

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COMMON BEAN GENOTYPES TO ANTHRACNOSE RESISTANCE

Ariadna F. Vieira¹; Demerson A. Sanglard²; Luana A. Rodrigues³; Adriane Wendland⁴; Helton S. Pereira⁴; Luís C. Faria⁴; Leonardo C. Melo⁴; Thiago Lívio P. O. Souza^{4*}

Introdução. O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura com ampla representatividade no mercado nacional, principalmente por ser a fonte protéica mais acessível aos consumidores, além de fornecer minerais e outros nutrientes. Embora a cultura apresente elevado potencial produtivo, sua produtividade média nacional ainda é baixa e instável. Entre os diversos fatores que explicam esta situação, está o grande número de doenças que acometem a cultura. Entre as doenças de maior importância, destaca-se a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. (Bianchini et al., 2005). Com isso, tornam-se essenciais os estudos visando um melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro no intuito de viabilizar o controle efetivo da doença por meio de cultivares resistentes. Já foram oficialmente identificados e caracterizados 12 genes (*Co-1* a *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*), o qual deverá ser incluído na próxima versão da lista oficial de genes de resistência à doença. A biotecnologia, por meio dos marcadores moleculares, auxilia na identificação e caracterização de fontes de resistência. Existem atualmente cerca de 59 marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ligados a genes de resistência a várias doenças que acometem a cultura do feijão, sendo que para antracnose já foram identificados aproximadamente 15 marcadores (BIC, 2014b). Diante do exposto, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização molecular de genótipos de feijoeiro-comum (cultivares e linhagens elites) quanto à resistência à antracnose, com base na genotipagem destas usando marcadores SCAR previamente identificados como ligados aos genes *Co-4*, *Co-4²*, *Co-5* e *Co-6*. Estes genes têm sido preferencialmente utilizados pelos programas de melhoramento no Brasil, uma vez que conferem maior espectro de resistência à antracnose (Ragagnin et al., 2009).

Material e Métodos. Foram avaliados 40 genótipos de feijoeiro-comum, incluindo cultivares, linhagens elite e variedades testemunhas. Sementes de cada genótipo foram obtidas junto ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro-Comum da Embrapa Arroz e Feijão e semeadas em casa de vegetação. Amostras foliares de cada um dos genótipos foram coletadas em *bulk*, sendo cada amostra formada por discos foliares obtidos a partir de 10 plântulas. A extração de DNA foi realizada utilizando o método do CTAB (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Após a extração, a qualidade e a quantidade de DNA de cada amostra foram analisadas em espectrofotômetro (Nanodrop, modelo 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Posteriormente, a concentração foi ajustada para 50 ng/μL. Nas reações de PCR com os marcadores SCAR descritos na Tabela 1, foi utilizado um volume final de 5,0 μL, sendo: 1,0 μL de DNA (50 ng/μL), 0,5 μL de *Q-Solution* (tampão) (Qiagen, Hilden, Alemanha), 2,5 μL da enzima *Go-Taq* (Promega, Madison, EUA) e 1,0 μL de cada *primer*. As condições de amplificação foram: uma fase inicial de 95°C por 15 minutos; seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60°C (SY20, SH18 e SAZ20) e 54°C (SAB3) por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguidos de uma etapa final de extensão a 72° por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado o corante azul de bromafenol aos produtos de amplificação, os quais foram submetidos à eletroforese em gel de

¹Mestranda em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG. aryaddnafv@hotmail.com.

²Professor, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG.

³Analista, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁴Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

*Autor para correspondência: (62) 3533-2129 – thiago.souza@embrapa.br.

agarose a 1,5%. 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 digitalizadas em fotodocumentador. Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados foram aferidos por comparação usando um marcador de peso molecular conhecido.

Resultados e Discussão. Os resultados obtidos a partir da amplificação do DNA dos genótipos de feijoeiro-comum analisados neste trabalho com marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose são apresentados na Tabela 2. Observando os resultados apresentados pelas testemunhas resistentes, nota-se que todos os marcadores testados foram específicos para os locos de resistência a que estão ligados. Contudo, o marcador SY20 amplificou fragmentos de DNA para as testemunhas TO (*Co-4*) e SEL 1308 (*Co-4*²), ou seja, este marcador discriminou o loco *Co-4* dos demais avaliados, porém não discriminou os diferentes alelos deste loco: *Co-4* e *Co-4*². Já no caso do marcador SH18, este foi eficiente em discriminar o alelo *Co-4* do *Co-4*² nas testemunhas, uma vez que apenas SEL 1308 apresentou a marca SH18. No que se refere às demais cultivares e linhagens testadas, apenas as linhagens K10 e K13 apresentaram produtos de amplificação para o marcador SY20, indicando a presença de alelos do gene *Co-4* nestas linhagens. Contudo, nenhum genótipo apresentou o marcador SH18, o que sugere a ausência do alelo *Co-4*². Cinco genótipos apresentaram o marcador SAB3 (BRS Campeiro, BRS Esplendor, BRS Supremo, K10 e K23), o que indica a presença do gene *Co-5*, enquanto que somente a linhagem K10 apresentou o marcador molecular SAZ20, ligado ao gene *Co-6*. Além disso, a linhagem K10 ainda apresentou os marcadores testados SY20, SAB3 e SAZ20, indicando a presença simultânea dos genes *Co-4*, *Co-5* e *Co-6* respectivamente. Esse resultado é coerente com o histórico de melhoramento desta linhagem. K10 se apresenta como uma linhagem promissora a ser usada como genitor doador em programas de melhoramento visando resistência à antracnose. Alzate-Marin e Sartorato (2004) demonstraram que variedades que apresentam o gene *Co-4* e seus alelos, além dos genes *Co-5* e *Co-6*, possuem maior espectro de resistência à antracnose no Brasil. Três cultivares apresentaram somente o marcador SAB3 (BRS Campeiro, BRS Esplendor e BRS Supremo), o que indica a presença do gene *Co-5*. De todas as cultivares trabalhadas, somente a BRS Campeiro, BRS Esplendor e BRS Supremo apresentaram o marcador molecular SAB3, associadas ao gene *Co-5*. O uso de marcadores moleculares previamente identificados como ligados a genes de resistência à antracnose como ferramenta para aferir a presença destes genes em cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum se mostrou uma ferramenta útil aos programas de melhoramento. Contudo, estes resultados precisam ser interpretados com critério, uma vez que os marcadores utilizados não estão perfeitamente ligados aos genes alvo, ou seja, estão localizados próximos aos genes e não exatamente nas regiões gênicas. Para uma perfeita confirmação da presença dos genes de resistência nos genótipos testados, inoculações com raças específicas do patógeno se fazem necessárias.

