

RENATA OLIVEIRA BATISTA

**RESISTÊNCIA DO FEJJOEIRO-COMUM À MURCHA-DE-FUSARIUM:  
SELEÇÃO DE GENITORES, HERANÇA E PROCESSO DE COLONIZAÇÃO  
DO PATÓGENO**

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  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B333r  
2015  
Batista, Renata Oliveira, 1986-  
Resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium : seleção de genitores, herança e processo de colonização do patógeno / Renata Oliveira Batista. - Viçosa, MG, 2015.  
xi, 108f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Feijão - Melhoramento genético. 3. Resistência a doenças e pragas. 4. *Fusarium oxysporum*. 5. Interação planta-patógeno. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Doutorado em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 635.652

RENATA OLIVEIRA BATISTA

**RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO-COMUM À MURCHA-DE-FUSARIUM:  
SELEÇÃO DE GENITORES, HERANÇA E PROCESSO DE COLONIZAÇÃO  
DO PATÓGENO**

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: 16 de novembro de 2015.

---

Marciane da Silva Oliveira

---

Trazilbo José de Paula Junior

---

Pedro Crescêncio Souza Carneiro  
(Coorientador)

---

Marisa Vieira de Queiroz  
(Coorientadora)

---

José Eustáquio de Souza Carneiro  
(Orientador)

“E até aqui eu sei que Deus tem me ajudado. Sei que em meio às provações Ele me dá o sustento necessário para prosseguir. Nem sempre entendo o porquê de tantas lutas, mas Ele me conforta, Sua graça me basta e tenho a plena certeza que grande é a vitória que tem preparado para mim.”

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, nem o que irei ser,  
mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

Aos meus pais Moacir e Isabel,  
motivo maior do meu esforço e dedicação.

Ao meu noivo Alessandro,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus, meu refúgio e fortaleza! Por me conceder saúde e perseverança para conquistar meus sonhos sem hesitar! Pelas maravilhas que fez e faz na minha vida, me amparando nos momentos de desespero e angústia e colocando em meu caminho pessoas que contribuíram para que essa jornada fosse concluída.

Aos meus pais, Moacir e Isabel, por acreditarem em mim mais do que eu mesma, torcendo e apoiando minhas decisões. Aos meus irmãos Daniel e Adriana e meu sobrinho Christian por todo o carinho, torcida, apoio e amor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino de qualidade e estrutura concedida. À Eveline Teixeira Caixeta e a todo corpo docente da UFV pelos ensinamentos. Ao Leonardo Lopes Bhering pelos ensinamentos e dedicação à sua profissão que me servirão de exemplo. Ao Departamento de Fitotecnia e Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação acadêmica e oportunidade.

Ao meu orientador José Eustáquio de S. Carneiro, pelos ensinamentos, confiança e exemplo de humildade. Pela oportunidade de ministrar aulas na disciplina de Feijão.

Ao meu coorientador Pedro Crescêncio S. Carneiro, pela paciência, ensinamentos e ajuda fundamental na análise dos dados e redação da tese. Pela convivência agradável no lab Biometria, momentos de descontração nos diários cafezinhos, amizade e conselhos que me ajudaram a amadurecer. Por ser um exemplo profissional. Pela oportunidade na monitoria da disciplina genética quantitativa (BIO 342).

À minha coorientadora Marisa Vieira de Queiroz, por ter me recebido de portas e braços abertos. Pela paciência e por comemorar comigo cada resultado obtido, me motivando e acreditando no meu potencial. Pelo carinho que sempre teve comigo!

Ao pesquisador Trazilbo José de Paula Junior, pelo apoio do projeto até a redação da tese. Pelo incentivo, atenção e gentileza na ajuda nos resultados inesperados.

À doutora Marciane da Silva Oliveira, pela amizade, carinho, ajuda nos concursos e contribuições na minha tese.

Ao Prof. José Luiz Carvalho Filho, pelas análises de herança no MONOGEN.

Aos colegas do Programa Feijão, pela ajuda na execução do experimento de campo e infinitas inoculações de Fop, em especial John Lennon e Michel. Aos colegas da Microbiologia e do laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos, em especial Tiago Leite e Manuela Brito pela ajuda, ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos funcionários do Campo Experimental Diogo Alves de Melo, em especial ao Paulo Paiva e Gilberto, sempre amigos e prestativos, ajudando a realizar este trabalho e da Fazenda Experimental da UFV, em Coimbra, pelos momentos de descontração, ajuda nos experimentos de campo e carinho, em especial Sebastião, Potoca e Douglas.

À Professora Renata Maria Strozi Alves Meira pela orientação no Laboratório de Anatomia Vegetal. A Luana, Carol, Aurora, Patrícia, Valéria e Talita, pela ajuda nos infinitos cortes. Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálises pela atenção e torcida ao longo das intermináveis análises.

Aos amigos de Viçosa que levarei para a vida, Franklin Silva, Inaia Rhavene, Hellen Silveira, Tânia Pires, Diego Batista, Leonardo Corrêa, Rafael Anjos, Michele Jorge, Karine Costa, Dênia Almeida, Dani Lelis, Marcelo Sekita, Isadora Martins e Rusthon Santos pelo carinho e por tantas vezes, terem transformado lágrimas em sorrisos!

À minha querida amiga Aninha, pelo carinho, apoio e amizade que me fizeram uma pessoa mais feliz nesses últimos anos de Viçosa! Obrigada por irradiar sua alegria até mim!

À minha amiga-irmã Lisandra, pela amizade, compreensão, apoio e imenso carinho! Pela paz que me transmite e serenidade que sempre me contagiou. Por me receber com carinho em sua casa como se fosse da família. Ao Léo, por tantos momentos de brincadeiras e alegrias que fizeram meus dias mais felizes! A Maíra pelo carinho e ao Bernardo por me receber com tanta gentileza!

Ao noivo/marido Alessandro, pela ajuda nas inoculações de Fop, discussões científicas e ensinamentos. Pelo seu carinho, amizade, companheirismo e por ser o meu amor!

## **BIOGRAFIA**

RENATA OLIVEIRA BATISTA, filha de Moacir Antônio Batista e Isabel de Oliveira Batista, nasceu em Unaí, Minas Gerais, no dia 15 de junho de 1986.

Em dezembro de 2003, concluiu o ensino Médio na Escola Nossa Senhora do Carmo, em Unaí, Minas Gerais.

Em julho de 2010, concluiu a graduação no curso de Agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus Janaúba, MG.

Em agosto de 2010, ingressou no programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2012.

Em fevereiro de 2012, ingressou no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da tese em novembro de 2015.

## RESUMO

BATISTA, Renata Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium: seleção de genitores, herança e processo de colonização do patógeno.** Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro. Coorientadores: Pedro Crescêncio Souza Carneiro e Marisa Vieira de Queiroz.

O melhoramento do feijoeiro para a obtenção de cultivares resistentes é a estratégia mais efetiva e econômica contra fitopatógenos, sobretudo habitantes de solo, onde o controle químico é inexistente e práticas culturais ineficientes. Os objetivos com este trabalho foram: i) estimar a capacidade geral e específica de combinação de genitores visando melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* - Fop) com base na severidade da doença e redução do crescimento da planta, ii) estudar a herança da resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium a partir de sete cruzamentos contrastantes e iii) transformação genética de Fop e uso desses transformantes para analisar o processo de colonização em tecidos do feijoeiro. Oito genótipos de feijoeiro grupo carioca foram combinados em esquema de dialelo parcial (3 x 5). Os genitores e 15 híbridos  $F_{1s}$  foram avaliados quanto a severidade da murcha-de-fusarium isolado FOP UFV 01, porcentagem de redução da altura e da massa fresca de parte aérea da planta e produtividade de grãos. A resistência do feijoeiro a Fop é controlada por poucos genes dominantes, enquanto a redução do crescimento da planta é governada por um conjunto diferente de genes, incluindo genes dominantes e recessivos. A redução do crescimento da planta, como resposta de suscetibilidade a Fop, aumentou a eficácia na seleção de genitores visando o melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium. A população segregante oriunda do cruzamento VC 25 / CVIII 8511 // VC 25 / Pérola, é promissora visando o melhoramento do feijoeiro para os caracteres produtividade de grãos, resistência à murcha-de-fusarium e redução do crescimento. Para o estudo de herança da resistência a Fop isolado FOP UFV 01, 210 plantas de cada população  $F_2$  resultante dos sete cruzamentos contrastantes do dialelo parcial foram avaliadas individualmente quanto à severidade da murcha-de-fusarium. Duas classes marcantes (resistente e suscetível) foram observadas nos parentais e gerações  $F_1$  e  $F_2$  dos cruzamentos, indicando herança oligogênica da resistência. A partir da segregação da geração  $F_2$ , houve contraste entre as metodologias, porém pelos estimadores de máxima verossimilhança, metodologia mais adequada, conclui-se que a resistência é governada por um gene dominante de efeito maior com a presença de poligenes. Altas estimativas de herdabilidade indicam maiores chances de sucesso com a seleção. Por

retrocruzamentos é possível à transferência do gene dominante de efeito maior das fontes de resistência deste trabalho. As fontes de resistência citadas neste trabalho direcionarão o melhoramento visando à desenvolvimento de cultivares de feijoeiro com resistência durável a Fop através da piramidação do gene dominante de efeito maior e dos poligenes. Para a análise do processo de colonização de Fop em tecidos da raiz e caule do feijoeiro, Fop raça 2 brasileira foi transformado para a expressão do gene da proteína verde fluorescente (egfp). O uso combinado de Driselase e Lyzing Enzyme foi eficiente para a protoplastização de micélio de Fop. O protocolo de transformação com base em PEG-CaCl<sub>2</sub> foi eficiente para a obtenção de transformantes estáveis com colônias expressando o gene egfp. Aos 6 dias após a inoculação (DAI), o fungo penetrou na planta via pelos radiculares e aos 11 DAI cresceu em células parenquimáticas de maneira intercelular. Aos 19 DAI, atingiu o xilema bloqueando a passagem de água e sais minerais resultando em murcha e morte da planta aos 25 dias.

## ABSTRACT

BATISTA, Renata Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2015. **Resistance to fusarium wilt in common bean: parents selection, inheritance and pathogen colonization process.** Adviser: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-advisers: Pedro Crescêncio Souza Carneiro and Marisa Vieira de Queiroz.

Common bean improvement for development of resistant cultivars is the most effective and economic strategy against plant pathogens, especially soil inhabitants where there is not chemical control and cultural practices is an incomplete control measure. The objectives of this study were: i) to estimate the general and specific combining ability of parents for common bean breeding for resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* - Fop), based on disease severity and reduced plant growth, ii) to study the inheritance of resistance to Fusarium wilt in common bean in seven contrasting crosses and iii) Fop genetic transformation and colonization in bean tissue. Eight bean genotypes of carioca group were combined in a partial diallel scheme (3 x 5). The parents and their 15 F<sub>1</sub>'s hybrids were evaluated for severity of Fusarium wilt, strain FOP UFV 01, percentage of height reduction and fresh weight of plant shoots and grain yield. Resistance to Fop in common bean is controlled by a few dominant genes, while the reduction in plant growth by a different set of genes, including dominant and recessive genes. Measuring the reduction in plant growth, a response of Fop susceptibility, increased the efficiency in parents selecting for common bean breeding for Fusarium wilt resistance. The segregating population, from the cross VC 25 / CVIII 8511 // VC 25 / Pérola, is promising for common bean breeding for the traits grain yield, resistance to Fusarium wilt and stunted growth. To study the inheritance of resistance to Fop strain FOP UFV 01, 210 plants of each F<sub>2</sub> population of the seven contrasting partial diallel crosses were individually evaluated for severity of Fusarium wilt. Two prevalent classes (resistant and susceptible) were observed in parental, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations of the crosses, indicating oligogenic inheritance of resistance. From the segregation of the F<sub>2</sub> generation, there was contrast results between the methodologies, but by maximum likelihood estimators, most appropriate methodology, it is concluded that resistance is governed by a single dominant major gene with the presence of polygenes. High heritability estimates indicate higher chances of success with selection. By backcrossing is possible to transfer the major dominant gene of resistance sources of this work. Resistance sources cited in this paper will direct improvement in order to development of bean cultivars with durable resistance to Fop by pyramiding of the major gene and the polygenes. For following the

Fop colonization process in bean root and stem tissues, Fop 2 Brazilian race was transformed for the green fluorescent protein gene (egfp) expression. The combined use of Driselase and Lyzing Enzyme was efficient for Fop mycelium protoplastization. The PEG-CaCl<sub>2</sub> transformation protocol was efficient to obtain stable transformants with colonies expression the egfp gene. At 6 days post-inoculation (DPI), the fungus penetrated the plant via root hair and grew 11 DPI in parenchyma cells in a intercellular way. At 19 DAI, reached the xylem, blocked the passage of water and minerals resulting in wilting and plant death at 25 days.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	4
CAPÍTULO 1. Resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium: análise dialéctica da severidade da doença e da redução do crescimento da planta .....	7
Resumo.....	8
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	10
Resultados .....	15
Discussão .....	23
Conclusões .....	31
Referências Bibliográficas .....	32
CAPÍTULO 2. Herança da resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium.....	36
Resumo.....	37
Introdução .....	38
Material e Métodos .....	40
Resultados .....	46
Discussão .....	55
Conclusão.....	65
Referências Bibliográficas .....	65
CHAPTER 3 – Infection and colonization of common bean by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. phaseoli race 2 expressing GFP.....	73
Abstract .....	74
Introduction .....	75
Material and Methods .....	77
Results .....	83
Discussion .....	92
Conclusions .....	98
References .....	99
CONCLUSÕES GERAIS .....	107
APOIO FINANCEIRO .....	108

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa de maior importância no consumo humano do mundo, principalmente em países subdesenvolvidos como da América do Sul e Central e sudeste da África (Meziadi et al., 2015). Nesses países, o feijão comum representa a principal fonte de proteínas para milhões de pessoas (Meziadi et al., 2015; Schmutz et al., 2014). Além do seu consumo, o cultivo do feijoeiro se expandiu em todo o mundo atingindo uma produção superior a 23 milhões de toneladas anualmente. O Brasil está entre os maiores produtores mundiais e é o maior produtor e consumidor das Américas (Faostat, 2013).

No Brasil, o feijão comum é dividido em grupos comerciais de acordo com o tipo de grão. Dentre os tipos de feijões comercializados, o tipo carioca responde por 70% da produção nacional de grãos e é o mais consumido no país (Melo et al., 2012). Apesar da sua importância, as cultivares de grãos carioca ainda deixam a desejar quanto aos caracteres arquitetura de plantas, produtividade de grãos e resistência às doenças, considerados simultaneamente.

Várias doenças acometem a cultura do feijoeiro, com destaque para as fúngicas (Paula Júnior e Wendland, 2012). A cultura é hospedeira de diversos fungos de parte aérea e habitantes de solo que interferem tanto no rendimento quanto na qualidade de grãos. Dentre as doenças causadas por fungos habitantes de solo destaca-se *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), agente causal da murcha-de-fusarium no feijoeiro, considerada atualmente uma das doenças mais importantes da cultura (Ramalho et al., 2012).

O fungo Fop é o principal patógeno de solo do feijoeiro e tem se estabelecido em todas as áreas produtoras de feijão do Brasil. As perdas causadas por essa doença têm sido crescentes principalmente em áreas sob plantios sucessivos e irrigados (Toledo-Souza et al., 2012). Além da ausência de controle químico, esse cenário é agravado devido

à produção de clamidósporos, estruturas de resistência produzidas pelo fungo que sobrevive por vários anos no solo mesmo na ausência de hospedeiro. Por essas razões a principal alternativa de controle desta doença é a obtenção de cultivares resistentes (Cross et al., 2000) que são facilmente adotadas pelos produtores e não apresentam riscos ambientais (Gonçalves-Vidigal et al., 2013).

No melhoramento, a seleção de genótipos resistentes marca o início de um programa que tem por objetivo o desenvolvimento de cultivares com genes R (genes de resistência). No entanto, essa seleção deve ser adotada de forma criteriosa, pois, dela depende o sucesso do programa em etapas posteriores em que, esses genótipos, originarão populações segregantes onde será realizada a seleção e extração de linhagens (Bertan et al., 2007; Pereira et al., 2007). Nesse sentido, destaca-se a análise dialélica que, por meio de estimativas de capacidades geral e específica de combinação, identifica os genitores com maior frequência de alelos favoráveis e mais divergentes entre si. Além disso, o dialelo determina os efeitos gênicos predominantes do caráter em estudo e aponta as populações segregantes mais promissoras geradas nos cruzamentos para a extração de linhagens (Cruz et al., 2012). Essas informações são importantes na escolha do método de condução das populações e no critério de seleção a ser adotado (Pimentel et al., 2013).

Na adoção do método de condução das populações segregantes o conhecimento do efeito gênico predominante do caráter fornecido pelo dialelo (genitores e híbridos) não é suficiente. Entretanto, além de genitores e híbridos, as avaliações das gerações segregantes do dialelo são capazes de definir o modo de herança da característica. Além disso, no estudo de herança, fontes de genes R são caracterizadas e podem ser usadas no melhoramento. Meziadi et al. (2015) relatam que esforços consideráveis são realizados por melhoristas em estudos de herança e caracterização de genes R em feijoeiro comum. Caixeta e Zambolim (2014) ressaltam que essas informações direcionam o melhorista no

planejamento do programa e decisão do método de melhoramento mais eficiente para a obtenção de cultivares resistentes.

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes, o entendimento dos mecanismos envolvidos na doença e na interação entre planta e patógeno, pode ser considerado uma ferramenta de grande potencial no melhoramento (Li et al., 2011). A interação planta-patógeno é um processo que envolve várias fases de desenvolvimento do patógeno no hospedeiro: reconhecimento dos exsudatos radiculares da planta pelo patógeno, infecção e colonização dos tecidos da planta, além das respostas da planta ao ataque do patógeno (Zvirin et al., 2010). Compreender a interação entre o patógeno e a planta permite ao melhorista a escolha mais eficiente de controle da doença (Li et al., 2011). Além disso, essas informações dão um suporte maior para o estudo visando o entendimento e reconhecimento de genes e produtos de genes que possivelmente estejam envolvidos na resistência da planta a esse patógeno. Uma metodologia que vem sendo amplamente utilizada para esse tipo de estudo é a transformação de fungos para a expressão da **Green Fluorescent Protein** - (Proteína Verde Fluorescente), extraída da água-viva *Aequorea victoria* (Lorang et al., 2001). Após a transformação genética do fungo, os transformantes podem ser usados em estudos de interação planta-patógeno (Muthamilarasan e Prasad, 2013).

Desse modo, os objetivos gerais com este trabalho foram: i) estimar a capacidade geral e específica de combinação de genitores para o melhoramento do feijoeiro comum visando resistência à murcha-de-fusarium, baseado na severidade da doença e redução do crescimento da planta; ii) estudar a herança da resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium, a partir de sete cruzamentos contrastantes e iii) transformar o isolado de Fop raça 2 para a expressão do gene *egfp* e o uso do transformante GFP para analisar o processo de colonização do feijoeiro comum.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTAN I, CARVALHO FIF, OLIVEIRA AC. 2007. Parental selection strategies in plant breeding programs. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10: 211-222.

CAIXETA ET, ZAMBOLIM L. 2014. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM L, JESUS JÚNIOR WC, RODRIGUES FA (Eds). *O Essencial da Fitopatologia: Controle de Doenças de Plantas*. Suprema Gráfica e Editora Ltda., Visconde do Rio Branco, MG, 551-576.

