

LUCIANNE BRAGA OLIVEIRA VILARINHO

**CULTIVARES-PONTE DE FEIJOEIRO, RESISTÊNCIA À MANCHA-
ANGULAR E MAPEAMENTO DE QTLs**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

LUCIANNE BRAGA OLIVEIRA VILARINHO

**CULTIVARES-PONTE DE FEIJOEIRO, RESISTÊNCIA À MANCHA-
ANGULAR E MAPEAMENTO DE QTLs**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de fevereiro de 2004.

Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Ao meu querido marido Aloisio.
À minha adorada filha Ana Julia.
Aos meus amados pais João e Marlene.

AGRADECIMENTO

A Deus, por todas as bênçãos que tem concedido a mim e a toda minha família.

À universidade Federal de Viçosa, à secretaria de genética e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade ímpar de realização desse trabalho.

A FAPEMIG, pela bolsa concedida durante o curso.

Ao meu marido Aloisio, pelo companheirismo, cumplicidade, carinho e amor. “AMO VOCÊ!”

À minha linda filha Ana Julia, pela paciência, amizade e por tornar a nossa vida muito mais feliz.

Aos meus pais e irmãos, por serem torcedores e incentivadores incondicionais do meu trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação firme e incentivadora, pela confiança e liberdade na condução desse trabalho.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pelos ensinamentos fundamentais para execução desse trabalho, pela amizade, incentivo, apoio e agradável convivência.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pelas valiosas sugestões e pelo esforço em nos oferecer as melhores condições de pesquisa.

À Dra Ana Lilia Alzate-Marin, pelo apoio efetivo e indispensável na etapa inicial deste trabalho, pelo incentivo, sugestões e ensinamento.

A minha amiga Eveline Teixeira Caixeta, que muito me ensinou, pelo companheirismo, solidariedade e pela amizade durante todo o curso.

Ao Dr Trazilbo José de Paula Júnior, pelas valiosas sugestões.

Ao professor Aluizio Borém, pela orientação na fase inicial do curso.

Ao professor Magno Antônio Patto Ramalho, por ter me iniciado no trabalho de pesquisa do feijão e por ser sempre um exemplo a ser seguido.

Aos meus colegas de disciplina, levo a lembrança de todos com muito carinho.

Aos meus colegas de laboratório, pessoas especiais com as quais tive o prazer de trabalhar, agradeço a todos.

Aos funcionários do BIOAGRO e casas de vegetação, pelo apoio prestado durante o curso.

Ao Pintinho, pela colaboração nos trabalhos em casa de vegetação.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, muito obrigada!

BIOGRAFIA

LUCIANNE BRAGA OLIVEIRA VILARINHO, filha de João José Oliveira e Marlene Braga Oliveira, nasceu em Montes Claros, MG, no dia 03 de abril de 1969.

Concluiu seus estudos de primeiro grau em Montes Claros e de segundo grau em Belo Horizonte.

Em agosto de 1988, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Escola Superior de Agricultura de Lavras – ESAL, vindo a concluí-lo em julho de 1993.

De abril a dezembro de 1992 foi monitora na área de genética no Departamento de Biologia.

Em agosto de 1993, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Lavras – UFLA, vindo a concluí-lo em agosto de 1995.

De 1994 a 1995, foi monitora da Pós-Graduação junto à disciplina Genética do curso de Mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de Plantas.

Em 1996 trabalhou na Empresa Arapuim Agropecuária e Industrial S/A, com a função de melhorista de feijão.

Atuou de 1996 a 1999 como professora de Biologia em cursos de segundo grau e pré-vestibular.

De outubro de 1999 a março de 2000 foi professora substituta no curso de Agronomia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa em março de 2000, tendo defendido tese em fevereiro de 2004.

Em janeiro de 2004 aprovou uma bolsa de DCR junto ao CNPq para início de trabalho em março de 2004.

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O cultivo do feijão no Brasil	1
1.2. Centro de origem e centro de diversidade	2
1.3. Grupos gênicos	3
1.4. A mancha-angular: etiologia, sintomatologia e epidemiologia.....	4
1.5. Feijão tipo Jalo como fonte de resistência à mancha-angular.....	7
1.6. Mapa genético e suas aplicações	7
1.7. Mapeamento de QTL	8
1.8. Organização genômica de genes envolvidos em mecanismos de resistência a doenças	10
2. OBJETIVOS	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CULTIVAR JALO EEP 558 À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO

RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

AVALIAÇÃO DO CULTIVAR DE FEIJÃO MILIONÁRIO COMO PONTE NO
CRUZAMENTO ENTRE OS CULTIVARES RUDÁ E JALO EEP 558

RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES-PONTE DE FEIJOEIRO E PROPOSIÇÃO
DE UM NOVO MODELO PARA O CONTROLE DA INCOMPATIBILIDADE

RESUMO	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Material genético e cruzamentos efetuados	42
2.2. Avaliação de resistência à mancha-angular	42
2.3. Confirmação da origem dos cultivares	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Confirmação da origem	44
3.2. Identificação dos cultivares-ponte	45
3.3. Novo modelo proposto para explicar a incompatibilidade	47
3.4. Reação de resistência	51
3.5. Eficiência da ponte na transferência de genes andinos para cultivares mesoamericanos	51
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

MAPPING QTLs FOR RESISTANCE TO BEAN ANGULAR LEAF SPOT AND
CO-LOCALIZATION OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO DISEASE
RESISTANCE GENES

SUMMARY	55
1. INTRODUCTION	56
2. MATERIALS AND METHODS.....	58
2.1. Genetic material and disease evaluation.....	58
2.2. Molecular marker analyses.....	59
2.3. Linkage map.....	60

2.4. QTL mapping - Single-factor analysis	61
2.5. QTL mapping - Composite interval mapping	61
3. RESULTS AND DISCUSSION	62
4. REFERENCES.....	73
RESUMO GERAL	79

RESUMO

VILARINHO, Lucianne Braga Oliveira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Cultivares-ponte de feijoeiro, resistência à mancha-angular e mapeamento de QTLs.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Cosme Damião Cruz e Maurílio Alves Moreira.

A mancha-angular do feijoeiro comum, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, encontra-se distribuída em todas as regiões do mundo onde se cultiva esta leguminosa. No Brasil, apresenta distribuição generalizada e ocorrência freqüente, afetando, com maior ou menor intensidade, todos os cultivares recomendados para plantio. As perdas no rendimento são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença. As perdas podem variar de 7 a 70%, dependendo da suscetibilidade dos cultivares. O cultivar Jalo EEP 558, freqüentemente citado como resistente a esta enfermidade, foi caracterizado no capítulo I deste trabalho. Este cultivar mostrou-se moderadamente resistente a oito de doze isolados de *P. griseola* testados, apresentando poucas pústulas de pequeno tamanho, típicas de resistência quantitativa. Contudo, uma vez que Jalo EEP 558 é de origem andina e freqüentemente estes cultivares são incompatíveis em cruzamento com cultivares mesoamericanos, foram estudadas nos capítulos II e III alternativas para a transferência destes genes de resistência andinos para cultivares mesoamericanos, que são de maior interesse no mercado consumidor brasileiro. No capítulo II, foi testado o cultivar Milionário como ponte no cruzamento entre Jalo EEP 558 e o cultivar Rudá (grão carioca e

origem mesoamericana). Milionário já havia sido citado como ponte em outros trabalhos, no entanto, os resultados aqui obtidos demonstraram que este cultivar não foi eficiente como ponte, apresentando incompatibilidade quando cruzado com Jalo EEP 558. Sendo assim, no capítulo III foram investigados cultivares alternativos a serem utilizados como ponte, no cruzamento entre Jalo EEP 558 e Rudá. Pela avaliação dos híbridos resultantes, os cultivares andinos Diacol Calima, AND 277 e Novo Jalo apresentaram plantas normais em cruzamento com o cultivar Rudá, o mesmo foi observado para os cultivares mesoamericanos CNF10, CNF261, Small White, KW765 e KW780 em cruzamento com cultivar Jalo EEP 558. Entretanto, o modelo atualmente aceito para explicar a herança da incompatibilidade não foi adequado para justificar os dados deste trabalho. Desta forma um novo modelo foi proposto com a presença de um terceiro gene de incompatibilidade. No último capítulo deste trabalho, foi investigada a herança quantitativa da resistência do cultivar Jalo EEP 558 à mancha-angular. Locos de herança quantitativa (QTL) foram identificados e mapeados. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à ferrugem e antracnose também foram mapeados e mostraram uma organização em “cluster”. Estes dados geram importantes implicações que devem ser consideradas em programas de melhoramento de feijoeiro que visam à obtenção de cultivares com resistência múltipla. O último capítulo deste trabalho foi submetido à revista *Euphytica*, portanto encontra-se formatado para tal.

ABSTRACT

VILARINHO, Lucianne Braga Oliveira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2004. **Common bean bridge cultivars, resistance to angular leaf spot and QTL mapping.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Cosme Damião Cruz and Maurílio Alves Moreira.

Common bean angular leaf spot (ALS), caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola*, is distributed in all bean growing regions of the world. In Brazil, it is widely distributed affecting all cultivars presently recommended for cultivation. Yield losses are greater if the symptoms appear early during the growing season. They can range from 7 to 70% depending on the susceptibility of the cultivars used. Jalo EEP 558, frequently cited as resistant to ALS was evaluated. It was moderately resistant to eight out of 12 *P. griseola* isolates tested, presenting few and small sized pustules which characterize quantitative resistance. However, Jalo EEP 558 is an andean cultivar and these cultivars are often incompatible with those of mesoamerican origin. 'Milionário' was tested as a bridge cultivar in the cross between 'Jalo EEP 558' and 'Rudá' (mesoamerican with carioca type grain). 'Milionário' had already been mentioned as an effective bridge cultivar in other studies, however, our results demonstrate that this cultivar was not effective for the cross we tested. It presented incompatibility in the cross with Jalo EEP 558. Other cultivars were also tested as bridge cultivars. Andean cultivars Diacol Calima, AND 277 and Novo Jalo produced normal plants in crosses with 'Rudá'. The same was observed for crosses involving mesoamerican cultivars CNF10, CNF261, Small

White, KW765 and KW780, and andean cultivar Jalo EEP 558. However, the present model proposed to explain the inheritance of incompatibility in crosses between andean and mesoamerican cultivars was not adequate to justify the results in our work. For this reason, we propose a new model involving a third incompatibility gene. In this work, we investigated the quantitative inheritance of ALS resistance present in 'Jalo EEP 558'. Quantitative trait loci (QTLs) were identified and mapped. Molecular markers linked to resistance genes for rust and anthracnose were also mapped. The data showed that the disease resistance genes were organized in clusters. Our results have important implications and should be considered in bean breeding programs aimed to develop cultivars with multiple disease resistance.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O cultivo do feijão no Brasil

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A produção brasileira em 2003 foi de 3,055 milhões de toneladas, ocupando uma área de 5,09 milhões de hectares, o consumo per capitã foi de 17,2 kg/habitante/ano, em média (FAOSTAT – banco de dados da FAO, 2003). A produção de cerca de 3 milhões de toneladas anuais, embora seja uma das maiores do mundo, não é suficiente para o pleno abastecimento do mercado interno. Para atender a demanda interna, é necessário importar 150 mil toneladas de grãos. Este mercado pode, portanto, ser considerado como não saturado (AGRIANUAL, 1997).

Dependendo da região, o plantio de feijão é feito ao longo do ano em três épocas. A primeira, também conhecida como safra das águas, é plantada no início do período chuvoso (outubro-novembro), e a colheita se faz no início do verão; a segunda safra, ou da seca, a semeadura é feita em fevereiro-março, é muito apreciado pelos pequenos agricultores, apesar do perigo de escassez de chuvas após o mês de março. Esse cultivo possibilita a colheita em época livre de chuvas; a terceira época de plantio (outono-inverno) é praticada por produtores que utilizam, geralmente, alta tecnologia, incluindo o emprego de irrigação. A semeadura é feita de abril a julho e a colheita no inverno.

Historicamente, a maior parte da produção brasileira de feijão é oriunda de cultivos em pequena escala, predominantemente em minifúndios. Nos últimos anos, 51% da produção foram obtidos em áreas entre 10 e 100 hectares. Em estrato de 10.000 hectares, a produtividade é, em média, 108%, a mais quando comparado a estrato de 10 hectares (YOKOYAMA et al.,1996). A produtividade desta cultura no Brasil (673 Kg/ha) é inferior à média mundial. Dentre os vários fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro no Brasil, a alta incidência de doenças tem sido considerada um dos mais importantes. Segundo BORÉM e CARNEIRO (1998), mais de 45 diferentes doenças podem ocorrer na cultura do feijão no Brasil, embora apenas cerca de dez sejam realmente importantes. Algumas doenças apresentam importância estritamente regional, enquanto que outras são de distribuição generalizada. De acordo com PAULA JR. e ZAMBOLIM (1998), muitas doenças do feijoeiro podem causar, dependendo das condições de ambiente, perdas totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Dentre as doenças mais importantes do feijoeiro em Minas Gerais, a mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, tem sido apontada como a mais importante da parte aérea, causando sérios prejuízos, especialmente durante os meses de abril a julho, quando são observadas temperaturas amenas e ocorrência de orvalho.

1.2. Centro de origem e centro de diversidade

Com a descoberta das Américas pelos europeus, no século XV, o feijão foi levado ao velho mundo, onde se tornou tão familiar aos agricultores e botânicos que sua origem americana foi esquecida. DE CANDOLLE (1883), botânico ilustre do século XIX, em seu tratado sobre a origem das plantas cultivadas, colocou o feijoeiro entre as espécies de origem desconhecida. Contudo, observações arqueológicas realizadas inicialmente no Peru e posteriormente no sudeste dos Estados Unidos, permitiram inferir, mesmo antes do século XIX, que o feijoeiro tinha como centro de origem o continente Americano. Hoje não há mais dúvida de que o feijão é de origem americana. VAVILOV (1945/50), com base em seu método fitogeográfico, já mostrara, nas primeiras décadas do século XX, que o centro de diversidade genética das

espécies de feijão *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. acutifolius* localizava-se no México e na América Central, pois foi nessa área que ele encontrou a maior variedade de formas dessas espécies. Identificou ainda um centro secundário de diversidade genética na área montanhosa que compreende o Peru. Embora “centro de diversidade” e “centro de origem” não sejam necessariamente coincidentes, o descobrimento de Vavilov constitui forte indício a favor da origem americana do feijoeiro (VIEIRA et al., 1999). Mas recentemente, foram obtidas evidências botânicas, bioquímicas, arqueológicas, filológicas e históricas que certificam essa origem. Também foram obtidas informações que indicam que essa espécie foi domesticada em áreas distintas da América Latina (VIEIRA et al., 1999). GEPTS (1984) apresentou evidências filológicas e históricas a favor da origem americana do feijão. As diversas línguas nativas das Américas possuem palavras específicas para designar o feijão. Nos Andes, por exemplo, os quíchuas e os aimarás utilizam a palavra “purutu”, que deu origem a “poroto” no castelhano moderno da Argentina, do Uruguai, do Chile e da Bolívia. Textos espanhóis do século XVI fazem menção da presença do feijão nas Américas, e revelam que ele era desconhecido entre os europeus antes da descoberta do Novo Mundo. Sob o aspecto evolucionário, *P. vulgaris* é considerado não-cêntrico, isto porque possui múltiplos centros de domesticação e extensa distribuição geográfica nas Américas do Sul e Central (VIEIRA et al., 1999).

1.3. Grupos gênicos

Durante o processo de domesticação, dada à diversidade de ambientes, ocorreu a formação de diferentes conjuntos ou *pool* gênicos, em função dos diversos centros de domesticação, inclusive, em alguns casos, iniciou-se um processo de isolamento reprodutivo entre eles (VIEIRA et al., 1999). Tanto é assim, que a hibridação entre materiais diferindo no tamanho dos grãos e tipo de faseolina, que são característicos para os diferentes grupos gênicos, não apresentam, muitas das vezes, F_1 férteis.

Em muitos cruzamentos envolvendo cultivares dos dois centros de domesticação (andinos e mesoamericanos), observa-se nanismo ou fraqueza do híbrido F_1 . Este fenômeno tem sido observado por diversos autores (SINGH

e GUTIÉRREZ, 1984; GEPTS,1988; VIEIRA, 1989). Essa anormalidade faz com que as plantas F₁ morram ou tenham fraco crescimento, exibindo diversas alterações, que podem incluir esterilidade, crescimento radicular reduzido, folhas cloróticas, ausência de raízes, formação de raízes adventícias no hipocótilo e outras anormalidades (VIEIRA et al., 1999). A fraqueza do híbrido F₁ normalmente ocorre quando se cruzam cultivares de sementes pequenas e faseolina do tipo 'S' com cultivares de sementes grandes e faseolina 'T' ou 'C' (SINGH e GUTIÉRREZ, 1984; GEPTS, 1988). Portanto, ela pode acontecer quando se cruzam cultivares originários do México e da América Central com cultivares originários dos Andes. Isso é um indicativo que houve longo isolamento geográfico entre os germoplasmas das duas regiões (VIEIRA, 1999).

Os primeiros cientistas que relataram este fenômeno foram DAVIES e FRAZIER (1964) e seu controle genético da “fraqueza do híbrido” foi discutido por vários pesquisadores. A fraqueza do híbrido F₁ é governada por dois genes dominantes complementares, denominados DL1 e DL2 por SHII et al.,(1980). O gene DL1 pode ser carregado por cultivares de sementes pequenas, como Rio Tibagi e Carioca, e o gene DL2, por cultivares de sementes grandes ou médias, como preto 60 dias e Diacol Andino (SINGH e GUTIÉRREZ, 1984; VIEIRA et al., 1989). Portanto, apenas as plantas F₁ de constituição DL1_ DL2_ são anormais. Cultivares de genótipo dl1dl1dl2dl2, como o Milionário 1732 e o Rio Vermelho, produzem híbridos F₁ normais (VIEIRA et al 1999). Desta forma, quando se almeja combinar genes desejáveis entre dois parentais incompatíveis, uma linhagem compatível ou seja de genótipo dl1dl1dl2dl2, deve ser usada como uma ponte. Primeiro se processa o cruzamento de um dos parentais com a linhagem compatível, depois o pólen do híbrido F₁ deve ser usado para o cruzamento do outro parental (SINGH e GUTIÉRREZ, 1984).

