NUNES, R. C.; REIS, F. G.;CARNEIRO, M. S. Seleção de linhagens de feijoeiro resistentes à mancha-angular assistida por marcadores moleculares e identificação de novas fontes de resistência. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Cientifica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO RESISTENTES À MANCHA-ANGULAR ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES E IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA

NUNES, Rudy Camilo[1]; **REIS**, Fabiana Gonçalves[2]; **CARNEIRO**, Monalisa Sampaio[3]

Palavras-chave: *Phaeoisariopsis griseola*, feijão, seleção assistida, mancha angular

1- Introdução

A mancha angular do feijoeiro comum é causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), a doença atinge todas as regiões do Brasil onde o feijoeiro é plantado, causando a defoliação prematura e resultando em perdas que variam de 7% 70% no rendimento dos grãos em lavouras suscetíveis (Sartorato & Rava, 1992). A resistência genética é um importante componente dentro do manejo integrado, reduzindo o uso indiscriminado de defensivos agrícolas e contribuindo para a manutenção da qualidade de vida. No desenvolvimento de feijoeiros resistentes, pode-se eliminar as dificuldades de inoculação do patógeno e de avaliação fenotípica das plantas por meio da identificação direta de genótipos resistentes. Isso é possível quando se utilizam marcadores moleculares que segregam conjuntamente com os alelos de resistência. Os marcadores RAPD e SCAR se destacam por sua simplicidade técnica e capacidade em detectar esse tipo de polimorfismos entre indivíduos.

O objetivo deste trabalho é avaliar 23 genótipos de feijão (Aruã, Carioca Rubi, Diamante Negro, Magnífico, Pérola, Piatã, Soberano, Uirapuru, Valente, Mar 2, Cornell 49-242, AND 277, Ouro Negro, CNFC 7806, CNFC 7813, CNFC 9504, CNFC 10276, CNFC 10281, CNFP 7776, CNFP 10120, CNFP 10125, CNFP 10138 e CNFP 10150) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e ao Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Arroz e Feijão quanto à resistência aos patótipos 63.19 e 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de inoculação artificial e seleção assistida pelo marcador SCAR OPN02 (ACCAGGGGCATTATGAACAG e ACCAGGGGCAACATACTATG).

2- Metodologia

Os experimentos foram realizados em casas de vegetação da EMBRAPA arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás – Goiás. As análises moleculares e as extrações de DNA foram efetuadas no laboratório de Biologia Molecular de Plantas - EAEA, UFG, Goiânia-Goiás.

2.1- Obtenção do material vegetal

Foram utilizados genótipos de *P. vulgaris* fornecidos pela EMBRAPA arroz e feijão.

2.2- Raça e preparo do inóculo

Foram utilizados os isolados monospóricos Ig 669 e Ig 664, das raças 63.19 e 63.23 de *P. griseola*, respectivamente, oriundos da Micoteca da Embrapa Arroz e Feijão. Para inocular foi preparada uma suspensão de conídios do fungo a uma concentração final de $25x10^3$ conídios/mL.

2.3- Inoculação e avaliação

Foram inoculadas 20 plantas de cada genótipo, sendo 10 indivíduos para cada raça do fungo, que foram expostas ao patótipo após 15 dias do plantio. Utilizou-se a cultivar Rosinha G-

2 como testemunha suscetível. Para inocular, utilizou-se um atomizador de Vilbiss nº 15. Foram inoculados os dois lados da folha de cada planta. Os indivíduos foram mantidos em câmara úmida por um período de 48 horas, com uma temperatura variando entre 20 ± 2°C e 100% de umidade relativa (Sartorato & Rava, 1992). O grau de severidade da doença foi verificado visualmente após 14 dias da inoculação. Usou-se uma escala diagramática que varia de 1 a 4mm, e a avaliação do índice de infecção, que corresponde à área foliar ocupada pelas lesões, empregando-se uma escala diagramática de 0 (sem sintomas) a 100% (severidade máxima de infecção), desenvolvida pelo CNPAF (Sartorato, 1989).

2.4- Extração e quantificação do DNA genômico

Foram coletadas 250 mg de folhas frescas e jovens dos indivíduos. O DNA foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990), baseada no detergente CTAB.

A concentração de DNA das bandas foi estimada visualmente, em gel de agarose a uma concentração de 1,0%, por comparação com uma série de concentrações conhecidas do DNA do fago lambda (25, 50, 75 e 100ng). A análise foi feita sob luz ultravioleta, através de imagens digitalizadas dos géis de agarose, reveladas pela coloração com brometo de etídeo (0,5µg/mL).

2.5- Reação de amplificação

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador PTC-100 da MJ Research, Inc., programado para 34 ciclos de 30 segundos a 94ºC (desnaturação do DNA), 1 minuto a 66ºC (pareamento do *primer* ao DNA molde), 1,5 minutos a 72ºC (extensão dos *primers)* e temperatura final de 15º para manutenção do término da reação*.* Cada reação de 25µL continha 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl (pH 8,0), 2,8 mM de $MgCl_2$, 100 mM de cada desoxiribonucleosídeo trifosfato, 2 *primers* (0,4 µM de cada*)*, uma unidade de Taq-polimerase e 25 ng de DNA.

