

## CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À FERRUGEM E MANCHA-ANGULAR, UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS

**Diogo Souza Alves<sup>1</sup>, Franciele Barros de Souza<sup>1</sup>, Érica Mangaravite<sup>1</sup>, Pablo Diego Silva Cabral<sup>1</sup>, Yaska Janaína Bastos Soares<sup>2</sup>, Olavo dos Santos Pereira Júnior<sup>1</sup>, Frederico de Pina Matta<sup>3</sup>, Marcelo Antônio Tomaz<sup>3</sup>, Sebastião Martins<sup>4</sup>, Taís Cristina Bastos Soares<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, UFES. Alto Universitário, s/nº Alegre, ES – 29.500-000, [tcbsouares@yahoo.com.br](mailto:tcbsouares@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense /Mestrado em Produção Vegetal, Campos do Goytacazes, R.J.,

<sup>3</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, UFES. Alto Universitário, s/nº Alegre, ES – 29.500-000

<sup>4</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Estatística, Viçosa, MG - 36571-000

**Resumo** - O feijoeiro está sujeito à ocorrência de um grande número de doenças, dentre as quais se destacam a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*) que são uma ameaça constante para a cultura por reduzir a quantidade e qualidade da produção. Este trabalho foi realizado para caracterizar molecularmente genótipos locais de feijoeiro, pertencentes a pequenos produtores do sul do estado do Espírito Santo, quanto à presença de marcas de resistência à ferrugem e à mancha-angular, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR, e cultivares comerciais de feijão como referência.

**Palavras-chave:** Feijão; Marcadores moleculares; SCAR; ferrugem e mancha-angular

**Área do Conhecimento:** Agronomia/Fitotecnia/Melhoramento Vegetal

### Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande expressão econômica para o Brasil, sendo uma das leguminosas mais consumidas no país (BRACKMANN & NEUWALD, 2002; COELHO et al., 2003). No estado do Espírito Santo o feijão é o terceiro produto agrícola de importância econômica, ocupando uma área de aproximadamente 24,4 mil hectares com a produção de 19,1 mil toneladas, e produtividade de 783 Kg/hectare na safra de 2006/2007 (CONAB, 2007).

Entretanto o feijoeiro é uma planta vulnerável à ação dos agentes do ambiente, seja de natureza abiótica ou de natureza biótica caracterizada por instabilidade produtiva (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Dentre os fatores responsáveis por baixar a produtividade do feijoeiro estão as doenças (VIEIRA, 2006), delas destacam-se, no território nacional, as de origem foliar provocada por fungos como a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*). A ferrugem é considerada como de grande importância, causando danos da ordem de 45% (JESUS JUNIOR et al., 2001) podendo chegar a 100%.

O controle da doença através de práticas culturais torna-se muito difícil devido à

disseminação do patógeno ser realizada através de correntes aéreas.

O método fundamentado na resistência genética se constitui em uma das formas mais eficientes e econômicas de controle de doenças de plantas (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Alguns marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem e à mancha-angular já estão descritos na literatura (DESSAUNE et al., 2005; QUEIROZ et al., 2004). Estes marcadores podem ser úteis para se inferir a presença de um gene de resistência nos genótipos avaliados, permitindo que a seleção de genótipos de interesse possa ocorrer nos primeiros estágios de desenvolvimento e os indivíduos superiores podem ser identificados com relativa facilidade (ZHANG; STOMMEL, 2001).

Com as informações destes marcadores, poderemos selecionar genótipos que apresentem genes de resistência à ferrugem e mancha-angular que apresentarem maior semelhança com o genótipo comercial mais adequado para cultivo na região, e fornecer estes grãos aos produtores da região.

### Metodologia

#### Material Genético

Neste experimento foram utilizados 24 genótipos locais de feijoeiro pertencentes a

comunidades do sul do estado do Espírito Santo, e mais alguns cultivares comerciais: Carioca, Rosinha, IAPAR 81, Aporé e Pérola.

### Extração do DNA

As folhas de cada planta foram coletadas e a extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

Tabela 1 - Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem e mancha-angular.

