

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR RAPD LIGADO AO ALELO *Co-4*² DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO COMUM AO AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE¹

MÁRCIA VANUSA DA SILVA²
JOÃO BOSCO DOS SANTOS³

RESUMO – A antracnose do feijoeiro, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das doenças mais importantes por ocorrer em todo o País e causar grandes perdas nessa cultura. A cultivar G2333, portadora de três alelos dominantes de resistência, de genes diferentes, *Co-4*², *Co-5* e *Co-7*, é uma conhecida fonte de resistência a 25 raças de *C. lindemuthianum* identificadas no Brasil; entretanto, o alelo *Co-7* ainda não foi marcado. Objetivou-se, portanto, identificar marcadores moleculares do tipo RAPD, ligados ao alelo *Co-7*, visando a auxiliar na seleção de plantas resistentes ao *C. lindemuthianum*. Foi utilizada a população F₁ [ESAL 696 (G 2333 x ESAL 696)], em que a linhagem ESAL 696 é portadora do alelo *Co-5*. A

segregação de metade das plantas resistentes e metade suscetíveis, após a inoculação com a raça 2047, confirmou o controle genético devido apenas ao gene *Co-4*². Empregou-se o método dos *bulks* segregantes de DNA, extraído de plantas constituintes da população F₁ de retrocruzamento. Procedeu-se à reação RAPD dos *bulks* e foi identificado o *primer* OPL04, que amplificou um fragmento de DNA, com cerca de 1000 pares de base (pb) ligado ao alelo *Co-4*². Na análise de co-segregação, verificou-se que esse marcador está estreitamente ligado ao alelo de resistência, a uma distância de 0,0 cM, e se constitui em um excelente marcador para a seleção indireta de plantas portadoras do alelo *Co-4*² em populações segregantes.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, alelo *Co-4*² de resistência e RAPD.

IDENTIFICATION OF RAPD MARKER LINKED TO THE COMMON BEAN *Co-4*² ALLELE FOR RESISTANCE TO CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE

ABSTRACT – Common bean anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is one of the most important diseases occurring all over the country and causing large losses in the crop. The cultivar G2333, carrier of three dominant resistance alleles of different genes, *Co-4*², *Co-5* and *Co-7*, is a known source of resistance to 25 races of *C. lindemuthianum* identified in Brazil, although the *Co-7* allele has not been marked yet. This work was designed to identify RAPD molecular markers linked to the *Co-7* allele aiming indirectly to select resistant plants in segregating populations. The population F₁ [ESAL 696 (G2333 x ESAL 696)] was utilized in which the line ESAL 696 is the carrier of the *Co-5* allele. The segregation of

half-resistant plants and half susceptible, after inoculation with race 2047, confirmed the genetic control due to only the *Co-4*² gene. The *bulk* segregant procedure of extracted DNA from plants constituting the backcross population was employed. The RAPD reaction of the *bulks* was proceeded and the primer OPL04 was identified, which amplified a DNA fragment of about 1000 base pairs (bp), linked to the *Co-4*² allele. In the co-segregation analysis, it was found that this marker is closely linked to the resistance allele at a distance of 0,0 cM, and becomes an excellent marker aiming at the indirect selection of plants carrying the *Co-4*² allele in segregating populations.

INDEX TERMS: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Co-4*² resistance allele and RAPD.

-
1. Trabalho apresentado à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA), Caixa Postal 37 – 37200.000 – Lavras, MG, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.
 2. Engenheiro Agrônomo, MS em Genética e Melhoramento de Plantas.

3. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Titular do Departamento de Biologia/UFLA.

INTRODUÇÃO

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

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

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

O desenvolvimento de cultivares resistentes é viável porque existem vários genes independentes de resistência e, em cada um, um ou mais alelos conferem resistência a várias raças (Rava, Purchio e Sartorato, 1994; Pastor-Corrales *et al.*, 1994; Young e Kelly, 1996b). Há, no entanto, o problema da durabilidade de uma cultivar resistente, quando portadora de apenas um alelo de resistência, pelo fato de a maioria conferir resistência completa, e, conseqüentemente, exercer uma grande pressão de seleção na população do patógeno e favorecer a seleção da nova raça que o vença.