Tabela 1. Marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro-comum.

Marcador	Gene	Fonte	Primer 5'-->3'	Distância (cM)	T(°C) ^a	Referências
SY20	<i>Co-4</i>	TO	F: AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R: CAGAGACCCTAGGCTTATCG	1,2	60	Queiroz et al. (2004); Kelly et al. (2003)
SH18	<i>Co-4</i> ²	SEL 1308	F: CCAGAAGGAGCTGATAGTAGTCCACAAC R: GGTAGGCACACTGATGAATCTCATGTTGGG	4,3	60	Awale; Kelly (2001); Kelly et al. (2003)
SAB03	<i>Co-5</i>	TU	F: TGGCGCACACATAAGTTCTCACGG R: TGGCGCACACCATCAAAAAGGTT	12,9	54	Vallejo; Kelly (2001); Campa et al. (2005)
SAZ20	<i>Co-6</i>	AB136	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	7,1	60	Queiroz et al. (2004); Kelly et al. (2003)

^a Temperatura de anelamento

Tabela 2. Perfil molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto à presença de marcadores SCAR ligados a genes de resistência à antracnose.

Linhagens	Marcadores Moleculares (Gene R)			
	SY20 ₈₃₀ (Co-4)	SH18 ₁₁₀₀ (Co-4 ²)	SAB3 ₄₀₀ (Co-5)	SAZ20 ₈₄₅ (Co-6)
Bola Cheia	0	0	0	0
BRS Agreste	0	0	0	0
BRS Campeiro	0	0	1	0
BRS Embaixador	0	0	0	0
BRS Esplendor	0	0	1	0
BRS Esteio	0	0	0	0
BRS Estilo	0	0	0	0
BRS Executivo	0	0	0	0
BRS Grafite	0	0	0	0
BRS Notável	0	0	0	0
BRS Pitanga	0	0	0	0
BRS Radiante	0	0	0	0
BRS Realce	0	0	0	0
BRS Requite	0	0	0	0
BRS Sublime	0	0	0	0
BRS Supremo	0	0	1	0
BRSMG Madrepérola	0	0	0	0
BRSMG Majestoso	0	0	0	0
BRSMG Talismã	0	0	0	0
CNFC 10729	0	0	0	0
CNFC 10762	0	0	0	0
CNFC 15873	0	0	0	0
CNFC 15874	0	0	0	0
CNFC 15875	0	0	1	0
CNFP 10120	0	0	0	0
CNFP 10794	0	0	0	0
CNFP 15330	0	0	0	0
Corinthiano	0	0	0	0
IAC Alvorada	0	0	0	0
IPR Colibri	0	0	0	0
IPR Juriti	0	0	0	0
IPR Tangará	0	0	0	0
IPR Uirapuru	0	0	0	0
Jalo Precoce	0	0	0	0
K10	1	0	1	1
K13	1	0	0	0
K23	0	0	1	0
Pérola	0	0	0	0
Rudá	0	0	0	0
Valente	0	0	0	0
Rosinha G2 ^a	0	0	0	0
TO (Co-4) ^b	1	0	0	0
SEL 1308 (Co-4 ²) ^b	1	1	0	0
TU (Co-5) ^b	0	0	1	0
AB 136 (Co-6) ^b	0	0	0	1

^aTestemunha suscetível

^bTestemunha resistente

Conclusão. Neste trabalho, os marcadores SH18, SAB3 e SAZ20 se mostraram específicos para os locos *Co-4*², *Co-5* e *Co-6*, respectivamente. O marcador SH18 mostrou-se ainda alelo-específico, discriminando *Co-4*² de *Co-4*. A linhagem K10 apresentou as marcas 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 identificado nos genótipos BRS Campeiro, BRS Esplendor e BRS Supremo.

Referências

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

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

BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE, **List of Genes - *Phaseolus vulgaris* L.**, http://bic.css.msu.edu/_pdf/Bean_Genes_List_2014.pdf. Acesso em junho de 2014a.

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

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. (Eds.) Manual de Fitopatologia. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, v.2, p. 333-349, 2005.

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**. 48: 68-69, 2005.

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

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.

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.

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**, v.47, p. 249-250, 2004.

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.

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.