CROSS H, BRICK MA, SCHWARTZ HF, PANELLA LW, BYRNE PF. 2000. Inheritance of resistance to Fusarium wilt in two common bean races. *Crop Science* 40: 954–958.

CRUZ CD, REGAZZI AJ, CARNEIRO PCS. 2012. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 1, 4ed. Editora UFV, Viçosa, 514 p.

FAOSTAT: FAO Statistical Databases 2013. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 27 out. 2015.

GONÇALVES-VIDIGAL MC, CRUZ AS, LACANALLO GF, VIDIGAL FILHO PS, SOUSA LL, PACHECO CMNA, MCCLEAN P, GEPTS MA, PASTOR-CORRALES, MA. 2013. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose Co-10 and angular leaf spot Phg-ON disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. *Theoretical and Applied Genetics*. 126: 2245–2255.

LI C, CHEN S, ZUO C, SUN Q, YE Q, YI G, HUANG B. 2011. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. *European Journal of Plant Pathology* 131: 327-340.

LORANG JM, TUORI RP, MARTINEZ JP, SAWYER TL, REDMAN RS, ROLLINS JA, WOLPERT TJ, JOHNSON KB, RODRIGUEZ RJ, DICKMAN MB, CIUFFETTI LM. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1987-1994.

MELO LC, PELOSO MJD, PEREIRA HS, FARIA LC, COSTA JGC, DÍAZ JLC, RAVA CA, WENDLAND A, ABREU AFB. 2010. BRS Estilo - common bean cultivar with carioca grain, upright growth and high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 377-379

MEZIADI C, RICHARD MMS, DERQUENNES A, THAREAU V, BLANCHET S, GRATIAS A, PFLIEGER S, GEFFROY V. 2015. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence, *Plant Science* (doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.006>).

MUTHAMILARASAN M, PRASAD M. 2013. Plant innate immunity: an updated insight in defense mechanism. *Journal of Biosciences* 38 (2): 433-49.

PAULA JUNIOR TJ, WENDLAND A (Eds.). 2012. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Epamig, Viçosa, Brazil.

PEREIRA HS, SANTOS JB, ABREU AFB, COUTO KR. 2007. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 707-713.

PIMENTEL AJB, RIBEIRO G, SOUZA MA, MOURA LM, ASSIS JC, MACHADO JC. 2013. Comparação de métodos de seleção de genitores e populações segregantes aplicados ao melhoramento de trigo. *Bragantia* 72 (2): 113-121.

RAMALHO MAP, ABREU AFB, CARNEIRO JES, WENDLAND A, PAULA JUNIOR TJ, VIEIRA RF, DEL PELOSO MJ, LOBO JUNIOR M, PEREIRA AC. 2012. Murcha-de-fusário. In: PAULA JUNIOR TJ AND WENDLAND A, editores, Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Epamig, Viçosa, Brazil. p 127-138.

SCHMUTZ J. et al., 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46: 707-713.

TOLEDO-SOUZA ED, SILVEIRA PM, CAFÉ-FILHO AC, LOBO-JÚNIOR M. 2012. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 1031-1037.

ZVIRIN T, HERMAN R, BROTMAN Y, DENISOV Y, BELAUSOV E, FREEMAN S, PERL-TREVES R. 2010. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1·2. *Plant Pathology* 59: 576-585.

**CAPÍTULO 1. Resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium: análise dialética da  
severidade da doença e da redução do crescimento da planta**

## Resumo

A seleção de genitores é a primeira etapa de um programa de melhoramento de plantas e determina o sucesso do mesmo. Conhecer o potencial destes possíveis genitores auxilia os melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares com menor tempo e custos. Assim, objetivou-se com este trabalho estimar a capacidade geral e específica de combinação de genitores visando melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium com base na severidade da doença e redução do crescimento da planta. Para tal, oito genótipos de feijoeiro comum, grão carioca, foram cruzados em esquema dialelo parcial 3 x 5 para obtenção dos híbridos  $F_1$ 's. Os genitores e seus 15 híbridos  $F_1$ 's foram avaliados quanto a severidade da murcha-de-fusarium, porcentagem de redução da altura e da massa fresca de parte aérea da planta e produtividade de grãos. Observou-se que a resistência do feijoeiro a Fop é controlada por poucos genes dominantes; enquanto a redução do crescimento da planta é governada por um conjunto diferente de genes, incluindo genes dominantes e recessivos. A redução do crescimento da planta, como resposta de suscetibilidade a Fop, aumentou a eficácia na seleção de genitores visando o melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium. A população segregante, oriunda do cruzamento VC 25 / CVIII 8511 // VC 25 / Pérola, é promissora visando o melhoramento do feijoeiro para os caracteres produtividade de grãos, resistência à murcha-de-fusarium e redução do crescimento.

## **Introdução**

*Fusarium oxysporum*, patógeno habitante de solo e amplamente disseminado, causa murchas vasculares em mais de 100 espécies de plantas e é considerado um dos 10 fungos fitopatogênicos de maior importância econômica e científica no mundo (Dean et al., 2012; Pantelides et al., 2013). No Brasil, a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) é predominante em todas as áreas produtoras de feijoeiro-comum (Abawi e Pastor-Corrales, 1990; Toledo-Souza et al., 2012), contribuindo de forma efetiva para a redução de sua produtividade. Segundo Ramalho et al. (2012), isto se deve aos plantios sucessivos do feijoeiro, ausência de rotação de culturas e uso de cultivares suscetíveis a Fop, inviabilizando o cultivo do feijoeiro sob irrigação por pivô central em várias áreas produtoras.

A introdução de Fop em áreas isentas do patógeno ocorre, em geral, por meio de sementes infectadas e uso de implementos agrícolas contaminados. Este fungo sobrevive tanto saprofiticamente ou pela produção de estruturas de resistência (clamidósporos), que permanecem viáveis no solo durante vários anos, o que aumenta a dificuldade em seu controle (Barbosa e Gonzaga, 2012). Em virtude de Fop ser um fungo habitante de solo e colonizar o sistema vascular, não se recomenda o uso de fungicidas na parte aérea da planta. O manejo de Fop restringe-se à rotação de culturas, tratamento de sementes e uso de cultivares resistentes. Cross et al. (2000) relatam que o uso de cultivares resistentes é o método mais efetivo de controlar as perdas econômicas causadas pela murcha-de-fusarium.

A avaliação da severidade da murcha-de-fusarium em feijoeiro é geralmente realizada com base em uma escala de notas desenvolvida por Pastor-Corrales e Abawi (1987) que tem como principal sintoma a murcha da parte aérea da planta. Entretanto, Pereira et al. (2013a) relatam que, além da murcha, o crescimento da planta é afetado em algumas cultivares de feijoeiro infectadas por Fop. Na avaliação desse caráter é

necessário utilizar plantas do mesmo genótipo como controle negativo (não inoculadas com o fungo) para quantificar a taxa de redução do crescimento, o que restringe essa avaliação a genótipos com alto grau de homozigose (linhagens ou híbridos  $F_1$ 's).

Atualmente, a hibridação é o principal método utilizado no melhoramento do feijoeiro e a escolha acurada dos genitores a serem cruzados é etapa fundamental, pois dela depende o sucesso das posteriores. Nesse sentido, destacam-se os cruzamentos dialélicos, que permitem estimar a capacidade geral e específica de combinação dos genitores, bem como determinar o controle genético predominante do caráter em questão.

Não há relatos em literatura do uso da redução do crescimento da planta, como resposta de suscetibilidade a Fop, na escolha de genitores de feijoeiro, visando melhoramento para resistência à murcha-de-fusarium. Deste modo, objetivou-se estimar a capacidade geral e específica de combinação de genitores visando melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium com base na severidade da doença e redução do crescimento da planta.

## **Material e Métodos**

### Material genético

Cultivares e linhagens elites de feijoeiro tipo carioca de porte ereto ou elevado potencial produtivo (BRS Estilo, VC 13 e VC 25) foram escolhidas para compor o Grupo 1 de um dialelo parcial. O Grupo 2 abrangeu genótipos resistentes a Fop: BRSMG Talismã, CVIII 8511, Pérola, RC-I-8 e CNFC 11965 (Tabela 1). Estes genitores foram hibridados manualmente em esquema dialélico parcial 3 x 5, em casa de vegetação em 2013, originando 15 híbridos  $F_1$ 's. No estágio R9 as sementes  $F_1$ 's foram colhidas e armazenadas para experimentos posteriores.

**Tabela 1-** Origem e principais caracteres de interesse de oito genitores de feijoeiro utilizados no dialelo parcial.

Genitores	Origem	Característica de Interesse
<b>Grupo 1</b>		
BRS Estilo	Embrapa	Porte Ereto e Produtividade de Grãos <sup>1</sup>
VC 13	UFV	Produtividade de Grãos <sup>2</sup>
VC 25	UFV	Produtividade de Grãos <sup>3</sup>
<b>Grupo 2</b>		
BRSMG Talismã	UFLA	Resistência a Fop <sup>4</sup>
RC-I-8	UFLA	Resistência a Fop <sup>4</sup>
CVIII 8511	UFLA	Resistência a Fop <sup>4</sup>
CNFC 11965	Embrapa	Resistência a Fop <sup>4</sup>
Pérola	Embrapa	Resistência a Fop <sup>4</sup>

1- Melo et al., 2010. 2- Silva et al., 2011. 3- Dados não publicados do Programa de Melhoramento do Feijoeiro - UFV, 4- Pereira et al., 2013b.

Caracteres avaliados

Reação a Fop

Em casa de vegetação, os oito genitores e seus 15 híbridos F<sub>1</sub>'s (totalizando 23 tratamentos) foram avaliados quanto a reação a Fop. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com três repetições e parcelas de um vaso com três plantas.

Foi utilizado o isolado FOP UFV 01, coletado em Coimbra (Minas Gerais, Brasil) de plantas da cultivar de feijoeiro Meia Noite que exibiram os sintomas típicos de murchar-de-fusarium (Pereira et al., 2013). Ao ser inoculado nas séries diferenciadoras de Fop propostas por Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002), Pereira (2013) considerou FOP UFV 01 uma nova raça da espécie. Para a produção do inóculo de FOP UFV 01, discos de BDA (batata - dextrose - ágar) contendo micélio do fungo foram repicados para placas de Petri contendo BDA. As placas foram mantidas em BOD durante 14 dias a 25°C±1°C, sob fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de esporos foi preparada uma hora antes da inoculação sendo utilizada a concentração de 1 x 10<sup>6</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, incluindo macro e microconídios, como recomendado por Pastor-Corrales e Abawi (1987).

Para a inoculação dos genótipos utilizou-se a metodologia de imersão de raízes em suspensão de conídios proposta por Pastor-Corrales e Abawi (1987). Para isso, a semeadura dos 23 genótipos foi realizada em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato para hortaliças Topstrato<sup>®</sup>, sendo mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento das plântulas. No estágio V2 (folha primária completamente expandida) as plântulas foram cuidadosamente retiradas das bandejas, suas raízes lavadas e 1/3 do seu comprimento foram cortadas. Imediatamente após o corte, as raízes das plântulas foram imersas na suspensão de macro e microconídios do isolado FOP UFV 01 durante 5 min. Após este procedimento, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 2,5 L de substrato Topstrato<sup>®</sup> e mantidas em casa de vegetação a 25°C ± 4°C. Diariamente as plantas foram irrigadas e, 10 dias após inoculação (DAI), cada vaso recebeu 1,0 g de uréia como fonte de nitrogênio.

A avaliação da reação dos genótipos à murcha-de-fusarium foi realizada utilizando a escala de notas da severidade da doença descrita por Pastor-Corrales e Abawi (1987), que se baseia, principalmente, na intensidade de murcha de parte aérea. Por esta escala, 1 = nenhum sintoma visível; 3 = de 1% a 10% de folhas sintomáticas (folhas com murcha suave e clorose); 5 = 11% a 25% de folhas sintomáticas (folhas com murcha moderada e clorose); 7 = 26% a 50% de folhas sintomáticas (folhas com murcha severa e clorose) e 9 = planta morta ou severamente infectada. As avaliações foram realizadas aos 15, 18 e 21 DAI, sendo a nota de severidade da última avaliação (SMF) usada para classificar os genótipos quanto à murcha-de-fusarium. Conforme Pastor-Corrales e Abawi (1987), genótipo com nota média de 1,0 a 3,0 é considerado resistente, de 3,1 a 6,0 de reação intermediária e 6,1 a 9,0 suscetível.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtida segundo Shaner e Finney (1977), utilizando as três avaliações, conforme se segue:

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right) (T_{i+1} - T_i) \right] \text{ em que:}$$

$Y_i$  = severidade da murcha-de-fusarium na i-ésima observação,

$T_i$  = tempo (dias após inoculação) na i-ésima observação e

$n$  = o número total de avaliações.

#### Redução do crescimento de plantas

A redução do crescimento das plantas foi avaliada pela redução da altura da planta e da massa fresca de parte aérea. Para tal, seis plântulas de mesmo genótipo daquelas inoculadas com FOP UFV 01 também tiveram 1/3 de suas raízes cortadas e imersas apenas em água destilada por 5 min e transplantadas para dois vasos, constituindo um controle negativo. Neste caso, utilizou-se duas repetições e parcelas de um vaso com três plantas. Após a última avaliação da severidade da doença, uma planta por vaso das parcelas inoculadas com FOP UFV 01 e também do controle negativo foram cortadas e sua altura aferida do nó cotiledonar até a inserção da última folha, expressa em centímetros (cm). Em seguida, cada planta foi acondicionada individualmente em saco de papel e pesada para a obtenção da massa fresca de parte aérea em gramas (g). A porcentagem de redução da altura (RALT) e da massa fresca de parte aérea (RMF) das plantas inoculadas com FOP UFV 01, em cada repetição, foi calculada em relação à média das medidas de altura e massa fresca das plantas do controle negativo, conforme a seguir:

$$RALT/RMF = \frac{(Y_{ic} - Y_i) \times 100}{Y_{ic}} \text{ em que:}$$

$Y_{ic}$  = valor médio da altura ou da massa fresca de parte aérea da planta do genótipo  $i$  inoculada em água destilada (controle negativo) e

$Y_i$  = valor da altura ou da massa fresca de parte aérea da planta do genótipo  $i$  inoculada com FOP UFV 01.

## Produtividade de grãos

A produtividade de grãos (PROD) foi obtida em experimento de campo conduzido na Estação Experimental de Coimbra (20°45' S e 42°51' W, 690 m de altitude), pertencente ao Departamento de Fitotecnia da UFV. Sementes dos oito genitores e seus 15 híbridos F<sub>1</sub>'s (totalizando 23 tratamentos) foram semeadas na safra da seca de 2014 com delineamento em blocos casualizados com três repetições. As parcelas foram constituídas de duas linhas de 1,5 m de comprimento, com densidade de plantio de 12 sementes por metro e espaçamento de 0,50 m entre linhas. Na ocasião da colheita, todas as plantas da parcela foram colhidas manualmente e os grãos beneficiados e pesados para a obtenção da produtividade de grãos, em kg ha<sup>-1</sup>. Cabe ressaltar que nesta safra não foi observada incidência de murcha-de-fusarium.

## Análises genético-estatísticas

Para a análise dialélica da severidade da murcha-de-fusarium (SMF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), redução da altura (RALT) e da massa fresca de parte aérea da planta (RMF) e produtividade de grãos (PROD) foi adotado o modelo de Griffing (1956) adaptado para dialelos parciais, conforme modelo a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + g'_j + s_{ij} + \bar{\varepsilon}_{ij}, \text{ em que}$$

$Y_{ij}$  = valor médio da combinação híbrida entre o i-ésimo progenitor do grupo I e o j-ésimo progenitor do grupo II;  $\mu$  = média geral do dialelo;  $g_i$  = efeito da capacidade geral de combinação do i-ésimo progenitor do grupo 1;  $g'_j$  = efeito da capacidade geral de combinação do j-ésimo progenitor do grupo 2;  $s_{ij}$  = efeito da capacidade específica de combinação entre progenitores de ordem i e j, dos grupos 1 e 2, respectivamente e  $\bar{\varepsilon}_{ij}$  = erro experimental médio.

Para todas as análises genético-estatísticas utilizou-se o software Genes (Cruz, 2013).

## **Resultados**

### Desempenho dos genitores e híbridos F<sub>1</sub>'s

Quanto à nota de severidade da murcha-de-fusarium (SMF) os genitores VC 13 e VC 25 do grupo 1 e BRSMG Talismã e CVIII 8511 do grupo 2, destacam-se por serem imunes a FOP UFV 01 com notas iguais a 1. O genitor Pérola do grupo 2, também resistente a FOP UFV 01, apresentou nota igual a 1,67 (Tabela 2 e Figura 1A). Os demais genitores apresentaram reação de suscetibilidade a Fop com notas superiores a 7,7 (Figura 1B). Todos os híbridos obtidos de cruzamentos entre pelo menos um genitor resistente (R) também apresentaram resistência a Fop, com notas iguais a 1. Híbridos suscetíveis (S) só foram observados nos cruzamentos entre genitores suscetíveis (S x S).

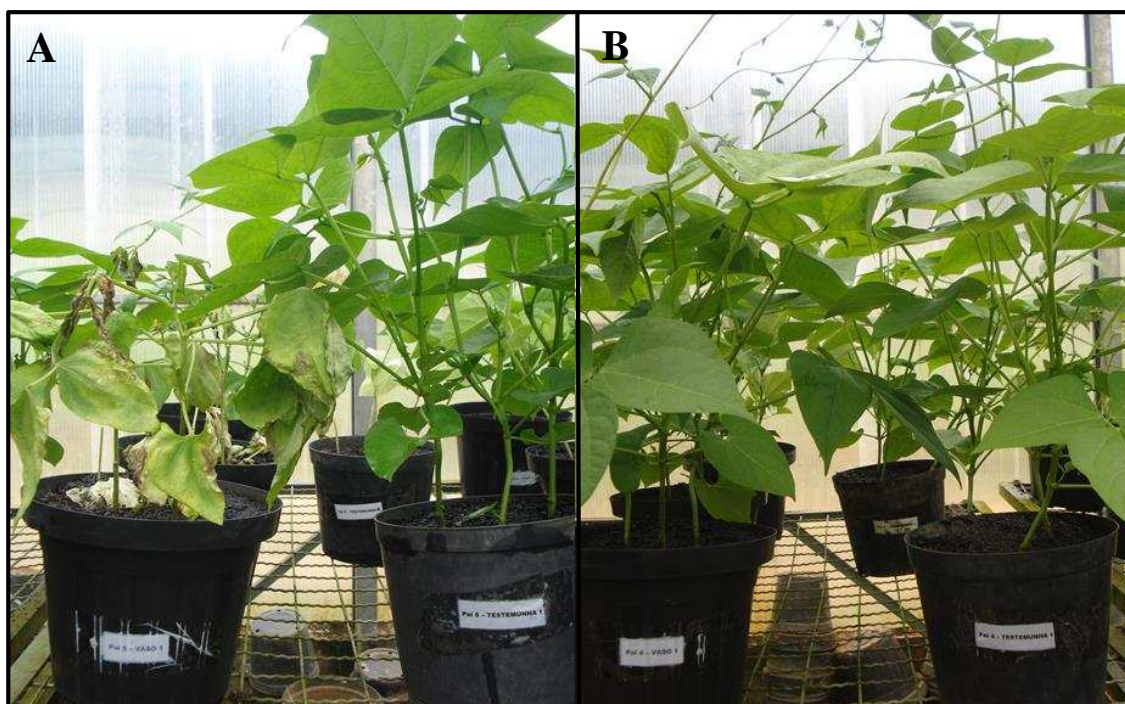
Os resultados com a variável área abaixo da curva de progresso da doença para Fop (AACPD) foram concordantes com os de SMF (Tabela 2) e conseqüentemente também determina a reação dos genótipos a Fop. Os genitores e híbridos resistentes (SMF) apresentaram os menores valores de AACPD. Do mesmo modo, os genitores e híbridos suscetíveis também apresentaram os maiores valores de AACPD.