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

Existe a dificuldade para identificação de uma cultivar, com vários alelos de resistência, por causa da necessidade de um conjunto de raças do patógeno diferenciadoras dos vários alelos e, muitas vezes, tais

raças não são disponíveis. Atualmente, é possível a marcação dos diferentes alelos com um marcador molecular, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que tem sido usado com sucesso em várias oportunidades (Michelmores, Paran e Kesseli, 1991; Kelly, 1995; Adam-Blondon *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1998), eliminando-se a necessidade de inoculação, na avaliação e seleção de plantas portadoras de alelos de resistência de um ou mais genes.

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

Diante dessas considerações, objetivou-se marcar o alelo *Co-7* de resistência da linhagem G2333, com marcadores RAPD, e estimar a distância entre os marcadores e o alelo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas a fonte de resistência G2333 e a linhagem ESAL 696. A G2333 é uma das 12 cultivares diferenciadoras para a antracnose, sendo portadora de três alelos dominantes de resistência de genes independentes, *Co-4*², *Co-5* e *Co-7*, que conferem resistência a todas as raças de *C. lindemuthianum* identificadas no Brasil. Entretanto, possui grãos vermelhos, hábito de crescimento tipo IV, sensibilidade ao fotoperíodo, sendo totalmente inadequada para o cultivo na região. A linhagem ESAL 696 possui o alelo *Co-5* de resistência ao patógeno, grãos do tipo 'Carioca', hábito de crescimento tipo II e excelente potencial de produção de grãos.

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

A raça de *C. lindemuthianum* utilizada para a inoculação da população F₁RC₁ foi a 2047, proveniente de uma cultura monospórica, que foi incubada em meio M3 (Junqueira *et al.*, 1984) sob condições assépticas, em câmara de crescimento a temperatura em torno de 20°C, por um período de 10 dias. Utilizando-se essa cultura, foi

preparada uma suspensão de esporos contendo cerca de $1,2 \times 10^6$ conídios por mililitro.

As plantas da população F_1RC_1 foram crescidas em vasos com cerca de 15 kg de solo. A inoculação foi realizada cerca de 10 (dez) dias após a emergência, quando as plantas apresentaram as folhas primárias abertas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob condições de 100% de umidade relativa durante cinco dias. Todas plantas que exibiram os sintomas típicos de necrose das nervuras foliares ou morte foram consideradas suscetíveis.

Antes da inoculação, foi coletada uma das folhas primárias de cada planta F_1RC_1 , para a extração de DNA, utilizando-se o procedimento modificado de Rogers e Bendich (1988). As folhas foram maceradas com areia, juntamente com 10 ml de um tampão de extração [0,2 g de brometo de cetiltrimetil-amônio (CTAB); 1 ml de tris 1M; 0,4 ml de EDTA 0,5 M; 0,82 g de NaCl; 0,1 g de polivinilpirrolidona 40.000; 8,6 ml de água pura], pré-aquecido a 65°C e 20µl de 2-β-mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria a 65°C, por cerca de 30 minutos, agitando-o a cada 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 ml da solução de 24 clorofórmio : 1 álcool isoamil, homogeneizando-se levemente e centrifugando-se durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e misturado com 30 ml da solução, de 6 álcool 95° : 1 acetato de amônio 7,5 M, mantendo-o no freezer (-20°C) por cerca de 1 hora, no mínimo. Em seguida, coletou-se o ácido nucléico (DNA) e adicionaram-se 300µl da solução TRIS 1mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7 (TE). Após o DNA ter se dissolvido, procedeu-se a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil. O sobrenadante foi coletado e adicionado o triplo do seu volume, com a solução de 20 álcool 95° : 1 acetato de sódio 3M, mantendo-o no freezer por pelo menos uma hora, ou até ocorrer a precipitação do DNA. A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA foi dissolvido em 300µl de TE. A operação seguinte consistiu em quantificar a concentração do DNA em fluorímetro (Hofer Scientific). Para isso, foram usados 2µl da solução de DNA em 2 ml de tampão (tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1µg/ml do corante H32258. Logo após, o DNA foi diluído com TE para a concentração de 10 ng/µl.