1.4. A mancha-angular: etiologia, sintomatologia e epidemiologia

A mancha-angular do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, encontra-se distribuída em todas as regiões do mundo onde se cultiva esta leguminosa (SARTORATO e RAVA 1994). No Brasil, foi uma das primeiras doenças do feijoeiro a ser investigada.

De distribuição generalizada e de ocorrência freqüente, afeta, com maior ou menor intensidade, todos os cultivares recomendados. No passado, foi considerada uma doença de pouca importância por ocorrer, principalmente, no final do ciclo da cultura e por acreditar-se que causava poucos danos à cultura no que se refere à produção (VIEIRA, 1974). No entanto, alguns fatores fizeram com que a mancha-angular se tornasse uma séria ameaça à cultura do feijão. PAULA JR. e ZAMBOLIM (1998), enumeraram alguns desses fatores: (a) o plantio da cultura em novas épocas (especialmente no outono-inverno-primavera, quando as temperaturas são favoráveis à proliferação do patógeno), fazendo com que haja feijão plantado ou restos de cultura contaminados no campo durante todo o ano; (b) o plantio irrigado com pivôs-centrais, que propicia condição de alta umidade, favorável à doença; (c) a utilização de sementes contaminadas, introduzindo o patógeno em novas regiões; (d) o plantio de novas variedades, quase sempre apresentando uma base genética de resistência à doença bastante restrita; e (e) as possíveis alterações no quadro das raças do patógeno ao longo dos anos.

As perdas no rendimento são maiores quanto mais precoce for o seu aparecimento na cultura. No Brasil, conforme MORA-BRENES et al. (1983) e RAVA et al. (1985), estas perdas podem variar de 7 a 70%, dependendo da maior ou menor susceptibilidade dos cultivares, das condições de ambiente e da virulência dos isolados. Em estudos desenvolvidos por SARTORATO e RAVA (1992), foi determinado que, no geral, para cada 10% de aumento na severidade da doença, há uma redução da ordem de 7,88% no rendimento.

P. griseola foi descrito pela primeira vez como *Isariopsis griseola* por Saccardo em 1878, na Itália (ZAUMEYER e THOMAS, 1957). Este fungo pertence à classe dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), à ordem Moniliales, família Stilbaceae (BARNETT e HUNTER, 1972). Nas lesões, na face inferior das folhas, nos caules, ramos, pecíolos e vagens, o fungo produz grupos de conidióforos denominados corêmios (ZAUMEYER e THOMAS, 1957). Estes são compostos por um pequeno número de conidióforos, geralmente de 8 a 40. Além da espécie *Phaseolus vulgaris*, este patógeno ataca também *P. lunatus* (feijão-fava) e *Vigna unguiculata* (caupi) (VIEIRA, 1988). A doença é favorecida pelas condições intermitentes de frio e calor, e de seca e umidade (PASTOR-CORRALES et al., 1998). Temperaturas entre 16 e 28°C, com um ótimo em

24°C, e alta umidade são condições favoráveis à infecção (VIEIRA, 1994). A produção de sinêmios e de conídios do fungo é intensa durante períodos prolongados de alta umidade (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998). Uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece a sua disseminação. PAULA JR. e ZAMBOLIM (1998) ressaltam que os conídios podem ser disseminados em grandes distâncias por correntes de ar e por respingos de chuva. Sementes contaminadas podem transmitir o patógeno, que também pode sobreviver, de uma safra para outra, em restos de cultura deixados no campo.

A mancha-angular pode ocorrer nas vagens, caule e ramos. As primeiras lesões podem aparecer nas folhas primárias, apresentando conformação mais ou menos circular com halos concêntricos, de cor castanho-escuro. Nas folhas trifolioladas, os sintomas da mancha-angular são bastante característicos, apresentam manchas que se originam na face inferior dos folíolos, a princípio cinzentas e a seguir, pardas, sem bordas coloridas. Nessas lesões, na face inferior da folha, aparecem pontos negros muito pequenos que são as estruturas reprodutivas do patógeno (sinêmios), formados por colunas de filamentos do fungo, que carregam, na extremidade, os esporos (conídios). As manchas pardas também aparecem na superfície superior das folhas. Delimitadas pelas nervuras, as lesões têm conformação nitidamente angular, motivando o nome da doença. É comum a união de várias lesões numa mesma folha, o que causa necrose parcial, amarelecimento das folhas e por fim, sua queda prematura. Nas folhas primárias, as lesões, de coloração castanho-acinzentada, não possuem formato bem característico. Nas vagens, as manchas têm tamanho e conformação variáveis, mas são geralmente circulares ou ovais, pardo-avermelhadas, e podem apresentar bordas com coloração mais escura. Quando numerosas, coalescem, cobrindo boa porção da vagem. Vagens infectadas apresentam sementes pouco desenvolvidas. Pontos pretos, observáveis nas folhas, também surgem nas lesões das vagens. No caule e nos pecíolos as lesões são pardo-avermelhadas e alongadas, e nelas também aparecem os pontos negros (VIEIRA, 1988, 1994; PAULA JR. e ZAMBOLIM, 1998).

1.5. Feijão tipo jalo como fonte de resistência à mancha-angular

Os feijões graúdos, isto é, com mais de 0,3 g por grão, são conhecidos como “manteigão” em Minas Gerais, sendo o mais popular deles o tipo Jalo que apresenta grãos de coloração creme amarelada, seguido do pintado (VIEIRA et al., 1997). Os feijões do tipo manteigão são de origem andina (SINGH, 1991) e, segundo VIEIRA (1993), são muito susceptíveis ao oídio (*Erysiphe polygoni* DC. Ex Merat) e à mancha-gris (*Cercospora castellanii* Matta et Belliard). Entretanto, em áreas irrigadas, feijões do tipo jalo tem sido os mais plantados depois do carioca, porque, além de serem comercialmente bem aceitos, apresentam resistência a duas doenças comuns nessas condições de cultivo: murcha-de-fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxisporum* f. sp. *phaseoli* (ROCHA JR. et al., 1998), e mancha-angular (PAULA JR. et al., 1998, VIEIRA et al., 1999).

Em Goiás, o cultivar Jalo EEP 558, mostrou-se resistente à mancha-angular (RAVA et al., 1985). Também pesquisadores do CNPAF (1985), avaliando 16 cultivares de feijão frente a cinco isolados de *P. griseola*, considerados como pertencentes a raças diferentes, observaram que Jalo EEP 558 foi resistente a todos os isolados. O Jalo EEP 558 também se mostrou resistente à mancha-angular nas avaliações feitas por VIEIRA et al. (2000), nas regiões de Leopoldina e Ponte Nova, MG.

1.6. Mapa genético e suas aplicações

O desenvolvimento de mapas genéticos saturados é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, e, potencialmente, no melhoramento de plantas. No contexto do melhoramento de plantas, mapas genéticos possibilitam a cobertura e a análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Para estudos de caracterização de germoplasma, a informação de mapeamento é muito útil para selecionar um conjunto de marcadores distribuídos de maneira tal a amostrar o genoma da espécie de forma homogênea. A construção de um mapa genético gera ainda um grande número de informações básicas sobre a estrutura e a organização do genoma da espécie estudada (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Um mapa bem saturado pode auxiliar inclusive na clonagem de genes de interesse (“positional cloning”). Esse gene pode ser usado em programas de melhoramento na obtenção, por exemplo, de plantas transgênicas. Segundo GUIMARÃES e MOREIRA (1999), o mapeamento genético é uma importante metodologia alternativa na clonagem de genes, principalmente, nos casos em que o produto gênico não é conhecido.

Uma outra aplicação dos mapas, citada por FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1996), é a possibilidade que eles abrem para o estudo da arquitetura de características quantitativas, ou seja, para a identificação, mapeamento e determinação da magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle destas características, e, potencialmente, para a manipulação destes fatores em base individual durante os procedimentos de seleção e recombinação genética.

A seleção indireta usando os marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, então esse marcador pode ser usado para selecionar a característica de interesse em um programa de melhoramento. Segundo HAYWARD et al. (1994), o método mais eficaz para esse tipo de associação envolve a produção de mapas genéticos detalhados nos quais são localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTL).

1.7. Mapeamento de QTL

A maioria dos caracteres de importância econômica em agropecuária está sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes (herança quantitativa). Além disso, apresenta um padrão contínuo de variação e, desta forma, em uma dada população, não há uma clara distinção entre

classes fenotípicas de indivíduos, o que torna difícil sua manipulação e compreensão (LYNCH e WALSH,1997). Regiões genômicas contendo locos associados a tais caracteres são denominadas QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Embora os efeitos individuais dos QTLs não possam ser observados diretamente nos indivíduos de uma população, uma possibilidade seria a de identificá-los indiretamente, utilizando genes de manifestação distinguível (qualitativa), que estejam ligados aos QTLs, ou seja, em mesmo cromossomo e em posição próxima. Assim, a detecção pode ser feita através da segregação conjunta desses genes e do QTL (BEARZOTI, 2000).

Utilizando a informação indireta dos marcadores, é possível, portanto, construir um mapa genético no qual os QTLs podem ser localizados. O mapeamento de QTLs possibilita não apenas sua localização física mas também permite estimar o número de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos e as interações com outros QTLs (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). O mapeamento de QTLs baseia-se em testes de associação entre marcadores moleculares e dados fenotípicos, por meio de várias metodologias estatísticas. Os procedimentos mais simples para a detecção de tais associações são os modelos de regressão linear e análise de variância, que analisam a distribuição dos valores fenotípicos para cada marcador, separadamente. Esta metodologia é de execução simples, bastante flexível e não requer a construção de mapas genéticos. No entanto, não permite a identificação da posição do QTL nem a magnitude do seu efeito. Uma alternativa para aumentar o poder de detecção das associações e para estimar o efeito e a posição dos QTLs tem sido o mapeamento por intervalo, proposto por LANDER e BOTSTEIN (1989). Tal metodologia é mais precisa para estimar o efeito e a posição do QTL, uma vez que analisa cada centimorgan (cM) do genoma mapeado. No entanto, é uma metodologia mais complexa que necessita tanto da construção de mapas genéticos quanto da utilização de programas computacionais específicos para as análises (LYNCH e WALSH,1997).

Atualmente, novos modelos têm sido propostos com o objetivo de aumentar a resolução do mapeamento de QTL, como o mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1994) e o mapeamento por intervalos múltiplos (KAO et al., 1999). Contudo, o sucesso na detecção de QTLs por meio de

marcadores moleculares depende da magnitude do efeito do QTL, do tamanho da população em estudo, do nível de saturação do mapa genético, da precisa quantificação dos dados fenotípicos e da utilização de uma estatística adequada.

1.8. Organização genômica de genes envolvidos em mecanismos de resistência a doenças

Dados da genética clássica e molecular mostram que genes que determinam resistência a doenças em plantas se encontram freqüentemente agrupados no genoma. A resistência a muitas doenças em plantas é determinada por membros individuais de famílias de genes dominantes, cada membro conferindo resistência a uma raça específica do patógeno (MICHELMORE e MEYERS, 1998).

No feijoeiro-comum, CORRÊA (1999) iniciou o estudo da organização de diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro com o auxílio de marcadores moleculares RAPD. Utilizando a técnica de inoculações múltiplas com diferentes raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* em populações F2 derivadas do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto 111 e as respectivas famílias F2:3. CORRÊA (1999) demonstrou que a resistência a quatro raças fisiológicas de *U. appendiculatus* e duas de *C. lindemuthianum* presente em Ouro Negro estão agrupados em uma única região cromossômica e que os genes de resistência a duas raças fisiológicas de *P. griseola* são independentes entre si e dos genes de resistência a *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*.

A organização de diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro de feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular foi estudada também por FALEIRO (2000) com o auxílio de marcadores moleculares. Uma população de 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) obtidas do cruzamento inicial entre Ouro Negro e Rudá foram inoculadas com sete raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*, três de *Colletotrichum lindemuthianum* e quatro de *Phaeoisariopsis griseola*. A análise da segregação da resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular na população de 154 RIL's revelou diferentes modos de herança da resistência a cada uma das

raças fisiológicas. A análise de ligação genética revelou o agrupamento dos diferentes genes de resistência à ferrugem e à antracnose no mesmo grupo de ligação. Os genes de resistência à mancha-angular também foram mapeados juntos, porém em outro grupo de ligação. Esta organização de genes de resistência em “cluster”, deve ser considerada em programas de melhoramento, principalmente aqueles que visão a piramidação como estratégia de obtenção de cultivares resistentes.

O complexo *rp1* é uma família de genes de resistência à ferrugem comum no milho. Desde 1960, análises genéticas deste complexo têm fornecido informações sobre a estrutura e a evolução de genes de resistência. SAXENA e HOOKER (1968) identificaram 16 diferentes genes em *rp1* usando uma coleção extensa de patógenos de ferrugem, destes, 14 foram designados *Rp1* (*Rp1-A* a *Rp1-N*) depois que eles foram mapeados para um único loco. Dois outros genes, designados *Rp5* e *Rp6*, apresentaram uma relativa frequência de recombinação com genes *Rp1*, indicando que eles estavam a pelo menos uma unidade de mapa de distância. Similarmente, o gene *Rp1-G* foi subsequente designado de *RpG*, após ele ter sido mapeado a aproximadamente duas unidades de mapa dos genes *Rp1* (SUDUPAK et al., 1993).

Freqüentemente, genes de resistência têm sido identificados em blocos, regiões altamente duplicadas com múltiplos genes organizados em tandem e possivelmente codificando resistência a diversos patógenos. As famílias multigênicas *Cf* em tomate, o loco *M* em linho, o loco *Xa21* em arroz e o grupo *Dm* em alface, exibem esta organização (MICHELMORE e MEYERS, 1998).

Análises genéticas demonstraram que pelo menos 15 genes dominantes para resistência ao míldio (genes *Dm*) estão localizados em pelo menos três grupos maiores no genoma de alface (BONNIER et al., 1994). O *Dm3*, que está localizado no grupo maior, pertence a uma família multigênica de seqüências candidatas a genes de resistência (RGC), a família RGC2, que codifica membros NBS-LRR, uma classe de proteínas de resistência (MEYERS et al., 1999). Membros da família estão agrupados em uma região que envolve *Dm3* e se estende por pelo menos 3,5 Mb. A família RGC2 é altamente complexa e possui várias repetições, contendo mais de 24 membros que se associam aos mesmos marcadores moleculares, e possuem 53-96% de seqüências

nucleotídicas idênticas. Análises de mutantes e transgênicos demonstraram que o membro da família, RGC2B, codifica especificamente Dm3 (CHIN, 2001).

As plantas são hospedeiras de milhares de doenças infecciosas causadas por diversos agentes fitopatogênicos, tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides. Uma pequena proporção de patógenos invade com sucesso a planta alvo causando doenças. Plantas reconhecem e resistem a muitos patógenos invasores por induzirem uma rápida resposta defensiva, chamada reação de hipersensibilidade (HR). Esta reação resulta na morte da célula e do tecido no sitio de infecção, desta forma a infecção é contida e não se dissemina pela planta (BAKER et al., 1997).

O mecanismo molecular envolvido nesse processo, é constituído por uma molécula codificada pelo gene Avr de um patógeno que, após ser reconhecida por meio de uma complementação com o receptor em um genótipo particular de planta, inicia a resposta de hipersensibilidade e outras respostas de defesa da planta, incluindo o acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRs). Esse mecanismo nada mais é que um mecanismo de transdução de sinais. Segundo TANG et al. (1996) e SCOFIELD et al. (1996), o receptor, codificado pelo gene R na planta, reconhece o elicitor (corresponde à molécula sinalizadora), secretado pelo patógeno, e ativa uma cascata de transdução de sinais que leva à HR e/ou a resposta resistente.

Segundo HAMMOND-KOSACK e JONES (1997), proteínas R ativam múltiplas vias de sinalização simultaneamente. A interação Pto/AvrPto é o único exemplo que fornece conhecimentos sobre a cascata de sinais iniciada após o contato físico entre as duas proteínas. Por meio da técnica “yeast two-hybrid system” constatou-se que Pto interage com outra serina/treonina cinase, Pti1, a qual se torna fosforilada via Pto. Pto, unida com Prf, é requerida para a indução da resposta de hipersensibilidade após a percepção de AvrPto. Interessantemente, Pto também interage com uma família de fatores de transcrição - Pti4, Pti5 e Pti6 - que se ligam a um elemento cis conservado, presente no promotor de regiões de vários genes que codificam proteínas PR básicas. Este mecanismo de transdução de sinais mencionado envolve receptor cinase citoplasmático (Pto) e não de membrana. BENT (1996) ressalta, no entanto, que é interessante comparar Xa21 com Pto/Ptf (essas proteínas só desencadeiam a cascata quando estão unidas). Pto possui

apenas o domínio cinase, Prf o domínio LRR (além de outros), e Xa21 possui ambos os domínios LRR e cinase. Essa similaridade, poderia sugerir mecanismos parecidos de transdução de sinais.

De um modo geral, a interação receptor/elicitador induz uma resposta imediata, como a ativação de proteínas cinases e fosfatases, ativação de fatores de transcrição, produção de oxigênio reativo e indução de fluxo iônico através da membrana celular (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK e JONES,1997). Esses e outros eventos ativam resposta de defesa, tal como engrossamento da parede celular e expressão de genes relacionada com a defesa (BENT, 1996). BENT relata, ainda, sobre um componente “downstream” da transdução de sinais de defesa e que tem uma particular ênfase, que é o ácido salicílico. O ácido salicílico é um sinal intermediário que promove uma resistência adquirida sistêmica, um processo em que infecções localizadas induzem um aumento quantitativo de resistência tanto local quanto em tecidos distantes do sítio da infecção original.