Considerando a redução de crescimento dos genitores, observou-se que os genitores suscetíveis apresentaram elevada porcentagem de redução da altura (RALT) e da massa fresca de parte aérea (RMF), com valores variando de 43% a 63% (Tabela 2). Entre os genitores resistentes, observou-se comportamento diferenciado quanto à redução do crescimento. Os genitores VC 13, BRSMG Talismã e CVIII 8511 apresentaram RALT e RMF de no máximo 11,11%, enquanto VC 25 e Pérola, também resistentes, apresentaram maior taxa de redução, variando de 18% a 26% (Tabela 2).

**Tabela 2** - Médias dos genitores e de seus híbridos F<sub>1</sub>s quanto à severidade da murcha-de-fusarium (SMF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de redução da altura (RALT), porcentagem de redução da massa fresca de parte aérea (RMF) e produtividade de grãos (PROD). Viçosa, MG, 2014

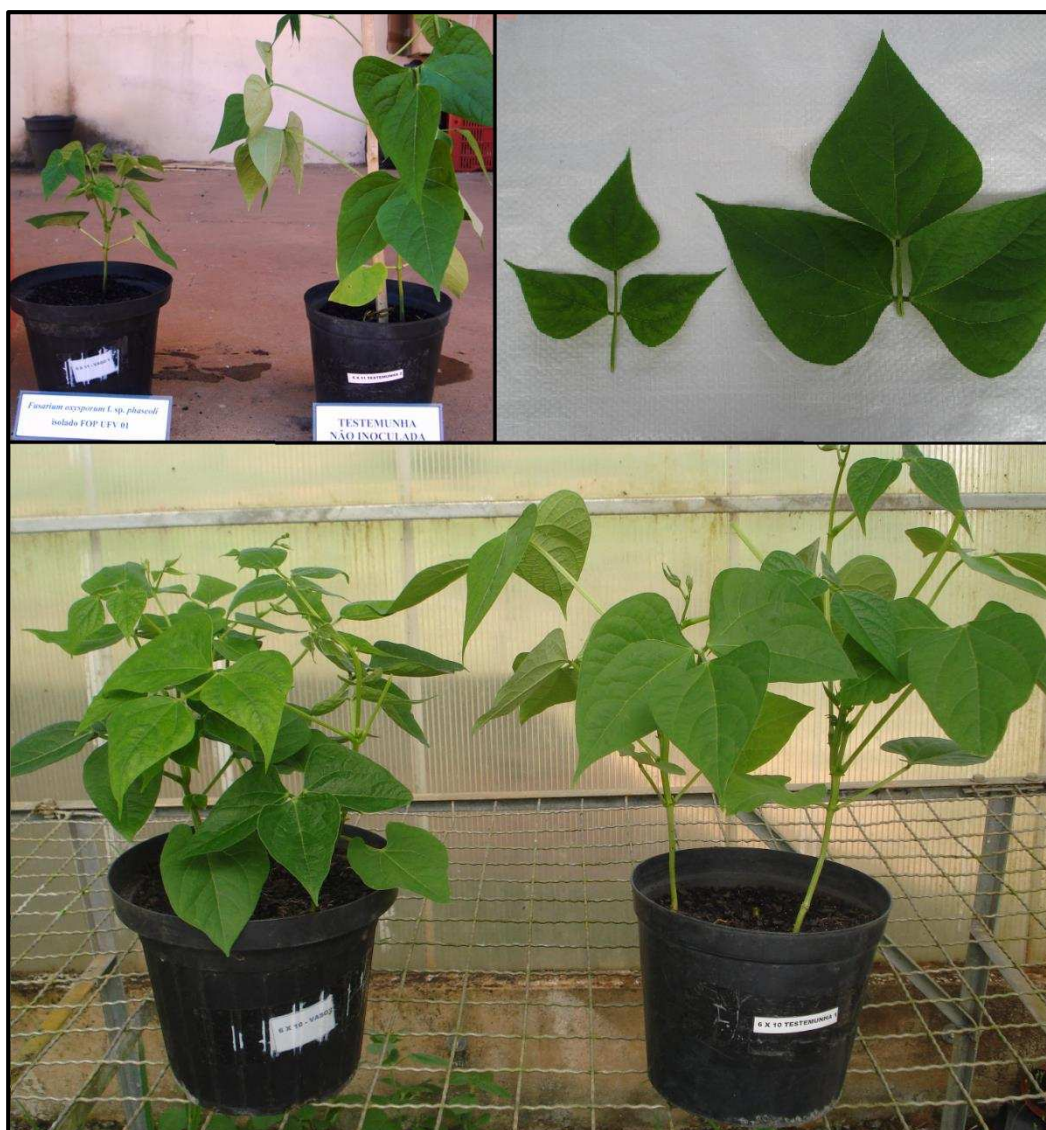
<b>Genitores</b>		<b>SMF</b>	<b>AACPD</b>	<b>RALT (%)</b>	<b>RMF (%)</b>	<b>PROD<sup>1</sup> (kg.ha<sup>-1</sup>)</b>
<b>Grupo 1</b>						
1	BRS Estilo	8,33	39,00	43,75	58,40	4195,51
2	VC 13	1,00	6,00	11,11	03,23	4150,62
3	VC 25	1,00	6,00	25,74	21,09	4944,86
<b>Grupo 2</b>						
1	BRSMG Talismã	1,00	6,00	6,84	0	3745,32
2	RC-I-8	7,00	29,00	54,70	44,15	4256,23
3	CVIII 8511	1,00	6,00	4,76	02,52	4180,92
4	CNFC 11965	8,50	37,50	63,72	60,10	3830,17
5	Pérola	1,67	7,00	19,33	18,55	3950,71
<b>Média</b>		<b>3,69</b>	<b>17,06</b>	<b>28,00</b>	<b>26,00</b>	<b>4156,79</b>
<b>Híbridos</b>						
1	BRS Estilo / BRSMG Talismã	1,00	6,00	47,75	42,18	4377,88
2	BRS Estilo / RC-I-8	7,70	37,80	41,67	48,96	5301,02
3	BRS Estilo / CVIII 8511	1,00	6,00	37,84	39,45	4987,41
4	BRS Estilo / CNFC 11965	9,00	45,25	54,95	57,68	4011,69
5	BRS Estilo / Pérola	1,00	6,00	53,79	56,20	5627,19
6	VC 13 / BRSMG Talismã	1,00	6,00	14,73	20,16	4201,39
7	VC 13 / RC-I-8	1,00	6,00	30,13	43,48	4787,72
8	VC 13 / CVIII 8511	1,00	6,00	17,02	12,49	4532,40
9	VC 13 / CNFC 11965	1,00	6,00	37,31	41,05	4604,43
10	VC 13 / Pérola	1,00	6,00	19,22	19,06	4669,39
11	VC 25 / BRSMG Talismã	1,00	6,00	18,33	27,87	4689,64
12	VC 25 / RC-I-8	1,00	6,00	44,14	53,53	4773,31
13	VC 25 / CVIII 8511	1,00	6,00	09,43	06,04	4643,84
14	VC 25 / CNFC 11965	1,00	6,00	35,90	35,95	5521,64
15	VC 25 / Pérola	1,00	6,00	29,68	25,28	5522,47
<b>Média</b>		<b>1,98</b>	<b>10,74</b>	<b>32,66</b>	<b>35,29</b>	<b>4816,76</b>

1 – A produtividade de grãos foi avaliada em condições de campo e sem incidência de Fop.



**Figura 1.** Redução de crescimento em linhagens de feijoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolado FOP UFV 01. (A) Genitor suscetível (CNFC 11965) (vaso esquerda) e testemunha não inoculada – controle negativo (vaso da direita) e (B) genitor resistente (CVIII 8511) (vaso esquerda) e testemunha não inoculada – controle negativo (vaso da direita).

De forma geral, a taxa de redução de crescimento dos híbridos resultantes de cruzamentos envolvendo pelo menos um genitor com altos valores de RALT e RMF também apresentaram elevada taxa de redução. Esse comportamento foi verificado nos híbridos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 e 12 (Tabela 2) (Figura 2). Os híbridos 9 e 14, resultantes do cruzamento de CNFC 11965 com VC 13 e VC 25, respectivamente, apresentaram redução do crescimento com valor próximo da média da porcentagem de redução do crescimento de seus genitores. Os híbridos 6 (VC 13 / BRSMG Talismã) e 8 (VC 13 / CVIII 8511), resultantes de cruzamentos entre genitores resistentes e com baixa redução do crescimento, apresentaram elevada taxa de redução comparada a seus genitores. O híbrido 15 (VC 25 / Pérola), também resultante de genitores resistentes e com maiores valores de taxa de redução, também apresentou elevada taxa de redução. O híbrido 13,



**Figura 2.** Redução de crescimento em híbridos de feijoeiro inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolado FOP UFV 01 em relação à testemunha não inoculada (controle negativo).

resultante do cruzamento entre VC 25 (resistente e com elevada taxa de redução) com CVIII 8511 (resistente e com baixa redução) apresentou baixa redução do crescimento.

A média da produtividade de grãos dos genitores ( $4156,79 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e de seus híbridos ( $4816,76 \text{ kg ha}^{-1}$ ) superou a média brasileira ( $1512 \text{ kg ha}^{-1}$ ) para a safra de 2014 (CONAB, 2014). Não houve incidência natural de murcha-de-fusarium no experimento de avaliação da produtividade de grãos dos genitores e de seus híbridos  $F_1$ 's. Esta característica será melhor explorada na análise dialélica.

## Análise dialélica

Verificou-se efeito significativo ( $p < 0.01$ ) de tratamentos sobre os caracteres SMF, AACPD, RALT, RMF e PROD (Tabela 3). A soma de quadrados de tratamentos foi desdobrada em efeito de genitores, híbridos e no contraste genitores vs. híbridos. O efeito de genitores do Grupo 1 e do Grupo 2 também foram significativos ( $p < 0.05$ ) sobre todos os caracteres, exceto PROD para o grupo 2. No contraste G1 vs. G2, os caracteres SMF, RALT, RMF e PROD apresentaram efeito significativo ( $p < 0.05$ ) e para AACPD não significativo.

O efeito de híbridos foi significativo para todos os caracteres. Este efeito de híbridos foi desdobrado em efeitos de capacidade geral de combinação dos grupos 1 e 2 ( $CGC_1$  e  $CGC_2$ ) e capacidade específica de combinação (CEC). Todos estes efeitos foram significativos para todos os caracteres (Tabela 3).

A magnitude da soma de quadrados da CGC ( $CGC_1 + CGC_2$ ) comparada à magnitude da soma de quadrados da CEC foi semelhante para os caracteres SMF, AACPD, RMF e PROD. Já para o caráter RALT, a magnitude da soma de quadrados da CGC ( $CGC_1 + CGC_2$ ) superou a da CEC com os percentuais de 70% (CGC) e 30% (CEC), respectivamente.

## Capacidade geral de combinação

### SMF e AACPD

Os genitores VC 13, VC 25, BRSMG Talismã, CVIII 8511 e Pérola se destacaram por apresentarem os menores valores de CGC para SMF e AACPD (Tabela 4). Cabe ressaltar que estes genitores foram resistentes a Fop (Tabela 2) e apresentaram os mesmos valores de CGC, para SMF e para AACPD.

**Tabela 3** - Análise de variância e dialélica dos genitores dos grupos 1 e 2 (G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) e de suas combinações híbridas quanto a reação à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (SMF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de redução da altura (RALT) e da massa fresca de parte aérea (RMF) e produtividade de grãos (PROD). Viçosa, MG, 2014

F.V.	GL	QM				
		SMF	AACPD	RALT	RMF	PROD <sup>1</sup>
<b>Tratamentos</b>	22	27,05**	553,13**	734,49**	980,17**	893893,77**
<b>Genitores (G)</b>	7	38,01**	699,52**	1058,72**	1749,13**	407797,01*
<b>Pais G<sub>1</sub></b>	2	53,78**	1089**	630,09**	2433,26**	597176,41*
<b>Pais G<sub>2</sub></b>	4	39,42**	679,65**	1481,35**	1506,53**	145691,53 <sup>ns</sup>
<b>G<sub>1</sub> vs G<sub>2</sub></b>	1	0,85*	0,57 <sup>ns</sup>	225,44*	1351,29**	1077460,17*
<b>Híbridos (H)</b>	14	20,25**	474,70**	554,23**	480,50**	713829,40**
<b>CGC<sub>1</sub></b>	2	43,22**	1009,62**	1935,36**	1006,89**	854357,21*
<b>CGC<sub>2</sub></b>	4	16,42**	385,54**	389,09**	289,95**	904633,54**
<b>CEC</b>	8	16,42**	385,54**	291,52**	444,19**	583295,38**
<b>G vs H</b>	1	45,63**	626,34**	998,52**	2592,66**	6817472,19**
<b>Resíduo</b>	46	0,17	4,44	57,74	44,34	189817,60
CV (%)		16,10	16,29	24,10	19,81	9,50
Média		2,57	12,94	31,53	33,61	4587,21

\*, \*\* e <sup>ns</sup> - Significativo a 5% e a 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste de F. 1 – A produtividade de grãos foi avaliada em condições de campo e sem incidência de Fop.

#### Redução do crescimento

Entre os genitores resistentes (Tabela 2), as linhagens VC 13 do grupo 1 e CVIII 8511 do grupo 2 se destacaram por apresentarem os menores valores de CGC para redução da altura (RALT) e da massa fresca de parte aérea (RMF) (Tabela 4). Já o genitor Pérola do grupo 2, também resistente por SMF e AACPD, apresentou CGC positiva para RALT e RMF. Os genitores VC 25 do grupo 1 e BRSMG Talismã do grupo 2, apresentaram valores de CGC intermediários a Pérola (maior valor de CGC) e VC 13 e CVIII 8511 (menores valores de CGC).

**Tabela 4-** Capacidade geral dos genitores usados no dialelo parcial quanto à reação a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (SMF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de redução da altura (RALT) e massa fresca de parte aérea (RMF) e produtividade de grãos (PROD).

<b>Genitores</b>		<b>SMF</b>	<b>AACPD</b>	<b>RALT</b>	<b>RMF</b>	<b>PROD</b>
<b>Grupo I</b>						
1	BRS Estilo	1,96	9,47	12,90	9,21	44,27
2	VC 13	-0,98	-4,74	-8,50	-6,46	-257,69
3	VC 25	-0,98	-4,74	-4,40	-2,75	213,42
<b>Grupo II</b>						
1	BRSMG Talismã	-0,98	-4,74	-5,10	-4,68	-393,79
2	RC-I-8	1,25	5,86	0,01	3,25	137,25
3	CVIII 8511	-0,98	-4,74	-7,60	-6,91	-95,54
4	CNFC 11965	1,69	8,35	8,42	6,81	-104,18
5	Pérola	-0,98	-4,74	4,27	1,53	456,25

#### Produtividade de grãos

Os genitores VC 25 do grupo 1 e Pérola do grupo 2 além de resistentes a Fop, apresentaram CGC positiva e alta para produtividade de grãos (Tabela 4). Os genitores suscetíveis a Fop BRS Estilo e RC-I-8, também apresentaram CGC positiva, porém de menor magnitude. As linhagens VC 13 do grupo 1 e CVIII 8511 do grupo 2, apesar de apresentar CGC negativa para PROD, são resistentes a Fop e possuem os menores valores de CGC para redução de crescimento.

#### Capacidade específica de combinação

Quanto aos caracteres de severidade a Fop (SMF e AACPD) observou-se valores negativos de CEC (Tabela 5) apenas em híbridos oriundos de cruzamentos entre genitores contrastantes para resistência a Fop (R x S). Todos os híbridos oriundos de cruzamentos entre genitores resistentes (R x R) apresentaram estimativas de CEC positivas e iguais.

**Tabela 5-** Capacidade específica de combinação entre genitores usados no dialelo parcial quanto a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (SMF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de redução da altura (RALT) e massa fresca de parte aérea (RMF) e produtividade de grãos (PROD).

	Híbrido	SMF	AACPD	RALT	RMF	PROD
1	BRS Estilo / BRSMG Talismã	-1,96	-9,47	5,65	-0,44	-89,37
2	BRS Estilo / RC-I-8	2,51	11,73	-5,54	-9,55	302,72
3	BRS Estilo / CVIII 8511	-1,96	-9,47	-1,76	-0,94	221,91
4	BRS Estilo / CNFC 11965	3,37	16,69	-0,67	3,57	-745,18
5	BRS Estilo / Pérola	-1,96	-9,47	2,32	7,36	309,90
6	VC 13 / BRSMG Talismã	0,98	4,74	0,81	-6,78	36,11
7	VC 13 / RC-I-8	-1,25	-5,86	-8,69	-5,40	91,40
8	VC 13 / CVIII 8511	0,98	4,74	12,63	17,33	68,89
9	VC 13 / CNFC 11965	-1,69	-8,35	3,09	2,62	149,54
10	VC 13 / Pérola	0,98	4,74	-7,84	-7,77	-345,93
11	VC 25 / BRSMG Talismã	0,98	4,74	-6,46	7,22	53,25
12	VC 25 / RC-I-8	-1,25	-5,87	14,24	14,95	-394,12
13	VC 25 / CVIII 8511	0,98	4,74	-10,87	-16,39	-290,80
14	VC 25 / CNFC 11965	-1,69	-8,35	-2,42	-6,19	595,64
15	VC 25 / Pérola	0,98	4,74	5,52	0,41	36,03

Considerando as variáveis RALT e RMF que mensuram a redução do crescimento da planta, observou-se variação nas estimativas de CEC dos híbridos tanto em magnitude quanto no sinal (Tabela 5), independente da reação a Fop de seus genitores, avaliada por SMF e AACPD. Entre os híbridos oriundos de cruzamentos de genitores resistentes (R x R) e com valores negativos de CGC para redução de crescimento (genitores com baixa frequência de alelos envolvidos na redução do crescimento), observou-se para o híbrido 8 (VC 13 / CVIII 8511) o maior valor de CEC. Já o híbrido 13 (VC 25 / CVIII 8511) apresentou a menor CEC, mesmo sendo oriundo de cruzamento de genitores com valores negativos de CGC para redução de crescimento. Por esses resultados, pode-se afirmar que

o genitor CVIII 8511 apresenta baixa divergência em relação ao genitor VC 13 e alta em relação a VC 25 para os caracteres RALT e RMF.

A população segregante F<sub>2</sub> oriunda do híbrido 13 (VC 25 / CVIII 8511) se destaca visando resistência à murcha-de-fusarium, uma vez que os genitores VC 25 e CVIII 8511, apresentam alelos de resistência a Fop e são divergentes para redução do crescimento. Além dos caracteres relacionados a Fop o genitor VC 25 ainda apresenta elevada CGC para PROD. Por sua vez, o híbrido 15 (VC 25 / Pérola) apresentou estimativa de CEC positiva para PROD e seus genitores apresentaram os maiores valores de CGC para o mesmo caráter. Além de se destacar como produtivo e com alta frequência de alelos favoráveis para o caráter, os genitores deste híbrido apresentam moderada taxa de redução do crescimento. Todavia, estes híbridos não são superiores em todos os caracteres considerados simultaneamente. O cruzamento entre eles pode resolver essa questão.