Após a coleta das folhas para a extração do DNA, as plantas F_1RC_1 foram inoculadas com a raça 2047 de *C. lindemuthianum*, para identificar as resistentes e as suscetíveis. Então, os DNAs de todas as plantas resistentes foram misturados equitativamente e,

igualmente, foram misturados os DNAs de todas as plantas suscetíveis (Michelmore, Paran e Kesseli, 1991). As duas misturas (*bulks*) de DNA foram amplificadas com 700 *primers* de 10 nucleotídeos (Operon Technologies Inc., Alameda, Ca, EUA) visando a identificar polimorfismo entre os *bulks*.

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

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

O marcador RAPD detectado nos *bulks* segregantes foi testado em todos os indivíduos constituintes de cada *bulk*.

Procedeu-se à análise χ^2 dos resultados observados, tanto da reação da população F_1RC_1 ao patógeno, quanto da segregação do marcador RAPD. Posteriormente, foi realizada a análise de ligação, considerando-se, simultaneamente, os resultados de reação e do marcador. Nessa análise, empregou-se o programa MAPMAKER/EXP (Lander, Green e Abrahamson, 1987), versão 3.0b, com LOD score

mínimo de 3,0. Esse valor indica que a região genômica que apresentar o valor de LOD igual ou maior que três será considerada como marcadora associada da característica em estudo. Em geral, o valor de LOD é estipulado entre um limite de 2 a 3 (Milach, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A situação mais favorável para se marcar um alelo é quando a herança do caráter é monogênica. Esse é o caso da reação do feijão à raça 2047, como pode ser observado na Tabela 1, pela segregação de metade de plantas resistentes e metade suscetíveis, na geração F_1 do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696). Embora tenha sido feita avaliação da reação ao patógeno em plantas individuais, as condições foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, produzindo um resultado muito próximo do esperado (Young *et al.*, 1998).

A análise dos *bulks* segregantes, por meio do RAPD, identificou um potencial marcador na fase de acoplamento, amplificado pelo *primer* OPL04 (5'GACTGCACAC3'), que amplificou uma banda de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) (Figura 1). Tal marcador também ocorreu no genitor resistente.

Quando o *primer* OPL04 foi utilizado para amplificar os DNA dos indivíduos componentes do *bulk* resistente, o produto amplificado de 1000 pb esteve presente em todos os indivíduos (Figura 2) e ausentes em todos os indivíduos do *bulk* suscetível (Figura 3). Por esse resultado, infere-se que o marcador está intimamente ligado ao alelo de resistência. Entretanto, em estudos anteriores, Young e Kelly (1996b) haviam mostrado que a raça 2047 de *C. lindemuthianum* era virulenta para a cultivar TO, mas avirulenta para o genótipo SEL 1308, sugerindo que a resistência em SEL 1308 é conferida por um alelo diferente de *Co-4*, sendo denominado de *Co-4²*. Como esse genótipo também amplificou o marcador de 1000pb, deduz-se que o alelo marcado é o *Co.4²* e não o *Co.7*, como inicialmente imaginado.

Um marcador ideal deve mostrar herança monogênica. Isso foi comprovado pelos resultados de segregação da presença ou ausência da banda identificada nas plantas da geração F_1 de retrocruzamento (Tabela 1). À semelhança dos resultados da reação ao patógeno, notou-se uma proporção de plantas com ou sem a banda muito próxima do esperado.

