômico do Sul, Pelotas. 1973, 5p.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, v.85, p.985-993, 1993.

PASTOR CORRALES. M.A., TU, JC. Anthracnose. In: PASTOR CORRALES, M.A., SCHWARTZ, H.H (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**: Viçosa: UFV, p. 375-433, 1989.

PASTOR-CORRALES, M.A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.) **La antracnosis del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en la America Latina**. Cali: CIAT, v.113, p. 212-239, 1992.

PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O.A., ESTRADA, E.I., SINGH, S.P. 1994. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease*, v. 78, p.959–962, 1994.

PASTOR-CORRALES, M. A., OTOYA, MOLINA, M. M., A., SINGH, S. P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Disease*, v. 79, p. 63-67. 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolución de *P. griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatología Colombiana**, Cali, **19**(1): p. 15-23, 1995.

PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. **Doenças**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais na cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998, p.375-433.

PEREIRA, H.S; MELO L.C; FÁRIA L.C DE; DEL PELOSO, M.J; COSTA, J.G.C; RAVA, C.A, WENDLAND, A. Adaptabilidade e Estabilidade de genótipos de feijoeiro-comum com grãos tipo carioca na Região Central do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.29-37, 2009.

POLETINE, J.P. Herança da resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) às raças 69 (epsilon) e 453 (zeta) de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. M.S.**Dissertação**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 1997.

QUEIROZ, V. T.; SOUSA, C. S.; COSTA, M. R.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A., BARROS, E. G. MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean

anthracnose resistance genes Co-4 and Co-6. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 249-250, 2004.

RAGAGNIN, V.A. Seleção, Caracterização e Comportamento de isolinhas de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem, antracnose e mancha angular. (**Dissertação, Mestrado em Genética e Melhoramento**), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

RAGAGNIN, V.A., SOUZA, T.L.P.O., SANGLARD, D.A., ARRUDA, K.M.A., COSTA, M.R., ALZATE-MARIN, A.L, CARNEIRO, J.E.S, MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, v. 128, p.156-163, 2009.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas – aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 271 p. 1993.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 388-391, 1993.

RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p.167-172, 1994.

RIPADO, M. F. B. O feijão: variedades, cultura, produção. Publicações Europa América, (s.n), 1992

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. *Cytogenetics of Colletotrichum lindemuthianum (Glomerella cingulata f. sp. phaseoli)*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 367-373, 2003.

RODRIGUES, L.S.; ANTUNES, I.F.; TEIXEIRA, M.G. et al. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, p.1275-1284, set. 2002.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA J. J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A.; GIRADLES, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p. 807-814, 2008.

ROSOLEM, C.A.; MARUBAYASHI, O.M. Seja o doutor do seu feijoeiro In: **Encarte do Informações Agronômicas**, n.68, 16p, dez 1994.

SANSIGOLO, A.L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M.A.; SOUZA, L.L. New races of *Colletotrichum*

Lindemuthianum in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Paraná State, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 51, p.192-193, 2008.

SCHWARTZ, H.F. Fungal diseases of aerial parts – anthracnose. In: Compendium of Bean Diseases. **The American Phytopathological Society**, p. 16-17. 1994.

SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.31, p.741-754, 1982.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo : Varela, p.184-229, 1996.

SILVA, O.F. **Dados de Conjuntura da Produção de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil**. Adaptado de Levantamento Sistemático da Produção Agrícola- IBGE (1985-2013) e modificado na Embrapa Arroz e Feijão (2013). Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em dezembro de 2014

SILVA, S.A.G; MORAIS, O.P; RAVA, C.A; COSTA, J.G.C. Método generalizado de análise de dialelos desbalanceados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35 (10), p. 1999-2005, 2000.

SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, Madison, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

SINGH, S.P., SCHWARTZ, H.F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**. 50: 2199–2223, 2010.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G.; Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabacea). **Economic Botany**, v.45, n.3, p.379-396, 1991.

SINGH, U., SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foodes. **Economic Botany**, v.46, p. 310-321, 1992.

SOLLER M., BECKMANN J.S.. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p. 25-33. 1983.

SUTTON, B. C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. *Colletotrichum – Biology, pathology and control*. C.A.B. International, Wallingford, UK. 1992, p. 1-16

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

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

TU, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean. Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance. In: *Colletotrichum – Biology, pathology and control*. Bailey, J. A.; Jeger, M. J. **C.A.B. International**, Wallingford, UK., p. 203-224, 1992.

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

VALLEJO, V.A., AND J. D.KELLY. Molecular tagging and genetic characterization of alleles at the Co-1 anthracnose resistance locus in common bean. ICFAI Univ. J. **Genetics & Evolution**, v. 1, p. 7-20. 2008.

VARSHNEY R.K., HOISINGTON D.A. TYAGI A.K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. **Trends in Biotechnology**, 24(11): 490-499. 2006.

VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M. A. P. **Contribuições do melhoramento genético de plantas no Brasil**. In: PATERNIANI, E. (Ed.). Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.57-89, 2000.

VIANA, J.M.S. The parametric restriction of the Griffing diallel analysis model: combining ability analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23(4), p. 877-881, 2000.

VIEIRA, C. **Cultivos consorciados**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. & BORÉM, A. Feijão: Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas 2 ed. Atual. Viçosa: Ed. UFV, cap 1, p. 493-529, 2008.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.. RAMALHO, M.A.P. **Melhoramento do feijão**. p.273-349. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Ed. UFV, Viçosa, 1999.

VIEIRA, C; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, MG, 600p., 2006.

VIEIRA, R.F; VIEIRA, C; VIEIRA, R.F. **Leguminosas graníferas**. Editora UFV, Viçosa, 2001.

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

YOUNG, R.A; KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v. 80, p. 650-654, 1996.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. D. A. **Agr. Teach. Bull.** , n. 868, 255p. 1957.