Os fragmentos de DNA foram separados, por eletroforese, em géis de agarose 1,4% em tampão TBE (Tris-Borato 10 mM, e EDTA 2 mM), corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e, posteriormente, fotografados sob luz ultravioleta, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Kodak EDA DC120. Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA ladder de 100bp.

3- Resultados e discussão

3.1- Teste de polimorfismo com marcador SCAR $OPN02_{890}$

Entre os 19 novos acessos testados, 7 demonstraram polimorfismo e 16 não se mostraram polimórficos para o marcador SCAR ($OPN02_{890}$). Os indivíduos que apresentaram polimorfismo foram: Ouro Negro, Uirapuru, CNFP 10138, CNFP 10150, CNFP 10120, CNFP 10125, Valente, e os indivíduos não polimórficos foram: Mar 2, Cornell 49-242, And 277, CNFP 7776, Soberano, Diamante Negro, CNFP 10281, CNFC 9504, CNFC 10276, CNFC 7813, Piatã, CNFC 7806, Pérola, Aruã, Magnífico e Carioca Rubi. A figura 1 demonstra um teste de polimorfismo entre o genótipo resistente Cornell 49-242 e o genótipo testado CNFC 7813 (BRS Pontal).

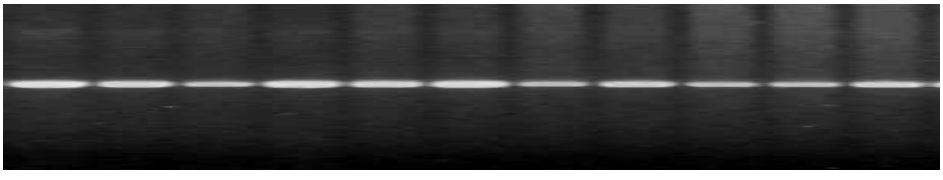

Figura 1. Análise eletroforética da amplificação dos produtos de DNA obtidos com o marcador SCAR OPN02. Seqüência: 1-3: Cornell 49-242; 4-11: CNFC 7813.

3.2- Inoculação com os isolados Ig 664 (raça 63.23) e Ig 669 (raça 63.19) de *P. griseola*

A resistência de alguns germoplasmas foi demonstrada em condições de casa de vegetação. Foram considerados suscetíveis aqueles genótipos que apresentaram uma severidade superior a 15%. Os genótipos CNFC 10281, CNFP 7776 (BRS Grafite), CNFC 7806 (BRS Requinte), CNFC 7813 (BRS Pontal), MAR 2, Cornell 49-242 e AND 277 foram resistentes a ambos os patótipos empregados. O genótipo CNFP 10138 foi resistente ao patótipo 63.23. Os genótipos CNFP 10120, CNFP 10125 e Valente foram resistentes ao patótipo 63.19.

As cultivares BRS Grafite, BRS Requinte e BRS Pontal foram recentemente, registrados e lançados no mercado pela Embrapa Arroz e Feijão. Além da resistência a outras raças de mancha angular, estas cultivares apresentam também outras características de grande interesse para o agricultor, o que facilita sua aceitação no mercado.

4- Conclusões

A análise eletroforética do DNA dos genótipos testados demonstrou que aqueles identificados como fontes de resistência apresentam a referida marca para o SCAR OPN02. Porém, foram obtidos resultados contraditórios como: indivíduos com 80% de doença apresentaram a marca e indivíduos com 10% de doença não apresentaram a marca. O marcador SCAR, que se encontra a uma distância de 5,9 cM do gene de resistência não apresentou correlação direta entre sua presença e a resistência. Esta distância denota a possibilidade de recombinação, pois, em contrapartida, quanto mais próximo do gene estiver a marca, menor a possibilidade de se encontrar resultados contraditórios. Portanto, para que os resultados sejam confirmados não só para este trabalho como também para outros que porventura venham testar marcadores desenvolvidos para outros genótipos em seus programas, é necessário que se teste o marcador em uma população segregante (F_2) e a partir daí retirar os indivíduos que apresentem a correlação entre a marca e a resistência para dar seqüência em programas de melhoramento com mais segurança.

5- Referências bibliográficas

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (Isariopsis griseola) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 247-251, 1992.

SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc**. 1989. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 1989.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus,** v.12, p.13-15, 1990.

6- Fontes de financiamento

CNPq e EMBRAPA Arroz e Feijão.

[1] Bolsista de iniciação científica. ICB, rudy_bio@pop.com.br

[2]Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas/EAEA/UFG, fafireis286@yahoo.com.br

[3] Orientadora/ICB/UFG, monalisa@icb.ufg.br