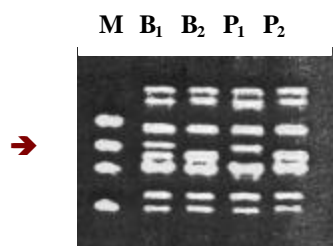


FIGURA 1 – Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} dos *bulks* resistente e suscetível (B₁ e B₂, respectivamente) e dos genitores G2333 e ESAL 696 (P₁ e P₂, respectivamente). A seta indica a banda \cong 1000 pb, ligada ao alelo *Co-4²*, presente em B₁ e P₁. M = corresponde ao DNA do fago X-174-RF digerido com a enzima de restrição Hae III.

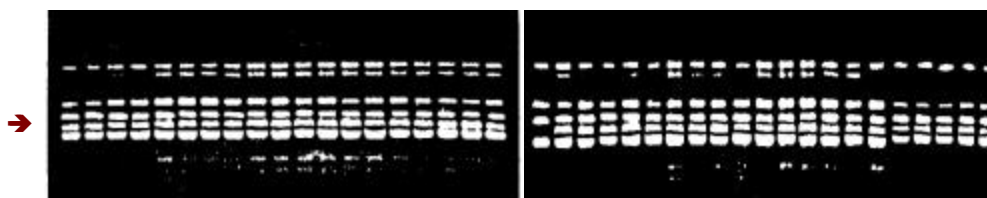


FIGURA 2 – Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o *primer* OPL04_{1000c} dos indivíduos do *bulk* resistente. A seta indica a banda \cong 1000 pb, ligada ao alelo *Co-4*², presente em todos os componentes do *bulk*.



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

Tanto os resultados de reação, quanto os da presença ou ausência da banda, podem ser considerados confiáveis, assim como a população foi de tamanho muito maior do que o ideal, porque seriam necessárias sete plantas do retrocruzamento para comprovar os presentes resultados com 99% de probabilidade (Ramalho, Santos e Pinto, 2001).

Para confirmar se o marcador estava, de fato, ligado ao alelo *Co-4*², foi feita a análise de co-segregação entre o marcador e o alelo de resistência. O elevado valor do χ^2 obtido refutou a hipótese de independência (1:1:1:1), confirmando a hipótese de ligação entre o marcador e o alelo *Co-4*² (Tabela 2). Nota-se que não ocorreu nenhum recombinante, indicando ligação completa nessa população de 78 indivíduos. Esse tamanho de população pode ser questionado. Entretanto, lembrando que se trata de uma população F₁

de retrocruzamento, espera-se que com dois locos ocorram $2^n = 2^2 = 4$ combinações genotípicas. Comparando-se com a geração F₂, que é também frequentemente utilizada na identificação de marcadores ligados a alelos, necessita-se, nesse caso, 4ⁿ combinações genotípicas na população; portanto, teoricamente, 16 combinações quando são utilizados dois locos. Considerando-se agora a população de 78 indivíduos utilizada correspondente a 2ⁿ, nota-se que n equivale a 6,285. Se em vez de utilizar retrocruzamento tivesse sido usada uma F₂, teoricamente ela deveria ter o tamanho $4^{6,285} = 6080,6$ indivíduos, para ser equivalente ao tamanho da população de retrocruzamento utilizada. Portanto, pode-se considerar que o tamanho usado foi maior do que os que têm sido normalmente utilizados em outros estudos (Young *et al.*, 1998; Arruda 1998; Castanheira *et al.*, 1999).

TABELA 1 – Análise de segregação do marcador RAPD, amplificado pelo *primer* OPL04 e do gene *Co-4*², na população F₁ do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696)

Locos Testados	Frequências Observadas	Frequências Esperadas	χ^2
<i>CO-4</i> ²	40:38	1:1 ^A	0,05128
OPL04	40:38	1:1 ^B	0,05128

^a 1:1 (resistente, R; suscetível, r); ^b 1:1 (presença de banda: ausência de banda).