Com base nessas observações mencionadas acima, pode-se verificar que o mecanismo de resistência de plantas a patógenos, é um mecanismo típico de transdução de sinais, onde um receptor, de membrana ou citoplasmático, cinase ou não, recebe e reconhece uma molécula sinal externa e a transmite, amplifica e direciona internamente, desencadeando a defesa da planta.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a resistência do cultivar Jalo EEP 558 frente ao fungo causador da mancha-angular *Phaeoisariopsis griseola*, identificar cultivares-ponte que pudessem ser usadas no processo de transferência destes genes de resistência identificados no Jalo EEP 558 para o cultivar Rudá, e identificar em um mapa previamente construído as regiões de resistência parcial do cultivar Jalo EEP 558 à mancha-angular.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Estudar o potencial do Jalo EEP 558, como fonte de resistência à mancha-angular.
- 2) Identificar marcadores moleculares ligados a regiões de resistência parcial presente no cultivar Jalo EEP 558.
- 3) Identificar cultivares-ponte, capazes de auxiliar no processo de transferência gênica entre cultivares andinos e mesoamericanos.
- 4) Avaliar a eficiência do cruzamento-ponte, na transferência do(s) gene(s) de resistência do Jalo EEP 558 para o Rudá.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 97. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, 1999. 435p.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S.P., Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, p.726-733, 1997.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.
- BEARZOTI, E. **Mapeamento de QTL**. In: PINHEIRO, J.B., CARNEIRO, I.F. (Eds). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**, Goiânia, 2000. p.63-224.
- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: Function meets structure. **Plant Cell**, v. 8, p. 1757-1771, 1996.
- BONNIER, F.J.M., REININK, K., GROENWOLD, R. Genetic analysis of *Lactuca* accessions with new major gene resistance to lettuce downy mildew. **Phytopathology** v. 84, p. 462-468, 1994.
- BORÉM, A., CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C., PAULA JR., T. J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**: Viçosa: Editora UFV, 1998. p.13-17.
- CHIN, D.B., ARROYO-GARCIA, R., OCHOA, O.E., KESSELI, R.V., LAVELLE, D.O., MICHELMORE, R.W., Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). **Genetics**, v.157, p. 831-849, 2001.
- CNPAF. Relatório científico 1984. Goiânia: Embrapa, 1985. p.149-150.

- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 115p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa.
- DAVIS, D. W., FRAZIER, W. A. The incidence of three abnormalities in F₂ progeny of crosses between true bushes and blue lake derived bush snap beans. **Ann. Rept. Bean Impr. Coop.** v. 7, p.14-16, 1964.
- DE CANDOLE, A. **Origine des plantes cultivées.** Paris: Librairie Germer Bailliére et C.^{ie} 1883. 377p.
- FALEIRO, F.G., **Melhoramento e mapeamento genético do feijoeiro comum: Análise de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 191p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa.
- FAOSTAT. Agriculture data. <http://www.fao.org>. 2003.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2^a ed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1996. 220p.
- GEPTS, P. **Nutritional and evolutionary implications of phaseolin seed protein variability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** Madison: Univ. of Wisconsin. 1984. 209p. (Ph. D. Thesis)
- GEPTS, P. Phaseolin as an evolutionary marker. In: Gepts, P. (Ed.) **Genetic resourcers of phaseolus beans.** Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 215-241.
- GEPTS, P., DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (Eds.). **Common beans: research for crop improvement.** Wallingford: CAB international, 1991. p. 7-53,
- GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 48, p. 575-607, 1997.
- HAYWARD, M.D., McADAM, N.J., JONES, J.G., EVANS, C., EVANS, G.M., FORSTER, J.W., USTIN, A., HOSSAIN, K.G., QUADER, B., STAMMERS, M., WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v. 77, p. 269-275, 1994.
- KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.152, p.1203-1216, 1999.

- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.,1997. 980p.
- MEYERS, B.C., DICKERMAN, A.W., MICHELMORE, R.W., PECHERER, R.M., SIVARAMAKRISHAN, S. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 20, p. 317-332, 1999.
- MICHELMORE, R.W., MEYERS, B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Res.** v. 8, p. 1113-1130, 1998.
- MORA-BRENES, B., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p.599,1983.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C., SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v.103, n.2, p.161-171, 1998.
- PAULA JR., T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JR., T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.375-433.
- RAVA, S.C.A., SARTORATO, A., CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Ann. Rept. Bean Impr. Coop.** v.28, p.5-6, 1985.
- ROCHA JR., W.C., SANTOS, J.B., MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares de linhagens de feijão a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 23, p. 407-409, 1998.
- SANTOS, M.L., BRAGA, M.J. Aspectos econômicos. In: VIEIRA, C., PAULA JR., T.J., BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.10-53.
- 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**, v.17, p.247-251,1992.
- SARTORATO, A., RAVA, C.A. Mancha-angular. In: Sartorato, A., Rava, C.A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMRAPA-SPI, 1994. p. 41-68.

- SAXENA, K.M.S., HOOKER, A.L. On the structure of a gene for disease resistance in maize. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.61, p. 1300-1305, 1968.
- SCOFIELD, S.R., TOBIAS, C.M., RATHJEN J.P., CHANG, J.H., LAVELLE, D.T., MICHELMORE, R.W., STASKAWICZ, B.J. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. **Science**, v. 274, p. 2063-2065, 1996.
- SHII, C.T., TEMPLE, S.R., MORK, D.W. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L.: Interaction between temperature and allelic dosage. **J. Hered.**, v. 71, p. 219- 222, 1980.
- SINGH, S.P. Breeding for seed yield. In: Van Schoonhoven A., Voysest, O. (Eds). **Common beans. Research for crop improvement**. Wallingford, CAB Internacional,1991. p. 383-443.
- SINGH, P., GUTIERREZ, J. A. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L. , their association with seed size and their significance to breeding. **Euphatica**, v.33 p.337-345, 1984.
- SUDUPAK, M.A., BENNETZEN, J.L., HULBERT, S.H. Unequal exchange and meiotic instability of disease resistance genes in the Rp1 region of maize. **Genetics**, v. 133, p. 119-125, 1993.
- TANG, X., FREDERISH, R.D., ZHOU, J., HALTERMAN, D.A., JIA, Y., MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v. 274, p. 2060-2063, 1996.
- VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. **Chronica Bot.**, 1949/1950.13:1-366.
- VIEIRA, A.L., RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, v.12. p. 169-171, 1989.
- VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de Minas Gerais, IV: estudos realizados no período de 1970 à 1973. **Revista Ceres**, Viçosa, v.16, p. 470-485,1974.
- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1988. 231p.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. In: **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.46-53, 1994.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV,1999. p. 273-349.

- VIEIRA, R.F., VIEIRA, C., ABREU, A.F., BERGER, P.G. Comportamento de cultivares de feijão do tipo manteigão em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 44, n. 256, p. 666-675, 1997.
- VIEIRA, R.F., VIEIRA, C., CARDOSO, R.A.L., SILVA, J.I. Comportamento de variedades e linhagens de feijão do tipo Jalo em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 47, p.145-153, 2000.
- YOKOYAMA, L.P., BANNO, K., KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura In: ARAÚJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M.J.de O. (Eds). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**, Piracicaba: Potafos. 1996. p. 1-20.
- ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington: USDA, 1957. 255p. (USDA. Technical Bulletin, 868).
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1468, 1994.

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CULTIVAR JALO EEP 558 À MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO.

RESUMO

A mancha-angular do feijoeiro é causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, que apresenta extensa variabilidade. Esse fato, somado às constantes mudanças no panorama produtivo do feijoeiro no Brasil, favorecem a ocorrência deste patógeno já no início do cultivo, sendo importante que os pesquisadores se esforcem para monitorar a resistência de cultivares aos novos patótipos, uma vez que o uso de cultivares resistentes é a melhor estratégia de controle dessa doença. Com o objetivo de detectar novas fontes de resistência à mancha-angular, o cultivar Jalo EEP 558 foi caracterizado frente a 12 isolados de *P. griseola*. Na avaliação da doença, o cultivar Jalo EEP 558 apresentou uma resistência moderada a maioria dos isolados testados, o que sugere a presença, neste cultivar, de um sistema de defesa ampla e que, na maioria das vezes, é quantitativa. Herança poligênica de resistência tem sido identificada, embora com baixa frequência, principalmente devido ao fato de ser mais difícil o estudo deste tipo de resistência. Entretanto é factível que a resistência do cultivar Jalo EEP 558 a *P. griseola* esteja sob controle de múltiplos genes, com um ou mais genes de efeito maior.

Palavras-Chave: *Phaeoisariopsis griseola*; resistência à doença; melhoramento do feijoeiro.

1. INTRODUÇÃO

Os feijões (*Phaseolus vulgaris*) graúdos, isto é, que normalmente pesam mais de 0,3 g por unidade, são conhecidos por manteigão em Minas Gerais, sendo o mais popular deles o do tipo jalo que apresenta grão de coloração creme amarelada, seguido do pintado (Vieira et al., 1997). Os feijões do tipo manteigão são de origem andina (Singh, 1991) e, segundo Vieira (1993), são muito susceptíveis ao oídio (agente causal: *Erysiphe polygoni* DC. Ex Merat) e à mancha-gris (agente causal: *Cercospora castellanii* Matta et Belliard). Entretanto, em áreas irrigadas, o jalo tem sido o mais plantado depois do carioca, uma vez que, além de ser comercialmente bem aceito, apresenta resistência a duas doenças comuns nessas condições de cultivo: murcha-de-fusarium, causada pelo fungo *Fusarium oxisporum* f. sp. *phaseoli* (Rocha Jr. et al., 1998), e mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Paula Jr. et al., 1998, Vieira et al., 1999).

Em Goiás, o cultivar Jalo EEP 558 mostrou-se resistente à mancha-angular (Rava et al., 1985). Pesquisadores do CNPAF (1985), avaliando 16 cultivares de feijão quanto à resistência a cinco isolados de *P. griseola*, pertencentes a diferentes raças, observaram que o Jalo EEP 558 foi resistente a todos os isolados. Este cultivar também mostrou-se resistente à mancha-angular nas avaliações feitas por Vieira et al. (2000), nas regiões de Leopoldina e Ponte Nova. Entretanto, Sartorato et al. (1991) verificaram que Jalo EEP 558 é suscetível a certos tipos de isolados.

O fungo *P. griseola* apresenta uma extensa variabilidade (Pastor-Corrales & Paula Jr., 1996; Paula Jr & Zambolim, 1998). Esse fato, somado às constantes mudanças no panorama produtivo do feijoeiro no Brasil, como por

exemplo, o uso de irrigação por pivô-central, favorece a ocorrência desse patógeno já no início do cultivo. Portanto, é importante que os pesquisadores se esforcem para monitorar a resistência de cultivares aos novos patótipos, uma vez que o uso de cultivares resistentes é a melhor estratégia de controle, sobretudo pela eficiência, economia e menor prejuízo ao meio ambiente (Ramalho & Abreu, 1998).

A incorporação de genes de resistência de origem andina em cultivares mesoamericanos tem sido sugerida por vários pesquisadores como estratégia de desenvolvimento de cultivares com resistência duradoura (Pastor-Corrales et al., 1998). Isto se deve à co-evolução patógeno/hospedeiro, que faz com que genes de resistência de origem mesoamericana sejam mais efetivos contra patógenos andinos e vice-versa (Guzmán et al., 1995).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a resistência do cultivar Jalo EEP 558 frente a sete raças de *P. griseola*, uma vez que este cultivar representa potencial fonte de genes de resistência andinos que podem ser incorporados a genótipos mesoamericanos, mais comumente cultivados no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da resistência do Jalo EEP 558 à mancha-angular, foram utilizados doze isolados correspondentes a sete raças diferentes: 61.41 (isolado 116-1), 63.19 (isolados 48-1 e 144-3), 63.55 (isolados 29-3 e 592-3), 63.23 (isolados 158-1, 109-1, 114-3), 63.47 (isolados 221-10 e 316-6), 63.31 (isolado 113-2) e 31.39 (isolado 122-5). Estes isolados pertencem a micoteca do Instituto de Biotecnologia (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Eles foram obtidos a partir de cultura monospórica, o que lhes assegura a pureza genética. Os isolados foram mantidos em placa de petri ou tubo de ensaio contendo meio de sucos de vegetais V8 (Campbel Soup Company, EUA) ou meio BDA (Batata dextrose + Agar). Para repicagem em laboratório, foram adicionados 2 mL de água estéril em cada tubo, obtendo-se uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio. Foram depositados 0,5 mL dessa suspensão no centro de placas contendo meio V8 ou BDA. Em seguida, as placas foram incubadas por 12 dias, no escuro, a 24°C. Este procedimento permitiu a obtenção de altos níveis de esporulação. A classificação dos isolados em raças foi realizada em trabalho anterior, usando a série diferenciadora para mancha-angular (Nietsche, 2000; Nietsche et al., 2001).

Sementes do cultivar Jalo EEP 558 e dos cultivares Rudá e Rosinha utilizados neste trabalho como testemunhas, foram plantadas em vasos contendo 3 plantas cada, em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Foram avaliadas 12 plantas para cada isolado testado, no período de 2000 a 2003. As plantas foram inoculadas aos 25 dias após a germinação, utilizando uma suspensão de esporos de 2×10^4 conídios/ml. Após a inoculação, as plantas foram incubadas

em câmara de nevoeiro (>90% de umidade relativa, 21°C) durante 48 h e, então, transferidas para casa de vegetação. As avaliações dos sintomas da doença foram realizadas aos 15 e 21 dias após a inoculação, por meio de uma escala de notas variando entre 1 (plantas com ausência de sintomas) a 9 (plantas muito susceptíveis) (Van Schoonhoven & Pastor Corrales, 1987). Para os objetivos deste trabalho, as plantas foram classificadas em resistentes (R, notas de 1 a 3), intermediárias (I, notas 4 e 5) ou suscetíveis (S, notas de 6 a 9).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivar Jalo EEP 558 apresentou suscetibilidade a quatro dos 12 isolados testados, resistência intermediária a 8 dos isolados (considerando o isolado 116-1 como I e S) e resistência a apenas um dos isolados, como está ilustrado na Tabela 1.

TABELA 1: Reação do cultivar Jalo EEP 558 a 19 isolados de *Phaeoisariopsis griseola*

Raça	Isolado	Data	Reação
61.41	116-1	14/11/2000	S
	116-1	03/10/2001	I
63.19	48-1	14/11/2000	I
	144-3	14/11/2000	I
	48-1	13/12/2001	I
63.55	29.3	13/12/2001	S
	29.3	28/08/2002	S
	29.3	16/04/2003	S
	592-3	26/04/2003	I
63.23	158-1	14/11/2000	R
	109-1	14/11/2000	I
	114-3	14/11/2000	I
	158-1	16/04/2003	R
	109-1	26/04/2003	I
63.47	221-10	14/11/2000	S
	316-6	13/12/2001	S
63.31	113-2	14/11/2000	I
31.39	122-5	14/11/2000	I

Jalo EEP 558 apresentou reações distintas para a raça 61.41 nos anos de 2000 e 2001, indicando que houve uma interação patótipo x ano. Entretanto, esta interação só foi observada para esta raça do patógeno.

Para a raça 63.55 o isolado 29.3 foi testado nos anos de 2001, 2002 e 2003 sendo sempre consistente a reação de suscetibilidade, entretanto quando foi testado o isolado 592-3, também classificado como raça 63.55, a reação foi de resistência intermediária. O mesmo foi observado para a raça 63.23, para a qual Jalo EEP 558 não apresentou sintomas de resistência consistentes para os isolados 158-1, 114-3 e 109-1. Este fato pode ser atribuído a novos genes de resistência do cultivar Jalo EEP 558, capazes de segregar isolados classificados em uma mesma raça pela série diferenciadora. Seria recomendável, avaliar, a inclusão deste cultivar na série diferenciadora para mancha-angular. Em trabalhos de avaliação do cultivar andino AND 277, Sartorato et al. (1999) encontraram resultados semelhantes aos aqui verificados, e sugeriram a incorporação do cultivar AND 277 na série diferenciadora.

Jalo EEP 558 apresentou uma resistência moderada à maioria dos isolados, o que sugere a presença, neste cultivar, de um sistema de defesa ampla e que na maioria das vezes é quantitativa. Herança poligênica de resistência tem sido identificada, embora com baixa frequência, principalmente devido ao fato de ser mais difícil o estudo deste tipo de resistência (Ribeiro do Vale et al., 2001). Entretanto é factível que a resistência a *P. griseola* esteja sob controle de múltiplos genes, com um ou mais genes de efeito maior. Este tipo de resistência já tem sido observada para outros patógenos causadores de antracnose, ferrugem, vírus do mosaico dourado, crestamento bacteriano (Singh, 2001). É importante salientar, que as inoculações e as condições de

incubação foram propícias ao desenvolvimento do patógeno, que encontrou um ambiente ótimo para seu desenvolvimento. Contudo, no campo nem sempre estas condições são observadas. Sendo assim, cultivares com resistência intermediária nessas condições podem apresentar um maior nível de resistência no campo. Todas as avaliações foram realizadas em casa de vegetação, sendo indicada a repetição deste trabalho no campo.

Para um melhor entendimento desse sistema e para a sua utilização de modo racional em programas de melhoramento, seria interessante mapear os QTLs controladores da resistência à mancha-angular em Jalo EEP 558.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CNPAF. 1985. Relatório científico 1984. Goiânia: Embrapa.p.149-150.
- Guzmán, P., R.L. Gilbertson, R. Nodari, W.C. Johnson, S.R. Temple, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire & P. Gepts, 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85: 600-607.
- Nietsche, S. Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares para resistência. Viçosa, MG: UFV, 2000. 74p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa.
- Nietsche, S., A. Borém, G.A. Carvalho, T.J. Paula-JR, C.F. Ferreira, E.G. Barros & M.A. Moreira, 2001. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Euphytica* 117: 77-84.
- Pastor-Corrales, M. A. & T.J. Paula-JR, 1996. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, 5, 1996, Goiânia. Anais, Goiânia, EMBRAPA-CNPAF-APA 1:23-41.
- Pastor-Corrales, M. A., C. Jara & S.P. Singh, 1998. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. *Euphytica* 103:161-171.
- Paula-JR, T. J. & L. Zambolim, 1998. Doenças. In: Vieira, C., Paula-JR, T. J., Borém, A. (Eds). Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas: Viçosa, Editora UFV, p.375-433.
- Paula-JR, T. J., S. Nietsche, G.A. Carvalho, C.F. Ferreira, A. Borém, E.G. Barros & M.A. Moreira, 1997. Resistência à mancha-angular de cultivares de feijão recomendados para Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 22: 294.
- Ramalho, M. A. P. & A. F. B. Abreu, 1998. Cultivares. In: Vieira, C., Paula-JR, T. J., Borém, A. (Eds). Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais, Viçosa: Editora UFV, p.435-449.
- Rava, C.A., A. Sartorato & J.R.P. Carvalho, 1985. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 28:5-6.
- Ribeiro do Vale, F.X., J.E. Parlevliet & L. Zambolim, 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira* 26: 577-589.
- Rocha Júnior, W. C., J.B. Santos & M.C. Mendes-Costa, 1998. Reação de cultivares de linhagens de feijão a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 23: 407-409.