## **Discussão**

*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) é o principal patógeno de solo do feijoeiro e tem se estabelecido em várias áreas produtoras do Brasil (Toledo-Souza et al., 2012). A principal alternativa de controle desta doença é a obtenção de cultivares resistentes (Cross et al., 2000). Para dar início ao programa de melhoramento do feijoeiro visando resistência a Fop da Universidade Federal de Viçosa, o uso de cruzamentos dialélicos foi adotado. Além de permitir identificar os genitores com maior frequência de alelos favoráveis e mais divergentes entre si, a análise dialélica estima os efeitos gênicos envolvidos no controle do caráter e aponta as populações segregantes mais promissoras para a extração de linhagens superiores. Neste trabalho, além da severidade da murcha-de-fusarium (SMF), duas novas características são propostas: a porcentagem de redução da altura da planta (RALT) e da massa fresca de parte aérea (RMF). Estas características foram propostas a partir da observação da redução do crescimento da planta em alguns

genótipos de feijoeiro infectados por Fop que não apresentavam murcha, sintoma principal da escala de notas da severidade da doença proposta por Pastor-Corrales e Abawi (1987). Analisando a redução de crescimento como resposta de suscetibilidade ao patógeno, a avaliação da RALT e RMF em análises dialélicas garantirá a seleção de genitores com maior frequência de alelos de resistência a Fop.

#### Desempenho dos genitores e híbridos F<sub>1</sub>'s

Os genitores VC 13 e VC 25 do grupo 1 e BRSMG Talismã, CVIII 8511 e Pérola do grupo 2 apresentaram resistência a FOP UFV 01 (R). Todos os híbridos envolvendo pelo menos um desses genitores fora resistentes a Fop, indicando que a resistência à murcha-de-fusarium (isolado FOP UFV 01) é determinada por poucos genes com dominância completa. Híbridos suscetíveis só foram observados em cruzamentos em que os dois genitores são suscetíveis (S x S). Outros autores também observaram dominância no controle genético da resistência à murcha-de-fusarium. Pereira et al. (2009), avaliando seis cruzamentos contrastantes, observaram efeito de dominância completa no controle genético da resistência do feijoeiro a Fop 01, isolado coletado em áreas experimentais da Universidade Federal de Lavras. Cross et al. (2000) avaliando duas gerações F<sub>2</sub> de cruzamentos contrastantes quanto à reação a Fop entre genitores de feijoeiro Durango, constataram um gene com dominância completa. Ribeiro e Hagedorn (1979) também relataram um gene com dominância completa no controle genético da resistência do feijoeiro a Fop.

Os resultados com AACPD para reação a Fop foram concordantes com os de SMF, indicando que a avaliação aos 21 dias foi suficiente para determinar a reação dos genótipos a Fop. É comum na literatura apenas uma avaliação aos 21 dias para determinar a severidade de Fop no feijoeiro (Pastor-Corrales e Abawi, 1987; Cândida et al., 2009; Pereira et al., 2009). Considerando o grande número de genótipos a serem avaliados em

programas de melhoramento, essa informação é relevante devido a economia de mão-de-obra para avaliações de Fop.

A redução do crescimento mensurada pela RALT e RMF variou de 43% a 63% nos genitores suscetíveis e de 11% a 26% nos genitores resistentes (Tabela 2). Entre os híbridos, a redução de crescimento variou de forma independente da redução de crescimento dos seus genitores, impedindo estimar o controle genético predominante do caráter. Desse modo, ao contrário da resistência a Fop, avaliada por SMF ou AACPD, a redução de crescimento, avaliada por RALT e RMF, tem controle genético mais complexo, ou seja, é governada por um conjunto de genes, incluindo genes dominantes e recessivos. Desta forma, os resultados de SMF em comparação com os de RALT e RMF indicam que os genes envolvidos na resistência à murcha-de-fusarium provavelmente não são os mesmos envolvidos na redução do crescimento. Estes resultados também evidenciam que além da SMF, os caracteres RALT e RMF apresentam potencial para serem usados no melhoramento do feijoeiro-comum visando à resistência a Fop.

A média da produtividade de grãos dos híbridos superou a média dos genitores em 660 kg ha<sup>-1</sup>. O vigor híbrido manifestado na geração F<sub>1</sub> justifica a superioridade das médias dessa geração em relação aos genitores.

#### Análise dialélica

A significância de tratamentos sobre os caracteres SMF, AACPD, RALT, RMF e PROD indica a existência de variabilidade entre os genótipos. Quanto aos genitores, a significância de todos os caracteres avaliados indica variabilidade na frequência de alelos favoráveis envolvidos no controle genético dos caracteres em questão.

A significância do contraste entre os grupos de genitores G1 vs G2 indica divergência de alelos favoráveis entre genitores de grupos distintos.

O efeito de híbridos, que foi significativo para todos os caracteres indica variabilidade entre as 15 combinações híbridas ( $F_1$ 's), o que permite ao melhorista praticar seleção e obter ganhos com ela.

A significância das estimativas de capacidade geral de combinação ( $CGC_1$  e  $CGC_2$ ) indica diferença na frequência de alelos favoráveis entre os genitores daquele grupo, enquanto a significância da CEC indica presença de desvios de dominância no controle genético dos caracteres em questão.

A soma de quadrados da CGC ( $CGC_1 + CGC_2$ ) comparada à soma de quadrados da CEC foi similar para os caracteres SMF, AACPD, RMF e PROD indicando predominância de genes com dominância completa no controle genético destes caracteres. Para o caráter RALT, a magnitude da soma de quadrados da CGC superou a da CEC ressaltando predominância de efeitos aditivos no controle genético da redução da altura.

#### Capacidade geral de combinação

##### SMF e AACPD

Os genitores resistentes apresentaram as menores estimativas de CGC tanto para SMF quanto AACPD. Uma vez que para estes caracteres os menores valores são os desejados, pode-se afirmar que esses genitores possuem alelos de resistência que contribuem para a redução da nota de severidade da doença. Além disso, a similaridade dos valores sugere que estes genitores possuem os mesmos alelos de resistência. Também é possível afirmar que a resistência a Fop é controlada por poucos genes dominantes.

##### Redução do crescimento

As linhagens VC 13 do grupo 1 e CVIII 8511 do grupo 2 apresentaram os menores valores de CGC para RALT e RMF. Menores valores de CGC indicam que estes genitores

possuem menor frequência de alelos que contribuem para que a planta reduza seu crescimento na presença de Fop. Estas linhagens são promissoras para serem usadas em programas de melhoramento por apresentarem maior frequência de alelos de resistência, tanto baseado na severidade de Fop quanto na redução de crescimento. Ao contrário do esperado, o genitor Pérola do grupo 2, também resistente por SMF e AACPD, apresentou CGC positiva para RALT e RMF. GCG positiva para redução do crescimento evidencia que esse genitor possui alelos desfavoráveis, ou seja, que reduzem o crescimento. Em seus híbridos, então, será observada maior redução de crescimento. Até o momento, apenas Pereira et al. (2013) citam a redução de crescimento em genótipos de feijoeiro infectados com Fop. Os autores relatam esse comportamento nos genótipos Meia Noite e VP8 ao compará-los com plantas não inoculadas do mesmo genótipo.

A escala de notas da severidade da doença desenvolvida por Pastor-Corrales e Abawi (1987), na qual foram baseados os caracteres SMF e AACPD, tem como principal sintoma a murcha da parte aérea. Cabe ressaltar que sintomas como crescimento da planta e redução da biomassa de parte aérea não são levados em consideração nesta escala. Entretanto, Andrade et al. (2009) e Araújo e Teixeira (2012) relatam que genótipos com menor produção de biomassa apresentam menor produtividade de grãos. Desse modo, ao serem plantados em áreas infestadas por Fop, genótipos classificados como resistentes segundo a escala de avaliação, assim como Pérola, terão seu crescimento reduzido na presença do patógeno e conseqüentemente sofrerão queda na produtividade de grãos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho apontam que em programas de melhoramento, além da severidade da doença, os caracteres envolvidos na redução do crescimento (RALT e RMF) devem ser levados em consideração tanto na seleção de genitores quanto na avaliação de linhagens elites. Adotando essas características será possível selecionar genótipos com maior frequência de alelos de resistência a Fop.

A divergência de resultados observados entre reação a Fop e redução de crescimento também é relevante no melhoramento por indicar que, diferentes genes estão envolvidos no controle dos caracteres de severidade de Fop (SMF e AACPD) e redução do crescimento (RALT e RMF).

#### Produtividade de grãos

Estimativas de CGC altas e positivas para PROD dos genitores VC 25 do grupo 1 e Pérola do grupo 2 indicam maior frequência de alelos favoráveis para produção de grãos nestes genitores. Além disso, VC 25 e Pérola, são resistentes a Fop, destacando a importância da seleção e recomendação desses genitores para programas de melhoramento. Os genitores suscetíveis BRS Estilo e RC-I-8 também apresentaram CGC positiva, porém de menor magnitude. As linhagens VC 13 do grupo 1 e CVIII 8511 do grupo 2, ambas resistentes a Fop, apresentaram CGC negativa para PROD. Entretanto, sua utilização em programas de melhoramento visando resistência a Fop não deve ser descartada, uma vez que são resistentes e apresentam os menores valores de CGC para redução de crescimento.

#### Capacidade específica de combinação

Nos caracteres de severidade a Fop mensurados por SMF e AACPD, observou-se valores negativos de CEC apenas em híbridos oriundos de cruzamentos entre genitores contrastantes para resistência a Fop (R x S). Os híbridos de cruzamentos entre genitores resistentes (R x R) apresentaram estimativas de CEC positivas e iguais. Em cruzamentos entre genitores suscetíveis (S x S), a CEC também foi positiva. De fato, a CEC é função direta da divergência entre genitores, de modo que valores desejáveis de CEC, que são os menores valores (negativos) só serão observados em cruzamentos contrastantes para um determinado caráter. Os alelos de resistência a Fop presentes nos genitores resistentes

deste trabalho, provavelmente são os mesmos. Essa afirmativa é evidenciada pelos valores iguais de CGC para SMF e AACPD para todos os genitores resistentes. Esses resultados corroboram a predominância de genes com dominância completa no controle genético da resistência à murcha-de-fusarium.

Variação nos valores das estimativas de CEC dos híbridos tanto em magnitude quanto no sinal foi observada para as características que mensuraram a redução do crescimento da planta (RALT e RMF). Independente da reação a Fop e da resposta de redução de crescimento de seus genitores mensurada pela CGC, os híbridos apresentaram valores divergentes. Esses resultados demonstram maior complexidade dos caracteres RALT e RMF redução do crescimento comparada à resistência avaliada por SMF ou AACPD. Ao comparar os valores das estimativas de CEC para RALT e RMF do híbrido 8 (VC 13 / CVIII 8511) com o híbrido 13 (VC 25 / CVIII 8511), nota-se que o híbrido 8 apresentou a maior estimativa e o híbrido 13 a menor estimativa para estes caracteres. Assim, concluiu-se que CVIII 8511 apresenta baixa divergência em relação ao genitor VC 13 e alta em relação a VC 25 para os caracteres RALT e RMF. Hallauer e Miranda (1988) relatam que cruzamentos envolvendo linhagens com mesma base genética apresentam estimativas de CEC negativas. Entretanto, para caracteres como redução do crescimento, em que interessam os menores valores, as estimativas positivas e de elevada magnitude é que indicam menor divergência entre os genitores cruzados.

Apesar do híbrido 13 (VC 25 / CVIII 8511) se destacar como resistente à murcha-de-fusarium pelos caracteres relacionados a severidade da doença e redução do crescimento, este híbrido apresentou CEC negativa para produtividade de grãos e uma das menores médias de produtividade entre os híbridos. Já no híbrido 15 (VC 25 / Pérola), comportamento contrário é observado. Além de ser o segundo mais produtivo, a estimativa de CEC do híbrido 15 para PROD é positiva e seus genitores apresentaram os maiores valores de CGC para o caráter. Entretanto, este híbrido se destaca apenas com

relação à PROD, uma vez que não houve incidência de Fop no campo e, pelo genitor Pérola, que apresentou CGC positiva para RALT e RMF, apresentar alelos que reduzem o crescimento. Apesar de não apresentarem alelos favoráveis para todos os caracteres em questão, a população segregante oriunda do cruzamento entre estes híbridos (VC 25 / CVIII 8511 // VC 25 / Pérola) é promissora visando o melhoramento do feijoeiro para produtividade de grãos, resistência à murcha-de-fusarium e redução do crescimento, considerados simultaneamente.

Aplicação da redução do crescimento no melhoramento visando resistência a Fop

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que, a utilização da redução do crescimento avaliada por RALT e RMF, associada à resistência a Fop por SMF e AACPD, aumenta a eficácia tanto na identificação de linhagens fontes de resistência à murcha-de-fusarium quanto na escolha de genitores pela análise dialélica. Cabe ressaltar que, no dialelo, a avaliação da RALT e RMF deve ser realizada apenas em genitores e híbridos pois, na avaliação da redução do crescimento, há a necessidade do controle negativo constituído de plantas de mesmo genótipo daquelas que serão inoculadas com Fop.

No melhoramento do feijoeiro, a etapa seguinte à escolha das populações segregantes com maior potencial para a extração de linhagens superiores é a avaliação de famílias endogâmicas, derivadas destas populações. Estas famílias são avaliadas em duas ou três gerações (Ramalho et al., 2001) quanto aos caracteres de herança mais complexa, entre eles produtividade de grãos e arquitetura de plantas. Nesta fase, não seria possível a avaliação da redução do crescimento em razão da ausência do controle negativo (plantas de mesmo genótipo a serem inoculadas em água). Entretanto, como há fortes indícios de que a severidade da murcha-de-fusarium (SMF) seja controlada por poucos genes dominantes, a inoculação de Fop em plantas F<sub>2</sub> e abertura de linhas apenas daquelas

resistentes, garantirá a presença do gene de resistência em plantas dentro das linhas em gerações mais avançadas de endogamia. Na extração de linhagens, a inoculação com Fop também poderia ser novamente utilizada, extraindo linhagens apenas de plantas resistentes, que serão avaliadas em ensaios de competição em diferentes anos, safras e locais. Nesta fase, as linhagens resistentes a Fop também poderão ser avaliadas quanto à redução de crescimento, aumentando as chances de sucesso no melhoramento do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium.

### **Conclusões**

i) a resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium (isolado FOP UFV 01) é controlada por poucos genes dominantes, enquanto a redução do crescimento da planta, como resposta de suscetibilidade a Fop, é governada por um conjunto diferente de genes, incluindo genes dominantes e recessivos;

ii) a redução do crescimento apresenta potencial na seleção de genitores e de linhas endogâmicas no melhoramento genético do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium e

iii) a população segregante, oriunda do cruzamento VC 25 / CVIII 8511 // VC 25 / Pérola é promissora, visando ao melhoramento do feijoeiro para os caracteres produtividade de grãos, resistência à murcha-de-fusarium e redução do crescimento.

## **Referências Bibliográficas**

ABAWI CS, PASTOR-CORRALES MA. 1990. Root rots of bean in Latin American and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali, Colombia. CIAT.

ALVES-SANTOS FM, CORDEIRO-LOPEZ L, SAYAGUÉS JM, MARTÍN-DOMINGUES R, GARCIA-BENAVIDES P, CRESPO MC, DÍAS-DOMINGUES JM, ESLAVA AP. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51: 605-611.

ANDRADE CAB, SCAPIM CA, BRACCINI AL, MARTORELLI DT. 2009. Produtividade, crescimento e partição de matéria seca em duas cultivares de feijão. *Acta Scientiarum, Agronomy* 31: 683-688.

ARAÚJO AP, TEIXEIRA MG. 2012. Variabilidade dos índices de colheita de nutrientes em genótipos de feijoeiro e sua relação com a produção de grãos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 36: 137-146.

BARBOSA FR, GONZAGA ACO. 2012. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão: Santo Antônio de Goiás, Brasil.

CÂNDIDA DV, COSTA JGC, RAVA CA, CARNEIRO MS. 2009. Controle genético da murcha do fusário. *Fusarium oxysporum*. em feijoeiro comum. *Tropical Plant Pathology* 34: 379-384.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2015. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, Agosto/2015, Brasília.

CROSS H, BRICK MA, SCHWARTZ HF, PANELLA LW, BYRNE PF. 2000. Inheritance of resistance to fusarium wilt in two common bean races. *Crop Science* 40:954–958.

CRUZ CD. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 35: 271-276.

DEAN R, VAN KAN JA, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, PIETRO AD, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430.

GRIFFING B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 463-493.

HALLAUER AR, MIRANDA JB. 1988. *Quantitative genetics in maize breeding*. 2nd ed. Iowa State Univ, Ames.

MADDEN, LV, HUGHES G, BOSCH FVD. 2007. *The study of plant disease epidemics*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

MELO LC, PELOSO MJD, PEREIRA HS, FARIA LC, COSTA JGC, DÍAZ JLC, RAVA CA, WENDLAND A, Abreu AFB. 2010. BRS Estilo - common bean cultivar with carioca grain, upright growth and high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 377-379.

NASCIMENTO SRC, KUROZAWA C, MARINGONI AC. 1995. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 20: 214-217.

- PANTELIDES IS, JAMOS SET, PAPPA S, KARGAKIS M, PAPLOMATAS EJ. 2013. The ethylene receptor ETR1 is required for *Fusarium oxysporum* pathogenicity. *Plant Pathology* 62: 1302-1309.
- PASTOR-CORRALES MA, ABAWI GS. 1987. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease* 71: 990-993.
- PEREIRA AC, CRUZ MFA, PAULA-JÚNIOR TJ, RODRIGUES FA, CARNEIRO JES, VIEIRA RF, CARNEIRO PCS. 2013. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology* 38:323-328.
- PEREIRA AC. 2013. Resistência do feijão-comum à murcha-de-fusário. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PEREIRA MJZ, RAMALHO MAP, ABREU AFB. 2009. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Brazilian race 2 in common bean. *Scientia Agricola* 66: 788-792.
- RAMALHO MAP, ABREU AFB, SANTOS JB. 2001. Melhoramento de espécies autóгамas. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC, editors, Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis, Fundação MT, p 201-230.
- RAMALHO MAP, ABREU AFB, CARNEIRO JES, WENDLAND A, PAULA JUNIOR TJ, VIEIRA RF, DEL PELOSO MJ, LOBO JUNIOR M, PEREIRA AC. 2012. Murcha-de-fusário. In: Paula Junior TJ and Wendland A. ed. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Epamig, Viçosa, Brasil. p 127-138.
- SHANER G, FINNEY RF. 1977. The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1055.

SILVA CA, ABREU AFB, RAMALHO MAP, CARNEIRO JES. 2011. Implicações da origem das linhagens de feijoeiro na magnitude da interação com ambientes. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46: 720-728.

TOLEDO-SOUZA ED, SILVEIRA PM, CAFÉ-FILHO AC, LOBO-JÚNIOR M. 2012. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. Pesquisa Agropecuária Brasileira 47: 1031-1037.

WOO SL, ZOINA A, DEL SORBO G, LORITO M, NANNI B, SCALA F, NOVIELLO C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. Phytopathology 86: 966-973.