TABELA 2 – Análise de co-segregação do gene de reação ao patógeno e do loco do marcador RAPD, amplificado pelo *primer* OPL04, na população F₁ do retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696).

Locos Testados	Frequências Observadas AB:Ab:aB:ab	Frequências Esperadas ^A AB:Ab:aB:ab	χ^2
<i>CO-4</i> ² /OPL04	40:0:0:38	1:1:1:1	78,1

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

TABELA 3 – Disposição do marcador RAPD OPL04 e do alelo *Co-4*², identificados na população de retrocruzamento ESAL 696 (G2333 x ESAL 696), pelo programa MAPMAKER/EXP.

ORDEM	ALELO/MARCADOR	DISTÂNCIA	LOD SCORE
1	CO-4 ²		...
2	OPL04	0,0 CM	23,48

Verificou-se na Tabela 3 que a frequência de recombinação entre o alelo e o marcador foi de 0,0% e a distância entre eles de 0,0 cM, com um LOD score calculado de 23,48 (Lander, Green e Abrahamson, 1987). Trata-se, portanto, de um excelente marcador do alelo *Co-4*², que deve ser altamente eficiente para se utilizar na seleção indireta de plantas resistentes, em populações segregantes, dispensando-se a inoculação (Tanksley, 1983; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Castanheira *et al.*, 1999).

Vários marcadores RAPD que conferem resistência ao *C. lindemuthianum* foram identificados próximos de alelos do feijão. Entre eles, alguns são importantes nos programas de melhoramento de feijão, e vêm sendo conduzidos em algumas instituições de pesquisa brasileiras. Como exemplo, foi identificado um fragmento de DNA ligado ao alelo *Co-5*, presente na cultivar diferenciadora G2333, amplificado pelo *primer* OAB3 unido em fase de acoplamento (5,9 cM), confirmando a presença desse alelo nas cultivares diferenciadoras de raças TU e G2333 (Young e Kelly, 1996a). Além desse, Castanheira *et al.* (1999), estudando as populações F₂, provenientes dos cruzamentos Carica 300V x Ouro (provavelmente portador do alelo *Co-5*) e também P24 x Ouro, identificaram um fragmento de DNA, amplificado pelo *primer* OPF10 com cerca de 912 pb ligado ao alelo *Co-5*. A mesma autora identificou um segundo marcador, também ligado ao alelo *Co-5*, considerando-se a análise da população F₂ do cruzamento P24 x Ouro, resultante da amplificação pelo *primer* OPR03, que possui cerca de 1112 pb. Constatou-se que esses dois marcadores estão flanqueando o alelo *Co-5*. Arruda (1998) identificou um fragmento de DNA, amplificado pelo *primer* ANT-TO1, com cerca de 830 pares de bases estreitamente ligado ao alelo *Co-4* (0,0 cM) em populações obtidas do cruzamento entre Rudá x TO (portador do alelo *Co-4*). Em estudos conduzidos

por Castanheira *et al.* (1999), com a população F₂ do cruzamento Carioca 300V x P45 (portador do alelo *Co-4*), foi identificado também o *primer* OPC08, que amplificou um fragmento de DNA com cerca de 1059 pb, ligado ao alelo *Co-4*.

O alelo *Co-4*², presente na cultivar G2333, foi identificado com o auxílio dos marcadores RAPD, utilizando os *primers* OAL9 e OAS13, e este último foi convertido no marcador SCAR por meio do par de *primers* SAS13.24XP e SAS13.24RP (Young *et al.*, 1998). Esses autores observaram que no cruzamento TO x SEL 1308 não ocorreu segregação, sugerindo que o alelo dominante em SEL 1308 está localizado no mesmo loco que o alelo *Co-4* de TO.