- Sartorato, A., S. Nietsche, E.T. Caixeta, E.G. Barros & M.A. Moreira, 1999. Contribution to increase the usefulness of the present differential series for common bean angular leaf spot. Annual Report of the Bean Improvement 42:19-20.
- Sartorato, A., C.A. Rava, J.O.M. Menten & A. Bergamim Filho, 1991. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola*. Fitopatologia Brasileira 16:43-46.
- Singh, S.P., 1991. Breeding for seed yield. In: Van Schoonhoven A. & Voysest, O. (Eds). Common beans. Research for crop improvement. Wallingford, CAB Internacional, p. 383-443.
- Singh, S.P., 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. Crop Sci. 41: 1659-1675.
- Van Schoonhoven, A. & M.A. Pastor-Corrales (Comps.), 1987. Standard system for evaluation of bean germplasm. Cali, Colombia: CIAT, 54p.
- Vieira, C., 1993. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa, UFV, 231 p.
- Vieira, C., A. Borém & M.A.P. Ramalho, 1999. Melhoramento do feijão. In: Borém, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas: Viçosa: Editora UFV, p.273-349.
- Vieira, R.F., C. Vieira, A.F. Abreu & P.G. Berger, 1997. Comportamento de cultivares de feijão do tipo manteigão em Minas Gerais. Revista Ceres, 44: 666-675.
- Vieira, R.F., C. Vieira, R.A.L. Cardoso & J.I. Silva, 2000. Comportamento de variedades e linhagens de feijão do tipo Jalo em Minas Gerais. Revista Ceres, 47:145-153.

AVALIAÇÃO DO CULTIVAR DE FEIJÃO MILIONÁRIO COMO PONTE NO CRUZAMENTO ENTRE OS CULTIVARES RUDÁ E JALO EEP 558

RESUMO

Em muitos cruzamentos envolvendo cultivares de feijão andinos e mesoamericanos, tem sido observado nanismo ou fraqueza do híbrido F_1 . Essa anormalidade faz com que as plantas F_1 morram ou tenham fraco crescimento, exibindo diversas alterações, que podem incluir esterilidade, crescimento radicular reduzido, folhas cloróticas, ausência de raízes, formação de raízes adventícias no hipocótilo, entre outras. A fraqueza do híbrido F_1 é governada por dois genes dominantes complementares, denominados DL1 e DL2. Cultivares de genótipo dl1dl1dl2dl2, como o Milionário e o Rio Vermelho, sempre produzem híbridos F_1 normais. Desta forma, quando se almeja combinar genes desejáveis entre dois parentais incompatíveis, uma linhagem compatível, de genótipo dl1dl1dl2dl2, deve ser usada como ponte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do cultivar Milionário como ponte na incorporação de genes de resistência à mancha-angular do cultivar andino Jalo EEP 558 para o cultivar mesoamericano Rudá. De acordo com os resultados observados, conclui-se que o cultivar Milionário não pode ser utilizado como ponte neste cruzamento, visto que, quando cruzado com o Jalo EEP 558, o híbrido resultante apresentou uma reação característica de incompatibilidade. Este resultado está em desacordo com resultados previamente publicados, que sugerem o cultivar Milionário como ponte.

Palavras-Chave: Incompatibilidade, melhoramento do feijoeiro, conjuntos gênicos.

1. INTRODUÇÃO

No melhoramento genético do feijoeiro, a piramidação de genes de resistência andinos e mesoamericanos em um único genótipo de interesse tem sido sugerida como uma estratégia eficiente para a obtenção de resistência ampla e durável (Young e Kelly, 1996; Pastor-Corrales et al., 1998). Devido à co-evolução patógeno/hospedeiro observada no feijoeiro, genes de resistência de origem mesoamericana são mais efetivos contra patógenos de origem andina e genes de resistência de origem andina são mais efetivos contra patógenos de origem mesoamericana (Guzmán et al., 1995). Sendo assim, os melhoristas de feijão têm uma oportunidade única de piramidar genes de resistência dos dois grupos para desenvolver resistência complementar a um grande número de raças (Kelly e Miklas, 1998).

Em muitos cruzamentos envolvendo cultivares andinos e mesoamericanos, entretanto, tem sido observado nanismo ou fraqueza do híbrido F_1 (Singh e Gutiérrez, 1984; Gepts, 1988; Vieira, 1989). Essa anormalidade faz com que as plantas F_1 morram ou tenham fraco crescimento, exibindo diversas alterações que podem incluir esterilidade, crescimento radicular reduzido, folhas cloróticas, ausência de raízes, formação de raízes adventícias no hipocótilo, entre outras (Vieira et al., 1999).

A fraqueza do híbrido F_1 é governada por dois genes dominantes complementares, denominados DL1 e DL2 por SHII et al. (1980). O gene DL1 normalmente está presente em cultivares de sementes pequenas, como Rio Tibagi e Carioca, e o gene DL2, em cultivares de sementes grandes ou médias, como Preto 60 Dias e Diacol Andino (Singh e Gutiérrez, 1984; Vieira et al., 1989). Portanto, apenas as plantas F_1 de constituição DL1_ DL2_ são anormais. Cultivares de genótipo dl1dl1dl2dl2, como o Milionário e o Rio Vermelho, produzem híbridos F_1 normais (Vieira et al., 1989; Vieira et al., 1999). Desta forma, quando se almeja combinar genes desejáveis entre dois parentais incompatíveis, uma linhagem compatível, de genótipo dl1dl1dl2dl2, deve ser usada como ponte. Primeiro se processa o cruzamento de um dos parentais com a linhagem ponte, depois o pólen do híbrido F_1 deve ser usado para o cruzamento com o outro parental (Singh e Gutiérrez, 1984).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do cultivar Milionário como ponte na incorporação de genes de resistência à mancha-angular do cultivar andino Jalo EEP 558 no cultivar mesoamericano Rudá. Este problema de incompatibilidade normalmente é verificado em cruzamentos entre cultivares andinos e mesoamericanos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas dos cultivares Jalo EEP 558 (andino), Rudá (mesoamericano) e Milionário (mesoamericano) foram cruzadas em esquema dialélico. Os cruzamentos foram realizados em março de 2001 em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para verificar o efeito da temperatura na manifestação da incompatibilidade, as sementes F_1 , provenientes do dialélico e as sementes dos respectivos parentais, foram semeadas em quatro épocas distintas: julho, setembro, novembro de 2001 e janeiro de 2002.

Shii et al. (1980, 1981) demonstraram que o efeito dos genes de incompatibilidade, principalmente o DL1, se manifesta primeiramente nas raízes. Sendo assim, na terceira época de avaliação (novembro/2001), as sementes foram submetidas a dois tratamentos distintos. No primeiro tratamento, as sementes foram desinfetadas com água sanitária e colocadas para germinar em meio de cultura contendo ágar e hormônio de enraizamento AIB (Ácido Indol Butírico) e, em seguida, foram levadas para uma câmara de crescimento. Duas semanas depois, as plantas foram transplantadas para vaso contendo solo autoclavado e, após três dias, foram levadas para casa de vegetação. No segundo tratamento, as sementes foram plantadas diretamente em vasos na casa de vegetação. Em ambos os tratamentos, foram feitas irrigações semanais com solução nutritiva e hormônio de enraizamento AIB.

As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30 e 40 dias após o plantio, nas quatro épocas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro épocas distintas de avaliação, as plantas F₁ provenientes do cruzamento entre Jalo EEP 558 e Rudá apresentaram a incompatibilidade típica já esperada entre andinos e mesoamericanos (Tabela 1). O cultivar Milionário, citado na literatura como ponte, se mostrou incompatível quando cruzado com o Jalo EEP 558. Os indivíduos F₁ do cruzamento entre os dois cultivares mesoamericanos, Rudá e Milionário, apresentaram compatibilidade, como esperado. No entanto, este híbrido quando cruzado com Jalo EEP 558 apresentou incompatibilidade (Tabela 1).

TABELA 1. Fenótipo observado nas plantas F₁ de diferentes cruzamentos

	Jalo EEP 558	Rudá	Milionário	Rudá x Milio (F1)
Jalo EEP 558		Incompatível	Incompatível	Incompatível
Rudá	Incompatível		Compatível	Compatível
Milionário	Incompatível	Compatível		Compatível
Rudá x Milion.	Incompatível	Compatível	Compatível	

Aos 10 dias após a germinação, nenhum híbrido apresentou alteração fenotípica típica de incompatibilidade. Aos 20 dias, as plantas F₁ não apresentaram reação visível de incompatibilidade, porém, um retardamento no crescimento começou a se manifestar. Aos 30 dias, os híbridos apresentaram uma paralisação completa do crescimento e as folhas apresentaram clorose que foi se generalizando com o passar dos dias. Aos 40 dias, as plantas apresentaram clorose generalizada, as folhas entraram em estágio de murcha, depois necrose, culminando com a sua queda (Figura 1).

Em todas as épocas plantadas, a reação de incompatibilidade se repetiu com a mesma intensidade. Quando as plantas foram tratadas com hormônio de enraizamento e solução nutritiva, foi observado um atraso de 10 a 15 dias na morte das plantas tratadas em relação às testemunhas. Porém, não foi o suficiente para que estas entrassem no período reprodutivo, visto que em nenhum caso foi observada a presença de flores.

O fenótipo de incompatibilidade foi o mesmo para todos os cruzamentos, ou seja, no cruzamento Jalo EEP 558 x Rudá, no cruzamento

Jalo EEP 558 x Milionário e no cruzamento do F₁ (Milionário x Rudá) x Jalo EEP 558, como mostra a Figura 1.

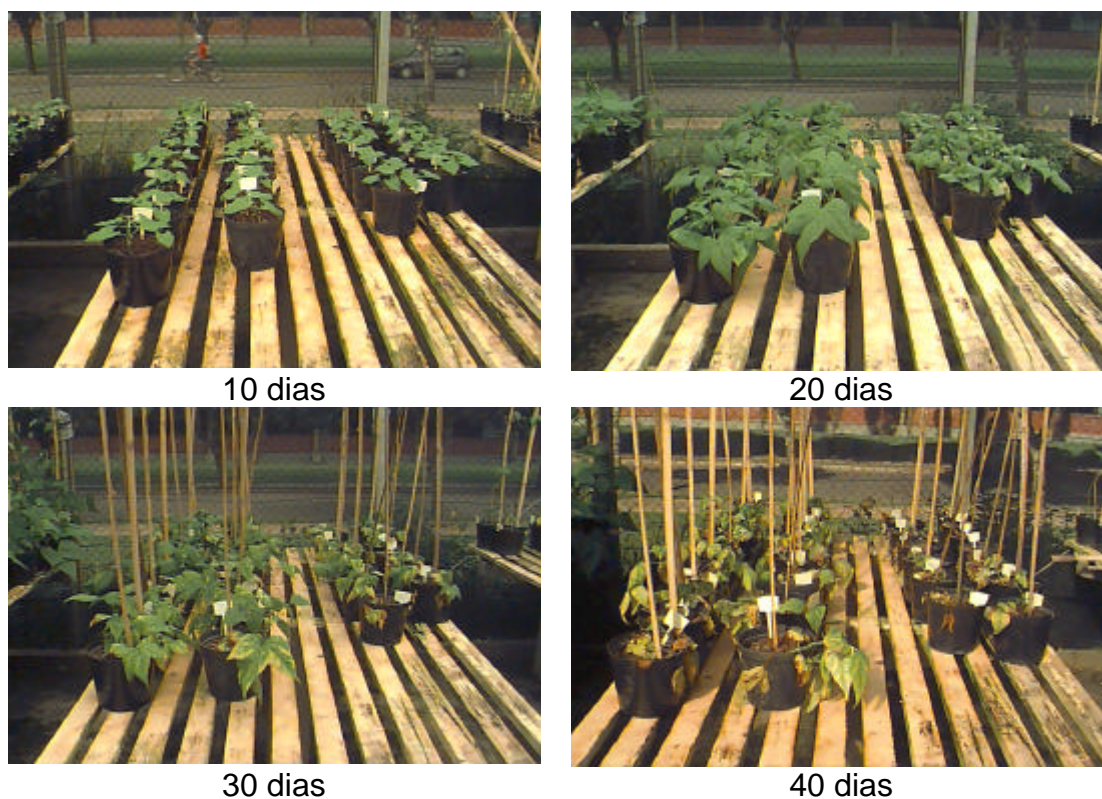


FIGURA 1. Híbridos anormais, provenientes de cruzamentos incompatíveis (Jalo EEP 558 x Rudá, Jalo EEP 558 x Milionário e do F₁ (Milionário x Rudá) x Jalo EEP 558). Aos 10, 20, 30 e 40 dias após a germinação.

As plantas, antes de morrerem, perderam todas as suas folhas. Os caules apresentaram aspecto raquítico e mal desenvolvido (Figura 2) e quando retiradas do vaso, as plantas apresentaram raízes pouco desenvolvidas (Figura 3)



FIGURA 2. Caule de plantas anormais provenientes de cruzamentos incompatíveis (à esquerda) e testemunha (à direita).



FIGURA 3. Raízes de plantas anormais, provenientes de cruzamentos incompatíveis (à esquerda) e testemunha (à direita).

De acordo com os resultados observados, conclui-se que o cultivar Milionário não pode ser utilizado como ponte neste cruzamento, visto que, quando cruzado com o Jalo EEP 558, o híbrido resultante apresentou uma reação característica de incompatibilidade. Este resultado está em desacordo com resultados previamente publicados, que sugerem o cultivar Milionário como ponte (Vieira et al., 1989; Vieira et al., 1999).

A incompatibilidade observada no cruzamento do F_1 (Milionário e Rudá) x Jalo EEP 558 sugere que o gene de incompatibilidade presente no cultivar Milionário seja o mesmo presente no cultivar Rudá. Avaliações adicionais devem ser realizadas contudo para confirmação dessa hipótese.

Os resultados aqui obtidos indicam que para estes cruzamentos e nas condições em que foi conduzido este experimento, as avaliações de incompatibilidade não deveriam ser feitas com apenas 10 dias após a germinação. Este dado também contradiz artigos publicados nos quais os autores avaliaram a incompatibilidade apenas neste período (Singh e Gutiérrez, 1984).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gepts, P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker, In: Gepts, P. (Ed.) Genetic resources of Phaseolus beans. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 215-241.
- Guzmán, P., R.L. Gilbertson, R. Nodari, W.C. Johnson, S.R. Temple, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire & P. Gepts, 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85: 600-607.
- Kelly, J.D. & P.N. Miklas, 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol. Breed.* 4:1-11.
- Pastor-Corrales, M.A., C. Jara & S.P. Singh, 1998. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. *Euphytica*, 103: 161-171.
- Shii, C.T., M.C. Mok & D.W. Mok, 1981. Developmental controls of morphological mutants of *Phaseolus vulgaris* L.: Differential expression of mutant loci in plant organs. *Develop. Genet.* 2: 279-290.
- Shii, C.T., S.R. Temple & D.W. Mok, 1980. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L.: Interaction between temperature and allelic dosage. *J. Hered.* 71: 219- 222.
- Singh, P. & J. A. Gutierrez 1984. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size and their significance to breeding. *Euphytica* 33: 337-345.
- Vieira, A.L., M.A.P. Ramalho & J.B. Santos, 1989. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. *Revista Brasileira de Genética* 12: 169-171.
- Vieira, C., A. Borém & M.A.P. Ramalho, 1999. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, p. 273-349.
- Young, R.A. & J.D. Kelly, 1996. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Disease* 80:650-654.

IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES-PONTE DE FEIJOEIRO E PROPOSIÇÃO DE UM NOVO MODELO PARA O CONTROLE DA INCOMPATIBILIDADE

RESUMO

Devido à co-evolução patógeno/hospedeiro, genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro de origem mesoamericana são mais efetivos contra patógenos andinos e vice-versa. Para programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular, pesquisadores sugerem a piramidação de genes de resistência andinos e mesoamericanos, por meio da hibridação. Contudo, durante a formação dos *pools* gênicos ocorreu também um processo de isolamento reprodutivo entre eles dificultando o seu cruzamento. Esta incompatibilidade é evidenciada por anormalidades observadas nos híbridos destes cruzamentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de cultivares-ponte na transferência de genes de resistência do cultivar Jalo EEP 558 (feijão tipo manteigão e origem andina) para o cultivar Rudá (feijão do tipo carioca e origem mesoamericana). Para isto, foram utilizados cultivares de feijoeiro citados na literatura como ponte. Pela avaliação dos híbridos resultantes, os cultivares andinos Diacol Calima, AND 277 e Novo Jalo apresentaram plantas normais em cruzamento com o cultivar mesoamericano. O mesmo foi observado para os cultivares mesoamericanos CNF10, CNF261, Small White, KW765 e KW780 em cruzamento com o cultivar andino. Teoricamente, as plantas viáveis oriundas destes cruzamentos deveriam apresentar o genótipo $dl_1dl_1DL_2dl_2$. Sendo assim, nas gerações seguintes de autofecundação, todas as plantas seriam viáveis. Contudo, este não foi o caso. Foi observada segregação quanto à viabilidade das plantas geradas por autofecundação. Um novo modelo foi proposto, com base na presença de um terceiro gene DL_3 , que agiria em homozigose recessiva em complementação ao gene DL_1 , em um modelo de epistasia dominante recessiva.