## **CAPÍTULO 2. Herança da resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium**

## Resumo

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é o legume mais consumido e cultivado no mundo sendo considerado uma fonte rica em nutrientes essenciais e proteínas para populações de baixa renda. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) é um patógeno habitante de solo que causa murcha vascular no feijoeiro, sendo uma das doenças mais importantes da cultura. A adoção de cultivares resistentes é a melhor estratégia de controle do patógeno. Assim, o modo de herança e a interação alélica dos genes de resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium foram estudados a partir de cruzamentos contrastantes do dialelo parcial 3 x 5 realizado previamente. Pais, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> foram inoculados com o isolado FOP UFV 01 e as plantas de cada geração foram avaliadas individualmente quanto à severidade da doença. Dos oito genitores, cinco foram resistentes e três suscetíveis a Fop. Apenas duas classes fenotípicas foram observadas nos parentais (resistente e suscetível). Na geração F<sub>1</sub> todos os indivíduos foram resistentes, indicando dominância da resistência. A partir da segregação da geração F<sub>2</sub>, houve contraste entre metodologias, porém pelos estimadores de máxima verossimilhança, metodologia mais adequada, conclui-se que a resistência é governada por um gene dominante de efeito maior com a presença de poligenes. Por retrocruzamento é possível a transferência do gene dominante de efeito maior das fontes de resistência deste trabalho. Por seleção recorrente, a piramidação dos poligenes também poderá ser realizada.

## **Introdução**

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é o legume mais consumido no mundo e considerado uma fonte rica em nutrientes essenciais e proteínas. Especialmente na África e na América Latina, mais de 200 milhões de pessoas dependem deste grão como alimento básico (Schmutz et al., 2014). Além do seu consumo, o cultivo do feijoeiro-comum se expandiu em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em mais de 100 países em todo o mundo, atingindo uma produção superior a 23 milhões de toneladas anualmente. Na América, o Brasil se destaca como maior produtor e consumidor de feijão (Faostat, 2013).

A murcha-de-fusarium causada pelo patógeno habitante de solo *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (Fop) é uma das doenças mais importantes do feijoeiro e está presente em regiões produtoras de vários países (Abawi e Pastor-Corrales, 1990; Alves-Santos et al., 2002; Buruchara e Camacho, 2000), inclusive no Brasil (Toledo-Souza et al., 2012). A infecção do feijoeiro por Fop se dá via ferimentos dos pelos do sistema radicular por onde o patógeno penetra e coloniza os tecidos da epiderme até atingir os vasos condutores. Os sintomas da doença incluem murcha das folhas mais velhas e clorose. Posteriormente, com o progresso da colonização, observa-se a senescência destas folhas, murcha das folhas mais novas, necrose do ápice da planta e dos tecidos vasculares, os quais adquirem coloração vermelho-amarronzada em corte longitudinal do caule. Em condições de umidade e temperatura favoráveis é possível visualizar esporos do patógeno na haste da planta morta. No campo os danos da doença são redução do ciclo da cultura, redução no tamanho das sementes, na produção de grãos e morte da planta (Abawi e Pastor-Corrales, 1990; Brick et al., 2006; Fall et al., 2001). Após a entrada do patógeno na área, o controle da doença se restringe a rotação de culturas. Além disso, Fop é conhecido por produzir clamidósporos, estruturas de resistência que permanecem viáveis no solo por vários anos. Deste modo, a resistência conferida por genes de resistência (genes R) é a melhor estratégia de controle, tanto em

termos econômicos e ambientais, quanto da facilidade de adoção por parte dos agricultores (Miklas et al., 2006).

Em um programa de melhoramento visando a resistência a doenças, a seleção de genitores constitui etapa inicial e fundamental, pois dela depende o sucesso de etapas posteriores. Após a seleção e recombinação de genótipos suscetíveis com aqueles que possuem o gene R, o método de condução da população segregante é primordial para a obtenção de uma cultivar resistente em menor tempo e custo. Entretanto, essa decisão depende do conhecimento do melhorista quanto à herança e parâmetros genéticos envolvidos na resistência.

A resistência do feijoeiro a Fop já foi retratada como mono (Cross et al., 2000; Fall et al., 2001; Ribeiro e Hagedorn, 1979; Salgado et al., 1995), oligo (Cândida et al., 2009; Pereira et al., 2009) e poligênica (Cross et al., 2000; Salgado et al., 1995). Cross et al. (2000) e Salgado et al. (1995) relataram um único gene dominante conferindo resistência a Fop raça 4 em feijoeiro Durango e herança poligênica para a mesma raça de Fop em feijoeiro de origem Mesoamericana. Fall et al. (2001) observaram resistência parcial à raça 4 de Fop devido a um QTL que explicou 63,5% da variação fenotípica das populações de RILs (Recombinant Inbred Line) de A55 e Belneb-RR1. Em A55, genitor Mesoamericano, os autores encontraram um locus de resistência com comportamento qualitativo atribuindo herança monogênica para esse genótipo apesar dos resultados sugerirem genes adicionais e interações gênicas na resistência da população oriunda dele.

Em feijoeiro, a resistência a Fop já foi relatada como raça-específica (Brick et al., 2004; Ribeiro e Hagedorn, 1979) e pode ser compreendida como resistência vertical, onde as classes fenotípicas predominantes são resistência e suscetibilidade (Zambolim et al., 2014). De fato, resultados contrastantes podem ser atribuídos ao uso de isolados distintos em cultivares e linhagens de diversos centros de origem. No Brasil, trabalhos com a raça 2 brasileira, isolado coletado no nordeste do país, já foram realizados (Cândida et al.,

2009; Pereira et al., 2009). Entretanto, a ausência de trabalhos com outros isolados em linhagens e cultivares com características agronômicas de interesse são escassos. Trabalhos envolvendo isolados distintos da raça 2 brasileira devem ser realizados, visando à obtenção de uma cultivar de feijoeiro resistente a Fop, sobretudo, com resistência durável e com características agronômicas de interesse.

Neste contexto, nosso objetivo neste trabalho foi estudar a herança da resistência do feijoeiro-comum à murcha-de-fusarium, isolado FOP UFV 01, a partir de sete cruzamentos contrastantes.

## **Material e Métodos**

### **Linhagens parentais e cruzamentos**

Este trabalho teve início a partir de sete cruzamentos contrastantes obtidos de um dialelo parcial 3 x 5. Neste dialelo, cultivares e linhagens elites de feijoeiro grão tipo carioca, porte ereto ou elevado potencial produtivo foram cruzados manualmente com genótipos resistentes a Fop (Tabela 1). No estágio R9 as sementes F<sub>1</sub>'s foram colhidas e armazenadas.

Na safra da seca (2014), sementes dos híbridos F<sub>1</sub>'s foram semeadas em campo para a obtenção de sementes F<sub>2</sub>. Após a colheita, as sementes F<sub>2</sub> foram armazenadas para a avaliação da severidade da murcha-de-fusarium. Plantas das gerações parentais P<sub>1</sub> (Resistente), P<sub>2</sub> (suscetível), F<sub>1</sub> (híbridos) e F<sub>2</sub> (população segregante) foram usadas para o estudo de herança da resistência a Fop em feijoeiro.

**Tabela 1.** Origem e principais caracteres de interesse de oito genitores de feijoeiro utilizados no dialelo parcial.

<b>Genitores</b>	<b>Origem</b>	<b>Característica de Interesse</b>
<b>Grupo 1</b>		
BRS Estilo	Embrapa	Porte ereto e produtividade de grãos <sup>1</sup>
VC 13	UFV	Resistência a Fop <sup>3</sup> e produtividade de grãos <sup>2</sup>
VC 25	UFV	Resistência a Fop <sup>3</sup> e produtividade de grãos <sup>3</sup>
<b>Grupo 2</b>		
BRSMG Talismã	UFLA	Resistência a Fop <sup>3</sup>
RC-I-8	UFLA	Produtividade de grãos <sup>3</sup>
CVIII 8511	UFLA	Resistência a Fop <sup>3</sup>
CNFC 11965	Embrapa	Produtividade de grãos <sup>3</sup>
Pérola	Embrapa	Resistência a Fop <sup>3</sup> e produtividade de grãos <sup>3</sup>

1- Melo et al., 2010. 2- Silva et al., 2011. 3- Dados não publicados do Programa de Melhoramento do Feijoeiro - UFV.

### Isolado do fungo

Foi utilizado o isolado FOP UFV 01, coletado em Coimbra (Minas Gerais, Brasil) de plantas da cultivar de feijoeiro Meia Noite que exibiram os sintomas típicos de murchar-de-fusarium (Pereira et al., 2013). Ao ser inoculado nas séries diferenciadoras de Fop propostas por Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002), Pereira (2013) considerou FOP UFV 01 uma nova raça da espécie.

Para a produção do inóculo de FOP UFV 01, discos de BDA (batata - dextrose - ágar) contendo micélio do fungo foram repicados para placas de Petri contendo novo meio BDA. As placas foram mantidas em BOD durante 14 dias a 25°C±1°C, sob fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de esporos foi preparada uma hora antes da inoculação sendo utilizada a concentração de 1 x 10<sup>6</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, incluindo macro e microconídios, como recomendado por Pastor-Corrales e Abawi (1987).

### Inoculação de Fop

Em casa-de-vegetação do Campo Experimental Diogo Alves de Melo da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, os genitores, híbridos e populações segregantes de cada cruzamento (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) foram avaliados quanto a resistência a Fop. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições (para

genitores e híbridos) e 70 repetições (para populações segregantes). A unidade experimental consistiu de um vaso com três plantas.

Para a inoculação destes genótipos utilizou-se a metodologia de imersão de raízes em suspensão de conídios proposta por Pastor-Corrales e Abawi (1987). Para isso, a semeadura de todos os genótipos foi realizada em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato para hortaliças Topstrato<sup>®</sup>, sendo mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento das plântulas. No estágio V2 (folha primária completamente expandida) nove plântulas dos pais e híbridos e 210 plântulas de cada população F<sub>2</sub> foram cuidadosamente retiradas das bandejas, suas raízes lavadas e 1/3 do seu comprimento foram cortadas. Imediatamente após o corte, as raízes das plântulas foram imersas na suspensão de macro e microconídios do isolado FOP UFV 01 durante 5 minutos. Após este procedimento, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 2,5 L de substrato Topstrato<sup>®</sup> e mantidas em casa de vegetação a 25°C ± 4°C. Diariamente as plantas foram irrigadas e, 10 dias após inoculação (DAI), cada vaso recebeu 1,0 g de uréia como fonte de nitrogênio.

#### Análise da severidade da doença

A avaliação da severidade da murcha-de-fusarium (SMF) foi realizada aos 21 DAI utilizando a escala de notas da severidade da doença descrita por Pastor-Corrales e Abawi (1987) que se baseia, principalmente, na intensidade de murcha de parte aérea. Por esta escala, 1 = nenhum sintoma visível; 3 = de 1% a 10% de folhas sintomáticas (folhas com murcha suave e clorose); 5 = 11% a 25% de folhas sintomáticas (folhas com murcha moderada e clorose); 7 = 26% a 50% de folhas sintomáticas (folhas com murcha severa e clorose) e 9 = planta morta. Foram considerados resistentes os genótipos com nota de 1,0 a 3,0; intermediário de 3,1 a 6,0 e suscetível de 6,1 a 9,0.

## Análise genético-estatística da herança da resistência a FOP UFV 01

As notas de severidade da murcha-de-fusarium atribuídas individualmente a plantas dos genitores, híbridos e populações segregantes de cada cruzamento foram utilizadas para a estimação de parâmetros genéticos e teste do modelo da resistência do feijoeiro a Fop.

### Estimativa de parâmetros genéticos da resistência do feijoeiro a FOP UFV 01

A partir das notas de severidade dos pais, híbridos e populações F<sub>2</sub> foram calculadas médias e variâncias genotípica ( $\hat{\sigma}_G^2$ ), fenotípica ( $\hat{\sigma}_F^2$ ) e ambiental ( $\hat{\sigma}_A^2$ ) de cada geração e cruzamento, conforme Mather e Jinks (1977). A partir dessas médias, o grau médio de dominância (GMD) também foi estimado.

A herdabilidade no sentido amplo ( $h_A^2$ ) foi calculada conforme abordado por Allard (1960):

$$h_A^2 = \frac{\hat{\sigma}_{GF_2}^2}{\hat{\sigma}_{FF_2}^2},$$

sendo  $\hat{\sigma}_{GF_2}^2$  a variância genotípica e  $\hat{\sigma}_{FF_2}^2$  a variância fenotípica da população F<sub>2</sub>.

Em cada cruzamento, o número mínimo de genes (n) determinando a resistência do feijoeiro a Fop foi estimado usando os métodos de Castle (1921) ( $n_{ca}$ ) e Cruz et al. (2012) ( $n_{cr}$ ). Esses métodos podem ser expressos por:

Método Castle ( $n_{ca}$ ) =  $\frac{(P_R - P_S)^2}{8 \times \hat{\sigma}_{GF_2}^2}$ , em que  $P_R$  representa a média da nota de severidade da

murcha-de-fusarium para o pai resistente e  $P_S$  do pai suscetível e Método Cruz ( $n_{cr}$ ) =

$\frac{(P_R - P_S)^2 \times (1 + 0,5K^2)}{8 \times \hat{\sigma}_{GF_2}^2}$ , sendo K o grau médio de dominância.

## Teste das hipóteses de herança mono e oligogênica da resistência a FOP UFV 01

As frequências das plantas resistentes, da classe intermediária e suscetíveis (R, I e S) dos genitores, híbridos e plantas da geração F<sub>2</sub> foram obtidas para cada cruzamento conforme Pastor-Corrales e Abawi (1987), em que plantas com notas de 1 a 3 foram agrupadas na classe R, de 3,1 a 6,9 na classe I e de 7 a 9 na classe S. A partir das frequências de plantas R, I e S da geração F<sub>2</sub> foram testadas hipóteses de herança Mendeliana da resistência pelo teste qui-quadrado, a 5% de probabilidade, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2013).

## Testes de modelos genéticos utilizando a função de máxima verossimilhança

A metodologia baseada em estimadores de máxima verossimilhança proposta por Silva (2003) foi considerada para testar a hipótese de um gene de efeito maior e/ou presença de poligenes afetando a expressão do gene R em feijoeiro. Baseado em médias e variâncias (Mather e Jinks, 1977) foi considerado que:

$$P_1 = (\mu - [a] - A, \sigma^2)$$

$$P_2 = (\mu + [a] + A, \sigma^2)$$

$$F_1 = (\mu + [d] + D, \sigma^2)$$

$$F_2 = \frac{1}{4} \left( \mu + \frac{[d]}{2} - A, \sigma^2 + V_A + V_D \right) + \frac{1}{2} \left( \mu + \frac{[d]}{2} + D, \sigma^2 + V_A + V_D \right) + \frac{1}{4} \left( \mu + \frac{[d]}{2} + A, \sigma^2 + V_A + V_D \right)$$

sendo:  $\mu$  = constante de referência;  $A$  = efeito aditivo do gene de efeito maior;  $D$  = efeito de dominância do gene de efeito maior;  $[a]$  = efeito aditivo dos poligênicos;  $[d]$  = efeito de dominância dos poligênicos;  $V_A$  = variância aditiva dos poligênicos;  $V_D$  = variância atribuída aos desvios de dominância dos poligênicos e  $\sigma^2$  = variância ambiental. A partir das funções de verossimilhança, para cada modelo, foi possível compor testes de interesse, tendo-se considerado diferentes hipóteses (Tabela 2). Tais testes de razão de

**Tabela 2.** Modelos genéticos testados para a resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium.

Modelos	Parâmetros
1= gene maior com efeito aditivo e de dominância + poligenes com efeito aditivo e de dominância	$\mu, A, D, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}^*, \sigma^2$
2= gene maior com efeito aditivo e de dominância + poligenes apenas com efeito aditivo	$\mu, A, D, [a], V_A, \sigma^2$
3= gene maior apenas com efeito aditivo + poligenes com efeito aditivo e de dominância	$\mu, A, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}^*, \sigma^2$
4= gene maior apenas com efeito aditivo + poligenes apenas com efeito aditivo	$\mu, A, [a], V_A, \sigma^2$
5= poligenes com efeito aditivo e de dominância	$\mu, [a], [d], V_A, V_D, S_{AD}^*, \sigma^2$
6= poligenes apenas com efeito aditivo	$\mu, [a], V_A, \sigma^2$
7= gene maior com efeitos aditivo e de dominância	$\mu, A, D, \sigma^2$
8= gene maior apenas com efeito aditivo	$\mu, A, \sigma^2$
9= apenas efeito do ambiente	$\mu, \sigma^2$

\* $S_{AD}$ : componente da variação relativa ao produto dos efeitos poligênicos aditivos pelos efeitos poligênicos de dominância.

verossimilhança foram feitos por meio da estatística LR (Likelihood ratio) (Mood et al., 1974) dada por:

$$LR = -2 \ln \frac{L(M_i)}{L(M_j)}$$

sendo  $L(M_i)$  e  $L(M_j)$  as funções de verossimilhança dos modelos  $i$  e  $j$ , em que o modelo  $i$  deve estar hierarquizado ao modelo  $j$ . Os testes foram realizados utilizando o software estatístico Monogen v.0.1 (Silva, 2003).

Os modelos 1, 3 e 5 não puderam ser testados devido à ausência dos retrocruzamentos, impossibilitando estimar o efeito de dominância associado aos efeitos poligenes.