Marcador	Distância (cM) e Fase de ligação	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Referência
SCARF10 <sub>1050</sub>	4,3 – acoplamento	<i>Ur-ON</i>	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
SCARI19 <sub>460</sub>	3,3 – acoplamento	<i>Ur-5</i>	Ferrugem	México 309	DESSAUNE et al. (2005)
SCARAE19 <sub>890</sub>	1,0 – repulsão	<i>Ur-11</i>	Ferrugem	Belmidak RR-3	QUEIROZ et al. (2004)
SCARH13 <sub>490</sub>	5,5 – acoplamento	<i>Phg-1</i>	Mancha-angular	AND 277	NIETSCHE et al. (2000)
SCARN02 <sub>890</sub>	5,9 - acoplamento	<i>Phg-Mex</i>	Mancha-angular	México 54	SARTORATO et al. (2000)
OPE04 <sub>500</sub>	5,8 - acoplamento	<i>Phg-Mar 2</i>	Mancha-angular	Mar 2	FERREIRA et al. (2000)
OPAO12 <sub>950</sub>	5,8 - acoplamento	<i>Phg-Bat332</i>	Mancha-angular	BAT 332	CAIXETA (2002)

### Análise de RAPD

Amostras de DNA dos cultivares foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com Alzate-Marin et al. (2001). Foram utilizados primers RAPD da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA) tomados ao acaso. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um primer, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 1 minuto a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4 °C. Após a amplificação adicionamos, a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras aplicaram em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética ocorreu em um período de cerca de 3 h, a 110 volts. Ao término da corrida, os géis foram visualizados em Transiluminador UV, 302 nm.

### Análise de SCAR

### Marcadores moleculares utilizados para avaliar a resistência à ferrugem e mancha-angular

Os marcadores moleculares utilizados para analisar a presença de genes de resistência à ferrugem e à mancha-angular estão listados na tabela 1.

Amostras de DNA das plantas submetidas à seleção amplificaram pela técnica de SCAR em mistura de reação de 25 µL contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto para o primer, que foi substituído por cinco picomoles de cada primer específico. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo final de 72°C por 7 minutos após o último ciclo. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Após a amplificação os fragmentos amplificados foram separados em gel de eletrofores e visualizados em Transiluminador UV, 302 nm da mesma forma descrita para a análise de RAPD.

### Análise dos dados

Os genótipos que apresentaram a presença das marcas de resistência à ferrugem e à mancha-angular foram selecionados. A presença destas marcas foi observada levando em consideração o fragmento amplificado nas testemunhas (fonte de resistência - Tabela 1). Cada marcador teve a sua respectiva testemunha.

### Resultados

Os fragmentos de DNA amplificados com os marcadores moleculares selecionados (Tabela 1) foram analisados em gel de agarose 1,2%. As marcas de resistência foram validadas pela

presença das respectivas testemunhas em cada gel. A figura 1 mostra os fragmentos obtidos com a utilização do marcador SCAR F10. A presença da

marca de resistência no genótipo é reconhecida pelo sinal positivo (+) e a ausência pelo sinal negativo (-).

**Figura 1** – Gel com a amplificação do marcador SCAR F10. O nome de cada genótipo pode ser encontrado na tabela 2. O número 30 corresponde à testemunha (Ouro Negro).

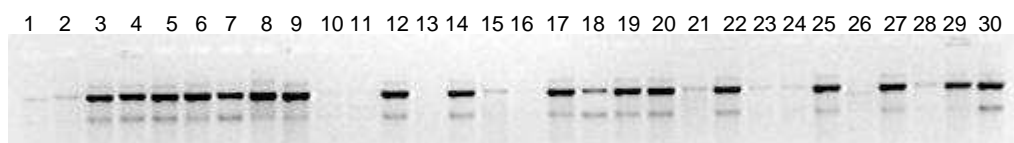


Tabela 2- Análise dos fragmentos amplificados nos géis. O sinal (+) representa a presença do fragmento, e o (-) a ausência.

Genótipos	SCAR					RAPD	
	F10	I19	AE19	H13	N02	OPE04	OPAO12
1 PÉROLA	-	+	-	-	+	-	+
2 FORT 04	-	+	-	-	+	+	-
3 FORT 05	+	-	-	-	-	-	-
4 FORT 06	+	+	-	-	-	-	-
5 FORT 09	+	+	+	-	+	-	-
6 FORT 11	+	-	-	-	-	-	-
7 FORT 12	+	+	-	-	-	-	-
8 FORT 13	+	-	-	-	-	-	-
9 FORT 14	+	+	-	+	+	+	-
10 FORT 16	-	+	-	-	-	-	-
11 FORT 17	-	+	-	-	-	-	-
12 MULATINHO	+	+	-	-	+	+	-
13 FORT 20	-	+	-	-	-	-	-
14 FORT 21	+	-	-	-	-	-	-
15 FORT 22	-	+	-	-	+	-	-
16 FORT 23	-	+	-	-	-	-	-
17 FORT 24	+	+	-	-	-	-	+
18 FORT 25	+	+	+	-	-	+	+
19 FORT 26	+	-	-	-	-	+	-
20 IAPAR-81	+	+	-	-	-	-	-
21 CARIOCA	-	+	+	-	-	-	-
22 FORT 30	-	-	+	+	+	-	-
23 FORT 32	-	+	-	-	+	-	-
24 FORT 34	+	-	-	-	+	-	-
25 FORT 36	-	+	-	-	-	-	-
26 FORT 37	+	+	-	-	-	-	+
27 FORT 38	-	+	+	-	+	-	-
28 FORT 33	+	-	-	-	+	+	-
29 OURO NEGRO	+	-	-	-	-	-	-