Palavras-chave: Feijão, incompatibilidade, grupos gênicos.

1. INTRODUÇÃO

O processo de domesticação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) levou à formação de dois *pools* gênicos denominados de Andino e Mesoamericano, de acordo com os seus centros de domesticação (Gepts & Debouck, 1991). Cultivares provenientes de tais centros de domesticação diferem, entre outras características fenotípicas, no tamanho dos grãos e tipos de faseolina (Gepts et al., 1986). Devido à co-evolução patógeno/hospedeiro, genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro de origem mesoamericana são mais eficientes contra raças andinas, e genes de resistência de origem andina são mais eficientes contra raças mesoamericanas (Guzmán et al., 1995). Para programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular, Pastor-Corrales et al. (1998) sugeriram a piramidação (associação) de genes de resistência andinos e mesoamericanos. Por meio da hibridação, os melhoristas de feijão têm uma oportunidade de piramidar genes de resistência dos dois grupos para desenvolver resistência complementar a um grande número de raças (Young & Kelly, 1996, Kelly & Miklas, 1998). Contudo, durante a formação dos *pools* gênicos, ocorreu também um processo de isolamento reprodutivo entre eles dificultando o seu cruzamento (Vieira et al., 1999). Esta incompatibilidade é evidenciada por anormalidades, como crescimento radicular reduzido, folhas cloróticas, ausência de raízes, formação de raízes adventícias no hipocótilo, esterilidade ou morte das plantas F₁ (Singh & Gutiérrez, 1984; Gepts, 1988; Vieira et al., 1989). Os genes envolvidos na incompatibilidade foram denominados DL₁ e DL₂ por Shii et al. (1980).

Singh & Gutiérrez (1984) constataram que estes dois genes estão envolvidos na determinação da incompatibilidade e que sementes pequenas, de origem mesoamericana, apresentam normalmente o genótipo DL₁DL₁dl₂dl₂, que é incompatível com o genótipo dl₁dl₁DL₂DL₂, apresentado por cultivares de sementes grandes, de origem andina. A geração F₁ desse cruzamento apresentará o genótipo DL₁dl₁DL₂dl₂, ocorrendo a incompatibilidade devido à ação conjunta dos dois genes. Desta forma, as plantas F₁ de constituição DL₁DL₂ são anormais. Contudo, cultivares de genótipo dl₁dl₁dl₂dl₂ sempre produzem híbridos normais, tanto em cruzamento com genótipos DL₁DL₁dl₂dl₂ quanto com genótipos dl₁dl₁DL₂DL₂. Portanto, estes cultivares podem ser

utilizados como ponte no cruzamento entre cultivares andinos e mesoamericanos.

O cultivar Jalo EEP 558 foi desenvolvido pela estação experimental de Patos de Minas (Minas Gerais, Brasil). Este cultivar é freqüentemente citado como uma importante fonte de resistência a *P. griseola* (CNPAP, 1985; Rava et al., 1985; Schwartz et al., 1982), tendo em vista que é de origem andina e adaptado às condições de cultivo brasileiras. Portanto, seria interessante a transferência dos genes de resistência presentes em Jalo EEP 558 para cultivares mesoamericanos de maior interesse econômico no Brasil, como os feijões do tipo carioca, por exemplo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de cultivares-ponte na transferência de genes de resistência do cultivar Jalo EEP 558 (feijão do tipo manteigão e de origem andina) para o cultivar Rudá (feijão do tipo carioca e de origem mesoamericana). O resultado do capítulo anterior mostrou que o cultivar Milionário, citado na literatura como ponte, foi incompatível em cruzamento com o cultivar Jalo EEP 558. Diante deste resultado foram investigados, neste capítulo, 14 cultivares de feijoeiro quanto à eficiência como cruzamento-ponte. Foram avaliados 8 cultivares citados na literatura como ponte, inclusive o cultivar Milionário que foi utilizado neste trabalho como padrão de incompatibilidade, e seis novos cultivares ainda não citados como ponte, com o intuito de fornecer alternativas adicionais de cultivares-ponte para programas de melhoramento que utilizam a hibridação entre cultivares andinos e mesoamericanos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e cruzamentos efetuados

Os cultivares avaliados como ponte foram: G 2858, Diacol Calima e Ica Pijão, citadas por Singh & Gutiérrez (1984); CNF 10, Milionário, Rio Vermelho, CNF 261 e Small White, citados por Vieira et al. (1989); e os novos cultivares testados foram KW 765, KW 780, GGWax, Novo Jalo, AND 277 e BAT 93.

Os cultivares-ponte de origem andinas foram cruzados com Rudá (mesoamericano), e os cultivares-ponte de origem mesoamericana foram cruzadas com Jalo EEP 558 (andino). Os cruzamentos foram realizados em março de 2002, em casa de vegetação do BIOAGRO/UFV. Para avaliar a capacidade dos cultivares-ponte em associar genótipos incompatíveis, todos os híbridos F_1 obtidos com Jalo EEP 558 foram cruzados com Rudá e todos os híbridos viáveis produzidos com o cultivar Rudá foram cruzados com Jalo EEP 558. Estes cruzamentos foram realizados em julho de 2002 em casa de vegetação do BIOAGRO/UFV. Todas as plantas viáveis, foram avaliadas em duas gerações F_1 e F_2 (Jalo EEP 558 X (cultivar ponte X Rudá) e F_1 e F_2 (Rudá X (cultivar ponte X Jalo EEP 558)).

Os cultivares andinos foram cruzados entre si em esquema dialélico assim como os cultivares mesoamericanos, com o objetivo de verificar se a incompatibilidade poderia ocorrer no cruzamento entre cultivares de um mesmo *pool* gênico.

2.2. Avaliação de resistência à mancha-angular

Os cultivares Jalo EEP 558, Rudá, os cultivares a serem testados como ponte e o cultivar Rosinha utilizado neste trabalho como testemunha de suscetibilidade, foram caracterizadas frente a doze isolados do fungo *Phaeoisariopsis griseola* (os isolados são aqueles apresentados no primeiro capítulo). Doze sementes de cada cultivar foram semeadas e as plantas foram avaliadas nos anos de 2000, 2001 2002 e 2003 em casa de vegetação do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) da Universidade Federal de Viçosa. As plantas foram inoculadas aos 25 dias após

a germinação, utilizando uma suspensão de 2×10^4 conídios/ml de água, para cada isolado testado. Após a inoculação, as plantas foram incubadas em câmara de nevoeiro (>90% de umidade relativa, 21°C), durante 48 h, e transferidas para casa de vegetação onde a temperatura variou de 18 a 30°C. As avaliações da doença foram realizadas aos 15 e 21 dias após a inoculação, usando uma escala de notas de 1 (plantas com ausência de sintomas) a 9 (plantas muito susceptíveis) (Van Schoonhoven & Pastor Corrales (1987)).

Foi selecionada a raça 63.23 para a qual o cultivar Jalo EEP 558 foi resistente e os demais, suscetíveis, objetivando avaliar a transferência dos genes de resistência andinos para um genótipo mesoamericano. Em abril/2003 uma população de 25 plantas F_2 (Rudá x (Small White X Jalo EEP 558)) foram inoculadas e avaliadas quanto à resistência à raça selecionada, com o intuito de confirmar a introgressão das regiões genômicas de resistência de Jalo EEP 558 para o cultivar Rudá, utilizando o cultivar Small White como ponte.

2.3. Confirmação da origem dos cultivares

Para confirmar a origem andina ou mesoamericana dos cultivares, foi utilizado um *primer* de RAPD OPB15, capaz de discriminar indivíduos pertencentes aos dois *pools* gênicos (Dr. Ana Lilia Alzate-Marin, comunicação pessoal).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Confirmação da origem

Todos os cultivares foram analisados pela técnica de RAPD, utilizando o *primer* OPB15, que permite a distinção de indivíduos de origem andina daqueles de origem mesoamericana. Os cultivares de grãos grandes, Jalo EEP 558, Diacol Calima, AND 277 e Novo Jalo apresentaram a banda de DNA típica do *pool* gênico andino. Os cultivares de grãos pequenos e médios, Rudá, Milionário, Rio Vermelho, BAT 93, Ica Pijão, KW780, CNF261, CNF10, G2858, GGWax, Small White e KW765 apresentaram a banda característica de cultivares de origem mesoamericana (Figura 1).

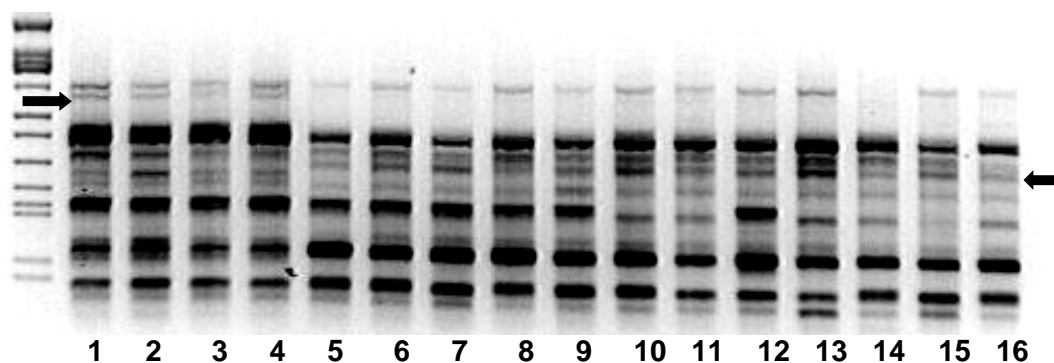


FIGURA 1. Análise eletroforética de produtos de amplificação obtidos com o *primer* OPB15 pela técnica de RAPD. A identificação das canaletas é a que se segue: 1, DNA de fago lâmbda digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI* (marcador de peso molecular); 2, Jalo EEP 558; 3, Diacol Calima; 4, AND 277; 5, Novo Jalo; 6, Rudá; 7, Milionário; 8, Rio Vermelho; 9, BAT 93; 10, Ica Pijão; 11, KW780; 12, CNF261; 13, CNF10; 14, G2858; 15, GGWax; 16, Small White; 17, KW765. A seta superior (esquerda) indica uma banda de DNA típica de cultivares andinos; a seta inferior (direita) indica uma banda de DNA típica de cultivares mesoamericanos.

3.2. Identificação dos cultivares-ponte

Pela avaliação dos híbridos resultantes do cruzamento de cultivares andinos com o cultivar mesoamericano Rudá, concluiu-se que Jalo EEP 558 foi incompatível com Rudá, porém os cultivares Diacol Calima, AND 277 e Novo Jalo apresentaram plantas normais em cruzamentos com aquele cultivar. Os híbridos derivados de cruzamentos compatíveis foram utilizados como genitores masculinos no cruzamento com o cultivar Jalo EEP 558. A avaliação das populações obtidas mostrou segregação de 1:1 entre plantas viáveis e não viáveis. Este resultado é coerente com o controle genético citado para a incompatibilidade, envolvendo dois genes dominantes e complementares (Singh & Gutiérrez, 1984), de acordo com a Figura 2.

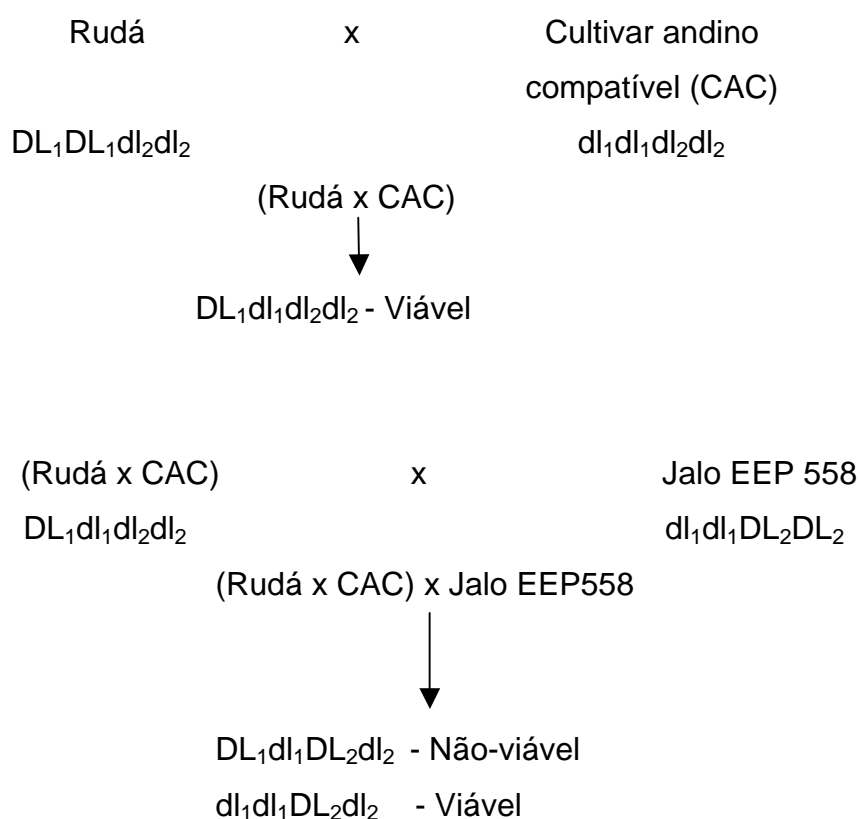


FIGURA 2: Esquema de cruzamento entre os cultivares Rudá e Jalo EEP 558 utilizando um cultivar andino compatível com Rudá como ponte.

Pela avaliação dos híbridos resultantes do cruzamento de cultivares mesoamericanos com o cultivar andino Jalo EEP 558, verificou-se que Rudá, Milionário, Rio Vermelho, BAT 93, Ica Pijão, GGWax e G 2858 foram incompatíveis com aquele cultivar. Por outro lado os cultivares CNF 10, CNF 261, Small White, KW 765 e KW 780 foram compatíveis. Os híbridos viáveis foram cruzados com o cultivar Rudá. Nestes cruzamentos, os híbridos foram utilizados tanto como doadores quanto como receptores de pólen. Para estes cruzamentos, não foi observada diferença entre recíprocos, e também foi obtida segregação de 1:1 entre plantas viáveis e não viáveis.

As plantas viáveis das populações segregantes foram avançadas por mais uma geração. Teoricamente, as plantas viáveis oriundas de cruzamentos ilustrados na Figura 2 deveriam apresentar o genótipo $dl_1dl_1DL_2dl_2$. Sendo assim, nas gerações seguintes de autofecundação, todas as plantas seriam viáveis. Contudo, este não foi o caso. Foi observada segregação quanto à viabilidade das plantas geradas por autofecundação. Os resultados obtidos para sete populações segregantes, na geração F_2 , estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1: Populações segregantes e suas respectivas progênes viáveis e não-viáveis.

Cruzamento	Viáveis	Não-viáveis
Rudá x (And277 x Jalo EEP 558)	16	1
Rudá x (CNF10 x Jalo EEP 558)	13	6
Rudá x (CNF261 x Jalo EEP 558)	17	0
Rudá x (KW765 x Jalo EEP 558)	34	0
(KW765 x Rudá) x Jalo EEP 558	4	0
Rudá x (Small White x Jalo EEP 558)	32	0
Rudá x (KW780 x Jalo EEP 558)	25	8
Total	141	15

3.3. Novo modelo proposto para explicar a incompatibilidade

Estes resultados não podem ser explicados pelo modelo proposto por Singh & Gutiérrez (1984), segundo o qual a incompatibilidade é controlada por dois genes dominantes complementares. Um novo modelo foi proposto, com base na presença de um terceiro gene (DL_3). Neste modelo, considerou-se que cultivares-ponte possuiriam o genótipo $dl_1dl_1dl_2dl_2DL_3DL_3$, o cultivar Jalo EEP 558 seria $dl_1dl_1DL_2DL_2dl_3dl_3$ e o cultivar Rudá $DL_1DL_1dl_2dl_2DL_3DL_3$. Desta forma, o gene DL_3 (em homozigose recessiva) agiria juntamente com o gene DL_1 (dominante, portanto $DL_1_$) em um modelo de epistasia dominante recessiva. Sendo assim, plantas com genótipos $DL_1_ dl_3dl_3$ não seriam viáveis. As representações genotípica e fenotípica de uma população F_2 (andino x mesoamericano) sem a presença do cultivar ponte, segundo o modelo de Singh & Gutiérrez (1984) e segundo o novo modelo proposto neste trabalho,

estão apresentadas no Quadro 2. É importante salientar, contudo, que estes genótipos não são obtidos de forma natural, uma vez que a F₁ deste cruzamento não seria viável.

QUADRO 2: Modelo de incompatibilidade proposto por Singh & Gutiérrez (1984) e o modelo de epistasia dominante recessiva proposto neste trabalho

Classes genotípicas	Fenótipo ^a	Classes genotípicas	Fenótipo ^b
9 DL ₁ _ DL ₂ _	Não-viável	27 DL ₁ _ DL ₂ _ DL ₃ _	Não-viável
3 DL ₁ _ dl ₂ dl ₂	Viável	9 DL ₁ _ DL ₂ _ dl ₃ dl ₃	Não-viável
3 dl ₁ dl ₁ DL ₂ _	Viável	9 DL ₁ _ dl ₂ dl ₂ DL ₃ _	Viável
1 dl ₁ dl ₁ dl ₂ dl ₂	Viável	3 DL ₁ _ dl ₂ dl ₂ dl ₃ dl ₃	Não-viável
		9 dl ₁ dl ₁ DL ₂ _ DL ₃ _	Viável
		3 dl ₁ dl ₁ DL ₂ _ dl ₃ dl ₃	Viável
		3 dl ₁ dl ₁ dl ₂ dl ₂ DL ₃ _	Viável
		1 dl ₁ dl ₁ dl ₂ dl ₂ dl ₃ dl ₃	Viável
Proporção esperada na F ₂	9 Não-viáveis 7 Viáveis		39 Não-viáveis 25 Viáveis

^a Modelo proposto por Singh & Gutiérrez (1984)

^b Modelo proposto neste trabalho

Com base neste modelo, seria esperado na geração F₁ (Rudá x (Ponte x Jalo EEP 558) ou Jalo EEP 558 x (Ponte x Rudá)) destas populações segregantes, uma segregação de 1:1 entre plantas viáveis e não-viáveis, assim

como no modelo apresentado por Singh & Gutiérrez (1984) (Figura 2). Entretanto, para a geração F_2 destas mesmas populações não poderia haver segregação para viabilidade pelo modelo Singh & Gutiérrez (1984). Os possíveis genótipos com base neste novo modelo estão relacionados no Quadro 2 e os cruzamentos efetuados envolvendo os cultivares Rudá, Jalo EEP 558 e o cultivar ponte estão ilustrados na Figura 4.