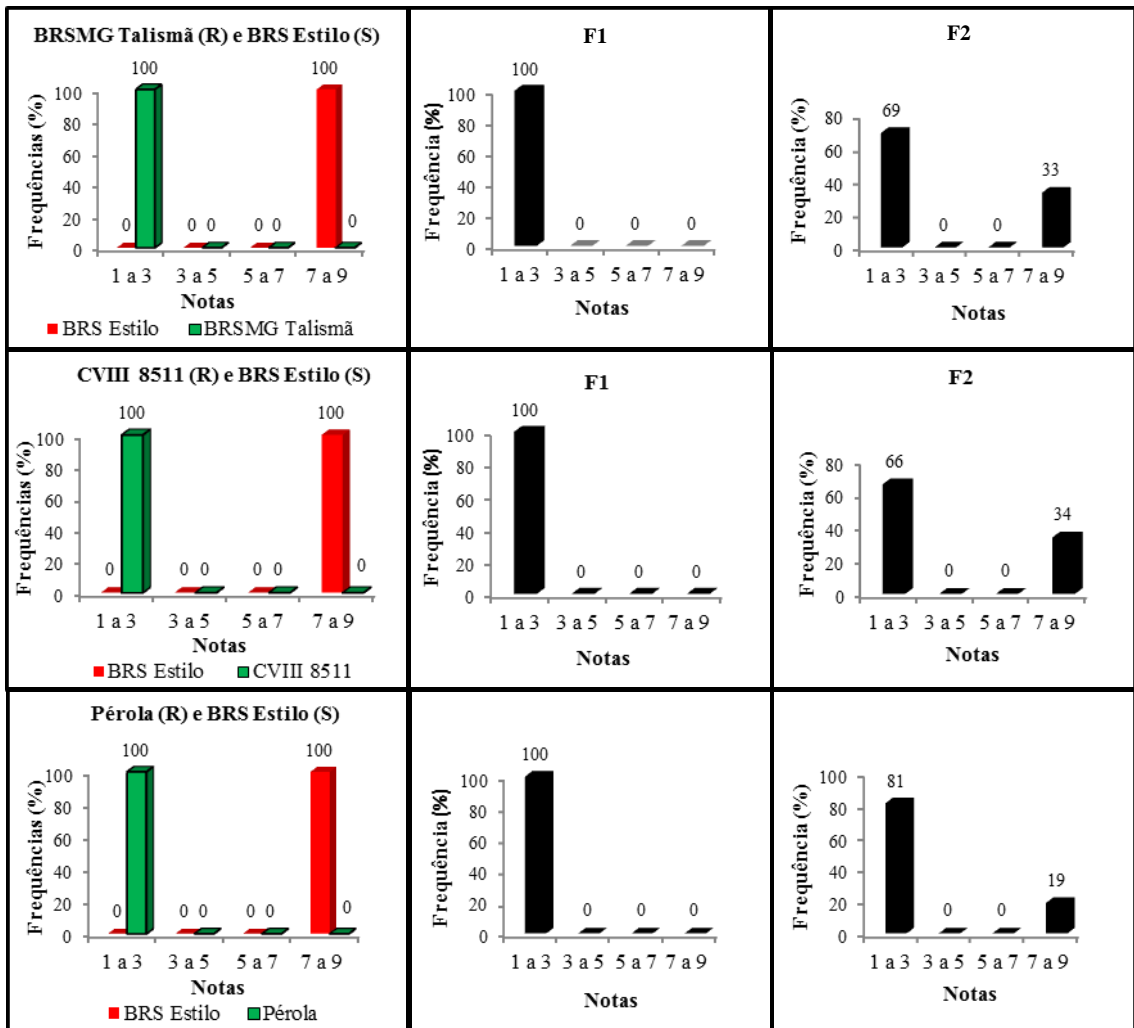
## **Resultados**

### Resistência dos genitores e híbridos F<sub>1</sub> a FOP UFV 01

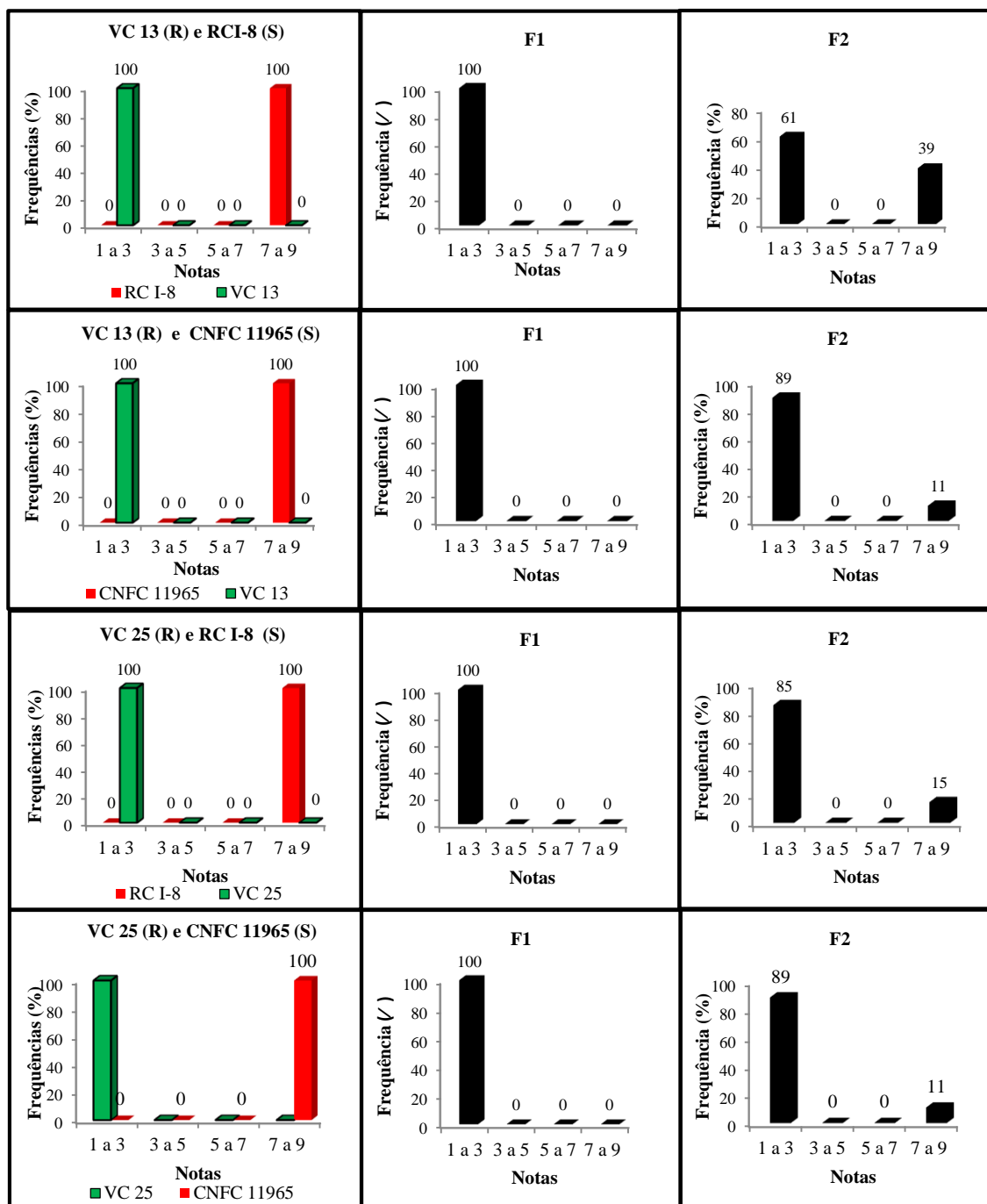
Os genótipos VC 13 e VC 25 do grupo 1 e BRSMG Talismã, CVIII 8511 e Pérola do grupo 2 foram resistentes a FOP UFV 01, enquanto BRS Estilo (grupo 1), RC-I-8 e CNFC 11965 (grupo 2) foram suscetíveis. Todos os genitores resistentes apresentaram alto nível de resistência, com a maioria considerada imune (nota de severidade igual a 1). Por outro lado, os genitores suscetíveis apresentaram uma pequena variação dentro da classe com notas de 7 a 9. Não foram observados genitores com nota intermediária (Figura 1).

Quando inoculado na geração F<sub>1</sub>, FOP UFV 01 não foi capaz de causar sintomas nas plantas de cruzamentos contrastantes (R x S), indicando dominância completa para a resistência (Figura 1).

A severidade da doença em plantas individuais, avaliada em 210 indivíduos de cada população F<sub>2</sub>, apresentou distribuição discreta com duas classes fenotípicas: resistente e suscetível (Figura 1). Menos de 2% dos genótipos apresentaram reação intermediária a Fop.



...continua



**Figura 1.** Distribuição das frequências das notas de severidade da murcha-de-fusarium de genitores, gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de cruzamentos contrastantes de um dialelo parcial em porcentagem de plantas com notas de 1 a 3, 3 a 5, 5 a 7 e 7 a 9.

## Estimativa de parâmetros genéticos da resistência do feijoeiro a FOP UFV 01

As estimativas de variância genotípica ( $\hat{\sigma}_G^2$ ) da população  $F_2$  foram próximas das fenotípicas ( $\hat{\sigma}_F^2$ ), indicando pouca variação de origem não genética na resistência. Entre os cruzamentos avaliados, VC 13 / RC-I-8 apresentou o maior valor de  $\hat{\sigma}_G^2$  e VC 25 / CNFC 11965 o menor valor para este parâmetro (Tabela 3).

O grau médio de dominância (GMD) obtido com base nas médias variou de -0,95 a -1,20 indicando dominância completa no sentido do menor valor do caráter nota de severidade da doença, o que implica em dominância da resistência a Fop. Altos valores de herdabilidade (de 94 a 99%) foram observados em todos os cruzamentos indicando ser possível a seleção fenotípica de genótipos resistentes. Apesar de se tratar de herdabilidade no sentido amplo, os altos valores observados indicam maior chance de sucesso com a seleção (Tabela 3).

O número mínimo de genes calculado conforme Castle (1921) indicou de 0,30 a 1,27 genes no controle da resistência do feijoeiro a Fop e de 0,54 a 1,51 conforme Cruz et al. (2012) (Tabela 3), ressaltando herança governada por um ou dois genes.

**Tabela 3.** Estimativas dos parâmetros genéticos: variância fenotípica ( $\hat{\sigma}_F^2$ ), ambiental ( $\hat{\sigma}_A^2$ ) e genotípica ( $\hat{\sigma}_G^2$ ), grau médio de dominância (GMD), herdabilidade no sentido amplo ( $h_A^2$ ) e número mínimo de genes (n) conforme Castle ( $n_{ca}$ ) e Cruz ( $n_{cr}$ ) em gerações segregantes e não segregantes (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) de feijoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) isolado FOP UFV 01.

Cruzamento	Variância fenotípica ( $\hat{\sigma}_F^2$ )	Variância ambiental ( $\hat{\sigma}_A^2$ )	Variância genotípica ( $\hat{\sigma}_G^2$ )	GMD	$h_A^2$	Número mínimo de genes (n)	
						Castle ( $n_{ca}$ )	Cruz ( $n_{cr}$ )
1 BRSMG Talismã / BRS Estilo	12,35	0,88	12,26	-1,00	99,29	0,55	0,65
2 CVIII 8511 / BRS Estilo	13,39	0,88	13,30	-1,00	99,34	0,50	0,60
3 Pérola / BRS Estilo	8,75	0,25	8,49	-1,20	97,08	0,65	0,94
4 VC 13 / RC I-8	15,07	0,15	14,92	-0,95	99,00	0,30	0,54
5 VC 13 / CNFC 11965	5,87	0,20	5,67	-1,00	96,63	1,24	1,41
6 VC 25 / RC I-8	7,47	0,21	7,26	-1,00	97,17	0,58	1,10
7 VC 25 / CNFC 11965	5,60	0,30	5,29	-0,98	94,61	1,27	1,51

## Teste das hipóteses de herança mono e oligogênica da resistência a FOP UFV 01

As proporções fenotípicas de plantas resistentes (R) e suscetíveis (S) observadas nas populações segregantes  $F_2$  variou entre os cruzamentos, possibilitando quatro hipóteses da herança do feijoeiro a Fop com valores de  $\chi^2$  não significativos (Tabelas 4 e 5).

Na primeira hipótese (3:1) a resistência é governada por um gene dominante ( $A\_$ ) e foi observada no primeiro cruzamento (BRSMG Talismã / BRS Estilo) (Tabela 5). Na hipótese 9:7, a resistência é governada por dois genes dominantes complementares ( $A\_B\_$ ) e foi observada no cruzamento quatro (VC 13 / RC-I-8). Considerando três genes segregantes, duas hipóteses foram elaboradas: i) a hipótese 43:21, observada na população  $F_2$  de CVIII8511 / BRS Estilo, referindo-se a dois genes dominantes ( $A\_B\_$ ) ou um único gene recessivo (cc) conferindo resistência e ii) a hipótese 54:10, que insere um quarto gene dominante observado nos cruzamentos três (Pérola// BRS Estilo), cinco (VC 13 / CNFC 11965) e seis (VC 25 / RC-I-8), em que a resistência é atribuída a dois genes dominantes complementares ( $A\_B\_$ ,  $A\_D\_$  ou  $B\_D\_$ ). A última hipótese com quatro genes envolvidos na resistência foi observada no cruzamento sete (VC 25 / CNFC 11965). Assim, pelo teste de  $\chi^2$ , a herança da resistência do feijoeiro a Fop é atribuída a três genes dominantes (A, B e D) ou um recessivo (c), sendo que plantas resistentes possuem dois dos três genes dominantes ou um recessivo apenas (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4.** Relação fenotípica esperada na geração F<sub>2</sub> com base nas hipóteses de resistência do feijoeiro a Fop para um, dois, três e quatro genes segregantes

Genes Segregantes	Relação fenotípica esperada (R:S)	Genes envolvidos na resistência	Genótipo de plantas resistentes*
Um gene	3:1	Um gene dominante	<b>A_</b>
Dois genes	9:7	Dois genes dominantes	<b>A_ B_</b>
	43:21	Dois genes dominantes (A e B) ou um recessivo (c)	<b>A_ B_ C_</b> aa bb <b>cc</b>
Três genes	54:10	Dois genes dominantes complementares (A, B ou D)	<b>A_ B_ CC dd</b> <b>A_ bb CC D_</b> aa <b>B_ CC D_</b> <b>A_ B_ CC D_</b>
Quatro genes	226:30	Dois genes dominantes complementares (A, B ou D) ou um recessivo (c)	<b>A_ B_ CC dd</b> <b>A_ bb CC D_</b> aa <b>B_ CC D_</b> aa bb <b>cc dd</b>

\* em negrito, os genes de resistência a Fop.

**Tabela 5.** Hipóteses da herança da resistência do feijoeiro comum à murcha-de-fusarium, isolado FOP UFV 01, em cruzamentos contrastantes (geração F<sub>2</sub>), associadas às relações fenotípicas esperadas e observadas com seus respectivos valores de qui-quadrado

Cruzamento	Hipótese	Relação observada	Relação esperada	$\chi^2_c$ e Probabilidade
1 BRSMG Talismã / BRS Estilo	3:1	144 R: 62 S	157 R: 53 S	2,85 <sup>ns</sup> (9,11%)
2 CVIII 8511 / BRS Estilo	43:21	134 R: 70 S	137 R: 67 S	0,21 <sup>ns</sup> (64,79%)
3 Pérola / BRS Estilo	54:10	170 R: 39 S	176 R: 33 S	1,46 <sup>ns</sup> (22,68%)
4 VC 13 / RC I-8	9:7	128 R: 82 S	118 R: 92 S	1,89 <sup>ns</sup> (16,95%)
5 VC 13 / CNFC 11965	54:10	185 R: 24 S	176 R: 33 S	2,72 <sup>ns</sup> (9,91%)
6 VC 25 / RC I-8	54:10	176 R: 33 S	178 R: 32 S	0,00 <sup>ns</sup> (94,78%)
7 VC 25 / CNFC 11965	226:30	186 R: 21 S	182 R: 24 S	0,49 <sup>ns</sup> (48,14%)

<sup>ns</sup> - não significativo pelo teste de qui-quadrado.

## Testes de modelos genéticos utilizando a função de máxima verossimilhança

A partir da nota de severidade, modelos genéticos foram testados para a herança da resistência pelo método da máxima verossimilhança. Em todos os cruzamentos, a significância do contraste entre os modelos 8 e 9 confirma que os valores observados deve-se a fatores genéticos e não apenas a efeitos ambientais (Tabela 6). Do mesmo modo, a significância do teste de hipótese entre os modelos 7 e 8 indicou que a herança em todos os cruzamentos deve ser atribuída tanto a efeitos aditivos dos genes de resistência, quanto a efeitos de dominância. Nos cruzamentos um, dois e três, que envolvem o genitor suscetível BRS Estilo, a significância do contraste entre os modelos 2 e 7, confirma a existência de um gene dominante de efeito maior além da presença de poligenes. Nos cruzamentos quatro e seis, que inclui o genitor suscetível RCI-8, o mesmo comportamento foi observado, mostrando que no controle genético da resistência há tanto genes dominantes de efeito maior quanto poligenes. Já nos cruzamentos cinco e sete, envolvendo CNFC 11965, genitor suscetível de maior nota da severidade da doença, o contraste entre os modelos 2 e 7 foi não significativo. Esses resultados destacam a presença de um gene de efeito maior nos genitores VC 13 e VC 25 e ausência de poligenes tanto nestes, quanto no genitor suscetível.

**Tabela 6.** Hipóteses de modelos genéticos da herança da resistência do feijoeiro comum à murcha-de-fusarium isolado FOP UFV 01 por meio da função de máxima verossimilhança.

Modelos	Graus de liberdade	$\chi^2_c$						
		BRSMG Talismã / BRS Estilo	CVIII 8511 / BRS Estilo	Pérola / BRS Estilo	VC 13 / RC I-8	VC 13 / CNFC 11965	VC 25 / RC I-8	VC 25 / CNFC 11965
2 vs. 4	1	545,40*	666,71*	591,03*	596,81*	745,02*	577,26*	628,68*
2 vs. 6	2	547,81*	672,56*	593,71*	690,46*	745,02*	577,42*	628,68*
2 vs. 7	2	14,33*	9,87*	23,65*	257,04*	0,19 <sup>NS</sup>	72,27*	0,27 <sup>NS</sup>
2 vs. 8	3	548,46*	669,22*	591,56*	702,94*	759,84*	585,31*	643,49*
2 vs. 9	4	628,11*	754,26*	654,89*	779,05*	825,44*	652,18*	709,98*
4 vs. 6	1	2,41 <sup>NS</sup>	5,85*	2,68 <sup>NS</sup>	93,64*	0 <sup>NS</sup>	0,15 <sup>NS</sup>	0 <sup>NS</sup>
4 vs. 8	2	3,06 <sup>NS</sup>	2,51 <sup>NS</sup>	0,52 <sup>NS</sup>	106,12*	14,82*	8,04*	14,81*
4 vs. 9	3	82,71*	87,55*	63,86*	182,23*	80,41*	74,92*	81,30*
6 vs. 9	2	80,29*	81,69*	61,18*	88,59*	80,41*	74,76*	81,30*
7 vs. 8	1	534,12*	659,35*	567,90*	445,89*	759,65*	513,03*	643,21*
7 vs. 9	2	613,77*	744,39*	631,23*	522,00*	825,25*	579,91*	709,71*
8 vs. 9	1	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-

1 - Valor negativo, talvez devido a problemas de convergência; \* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de quadrado, <sup>NS</sup> não significativo.

## **Discussão**

A demanda dos produtores por cultivares de feijoeiro com resistência durável tem estimulado melhoristas a se empenharem em estudos de herança mais acurados visando à estimação de parâmetros envolvidos no controle genético e identificação de genes de resistência a patógenos. Este é o primeiro estudo de herança da resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium em um dialelo realizado com este objetivo e com o isolado FOP UFV 01. Os parâmetros e informações a respeito da herança da resistência retratados neste trabalho irão subsidiar programas de melhoramento em decisões na seleção e condução das populações segregantes, reduzindo tempo e recursos no desenvolvimento de cultivares resistentes a Fop.

As classes fenotípicas dos genitores, híbridos e geração F<sub>2</sub> observadas para nota de severidade da murcha-de-fusarium apresentaram distribuição discreta com classificação dos genótipos em resistente ou suscetível. Entre os resistentes, a nota de severidade mais frequente foi imunidade (nota 1,0), enquanto uma pequena variação foi observada entre os genitores suscetíveis (notas superiores a 7,0); genótipos com reação intermediária foram observados em menos de 2% dos indivíduos. Distribuição descontínua das classes fenotípicas geralmente é retratada em caracteres de herança mono ou oligogênica (Ramalho et al., 2012) e em resistência vertical (Zambolim et al., 2014). Ao avaliar linhagens de feijoeiro do banco de germoplasma da UFLA quanto à severidade da murcha-de-fusarium com o isolado Fop 01, a predominância das classes resistente e suscetível também foi observada nas linhagens avaliadas por Pereira et al. (2011). Em contraste, Cross et al. (2000) concluíram herança poligênica para resistência à raça 4 de Fop em feijoeiro do grupo Mesoamericano, mesmo grupo dos genitores utilizados em nosso trabalho. Os autores chegaram a esta conclusão pela distribuição contínua das notas de severidade na geração F<sub>2</sub> e pelo padrão de segregação observado não se adequar a modelos genéticos de herança simples. A utilização de isolados diferentes podem ser a

justificativa dessa divergência de resultados. Um exemplo que ressalta essa afirmativa são os estudos da resistência do feijoeiro a Fop raça 2 brasileira, em que Cândida et al. (2009) e Pereira et al. (2009) afirmam que poucos genes estão envolvidos no controle genético do caráter. Brick et al. (2004) retratam em seu trabalho exatamente a resistência raça-específica característica da resistência vertical, onde os autores afirmam que genes diferentes estariam envolvidos na resistência às raças 4 e 5 do patógeno. Em outras formas especiais de *Fusarium oxysporum*, herança simples para murcha-de-fusarium também é relatada em outros patossistemas com as culturas do repolho (Lv et al., 2014), couve chinesa (Shimizu et al., 2014), banana (Ssali et al., 2013), melão (Oumouloud et al., 2010), berinjela (Boyaci et al., 2011) e maxixe (Matsumoto e Miyagi, 2012).