### Discussão

Todos os outros genótipos apresentaram marcas de resistência ou à ferrugem, ou à mancha-angular ou a ambas as doenças. Os genótipos que se destacaram foram FORT 09 (3 genes de resistência à ferrugem e 1 à mancha-angular), FORT 14 (2 genes de resistência à ferrugem e 3 à mancha-angular), e FORT 25 (3 genes de resistência à ferrugem e 2 à mancha-angular), pois apresentaram mais genes de

resistência em relação aos outros genótipos, superando inclusive genótipos comerciais como o CARIOCA (variedade de feijão adaptada para cultivo na região sul do estado do Espírito Santo).

Os genótipos FORT 5, 6, 11, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 23 e 36 apresentaram somente marcas de resistência à ferrugem.

Numa próxima etapa, todos estes genótipos serão submetidos à inoculação com os patógenos

em casa de vegetação para podermos avaliar como estes genótipos se comportam fenotipicamente e assim podermos fazer uma seleção mais precisa.

### Conclusão

Dos vinte e nove genótipos avaliados, todos apresentaram marcas de resistência à ferrugem ou à mancha-angular, ou a ambas as doenças. Três genótipos (FORT 9, 14 e 25) se destacaram por apresentarem um número maior de genes de resistência do que os outros genótipos avaliados. Alguns genótipos só apresentaram genes de resistência à ferrugem.

Estes genótipos serão agora avaliados, em casa de vegetação, sobre o comportamento dos mesmos na presença de inóculos causadores de ferrugem e mancha-angular.

### Referências

- BRACKMANN, A. & NEUWALD, D. A. **Armazenamento de feijão**. Cultivar, v.4, n.39, p.28-29, 2002.

- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. 2002. 90p. (Tese de doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

- COELHO, R.R.; VALE, F.X.R. DO; JESUS JUNIOR, W.C. DE; PAUL, P. A.; ZAMBOLIM, L.; BARRETO, R.W. **Determinação das condições climáticas que favorecem o desenvolvimento da ferrugem e da mancha angular do feijoeiro**. Fitopatologia Brasileira, v.28, p.508-514, 2003.

- CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento. 4º Levantamento de grãos 2006/2007**. 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 25 de janeiro de 2007.

- 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.

- DESSAUNE, S. N. ; Souza, T. L. P. ; NUNES, E. S. ; SANGLARD, D. A. ; SOUSA, C. S.; Moreira, M. A. ; Barros, E. G de . **Uso do cultivar México 309 como fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro no Brasil central**. In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Passo Fundo. CBMP 2005.

- DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de Feijão**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2000. p. 253-280

- FERREIRA, C. F.; BOREM, A. ; BARROS, E. G. ; CARVALHO, G. A. ; MOREIRA, M. A.; SILVIA, N. ; Paula Jr. . **Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of RAPD marker linked to the resistance gene**. Crop Science, v. 40, p. 1130-1133, 2000.

- HALEY, S.D.; M IKLAS, P.N.; AFANADOR, L.; KELLY,J.D. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean**. Journal of the American Society for Horticultural Science, v.119, p.122-125, 1994.

- JESUS JUNIOR, W.C. DE; VALE, F.X.R. DO; COELHO, R.R.; HAU, B.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L.C.; BERGAMIN FILHO, A. **Effects of angular leaf spot and rust on yield loss of Phaseolus vulgaris**. Phytopathology, v.11, p.1045-1053, 2001.

- NIETSCHE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência**. 2000. 65p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLAD, D.A.; ARRUDA, K. M.A.; SOUZA, T.L.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. **Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes**. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, v.47, p.237-238, 2004.

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

- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1983. 71 p.  
VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, Editora UFV, 2006. 2ª Edição, 600p

- ZHANG, Y.; STOMMEL, J.R. **Development of SCAR and CAPS markers linked to the beta gene in tomato**. Crop Science, v.41, p.602-1608, 2001.