Um conjunto de plantas não-viáveis, juntamente com uma planta viável, plantadas no mesmo dia, está apresentado na Figura 3.



FIGURA 3: Plantas F_{1s} , provenientes de cruzamentos incompatíveis (A e B), planta testemunha Rudá (C). Aos 40 dias após a germinação.

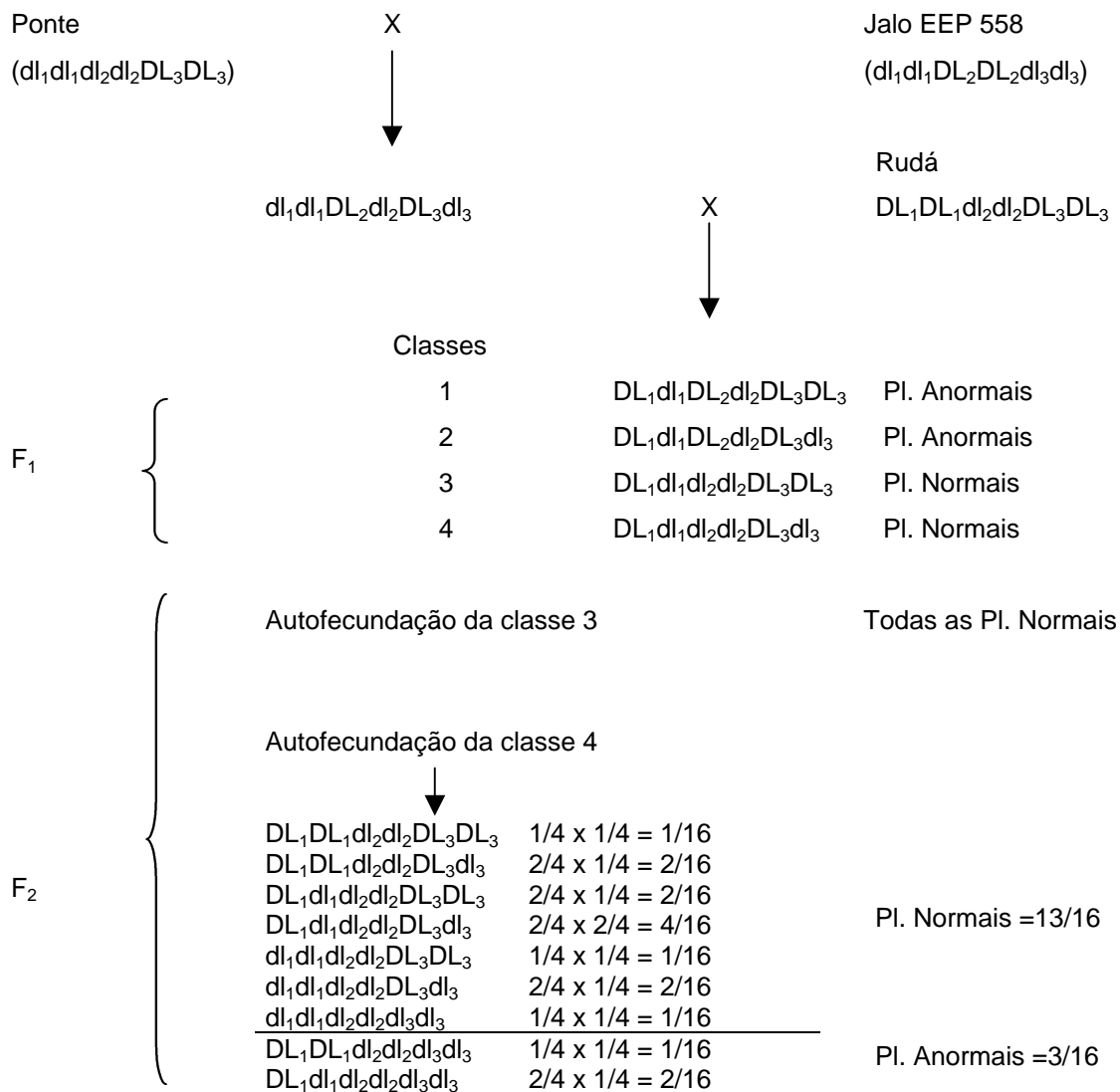


FIGURA 4: Possíveis genótipos considerando um novo modelo para a incompatibilidade com a presença de um terceiro gene DL₃.

Considerando todas as plantas normais da geração F₂ entre descendentes da classe 3 e descendentes da classe 4, seria esperada proporção de 58:6 entre plantas viáveis e não-viáveis. As sete populações segregantes (Quadro 1) possuíam os genótipos de Rudá e Jalo EEP 558 em comum, variando apenas o genótipo do cultivar-ponte. Não sendo possível supor, que o genótipo dos cultivares-ponte fosse dl₁dl₁dl₂dl₂dl₃dl₃, pois assim, não seriam possíveis híbridos normais destes cultivares em cruzamento com cultivares mesoamericanos. Desta forma, a única combinação gênica para estes três locos, para os cultivares-ponte seria dl₁dl₁dl₂dl₂DL₃DL₃, como ilustrado na Figura 4. Sendo assim, um teste de χ^2 foi realizado com os dados

obtidos conjuntamente, para as sete populações segregantes. O teste de que a proporção obtida de 141 plantas viáveis para 15 plantas não-viáveis, está na proporção de 58:6, não foi rejeitado a 91,79% de probabilidade. Ou seja, o modelo proposto, com a presença de um terceiro gene DL₃ no controle da incompatibilidade, não foi rejeitado pelo teste de χ^2 .

3.4. Reação de resistência

Dos doze isolados testados, foi selecionado o isolado 158-1 pertencente à raça 63.23. Para este isolado, o cultivar Jalo EEP 558 foi resistente e os cultivares Rosinha e Rudá foram suscetíveis. Os cultivares avaliados como ponte tiveram reações divergentes, sendo que o cultivar Small White dentre outros foi suscetível a esta raça do fungo.

3.5. Eficiência da ponte na transferência de genes andinos para cultivares mesoamericanos

Para testar a eficiência do cultivar ponte na transferência de genes de resistência do cultivar Jalo EEP 558 para o cultivar Rudá, 25 plantas na geração F₂ do cruzamento (Rudá x (Small White X Jalo EEP 558)), foram inoculados com uma suspensão de esporos da raça 63.23 de *P. griseola*. O cultivar Jalo EEP 558 apresentou resistência a esta raça, com poucas pústulas de pequeno tamanho, variando de 2 a 3 na escala de notas. Já os cultivares Small White e Rudá foram suscetíveis, obtendo notas de 5 a 6. A severidade da doença nas 25 plantas avaliadas foi de 2,5. Esta média foi inferior à média do pai resistente, o que pode ser explicado pela presença de genes que conferem resistência também nos cultivares suscetíveis e, quando associados a genes de resistência do cultivar Jalo EEP 558, originaram materiais ainda mais resistentes. Das 25 plantas desta população, 6 apresentaram nota 1, fazendo desta população uma promissora fornecedora de linhas resistentes à mancha-angular. As reações à raça 63.23 dos cultivares Rudá (A) Jalo EEP 558 (B) e de uma planta representante da F₂ (Rudá x (Small White X Jalo EEP 558)) (C), aos 15 dias após a inoculação, estão apresentadas na Figura 5.



FIGURA 5: Sintomas de mancha-angular no cultivar Rudá (A), Jalo EEP 558 (B) e F₂ (Rudá X (Small White x Jalo EEP 558)) (C). Aos 15 dias após a inoculação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CNPAF. 1985. Relatório científico 1984. Goiânia: Embrapa. p.149-150.
- Gepts, P. & D. Debouck, 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7-53. In A. Van Schoonhoven and O. Voysest (Ed.) Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl., Wallingford, UK and CIAT. Cali, Colombia.
- Gepts, P. Phaseolin as an evolutionary marker, 1988. In: Gepts, P. (Ed.) Genetic resources of Phaseolus beans. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 215-241.
- Gepts, P., T.C. Osborn, K. Rashka & F.A. Bliss, 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. Econ. Bot. 40: 451-468.
- Guzmán, P., R.L. Gilbertson, R. Nodari, W.C. Johnson, S.R. Temple, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire & P. Gepts, 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Phytopathology 85: 600-607.
- Kelly, J.D. & P.N. Miklas, 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. Mol. Breed. 4:1-11.
- Pastor-Corrales, M. A., C. Jara, S. P. Singh, 1998. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. Euphytica 103: 161-171.
- Rava, S.C.A., A. Sartorato, J.R.P. Carvalho, 1985. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 28: 5-6.
- Schwartz H.F., M.A. Pastor Corrales, S.P. Singh, 1982. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot os beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica 31:741-754.
- Shii, C.T., S.R. Temple & D. W. Mork, 1980. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L. : Interaction between temperature and allelic dosage. J. Hered. 71: 219- 222.
- Singh, P. & J. A. Gutierrez, 1984. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size and their significance to breeding. Euphytica 33: 337-345.
- Van Schoonhoven, A. & M. A. Pastor-Corrales (Comps.), 1987. Standard system for evaluation of bean germplasm. Cali, Colombia: CIAT, 54p.

- Vieira, A.L., M.A.P. Ramalho & J.B. Santos, 1989. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. *Revista Brasileira de Genética* 12: 169-171.
- Vieira, C., A. Borém, M.A.P. Ramalho, 1999. Melhoramento do feijão. In: Borém, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV, p. 273-349.
- Young, R.A. & J.D. Kelly, 1996. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Disease* 80:650-654.

MAPPING QTLs FOR RESISTANCE TO BEAN ANGULAR LEAF SPOT AND CO-LOCALIZATION OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO DISEASE RESISTANCE GENES

SUMMARY

Angular leaf spot (ALS) is a major fungal disease that affects common bean crops in several growing regions in the world. Although resistance to ALS has often been treated as a monogenic character, the possibility of identifying genes governing partial resistance to ALS should provide an alternative strategy for development of cultivars with durable resistance in common bean breeding programs. In this work we used a recombinant inbred line population derived from a cross between cultivars BAT 93 and Jalo EEP 558 to map quantitative trait loci associated with resistance to ALS. One hundred and fifty four RFLP, RAPD and SCAR markers were tested in the population. The RFLP markers and the data related to them were obtained by Dr. Paul Gepts' group and the results are available in the internet (<http://agronomy.ucdavis.edu/gepts/gepts.htm>). One hundred and fourteen of them segregated 1:1 and 86 were assigned to 13 linkage groups. The population was inoculated with *Phaeoisariopsis griseola* races 63.23 and 63.55 and the single-factor analysis detected three markers linked to resistance to race 63.55 and 10 markers linked to resistance to race 63.23. In the composite mapping analysis only one marker was confirmed as linked to resistance to race 63.55 responding to 26% of the phenotypic variation. In the case of race 63.23, four markers were confirmed. Two of them explained together 36.41% of the phenotypic variation.

Key words: *Phaeoisariopsis griseola*, genetic breeding, common bean

1. INTRODUCTION

Angular leaf spot (ALS), caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola*, is a common disease affecting bean crops in tropical and sub-tropical regions. This disease is important in more than 60 different countries leading to yield losses that may reach 80% of the expected production depending on the susceptibility of the cultivars, the environmental conditions and development stage of the crop when the fungus is present (Schwartz et al., 1981; Sartorato & Rava, 1994). Breeding programs aimed to develop cultivars resistant to ALS usually focus on monogenic resistance (Barros et al., 1957; Cardona-Alvarez, 1962; Santos Filho et al., 1976; Singh & Saini, 1980; Sartorato et al., 1993, Caixeta et al., 2003). However, the use of specific resistance may not provide a durable resistance specially in Latin America where the common bean originated (Vavilov, 1949/50; Gepts, 1998). The pathogen is highly diversified and resistance can be easily overcome. More than 50 *P. griseola* pathotypes have been identified in Latin America (Pastor-Corales & Jara, 1995).

Incorporation of genes conferring partial resistance is an interesting alternative to develop cultivars with durable resistance (Johnson, 1984). This alternative has not been widely used in common bean breeding programs, specially in the case of ALS. Availability of more information concerning partial resistance to ALS and the existence of molecular markers linked to genes conferring this type of resistance should allow for the use of such important alternative.

Lately, molecular marker assisted selection (MAS) is being used as an alternative to aid the breeding of crops for disease resistance. Molecular markers are important as a source of genetic information for the breeder and as

a tool for the indirect selection of traits of interest. In addition, in the case of breeding for resistance the use of molecular markers allows for selection in the absence of the pathogen.

Recombinant inbred lines (RILs) are ideal populations for mapping purposes once they in theory maintain the variability present in the F₂ generation (Lander & Botstein, 1989). As they have a high degree of homozygosity they can be tested in different environments allowing for the determination of the genotype-environment interaction. Besides, several research groups can use the same population facilitating the exchange of the genetic information obtained (Burr et al., 1988; Freyre et al., 1998; Geffroy et al., 2000; Fall et al., 2001).

Several QTLs (Quantitative trait loci) associated with disease resistance have been identified in the common bean (Ariyaratne et al., 1999; Kelly and Miklas, 1999; Geffroy et al., 2000). However, no QTLs have been identified linked to resistance to ALS. Considering the relevance of this disease and the extensive variability of *P. griseola* it would be of great interest to identify QTLs conferring partial resistance to be used in a MAS program aimed to create cultivars with durable resistance to ALS.

The present work aimed to evaluate the existence of partial resistance of *Phaseolus vulgaris* to ALS and to identify QTLs associated to it. Two *P. griseola* races 63.55 and 63.23, were used to inoculate a population of 50 RILs at generation F₈₋₉ derived from a cross between cultivars BAT 93 and Jalo EEP 558 (Gepts et al., 1993). Twenty-eight markers (RAPD and SCAR), previously identified as linked to resistance to rust, ALS and anthracnose were also mapped in this population.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Genetic material and disease evaluation

Seeds of common bean RILs at generation F₈₋₉ derived from the cross BAT 93 (mesoamerican) X Jalo EEP 558 (andean) were kindly provided by Dr. S. M. Tsai. The initial cross was performed by Nodari et al. (1993a) who mapped the F₂ population with RFLP markers. These same group (Nodari et al. 1993b) used the F₃ generation to map QTLs for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and also for nodulation. An integrated map based on 77 RILs obtained from this population was developed (Freyre et al., 1998). These same RILs were used to map QTLs for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* (Geffroy et al., 2000), and localization of QTLs associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Tsai et al., 1998).

In this work only 50 RILs could be used due to germination problems in the environmental conditions of the experiments. The parents were initially inoculated with *P. griseola* races 61.41, 63.19, 63.55, 63.23, 63.47, 63.31, and 31.39 to identify the ones to which they responded differentially. The races used correspond to monosporic cultures which were collected in different bean producing regions in Brazil. These cultures are maintained at the Biotechnology Institute (BIOAGRO) of the Federal University of Viçosa (Minas Gerais, Brazil). The selected races were used to inoculate the 50 RILs.

The RILs were planted in May 2002 and March 2003 in the greenhouse. They were inoculated 25 days after germination with a spore suspension containing 2×10^4 conidia/ml with the use of a De Vilbiss no. 15 apparatus.

After inoculation the plants were incubated in a mist chamber (>90% relative humidity and 21°C) during 48 h and then transferred to the greenhouse where the temperature varied between 18 and 30°C. Disease symptoms were evaluated 18 days after inoculation (race 63.55) or 15 and 21 days after inoculation (race 63.23) using a 1 to 9 scale in which 1 is assigned to plants with no symptoms and 9 to plants severely diseased (Van Schoonhoven & Pastor-Corrales, 1987). Evaluation of symptoms 15 and 21 days after inoculation for race 63.23 was done to detect possible differences on the resistance response with time.

2.2. Molecular marker analyses

Molecular markers previously identified in the common bean as linked to resistance to rust, ALS and anthracnose were tested in the RILs population and the parents for further mapping purposes (Table 1).

Table 1: Molecular markers linked to resistance to rust, angular leaf spot and anthracnose tested in the RIL population

Rust	Angular leaf spot	Anthracnose
A14 _(1,100) Miklas et al., 1993	H13 ₍₄₉₀₎ Carvalho et al., 1998	Z04 ₍₅₆₀₎ Alzate-Marin et al., 1999
K14 ₍₆₂₀₎ Haley et al., 1994	E04 ₍₅₀₀₎ Ferreira et al., 2000	Z09 ₍₉₅₀₎ Alzate-Marin et al., 1999
AC20 ₍₄₉₀₎ Johnson et al., 1995	AC14 _(2,400) Sartorato et al., 2000	AZ20 ₍₉₄₀₎ Alzate-Marin et al., 2000
AE19 ₍₈₉₀₎ Johnson et al., 1995	SCAR N02 ₍₈₉₀₎ Sartorato et al., 2000	C08 ₍₉₀₀₎ Alzate-Marin et al., 2000
I19 ₍₄₆₀₎ Haley et al., 1993	AA07 ₍₉₅₀₎ Caixeta et al., 2003	I16 ₍₈₅₀₎ Alzate-Marin et al., 2000
X11 ₍₆₃₀₎ Faleiro et al., 2001	AO12 ₍₉₅₀₎ Caixeta et al., 2003	J01 _(1,380) Alzate-Marin et al., 2000
F10 ₍₉₇₀₎ Haley et al., 1993	M02 ₍₄₆₀₎ Corrêa et al., 2001	B03 _(1,800) Alzate-Marin et al., 2000
SCAR F10 _(1,050) Corrêa et al., 2000	AA19 ₍₆₀₀₎ Corrêa et al., 2001	A18 ₍₈₃₀₎ Alzate-Marin et al., 2000
SCAR BA08 ₍₅₃₀₎ Corrêa et al., 2000	E04 ₍₆₅₀₎ Sartorato et al., 2000	H18 _(1,200) Alzate-Marin et al., 2001
		SCAR Y20 ₍₈₃₀₎ Alzate-Marin et al., 2000

* The numbers in parenthesis correspond to the sizes of the markers, in base pairs (bp).