#### Parâmetros genéticos

Altas estimativas de herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) foram observadas em todos os cruzamentos (de 96 a 98%), indicando variância genética entre genitores e baixa magnitude da variância de origem ambiental. Uma vez que a variância ambiental exerce grande influência sobre a severidade da murcha-de-fusarium (Abdullaev et al., 2015; Salgado et al., 1995), o controle ambiental foi suficiente para assegurar que essa estimativa fosse de baixa magnitude, o que também contribuiu para maiores estimativas de herdabilidade. Valores elevados de herdabilidade também sugerem que o caráter está sob controle genético de poucos locos (Beserra Júnior et al., 2006). Além disso, indica que o melhoramento desse caráter a partir de fontes de resistência como os genitores deste trabalho, pode ser facilitado pelo processo de seleção devido a maiores chances de ganho (Mukankusi et al., 2011). Altos valores de herdabilidade que sugerem controle oligogênico da resistência a Fop são concordantes com estudos anteriores de Brick et al. (2004), Pereira et al. (2009) e Cândida et al. (2009). Em grão de bico, estimativas de herdabilidade de 90% foram relatadas por Halila et al. (2010), indicando herança simples

da resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, agente causal da murcha-de-fusarium nesta cultura.

A dominância completa no sentido do menor valor do caráter observada em todos os híbridos ( $GMD = -1$ ) revela a dominância da resistência. Várias murchas causadas por *Fusarium oxysporum* apresentam esse comportamento. Lv et al. (2014) avaliaram uma população  $F_2$  resultante de um cruzamento contrastante de repolho e observaram um gene dominante conferindo resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Os autores utilizaram essa população para mapear o gene de resistência e desenvolver marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento com seleção assistida. A partir de avaliações fenotípicas, Ulloa et al. (2013) também identificaram um gene dominante no algodão conferindo resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em três populações  $F_2$  oriundas de cruzamentos interespecíficos de *Gossypium hirsutum* x *G. barbadense*. Em feijoeiro, um gene dominante conferindo resistência às raças 3, 7, 19 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* foram relatados por Campa et al. (2011). Hart e Griffiths (2015) também observaram herança simples e dominância para resistência a Bean yellow mosaic virus. Do mesmo modo, Zapata et al. (2011) observaram o mesmo comportamento para resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Entretanto, genes recessivos também já foram relatados conferindo resistência ao crestamento bacteriano aureolado em feijoeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) (Duncan et al., 2014).

O número de genes estimado conforme Castle (1921) e Cruz et al. (2012) variou de 0,30 a 1,51 genes. Vale ressaltar que estas metodologias detectam apenas genes dominantes indicando que, caso outros genes de efeito apenas aditivo estejam influenciando o caráter, estes não seriam identificados e a estimativa estaria, portanto, subestimada. Bjarko e Line (1988) destacam que ao estimar o número de genes no controle da resistência da ferrugem em trigo, a presença de genes ligados, dominância e efeito diferenciado de cada gene resulta em valores subestimados do número de genes.

## Teste das hipóteses de herança mono e oligogênica da resistência a FOP UFV 01

Cinco hipóteses explicaram as proporções fenotípicas dos sete cruzamentos que indicaram um a quatro genes conferindo resistência ao isolado FOP UFV 01, pelo teste de qui-quadrado. Três genes dominantes, sendo dois complementares (A\_, B\_ e D\_) ou um gene recessivo (c) estão presentes nos genitores avaliados. O primeiro cruzamento (BRSMG Talismã // BRS Estilo) é explicado pela hipótese de herança simples de um gene dominante. Já a hipótese do último cruzamento (VC // CNFC 11965) apresenta maior complexidade com quatro genes segregantes, apontando que o genitor VC 25 possui os quatro genes de resistência e CNFC 11965 nenhum deles. Campa et al. (2011) relatam três genes dominantes independentes para a resistência do feijoeiro à antracnose, raça 1545 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Entretanto, os autores basearam os resultados em dados moleculares para afirmar essa hipótese. Em contrapartida, Mukankusi et al. (2011), com base em dados fenotípicos, testaram um a três genes dominantes e recessivos pelo teste qui-quadrado, porém, concluíram que devido a interações alélicas, epistáticas e efeito materno, provavelmente vários genes devem estar envolvidos na resistência do feijoeiro à podridão radicular-seca (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*).

## Modelos genéticos

Os modelos genéticos de herança testados pelos estimadores de máxima verossimilhança (EMV) foram aplicados visando identificar a predominância de efeitos aditivos ou de dominância do gene de resistência a Fop em feijoeiro, além de apontar a existência de poligenes no controle genético do caráter. Por esta metodologia, o modelo completo (modelo 2) foi confrontado um a um com cada um dos modelos reduzidos (modelos 4, 6, 7, 8 e 9). A significância do contraste entre esses modelos indica que o

efeito dos parâmetros diferentes entre eles (que estão apenas no modelo completo) é significativo e, portanto, o modelo completo é mais adequado para explicar a herança da resistência no cruzamento envolvendo aqueles genitores. Por conseguinte, a não significância do contraste entre modelos indica que o modelo reduzido é o que melhor explica a herança da resistência naquele cruzamento.

A significância do contraste entre os modelos 7 e 8 para todos os cruzamentos evidencia a presença de efeitos aditivos e de dominância dos genes de resistência. A resistência de 100% das plantas da geração F<sub>1</sub> em todos os cruzamentos já é um indício dessa afirmativa que também pode ser confirmada pela magnitude da capacidade específica de combinação na análise dialélica dos genitores do dialelo parcial (dados não mostrados). A dominância da resistência do feijoeiro a Fop também já foi relatada em outros trabalhos (Brick et al., 2004; Pereira et al., 2009; Ribeiro e Hagedorn, 1979). A significância do contraste entre os modelos 2 e 7 nos cruzamentos um, dois, três, quatro e seis, envolvendo os genitores BRS Estilo e RCI-8 aponta para poligenes além do gene dominante de efeito maior. Entretanto, nos cruzamentos cinco (VC 13 / CNFC 11965) e sete (VC 25 / CNFC 11965) ambos com o genitor suscetível CNFC 11965, a não significância do contraste entre os modelos 2 vs. 7 ressalta que poligenes não foram detectados. Neste caso, pode-se afirmar que nestes cruzamentos a resistência é governada apenas por um gene dominante de efeito maior, que está presente nos genitores resistentes VC 13 e VC 25. Embora possa haver poligenes presentes em genitores resistentes, estes geralmente apresentam genes de efeito maior. A partir destes genes a resistência vertical pode ser proposta para a resistência do feijoeiro a Fop. A resistência vertical é observada quando ocorre a interação entre o gene R (da planta) e o gene AVR (presente no patógeno), acarretando em imunidade resultante da interação raça-específica (Brick et al., 2004). Essa interação contribui para o controle do inóculo inicial impedindo que o patógeno seja capaz de multiplicar-se em um ambiente, uma vez que, este não é capaz de colonizar os

tecidos do hospedeiro (Zambolim et al., 2014). Essa resistência é possível apenas para genes de efeito maior.

Apesar da expressão dos poligenes geralmente não ser observada fenotipicamente devido à expressão do gene de efeito maior (Ulloa et al., 2013), sua detecção é possível pelos estimadores de máxima verossimilhança. Nos cruzamentos um, dois, três, quatro e seis, poligenes com efeito aditivo foram detectados juntamente com um gene dominante de efeito maior. Uma nova abordagem descrita por Singh et al. (2014), aponta para a aplicação dos poligenes no Centro Internacional de Melhoramento do Milho e do Trigo (CIMMYT). Os autores relatam que o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes à ferrugem é baseado na combinação de genes de efeito menor que, quando presentes sozinhos, não conferem resistência adequada especialmente sobre alta pressão de inóculo do patógeno. Entretanto, a combinação de 4 a 5 genes de efeito menor, geralmente resultam em “quase imunidade” ou alto nível de resistência, assim como a conferida por um gene de efeito maior.

#### Contraste de metodologias

As três metodologias (análise de gerações, teste de hipóteses de herança mono e oligogênica pelo teste de qui-quadrado e teste de modelos genéticos usando estimadores de máxima verossimilhança - EMV) utilizadas no estudo de herança da resistência a FOP UFV 01 apresentaram resultados diferentes. Na análise de gerações, a conclusão foi que a herança é conferida por pelo menos dois genes dominantes. Pelo teste de qui-quadrado, a herança do caráter é devido a três genes dominantes, sendo dois complementares ou apenas um gene recessivo. Por estimadores de máxima verossimilhança, um gene dominante de efeito maior e poligenes com efeito aditivo foram apontados no controle da resistência. Além da peculiaridade de cada metodologia, a forma de considerar os dados de nota de severidade é uma justificativa desses resultados divergentes. Na geração

segregante F<sub>2</sub>, 210 plantas de cada um dos sete cruzamentos foram avaliadas. Na análise de gerações e EMV, a nota de cada planta foi considerada individualmente, permitindo explorar a variabilidade dentro de cada uma das classes fenotípicas de resistência (R) e suscetibilidade (S). No teste de qui-quadrado, as notas dos indivíduos são agrupadas nas classes R ou S, impossibilitando detectar as variações individuais que podem ser atribuídas a fatores genéticos.

Uma das limitações do qui-quadrado está na ambiguidade de segregação, em que hipóteses similares com número de genes diferentes podem não ser rejeitadas pelo teste. Um exemplo é a segregação ambígua das hipóteses 3:1 (um gene) e 13:3 (dois genes) assim como, as hipóteses 9:7 (dois genes) e 27:37 (três genes) (Salgado, 2012). O autor ressalta a ineficiência do teste na ambiguidade de segregação, ou seja, indicar a hipótese correta quando hipóteses alternativas semelhantes são testadas. Quanto ao tamanho da amostra, o teste também se mostra bastante sensível, principalmente tratando-se de hipóteses similares. Liu et al. (1997), avaliando tamanho populacional ótimo para discriminar hipóteses similares pelo qui-quadrado, concluiu que seriam necessários pelo menos 666 indivíduos para inferir a hipótese mais apropriada entre 3:1 e 13:3 e, entre 9:7 e 27:37, 23.383 indivíduos. Um grande número de indivíduos certamente aumentaria a chance de não rejeitar a hipótese verdadeira no teste de qui-quadrado. Entretanto, em programas de melhoramento, há grande dificuldade de avaliar tamanhos populacionais elevados devido ao tempo, mão de obra e custo requeridos. Salgado (2012) também relata que a ambiguidade de hipóteses aumenta para número maior de genes envolvidos no controle genético da característica em estudo. Assim, a ambiguidade de hipóteses pode ser responsável pela ausência de conclusões quanto ao número exato de genes que controlam a resistência a Fop em feijoeiro. Isso pode ser observado em trabalhos que, apesar de citarem altos valores de herdabilidade e distribuição discreta da geração segregante em classes predominantes R e S, concluírem que a resistência é conferida por

poucos genes, sem citar exatamente quantos (Pereira et al., 2009; Cândida et al., 2009). Pelo teste qui-quadrado, não é raro encontrar discordância sobre o padrão de herança da resistência a patógenos em uma mesma cultura. Em café, Kukhang et al. (1993) identificou um gene dominante (3:1) para resistência a *Hemileia vastatrix* em híbridos de Timor. Entretanto, para este mesmo híbrido, Capucho et al. (2009) relataram tanto as proporções 15:1 e 61:3 envolvidas no controle genético da resistência, indicando pelo menos dois ou três genes dominantes presentes nestes híbridos.

Quanto aos estimadores de máxima verossimilhança, uma limitação também é observada. Ao apontar a existência de poligenes no controle genético da resistência do feijoeiro a Fop, não se sabe ao certo, quantos genes de efeito menor estariam envolvidos. Apenas com dados fenotípicos não é possível responder a essa questão. No entanto, a análise com dados moleculares possibilitaria determinar de forma mais precisa quantos genes estariam envolvidos, bem como os efeitos de cada gene. Todavia, a metodologia EMV apresenta a vantagem de identificar um gene de efeito maior e poligenes de pequenos efeitos envolvidos no controle genético do caráter.

A análise de gerações apresenta limitações similares ao teste de qui-quadrado. Essa metodologia fornece apenas o número de genes que exibem dominância e não o efeito de cada gene envolvido no controle do caráter, sendo incapaz de identificar poligenes.

#### Limitações da avaliação da severidade da murcha-de-fusarium

Nas avaliações da murcha-de-fusarium em feijoeiro, a desuniformidade de infecção e condições ambientais que afetam o crescimento do patógeno, da planta e a interação entre eles, podem influenciar os sintomas e conseqüentemente as notas finais de severidade (Salgado et al., 1995). Escape dessa natureza pode ocorrer nas avaliações, o que demanda dos pesquisadores maior atenção e cuidado ao avaliar a severidade da

doença. Erros quanto à classificação fenotípica de uma planta S em R podem eventualmente ocorrer. Entretanto, o método de estimadores de máxima verossimilhança é menos sensível a essas variações individuais de nota de severidade comparativamente ao qui-quadrado pelo fato de este método estimar parâmetros a partir de todas as notas, como citado anteriormente. Já no qui-quadrado, pequenas alterações no número de plantas de uma classe para outra é capaz de provocar mudanças quanto à rejeição ou não rejeição de uma dada hipótese, o que aumenta as chances de erro com o uso dessa metodologia.

#### Perspectivas e aplicação em programas de melhoramento

Nos últimos anos, a murcha-de-fusarium tornou-se uma das principais doenças do feijoeiro, expandindo-se no país devido ao uso de implementos infestados com conídios do fungo e uso irregular da irrigação. O plantio sucessivo do feijoeiro distribuído em três safras ao ano, permitiu que essa doença causasse danos expressivos devido ao aumento do inóculo inicial. Por tratar-se de um patógeno de solo, o uso de cultivares resistentes é a estratégia de controle mais efetiva neste patossistema.

Em programas de melhoramento visando resistência às doenças as etapas principais são: i) seleção de germoplasma resistente, ii) escolha do método de melhoramento, iii) recombinação e seleção e iv) avaliação do genótipos (Caixeta e Zambolim, 2014). Na escolha do método de melhoramento a ser adotado o modo de herança da resistência é crucial, sendo o sucesso do programa dependente dessa decisão. Informações incorretas em relação à natureza da herança da resistência induz a estratégias menos eficientes de seleção e condução de populações segregantes acarretando em perda de recursos do programa e tempo para incorporar esses genes no genótipo de interesse. Além disso, no nosso estudo de herança, fontes de genes R foram identificadas e podem ser utilizadas para a incorporação desses genes em cultivares comerciais. Os altos valores

de herdabilidade já são indício de que com a seleção, maiores ganhos podem ser proporcionados.

A resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium é dominante e governada por um gene de efeito maior e poligenes. A partir de retrocruzamentos, a introgressão do gene dominante de efeito maior pode ser realizada com sucesso. Quanto aos poligenes, cabem estudos para determinar a proporção de seus efeitos na resistência. Uma hipótese seria que esses genes de efeito menor estejam envolvidos na redução do crescimento da planta, sintoma observado em alguns genótipos de feijoeiro infectados com FOP UFV 01. Entretanto, apenas com análises moleculares as proporções que os poligenes explicam da resistência seriam determinadas. Caso expliquem uma fração considerável, é recomendado um programa de seleção recorrente a fim de incorporá-los em linhagens elites do programa. Além deste método, a seleção assistida por marcadores moleculares também pode ser adotada na piramidação destes genes a fim de reduzir o tempo de obtenção de cultivares resistentes a Fop. Vale ressaltar que a introgressão de poligenes para piramidação de genes de resistência é uma estratégia eficiente para evitar o efeito vertifolia, que ocorre com a suplantação de genes de efeito maior. A piramidação de genes de resistência pode garantir ao cultivar, maior vida útil no mercado devido à dificuldade de suplantação da resistência pelo patógeno (Young e Kelly, 1996). Com o desenvolvimento de cultivares contendo o gene dominante de efeito maior e poligenes piramidados, uma nova concepção do melhoramento do feijoeiro para resistência a Fop pode ser consolidada.

## **Conclusão**

A resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium é dominante e governada por um gene de efeito maior e poligenes. A partir de retrocruzamentos, a introgressão do gene dominante de efeito maior pode ser realizada com sucesso. Por seleção recorrente, os poligenes podem ser piramidados visando à obtenção de cultivares de feijoeiro resistentes a Fop.

## **Referências Bibliográficas**

ABAWI CS, PASTOR-CORRALES MA, 1990. Root rots of bean in Latin American and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies (Eds.). Cali Colombia. CIAT.

ABDULLAEV AA, SALAKHUTDINOV IB, EGAMBERDIEV SSH, KURYAZOV Z, GLUKHOVA LA, ADILOVA AT, RIZAEVA SM, ULLOA M, ABDURAKHMONOV IY. 2015. Analyses of Fusarium wilt race 3 resistance in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetica* 143: 385-392.

ALVES-SANTOS FM, CORDEIRO-LOPEZ L, SAYAGUÉS JM, MARTÍN-DOMINGUES R, GARCIA-BENAVIDES P, CRESPO MC, DÍAS-DOMINGUES JM, ESLAVA AP, 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51: 605-611.

BESERRA JÚNIOR JEA, MALUF WR, FIGUEIRA AR, BARGUIL BM. 2006. Herança da resistência ao Watermelon mosaic virus em melancia (*C. lanatus* L.). *Fitopatologia Brasileira* 31 (3): 302-305.

BJARKO ME, LINE RF. 1988. Heritability and number of genes controlling leaf rust resistance in 4 cultivars of wheat. *Phytopathology* 78 (4): 457-461.

BOYACI HF, UNLU A, ABAK K. 2011. Genetic analysis of resistance to wilt caused by *Fusarium* (*Fusarium oxysporum melongenae*) in eggplant (*Solanum melongena*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 81 (9): 26-29.

BRICK MA, BYRNE PF, SCHWARTZ HF, OGG JB, OTTO K, FALL AL, GILBERT J. 2006. Reaction to three races of fusarium wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. *Crop Science* 46: 1245-1252.

BRICK, MA, OGG JB, SCHWARTZ HF, BYRNE PF, KELLY JD. 2004. Resistance to multiple races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 47: 131-132.

BURUCHARA RA, CAMACHO L. 2000. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. *Journal of Phytopathology* 148: 39-45.

CAIXETA ET, ZAMBOLIM L. 2014. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM L, JESUS JÚNIOR WC, RODRIGUES FA (Eds). *O Essencial da Fitopatologia: Controle de Doenças de Plantas*. Suprema Gráfica e Editora Ltda., Visconde do Rio Branco, MG, 551-576.

CAMPA A, GIRALDEZ R, FERREIRA JJ. 2011. Genetic analysis of the resistance to eight anthracnose races in the common bean differential cultivar Kaboon. *Phytopathology* 101:757-764.