Ainda há algumas controvérsias na literatura sobre o alelo de resistência *Co-4*², do gene *Co-4* e do alelo *Co-7*. Conforme comentado por Young *et al.* (1998), eles são alelos de genes diferentes. Além disso, Pastor-Corrales *et al.* (1994), estudando a resistência ao patógeno conferida pelo G2333, quando inoculado com a raça 521, que vence a resistência conferida pelo alelo *Co-5*, presente na diferenciadora TU, constataram a ocorrência de dois alelos dominantes de genes diferentes, portanto, concordantes com os alelos *Co-4*² e *Co-7*. Entretanto, Kelly (informação pessoal, 1999) (Kelly, J.D., Michigan State University, Dept Crop & Soil Science, East Lansing, MI 48824 USA) acredita que *Co-4*² e *Co-7* sejam o mesmo alelo, embora discorde dos resultados mencionados da literatura. Vale salientar que, independente da existência do alelo *Co-7*, o marcador identificador pelo *primer* OPL04 ainda não havia sido encontrado, e constitui-se uma alternativa a mais que os melhoristas e geneticistas terão para auxiliar na seleção de plantas resistentes ao *C. lindemuthianum*.

CONCLUSÕES

O alelo de resistência do feijão à raça 2047 de *C. lindemuthianum* foi marcado por meio do RAPD pelo primer OPL04. O fragmento de DNA amplificado possui cerca de 1000 pb e constitui-se um excelente marcador por ocorrer em ligação completa com o alelo de resistência. Esse alelo é o *Co-4*² e não o *Co-7*.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e CAPES, pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *ARE*, a simple gene conferring resistance to *C. lindemuthianum*, the causal agent of antracnose in French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, n.6/7, p.865-870, Aug. 1994.
- ALZATE-MARIN, A.L.; PAULA JR., T.J.; MENARIN, H.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of RAPD markers to understand the dominant nature of antracnose resistance genes present in common bean cultivar AB- 136. **Annual Reporter of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.40, p.132-133, 1997.
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose**: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene *Co-4* no cultivar Rudã. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F.; MELO, L.C. Identification of common bean alleles resistant to antracnose using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.519-524, Dec. 1999.
- ESTIMATIVAS de safras. **Indicadores da Agropecuária CONAB**, Brasília, v.8, n.10, p.5-6, out. 1999.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v.34, n.4, p. 1061-1066, July/Aug. 1994.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIN, L.; ROMEIRO, R.S.; GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v.31, n.177, p.322-331, set. 1984.
- KELLY, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.3, p.461-465, June 1995.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-11, Jan. 1998.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Austin, v.1, n.1, p.174-181, Jan. 1987.
- MICHELMORE, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.393-427, 1995.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations (RAPD/RFLP). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.88, n.21, p.9828-9832, Nov. 1991.
- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: _____. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.17-28.
- PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of antracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, Washington, v.78, n.10, p.959-962, Oct. 1994.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa: UFV, 1998. p.435-449.

- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 2. ed. Lavras: EDUFPA, 2001. 472p.
- RAVA, C.A.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.167-172, jun. 1994.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extration of DNA from plant tissues. In:_____. **Plant molecular biology: manual A6**. [S.l.: s.n.], 1988. v.6, p.1-10.
- SANTOS, J.B. dos; CASTANHEIRA, A.L.M.; MELO, L.C. Emprego de marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a antracnose no feijão. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia, **Resumos ...** Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1996. v.1, p.263-264.
- SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J.; SKROCH, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determinig genetic similarity among *Brassica oleracea* L. Genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, n.8, p.909-915, June 1994.
- SKROCH, P.W.; SANTOS, J.B dos; NIENHUIS, J. Genetics relationships among *Phaseolus vulgaris* genotypes based on RAPD markers data. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.35, p.23-24, 1992.
- TANKSLEY, S.D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, Amsterdam, v.1, n.1, p.3-8, Jan. 1983.
- YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.6, p.650-654, June 1996a.
- YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Gene pyramiding using markers assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.39, p.57-58, 1996b.
- YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, n.1, p.87-94, Jan. 1998.