2.3. Linkage map

To build the linkage map, the molecular markers (126 RFLPs - <http://agronomy.ucdavis.edu/gepts/gepts.htm>, 24 RAPDs and 4 SCARs (Table 1) were submitted to a segregation analysis. Only those segregating 1:1 by the chi-square test were used to generate the map. To define the linkage groups (LG) a LOD score minimum of 2.0 and a recombination frequency of 40 centiMorgans (cM) were considered. The recombination frequencies were transformed into genetic distances according to the Kosambi map function. All

procedures were performed with the aid of the GQMOL program (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm).

2.4. QTL mapping - single-factor analysis

Single-factor variance analysis ($P < 0.05$) was done to identify QTLs associated with resistance to ALS with the aid of the GQMOL program. This type of procedure allows for the evaluation of the effect of each marker even if it is not included in the LGs.

2.5. QTL mapping - composite interval mapping

To better estimate the number and position of the QTLs, and to verify the results obtained with the single-factor ANOVA, the markers assigned to specific LGs were evaluated by composite interval mapping. For this procedure the QTL Cartographer version 1.14 (Basten et al., 2000) and the GQMOL programs were used. The option model 6 of the Zmapqtl with 10 background parameters based on forward-backward regression analysis, and a 1-cM walking speed were used. To determine an empirical threshold significance level for QTL detection 1,000 permutations were performed, considering significance levels of 5 and 10% (Churchill and Doerge, 1994).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Jalo EEP 558 and BAT 93 responded differentially to *P. griseola* races 63.55 and 63.23 and so these races were selected to inoculate the RILs. Jalo EEP 558 was susceptible to race 63.55 (scores 5 to 9) and resistant to race 63.23 (scores 1 to 3). BAT 93 was resistant to race 63.55 (scores 1 to 3) and susceptible to race 63.23 (scores 5.5 to 9). The scores of the RILs varied from 1 to 9 for both races. Figure 1 shows that Jalo EEP 558 presented few pustules with small diameter when inoculated by spores of race 63.23 while BAT 93 was severely diseased. The symptom pattern presented by Jalo EEP 558 indicates that resistance to ALS in this cultivar is partial or quantitative, as reported for maize rust resistance (Hulbert, 1997).



Figure 1: Symptoms of cultivars BAT93 (left) and Jalo EEP 558 (right) 15 days after inoculation with spores of *Phaeoisariopsis griseola* race 63.23.

Out of the 126 RFLP markers available for this population, 105 segregated 1:1 in the 50-RIL population. Among the RAPD and SCAR markers tested, seven RAPD and two SCAR markers segregated 1:1. The 114 markers

which segregated according to the expected ratio were submitted to single-factor analysis to detect those linked to regions conferring partial resistance to ALS. Three markers were linked to resistance to *P. griseola* race 63.55 ($P < 0.05$), while 10 markers were linked to resistance to race 63.23 ($P < 0.05$). The results for this type of analysis are depicted in Table 2.

Table 2: Molecular markers linked to ALS resistance QTLs as detected by single-factor analysis

Resistance to race 63-55 18 days after inoculation				
Markers	Allele ^a	F	Estimated Distance in cM	Linkage group ^b
D1390	B	0.0305*	0.2593	Not linked
D1157	B	0.0398*	0.2624	8
D1287	J	0.0351*	0.258	11
D1512	J	0.0609ns	0.279	3
Resistance to race 63-23 15 days after inoculation				
D1032	J	0.011*	0.2171	Not linked
D1151	J	0.0226*	0.2525	Not linked
OPX11	J	0.0041**	0.2146	5
SCARBA08	B	0.0274*	0.2654	7
SCARF10	B	0.0795ns	0.3028	7
RF10b	B	0.0016**	0.1699	7
D1174	B	0.0682ns	0.2899	7
D1468	B	0.0252*	0.2555	9
RAD19b	B	0.0138*	0.2267	9
Resistance to race 63-23 21 days after inoculation				
D1032	J	0.0096**	0.2137	Not linked
D1151	J	0.0141*	0.2393	Not linked
RE9c	J	0.0295*	0.2599	5
OPX11	J	0.0004**	0.173	5
RF10b	B	0.0324*	0.2427	7
RAD19b	B	0.0243*	0.243	9
D1468	B	0.0297*	0.2606	9
OPAA19	B	0.0199*	0.2245	11
OPC08	J	0.0287*	0.2555	12

*,** Significant at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

^a B or J indicate that the BAT93 or the Jalo EEP 558 allele, respectively, increased resistance.

^b Linkage group number as defined in Figure 3.

Eighty-six of the markers grouped in 13 LGs corresponding to 574.59 cM, i. e., one marker at each 6.68 cM on average. These markers were submitted to composite interval mapping (CIM) using the QTL cartographer program. For resistance to race 63.55 the significance threshold value determined by the permutation test was 22.38 ($P < 0.05$) and 17.27 ($P < 0.10$). These values correspond to LOD scores of 4.86 and 3.75, respectively. For resistance to race 63.23 tested 15 days after inoculation the permutation test determined a significance threshold of 14.15 ($P < 0.05$) and 12.58 ($P < 0.10$), which correspond to LOD scores of 3.07 and 2.73, respectively. For resistance to race 63.23 tested 21 days after inoculation the permutation test determined a significance threshold of 13.20 ($P < 0.05$) and 11.65 ($P < 0.10$), which correspond to LOD scores of 2.86 and 2.53, respectively.

The markers identified in the single-factor analysis and assigned to LGs were confirmed by the CIM. Table 3 shows the regions identified by CIM, the corresponding likelihood ratio (LR), their positions and the R^2 values relative to these positions.

Table 3: QTLs linked to resistance to races 63.55, and 63.23 (15 and 21 days after inoculation), identified by composite interval mapping (CIM) using QTL cartographer

Race 63.55 (Significance threshold 22.38 at 5% and 17.27 at 10%)						
Linkage group ^a	Marker	Position ^b	LR ^c	R ² ^d	allele ^e	Additive effect ^f
3	D1512	10.31	17.95	0.26	J	-1.6318
Race 63.23 – 15 days (Significance threshold 14.15 at 5% and 12.58 at 10%)						
5	OPX11	42.21	14.23	0.169	J	-0.338
7	RF10b	40.53	15.99	0.20	B	-0.387
7	SCARBA08	54.56	12.96	0.16	B	-0.33
Race 63.23 – 21 days (Significance threshold 13.20 at 5% and 11.65 at 10%)						
5	OPX11	42.21	22.61	0.25	J	-0.65
5	RE9c	54.41	16.61	0.23	J	-0.64
7	RF10b	40.53	11.85	0.12	B	-0.44

^a Linkage group number as defined in Figure 3.

^b Position of likelihood peak (maximum LR) with underscored numbers plus support interval in Kosambi centiMorgans relative to the first marker on linkage group.

^c Likelihood ratio.

^d Percentage of phenotypic variation explained by each marker.

^e B or J indicate that the BAT 93 or the Jalo EEP 558 allele, respectively, increased resistance.

^f Additive effect associated with the B or J alleles.

All these analyses were also done using the QTMOL program. This program gives the user the opportunity to select cofactors (reference markers) in the CIM analysis. For instance, for resistance to race 63.23 (15 days after inoculation) the cofactors RAD19b (LG9), RF10b (LG7) and OPX11(LG5) were selected based on Stepwise analysis for the analysis of LG7. Cofactors D1476 (LG5) and H18 (GL7) were used to evaluate GL5. The QTL associated with this characteristic in LG 7 and LG 5, and the LR corresponding curves are shown in Figure 2.

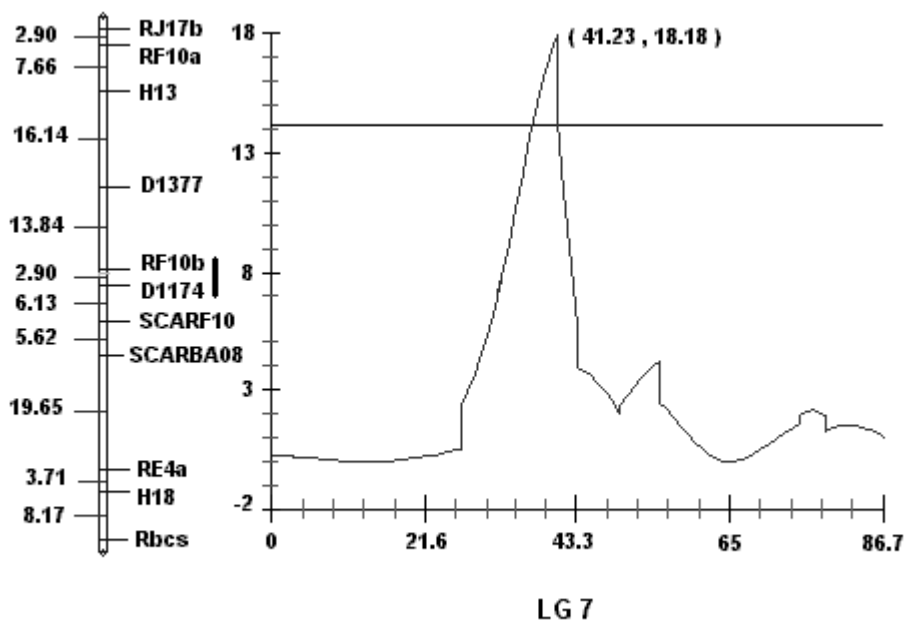
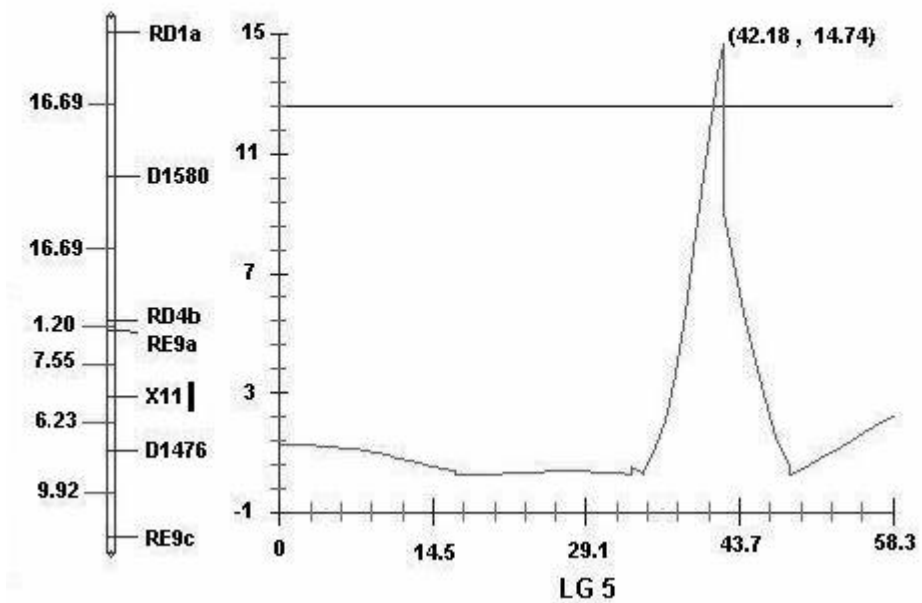
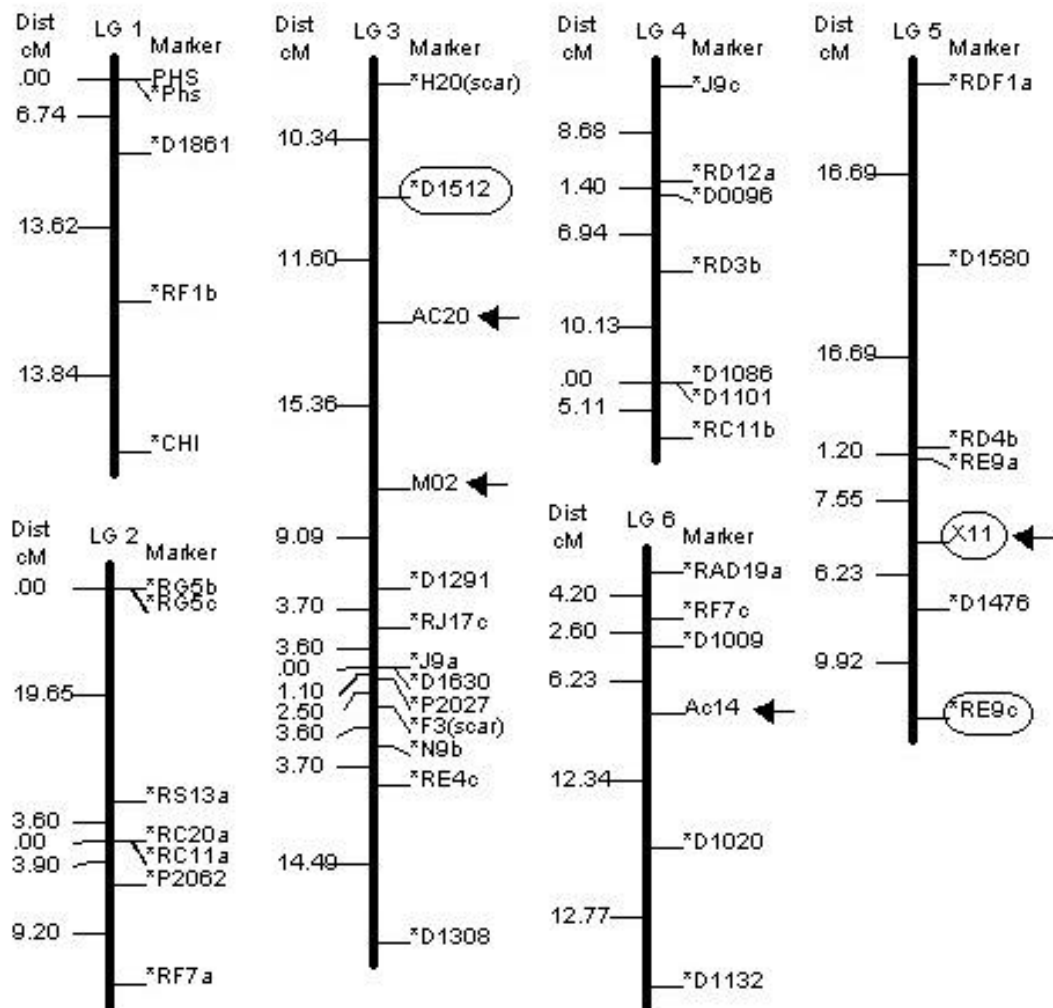


Figure 2: Mapping of QTL associated with resistance to *P. griseola* race 63.23 (15 days after inoculation). Linkage groups 5 and 7 are shown on the left and the corresponding likelihood ratio (LR) curves on the right. The maximum LR value in LG5 coincides with the position of marker X11. The maximum LR in LG7 is flanked by markers RF10b and D1174. Both regions are indicated by vertical bars on the linkage groups.

The results obtained with the two programs, QTL cartographer and GQMOL, were similar to each other. The slight differences observed in the parameter estimates seem to be justified by the cofactors selected by the user in the GQMOL analysis which might not correspond to the same factors chosen by QTL cartographer.

Although the single-factor analysis indicated that marker D1390 was linked to resistance to *P. griseola* race 63.55 (Table 2) this marker was not evaluated by CIM because it did not map to any of the LGs. However, this marker was mapped to a linkage group in the F₂ population which gave rise to the RILs used in this work (Gepts et al., 1993). The region close to this marker was shown to be linked to QTLs conferring resistance to several diseases (Nodari et al., 1993b; Tsai et al., 1998; Geffroy et al., 2000), indicating that it might be involved with the plant general defense system. Marker D1512 was found to be linked to ALS resistance considering a significance level greater than 6% in the single-factor analysis. This marker was also detected in the CIM analysis ($P < 0.01$). The region close to this marker has been shown to be linked to QTLs for resistance to anthracnose (Geffroy et al. 2000) and to common bacterial blight (Nodari et al., 1993b). In addition, markers OPAC20, linked to rust resistance (Johnson et al., 1995) and OPM02, linked to ALS resistance (Correa et al., 2001) were also mapped close to this region (Figure 3).



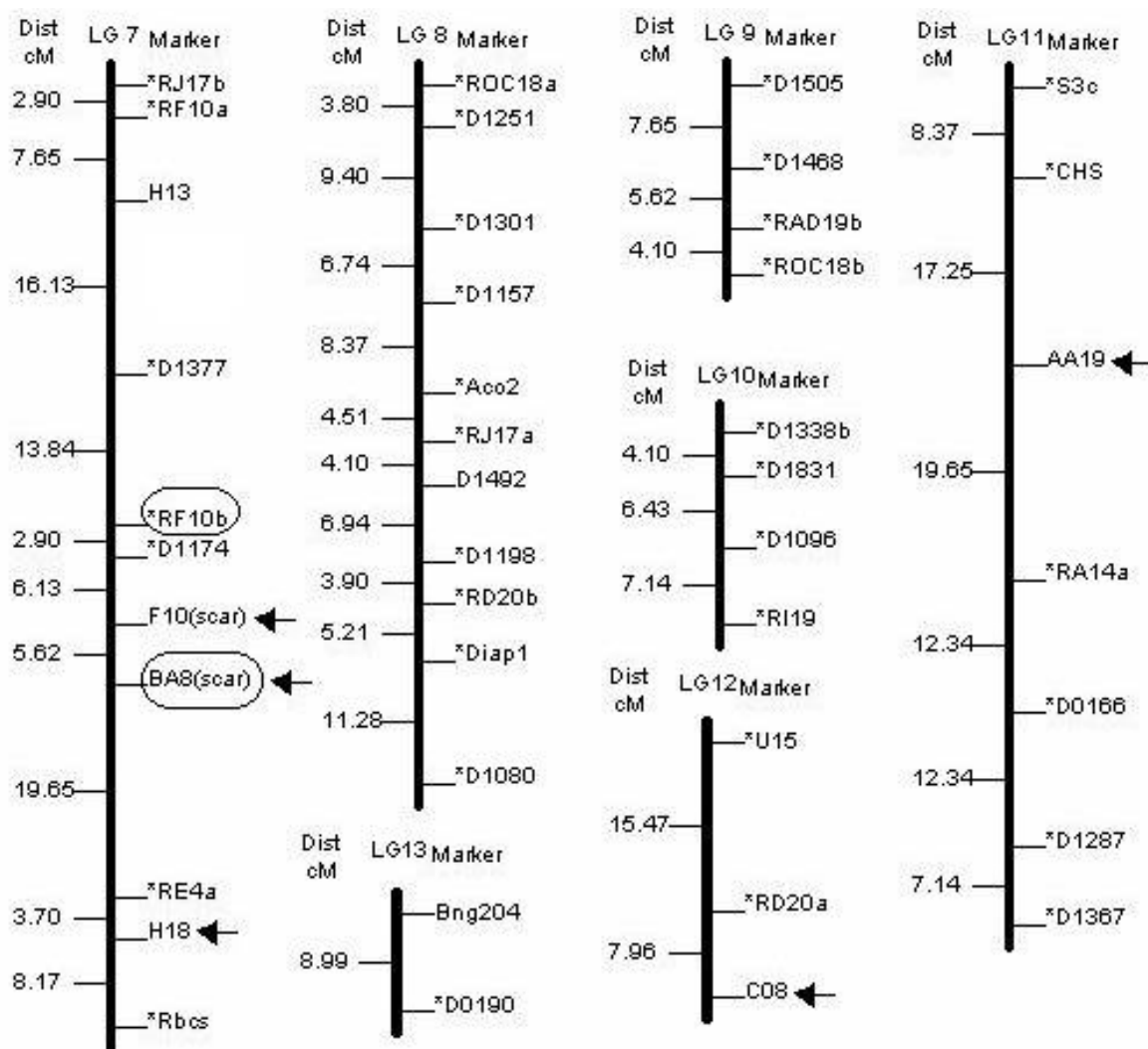


Figure 3: Mapping of disease resistance genes in the common bean linkage map based on a population of 50 RILs from the cross BAT 93 vs. Jalo EEP 558. The arrows indicate markers linked to known disease resistance genes. The regions marked with an ellipse correspond to QTLs for resistance to angular leaf spot as determined by CIM analysis.

Single-factor analysis detected marker OPX11 ($P < 0.01$) as linked to resistance to *P. griseola* race 63.23, 15 and 21 days after inoculation (Table 2). This was confirmed in the CIM analysis (Table 3), and the fraction of the phenotypic variation (R^2) explained by the marker was 25%. This marker was originally found to be linked in coupling phase to a rust resistance gene block present in cultivar Ouro Negro (Faleiro et al., 2001). In the population analyzed in this work, this marker was linked in repulsion phase to partial resistance to ALS. This region is also involved with partial resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Tsai et al., 1998).

Markers RF10b and SCAR BA08 were also confirmed by CIM analysis as linked to ALS resistance (Table 3). Although these markers tag ALS resistance, they are present in the susceptible parent (BAT 93). Apparently this genotype also carries positive QTL alleles for ALS resistance, and this might explain the transgressive segregation observed in the RILs. This region was also shown to be linked to partial resistance to anthracnose (Geffroy et al. 2000). Faleiro et al. (2000) has also observed the linkage between genes controlling resistance to two different diseases, rust and anthracnose, in common bean cultivar Ouro Negro.

Among the 28 molecular markers previously identified as linked to disease resistance genes in common bean, only 12 were polymorphic between cultivars BAT 93 and Jalo EEP 558, and nine out of these segregated 1:1 in the RIL population. They have been assigned to different LGs in the map depicted in Figure 3.

To evaluate the marker selection efficiency we considered the data obtained by inoculation with *P. griseola* race 63.23 (15 and 21 days after inoculation). Although the CIM analysis identified at least three QTL regions

associated with ALS resistance (Table 3), a Stepwise analysis confirmed only markers RF10b and X11 for both evaluation dates. The R^2 obtained with this type of analysis were 36.41% (15 days) and 32.48% (21 days), and the corresponding heritability values were 91.08% and 90.33%, respectively. The high heritability values indicate that these markers are indeed robust because the phenotypic data obtained was not significantly influenced by the environment.

Five RILs were selected based on the presence of favorable alleles corresponding to loci RF10b (BAT 93) and X11 (Jalo EEP 558), among them four were resistant and the remaining one was moderately resistant (Figure 4). Thirteen of the RILs presented the unfavorable allele combination for these loci. They were classified as intermediate (9 RILs) or susceptible (4 RILs) (Figure 4).

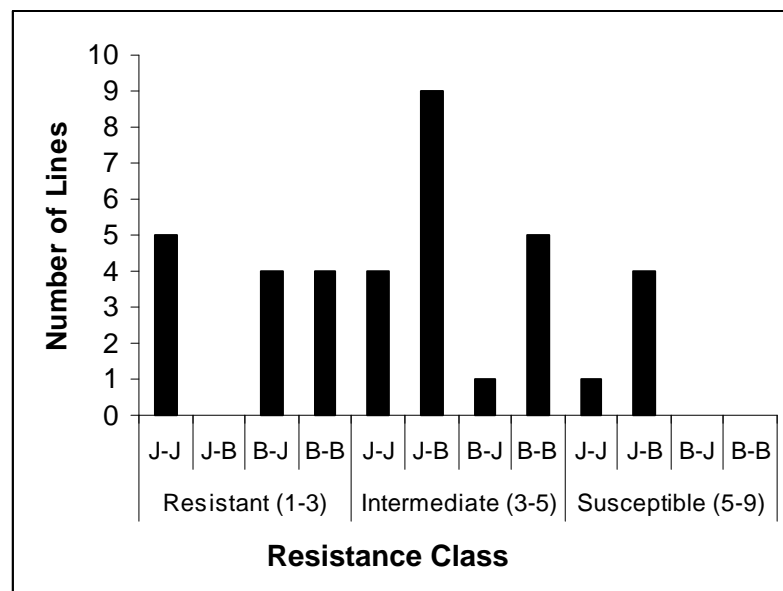


Figure 4. Frequency of favorable alleles from BAT 93 (B) in locus RF10b and from Jalo EEP 558 (J) in locus X11 in different RILs previously classified in ALS resistance classes. The numbers in parenthesis following each resistance class correspond to ALS symptom scores.

Our data demonstrate that ALS resistance is inherited quantitatively in common bean and confirm molecularly that susceptible sources carry favorable alleles that can be used in breeding programs. The molecular markers identified in this work can be used to aid the selection of lines enriched for the presence of favorable alleles. Our data also showed that several genes for resistance to various diseases in common bean, including ALS, map to the same regions, a fact that should be considered in breeding programs particularly the ones that use the gene pyramiding strategy.

4. REFERENCES

- Alzate-Marin, A.L., H. Menarin, G.A. Carvalho, T.J. Paula Jr., E.G. Barros & M.A. Moreira, 1999. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology* 89: 281-285.
- Alzate-Marin, A.L., H. Menarin, G.S. Baia, T.J. Paula Jr., K.A. Souza, M.R. Costa, E.G. Barros & M.A. Moreira, 2001. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the Co-4² gene. *J. Phytopathol.* 149: 259-264.
- Alzate-Marin, A.L., H. Menarin, J.M. Chagas, E.G. Barros & M.A. Moreira, 2000. Identification of a RAPD marker linked to the Co-6 anthracnose resistant gene in common bean cultivar AB 136. *Genetics and Molecular Biology* 23: 633-637.
- Ariyaratne, H.M., D.P. Coiné, G. Jung, P.W. Skroch, A.K. Vidaver, J.R. Steadman, P.N. Miklas & M.J. Basset, 1999. Molecular mapping of disease resistance gene for halo blight, common bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124: 654-662.
- Barros, O., R. Cardenosa, R.L. Skiles, 1957. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. *Phytopathology* 47: 3.
- Basten, C.J., B.S. Weir & Z.B. Zeng, 2000. QTL Cartographer version 1.14. Dep. of Statistics, North Carolina State Univ., Raleigh, NC.
- Burr, B., F.A. Burr, K.H. Thompson, M. Albertson & C.W. Stuber, 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 519-526.

- Cardona-Alvarez, C., 1962. Herencia de la resistencia a la mancha-angular em frijol. *Agronomía Tropical* 18: 330-331.
- Carvalho, G.A., T.J. Paula Jr., A.L. Alzate-Marin, S. Nietsche, E.G. Barros & M.A. Moreira, 1998. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. *Fitopatol. bras.* 23: 482-485.
- Churchill, G.A. & R.W. Doerge, 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Corrêa, R.X., M.R. Costa, P.I. Good-God, V.A. Ragagnin, F.G. Faleiro, M.A. Moreira & E.G. Barros, 2000. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in common bean. *Crop Sci.* 40: 804-807.
- Corrêa, R.X., P.I.V. Good-God, M.L.P. Oliveira, S. Nietsche, M.A. Moreira & E.G. Barros, 2001. Herança de resistencia à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. *Fitopatol. bras.* 26: 27-32.
- Caixeta, E.T., A. Borém, S.A. Fagundes, S. Nietsche, E.G. Barros & M.A. Moreira, 2003. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line Bat 332 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene. *Euphytica* 134:297-303.
- Faleiro, F.G., V.A. Ragagnin, R.X. Corrêa, W.S. Vinhadelli, M.A. Moreira & E.G. Barros, 2000. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. *Rev. Ceres* 47: 375-382.
- Faleiro, F.G., S. Nietsche, V.A. Ragagnin, A. Borém, M.A. Moreira & E.G. Barros. 2001. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha-angular em condições de casa de vegetação. *Fitopatol. bras.* 26: 86-89.

- Fall, A.L., P.F. Byrne, G. Jung, D.P. Coyne, M.A. Brick & H. F. Schwartz, 2001. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Crop Sci.* 41: 1494-1498.
- Ferreira, C.F., A. Borém, G.A. Carvalho, S. Nietsche, T.J. Paula Jr., E.G. Barros & M.A. Moreira, 2000. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Sci.* 40: 1130-1133.
- Freyre, R., P. Skroch, V. Geffroy, A.F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W.C. Johnson, V. Llaca, R.O. Nodari, P.A.Pereira, S.M.Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C.E. Vallejos & P. Gepts, 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor. Appl. Genet.* 97: 847-856.
- Geffroy, V., M. Sévignac, J.C.F. Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin & M. Dron, 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 287-296.
- Gepts, P., 1998. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. *HortScience* 33:1124-1130.
- Gepts, P., R. Nodari, S.M. Tsai, R.M.K. Koinange, V. Llaca, , R. Gilbertson & P. Guzman, 1993. Linkage mapping in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 36:24-38.
- Haley, S.D., L.K. Afanador, P.N. Miklas, J.R. Stavely & J.D. Kelly. 1994. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of nears-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theor. Appl. Genet.* 88: 337-342.

- Haley, S.D., P.N. Miklas, J.R. Stavely, J. Byrum & J.D. Kelly. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 86: 505-512.
- Hulbert, S.H., 1997. Structure and evolution of the *rp1* complex conferring rust resistance in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 293-310.
- Johnson, R., 1984. A critical analysis of durable resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 309-330.
- Johnson, E., P.N. Miklas, J.R. Stavely & J.C. Martinez-Cruzado, 1995. Coupling- and repulsion- phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 90: 659-664.
- Kelly, J.D. & P.N. Miklas, 1999. Marker-assisted selection *In: S.P. Singh (Ed.)*. Common bean improvement in the twenty first century, P.93-124. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Lander, E.S. & D. Botstein, 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits by using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Miklas, P.N., J.R. Stavely & J.D. Kelly. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85: 745-749.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzmán, R.L. Gilbertson & P. Gepts, 1993b. Toward an integrated map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterial interactions. *Genetics* 134: 341-350.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, R.L. Gilbertson & P. Gepts, 1993a. Towards an integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 85: 513-520.

- Pastor-Corrales, M.A. & C.E. Jara, 1995. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. Fitopatología Colombiana 19: 15-24.
- Santos Filho, H.P., S. Ferraz & C. Vieira, 1976. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Ceres 23: 226-230.
- Sartorato, A. & C.A. Rava, 1994. Mancha-angular. In: Sartorato, A. & Rava, C.A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 41-68.
- Sartorato, A., M.J.O. Zimmermann, C.A. Rava & J.E.S. Carneiro, 1993. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. Summa Phytopathologica 19: 30.
- Sartorato, A., S. Nietsche, E.G. Barros & M.A. Moreira, 2000. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. Fitopatol. bras. 25: 637-642.
- Schwartz, H.F., F. Correa-Victoria, P.A. Pineda, M. Otoya & M.J. Katherman, 1981. Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. Plant Disease 65: 494-496.
- Singh, A.K. & S.S. Saini, Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica 29: 175-176.
- Tsai, S.M., R.O. Nodari, D.H. Moon, L.E.A. Camargo, R. Vencovsky & P. Gepts, 1998. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil 204:135-145.
- Van Schoonhoven, A. & M. A. Pastor-Corrales (Comps.), 1987. Standard system for evaluation of bean germplasm. Cali, Colombia: CIAT, 54p.

Vavilov, N.I. 1949/1950. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Bot.* 13:1-366.

Acknowledgements

This work was financed by CNPq. Lucianne Braga Oliveira Vilarinho was supported by a scholarship from FAPEMIG.

RESUMO GERAL

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Além de sua importância na dieta do brasileiro, o feijão é um dos produtos de maior importância econômico-social por ser uma fonte de proteínas de baixo custo em relação à proteína animal, em razão de ser cultivado em grandes áreas e devido à mão-de-obra intensiva que emprega durante o ciclo da cultura. Contudo, está havendo uma mudança nesse panorama; o cultivo do feijão está deixando de ser de subsistência para se transformar em uma cultura de alta tecnologia, com uso de irrigação, insumos e colheita mecanizada. Isto favorece o plantio da cultura em novas épocas, especialmente outono-inverno-primavera, quando as temperaturas são favoráveis ao aparecimento de patógenos.

A mancha-angular do feijoeiro, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., é uma doença comum nas regiões tropicais e subtropicais. Por vários anos, foi considerada de importância secundária, em razão de seu aparecimento apenas no final do ciclo cultura. Mas com as mudanças no sistema de cultivo que permitem que haja feijão plantado ou restos de cultura contaminados no campo durante todo o ano, esse fungo passou a ser de grande importância, provocando perdas de até 80% da produção, dependendo da suscetibilidade dos cultivares utilizados, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura por ocasião de sua ocorrência. Para controlar esta enfermidade, melhoristas tem buscado fontes de resistência, para incorporar em programas de melhoramento que visam à obtenção de cultivares resistentes.

No presente trabalho foi avaliada a resistência do cultivar andino Jalo EEP 558, que apresentou resistência parcial ou quantitativa à *P. griseola*. Devido à co-evolução patógeno-hospedeiro, a incorporação de genes de resistência andinos em cultivares mesoamericanos e vice-versa deve possibilitar o desenvolvimento de cultivares com ampla resistência. O cultivar Jalo EEP 558 é uma fonte potencial de genes de resistência à mancha-angular para genótipos mesoamericanos, sobretudo pela sua ampla adaptação a ambientes de cultivo brasileiros. Atualmente a única fonte de resistência andina

no programa do BIOAGRO/UFV é o cultivar AND 277, que apresentou, em trabalhos anteriores, três genes de resistência que, inesperadamente, não segregaram com relação a genes de cultivares mesoamericanos, sugerindo a presença de genes mesoamericanos neste cultivar andino. Sendo assim, a identificação de novas fontes de resistência andina faz-se necessária.

Apesar da idéia da incorporação de genes de resistência andinos em cultivares mesoamericanos ser atraente, devido aos diferentes centros de origem ocorreu um isolamento reprodutivo, fazendo com que genótipos mesoamericanos quando cruzados com genótipos andinos gerem híbridos inviáveis, que quase sempre não deixam descendentes. Uma alternativa para transpor esta barreira, seria a utilização de cruzamentos-ponte, que é a utilização de cultivares que não apresentam genes de incompatibilidade e por isso são passíveis de cruzamento com ambos os *pools* gênicos. Neste trabalho foram testados quatorze cultivares como ponte, sendo três andinos: Diacol Calima, AND 277 e Novo Jalo; e onze mesoamericanos: Milionário, Rio Vermelho, BAT 93, Ica Pijão, KW780, CNF261, CNF10, G2858, GGWax, Small White e KW765. Destes, os três cultivares andinos foram eficientes como ponte e cinco dos mesoamericanos (CNF10, CNF261 Small White, KW765 e KW780), também apresentaram híbridos normais em cruzamentos com o cultivar andino Jalo EEP 558, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento que visem a incorporação de genes andinos e mesoamericanos em um único cultivar.

A identificação de marcadores moleculares de herança monogênica, proximamente ligados a regiões genômicas que governam resistência a doenças, vem sendo praticada em vários programas de melhoramento. Entretanto, menor atenção tem sido dada à identificação de genes de resistência de herança poligênica, provavelmente pelo fato do estudo deste tipo de resistência ser mais difícil. Neste caso, é imprescindível a existência de um mapa de ligação com alto grau de saturação para a identificação de locos envolvidos no controle das características de herança quantitativa chamados de QTL. Contudo, a combinação de genes de resistência monogênica a regiões de resistência quantitativa vem sendo aplicada a algumas culturas como o trigo, com o intuito de obtenção de cultivares com resistência duradoura.

Neste trabalho, foi ainda investigada a ocorrência de regiões genômicas de controle parcial da resistência à mancha-angular e posicionado estes QTLs em um mapa previamente construído. Regiões genômicas de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular de herança monogênica, identificadas em trabalhos anteriores, também foram mapeadas. Foram identificados “clusters” envolvidos no controle de diversas doenças do feijoeiro, confirmando a hipótese de que genes envolvidos no controle de resistência a doenças normalmente se organizam em blocos no genoma das plantas. Esta observação deve ser tratada com atenção sobretudo no processo de piramidação de genes de resistência em um mesmo cultivar.