CÂNDIDA DV, COSTA JGC, RAVA CA, CARNEIRO MS. 2009. Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. *Tropical Plant Pathology* 34: 379-384.

CAPUCHO AS, CAIXETA ET, ZAMBOLIM EM, ZAMBOLIM L. 2009. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 276-282.

CASTLE WE. 1921. An improved method of estimating the number of genetic factors concerned in cases of blending inheritance. *Science* 54, 223.

CROSS H, BRICK MA, SCHWARTZ HF, PANELLA LW, BYRNE PF. 2000. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in two common bean races. *Crop Science* 40: 954-958.

CRUZ CD, REGAZZI AJ, CARNEIRO PCS. 2012. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 1, 4ed. Editora UFV, Viçosa, 514 p.

CRUZ CD. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 35: 271-276.

DUNCAN RW, GILBERTSON RL, LEMA M, SINGH SP. 2014. Inheritance of resistance to the widely distributed race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in common bean pinto US14HBR6. *Canadian Journal of Plant Science* 94(5): 923-928.

FALL AL, BYRNE PF, JUNG G, COYNE DP, BRICK MA, SCHWARTZ HF. 2001. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Crop Science* 41: 1494-1498.

FAOSTAT: FAO Statistical Databases 2013. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 27 out. 2015.

- HALILA I, RUBIO J, MILLÁN T, GIL J, KHARRAT M, MARRAKCHI M. 2010. Resistance in chickpea (*Cicer arietinum*) to Fusarium wilt race '0'. *Plant Breeding* 129: 56-566.
- HART JP, GRIFFITHS PD. 2015. Genotyping-by-sequencing enabled mapping and marker development for the By-2 Potyvirus resistance allele in common bean. *The plant genome* 8 (1): 1-14.
- KUKHANG TD, MAWARDI S, ESKES AB. 1993. Studies on the inheritance of the SH3 resistance factor to coffee leaf rust. In: *Colloque Scientifique International sur Le Café, ASIC, Montpellier, França. Resumos...* 776–778.
- LIU BH. 1997. *Statistical Genomics: linkage mapping and QTL analysis*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 610 p.
- LV H, FANG Z, YANG L, ZHANG Y, WANG Q, LIU Y, ZHUANG M, YANG Y, et al. 2014. Mapping and analysis of a novel candidate Fusarium wilt resistance gene FOC1 in *Brassica Oleracea*. *BMC Genomics* 15 (1094): 1-10.
- MATHER K, JINKS JL. 1977. *Introduction to biometrical genetics*. Ithaca NY. Cornell Univ. Press.
- MATSUMOTO Y, MIYAGI M. 2012. Chromosomal location and mode of inheritance of a gene conferring resistance to Fusarium wilt in *Cucumis anguria* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 87(6): 539-544.
- MELO LC, PELOSO MJD, PEREIRA HS, FARIA LC, COSTA JGC, DÍAZ JLC, RAVA CA, WENDLAND A, ABREU AFB. 2010. BRS Estilo - common bean cultivar with carioca grain, upright growth and high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 377-379.

MIKLAS PN, KELLY JD, BEEBE SE, BLAIR MW. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.

MOOD AM, GRAYBILL FA, BOES DC. 1974. Introduction to the theory of statistics. 3. ed Tóquio: McGraw-Hill Kogakusha, 564 p.

MUKANKUSI C, DERERA J, MELIS R, GIBSON PT, BURUCHARA R. 2011. Genetic analysis of resistance to *Fusarium* root rot in common bean. *Euphytica* 182:11-23.

NASCIMENTO SRC, KUROZAWA C, MARINGONI AC. 1995. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 20: 214-217.

OUMOULOU A, ARNEDO-ANDRÉS MS, GONZÁLEZ-TORRES R, ÁLVAREZ JM. 2010. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0 and 2 in melon accession Tortuga. *Euphytica* 176:183–189.

PASTOR-CORRALES MA, ABAWI GS. 1987. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease* 71: 990-993.

PEREIRA AA. 1995. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. 66p.

PEREIRA MJZ, RAMALHO MAP, ABREU AFB. 2011. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. *Ciência e Agrotecnologia* 35 (5): 940-947.

PEREIRA AC. 2013b. Resistência do feijão-comum à murcha-de-fusário. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 99p.

PEREIRA AC, CRUZ MFA, PAULA-JÚNIOR TJ, RODRIGUES FA, CARNEIRO JES, VIEIRA RF, CARNEIRO PCS. 2013a. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology* 38: 323-328.

PEREIRA MJZ, RAMALHO MAP, ABREU AFB. 2009. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Brazilian race 2 in common bean. *Scientia Agricola* 66: 788-792.

RAMALHO MAP, ABREU AFB, SANTOS JB, NUNES JAR. 2012. Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 522p.

RIBEIRO RLD, HAGEDORN DJ. 1979. Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*: 69: 859-861.

SALGADO CS. Abordagem sobre estudo de herança de caracteres pela genética clássica e molecular. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 90p.

SALGADO MO, SCHWARTZ HF, BRICK MA. 1995. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease* 79: 279-281.

SCHMUTZ J. et al., 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46: 707-713.

SHIMIZU M, FUJIMOTO R, YING H, PU Z, EBE Y, KAWANABE T, SAEKI N, TAYLOR J et al. 2014. Identification of candidate genes for fusarium yellows resistance in Chinese cabbage by differential expression analysis. *Plant Molecular Biology* 85: 247-257.

SILVA CA, ABREU AFB, RAMALHO MAP, CARNEIRO JES. 2011. Implicações da origem das linhagens de feijoeiro na magnitude da interação com ambientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 720-728.

SILVA WP. 2003. Estimadores de máxima verossimilhança em misturas de densidade normais: uma aplicação em genética. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 60 p.

SINGH RP, HERRERA-FOESSEL S, HUERTA-ESPINO J, SINGH S, BHAVANI S, LAN C, BASNET BR. 2014. Progress towards genetics and breeding for minor genes based resistance to Ug99 and other rusts in CIMMYT high-yielding spring wheat. *Journal of Integrative Agriculture* 3(2): 255-261.

SSALI RT, KIGGUNDU A, LORENZEN J, KARAMURA E, TUSHEMEREIRWE W, VILJOEN A. 2013. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 in bananas. *Euphytica* 194: 425-430.

TOLEDO-SOUZA ED, SILVEIRA PM, CAFÉ-FILHO AC, LOBO-JÚNIOR M. 2012. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 1031-1037.

ULLOA M, HUTMACHER RB, ROBERTS PA, WRIGHT SD, NICHOLS RL, DAVIS RM. 2013. Inheritance and QTL mapping of Fusarium wilt race 4 resistance in cotton. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 1405-1418.

WOO SL, ZOINA A, DEL SORBO G, LORITO M, NANNI B, SCALA F, NOVIELLO C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* 86: 966-973.

YOUNG RA, KELLY JD. 1996. Characterization of genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Disease* 80: 650–654.

ZAMBOLIM L, JESUS JUNIOR WC, RODRIGUES FA. (eds.). 2014. *O Essencial da Fitopatologia: Controle de Doenças de Plantas*. Suprema Gráfica e Editora. 576 p.

ZAPATA M, BEAVER JS, PORCH TG. 2011. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica* 179:373-382.

**CHAPTER 3 – Infection and colonization of common bean by *Fusarium oxysporum*  
f. sp. phaseoli race 2 expressing GFP**

## **Abstract**

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) is one of the most serious diseases of common bean and occurs in many fields around the world. However, the disease development process is poorly understood. In order to study the colonization of common bean by this fungus, we transformed Fop Brazilian race 2 for *egfp* gene expression, and use these transformants to analyze the colonization process in common bean roots and stems. Based on our results, the combined use of Driselase and Lyzing Enzyme was efficient for Fop mycelium protoplastization. The PEG-CaCl<sub>2</sub> transformation protocol was efficient to obtain stable transformants with colonies expression the *egfp* gene. Regarding the colonization process by Fop transformants, at 6 days post-inoculation (DPI), the fungus grew on the root hair epidermis, and on parenchymatic cells at 11 DPI, in an intercellular way. At 19 DPI, the fungus reached xylem vessels blocking the water and minerals passage for shoots resulting in wilt and plant death in a few days. This study can contribute to the development of more effective control measures against this phytopathogen, by add details about the main stages of development exhibited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) in the colonization process of common bean tissues.

## **Introduction**

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important food crops for human consumption, mainly because they are rich source of protein, complex carbohydrates, and micronutrients (Nemli et al., 2015). In Brazil, common bean represents a principal source of daily protein for consumption (Toledo et al., 2013). Unfortunately, its production is severely constrained by many pathogens that results to major yield loss (Paula Junior and Wendland, 2012).

Fusarium wilt (or Fusarium yellow) is caused by the soilborne fungus *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *phaseoli* Kendrick and Snyder. It occurs in the USA, South America, Europe, Africa, and Asia (Kendrick and Snyder, 1942; Armstrong and Armstrong, 1963; Abawi and Pastor-Corrales, 1990; Alves-Santos et al., 2002; Saremi et al., 2011). In Brazil, it is the most important bean soil pathogen and occurs in many fields of the crop (Toledo-Souza et al., 2012). The disease results in severe losses that have been gradually increasing in Brazil, mainly under central pivot irrigation, due to intensive production practices, as planting bean succession in the same area (Ramalho et al., 2012; Paula Junior et al., 2015).

*Fusarium oxysporum* infects the root system, wherein it progress through the epidermis, cortex and endodermal tissues and penetrates the xylem vessels through the pits. From this stage on, the fungus uses the xylem for upward movement and establishment throughout the plant (Bishop and Cooper, 1983). The mainly symptoms include foliar chlorosis, premature senescence of lower leaves, red-brown discolouration of vascular tissue and wilting, which often lead to early maturity, reduction in seed size, yield loss and plant death (Abawi and Pastor-Corrales, 1990; Brick et al., 2006; Ronquillo-Lopez et al., 2010). In this situation, the most effective measure adopted by farmers to control economic losses from the pathogen is the use of resistant cultivars

(Abawi, 1989; Abawi and Pastor- Corrales, 1990; Cross et al., 2000; Brick et al., 2006; Paula Junior et al., 2015).

Niño-Sánchez et al. (2015) at Spain using specific country isolates and cultivars studied colonization of bean roots by Fop and the mechanisms related to colonization dynamics. Studies from this nature can provide relevant information to comprehend pathogen development, spatial and/or temporal, in roots of susceptible cultivars. Besides, the complete understanding of the colonization dynamics will allow the development of new and more effective control measures, including new resistant cultivars (Zvirin et al., 2010; Li et al, 2011).

The *gfp* gene that express the **Green Fluorescent Protein (GFP)** was amplified from the genome of the jellyfish *Aequorea victoria* (Chalfie and Kain, 1998) and it has been widely used as a molecular marker to follow, and soon to study the colonization process of many pathogens in plant tissues (Lorang et al., 2001; Oren et al., 2003; Venard et al., 2007; Paparu et al., 2009; Morocko-Bicevska et al., 2011; Liu et al., 2012). GFP-transformants of different *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* were successfully used to follow the colonization process in their hosts, such as bananas (Li et al., 2011), carnation (Sarrocchio et al., 2007), tomato (Lagopodi et al., 2002), gladioli (Lakshman et al., 2012), and melon (Zvirin et al., 2010). In common beans, Niño-Sánchez et al. (2015) transformed two isolates of Fop to follow the dynamics of the colonization in roots and hypocotyl tissues. However, until the moment, any study was conducted with Brazilian isolates of Fop.

Thus, in the present study, we aim the use of GFP-transformed isolates to study infection of common bean with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* race 2.

## Material and Methods

### Fungal strain

*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) isolate Fop 46, denominated Brazilian race 2 wild type (WT) (Ribeiro and Hagedorn, 1979) was kindly provided by Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão (Embrapa Arroz e Feijão). The isolate grown at 25°C with a photoperiod of 12 h under white light on Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia Labs, Mumbai, India). Mycelial discs, 8 mm in diameter, were removed from the cultures and stored in sterile distilled water at 4°C, for posterior use (Castellani, 1939).

### Plasmid vector

In this study, we used the pSM1 plasmid vector (Pöggeler et al., 2003). The construction contains the *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase (*hph*) gene and the *Aequorea victoria* enhanced green fluorescent protein (*egfp* gene). The *egfp* gene codified the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and the hygromycin B phosphotransferase gene codified the resistant to Hygromycin B antibiotic, a common dominant selectable marker for fungi transformation. The *egfp* gene utilizes the strong promoter glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene and *trpC* gene terminator (involving in tryptophan synthesis), both of *Aspergillus nidulans*.

The pSM1 plasmid was propagated according to Sambrook et al. (1987), by employing the *E. coli* competent strain DH5 $\alpha$ , and purified using the PhoenIX™ Maxiprep Kit purification (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, United States) according to fabricant's instructions.

### Minimum inhibitory concentration (MIC)

To evaluate the minimal concentration of hygromycin B (Hygromycin B from *Streptomyces hygroscopicus* - Sigma-Aldrich, Product number: H7772-1G) that inhibited the growth of Fop race 2 WT, the fungal culture was grown on PDA medium supplemented with different concentrations of hygromycin B ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): 25, 50, 100, 150, 200, and one negative control without antibiotic. For each concentration we performed three replications and incubated the plates at 25 °C for 10 days.

### Isolation of fungal protoplasts

Fop race 2 mycelium was collected from PDA plates, inoculated in PDB (Potato Dextrose Broth) and incubated at 25°C for 40 h in continuous shaking at 120 rpm. After the incubation period, the mycelium was collected on a filter paper and washed three times with a saline solution (0.9% NaCl w/v). We weighed 480 mg of mycelium and transferred it to 250 mL Erlenmeyer in which protoplasts would be isolated according to Pecchia and Anné (1989) with some modifications. Enzyme solution was prepared with Driselase at 10 mg mL<sup>-1</sup> (Driselase from *Basidiomycetes* sp. - Sigma-Aldrich, Product number: D9515-1G) dissolved in 10 mL of 0.7 M NaCl (pH 6.0) and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane to retain carbohydrates (mainly, starch). Lysing Enzyme at 10 mg mL<sup>-1</sup> (Lysing Enzyme from *Trichoderma harzianum* - Sigma-Aldrich, Product number: L1412-25G) was summed to initial enzyme solution and the solution with both enzymes was added to the Erlenmeyer contained the mycelium. The suspension was incubated with gentle shaking (70 rpm) at 28°C and protoplast release was monitored once every hour for 3 hours by microscopic observation of 10  $\mu\text{L}$  in hemocytometer. After 3 hours, the solution was then passed through four layers of cheesecloth to retain the mycelial cells and centrifuged at 1000 rpm for 10 min at 5°C, where protoplasts were remained in the supernatant fluid and the remaining mycelium pelleted. The pellet was washed in 0.7 M

NaCl (pH 6.0) and centrifuged again (1000 rpm, 10 min, 5°C) to collect the remaining protoplasts. Protoplast suspension was centrifuged (2500 rpm, 20 min, 5°C) and resuspended in 0.7 M NaCl (pH 6.0) to a final concentration of  $10^6$  protoplasts mL<sup>-1</sup>. The solution was added to microtubes (1.5 mL) that was placed on ice for posterior use.

### Fungal Transformation

The genetic transformation of Fop race 2 WT was performed according Sarrocco et al. (2007) with some modifications. The plasmid pSM1 (5µg) was mixed to 200 µL of protoplast solution and 50 µL of PEG Solution (25 % polyethylene glycol 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M Sorbitol, 50 mM - pH 7.5 - Tris-HCl), and incubated on ice for 20 min. 500 µL of PEG Solution were then added and the suspensions were incubated at room temperature for 5 minutes. Aliquots of 250 µL were poured onto Petri dishes containing 20 mL of regenerating medium (PDA supplemented with 1 M Sorbitol). Plates were incubated at 25°C and overlaid after 16 h with 5 mL of selective molten semisolid PDA medium [0.8% (w/v) agar, 45°C] supplemented with hygromycin B at MIC.

### Protoplasts regeneration and mitotic stability

Regenerating protoplasts were observed at regular intervals, from 72 h after antibiotic addition. Hygromycin-resistant protoplast derived cell colonies were tested for egfp expression by examination under the fluorescence microscope. The microscope used was Olympus (Model IX 50) with a digital camera Q Color3 (Olympus PM-C35DX) coupled to the program Q Capture Pro 6. Putative transformants that grew through the selective agar layer were transferred to fresh selective agar plates supplemented with hygromycin B at MIC. These transformants were also submitted to six successive subcultures on selective and non-selective PDA medium for confirming the mitotic stability. Before each subculture, fluorescence from the mycelium was checked by

microscopic observation. Fungal colonies that maintained their growth and the fluorescence were considered as stable transformants strains. Single-spores colonies were obtained from fluorescent mycelium. Mycelial discs from fungal colonies transformants were stored similarly to fungal wild type.

#### DNA extraction and PCR reaction

Fop race 2 WT strain and putative transformants grown over cellophane at non-selective and selective PDA medium, respectively. After seven days, the mycelium was collected for DNA extraction according to Specht et al. (1982). PCR reaction was performed for detection of the phosphotransferase gene (*hph*) in transformants. The thermocycler Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany) was programmed to perform the initial denaturation at 95° C for 2 min followed by 39 cycles at 95° C for 1 min, 60° C for 1 min and 72° C for 1 min, and a final elongation at 72° C for 7 min. Amplification was performed for a 25 µL final volume containing 5.0 µL of Go Taq® Flexi Colorless Buffer [5X] (Promega, Madison, USA); 2.5 µL of MgCl<sub>2</sub> [25 mM] (Promega, Madison, USA); 1.0 µL of dNTPs [2.5 mM of each dNTP]; 1.0 µL of the primer *hph1* (5' CAGCGAGAGCCTGACCTATTGC 3') [5 µM]; 1.0 µL of the primer *hph2* (5' GCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC 3') [5 µM]; 0.25 µL of the Go Taq® DNA Polymerase [5 U/µL] (Promega, Madison, USA), 1.0 µL of genomic DNA [150 ng µL<sup>-1</sup>] and 13.25 µL of autoclaved ultrapure water. After amplification, the PCR products of the *hph* gene of ~690 bp were separated by electrophoresis in a 1.2 % agarose gel (w/v) stained with ethidium bromide (0.2 µg mL<sup>-1</sup>).  $\phi$ X174/HaeIII (Promega, Madison USA) was used as a molecular size marker.

#### Southern Blotting

Integration of the *egfp* gene was checked by Southern Blotting analysis. For this, the genomic DNA of Fop race 2 WT isolate and putative transformants were digested

with the restriction enzyme HindIII (Promega, Madison, USA), which cut once within the pSM1 outside the hph gene. The digestion reaction was performed for a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with: 8  $\mu\text{L}$  DNA ( $1\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ), 4  $\mu\text{L}$  of HindIII ( $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  Buffer E (10X) (Promega, Madison, USA), 1  $\mu\text{L}$  of BSA (Bovin Serum Albumin Acetylated) (Promega, Madison, USA) and 27  $\mu\text{L}$  of ultrapure water to complete the volume. The plasmid was used as a positive control. The reactions were putted on water bath at 37°C overnight. After the cleavage, the digestion reactions were stopped by putting it on water bath for 20 min at 80°C. The DNA digests were electrophoresed on a 0.8% agarose gel in TAE 1X for 12 hours at 40 V.

Before blotting, the gel was treated with denaturation solution (1.0 M NaCl and 0.4 M NaOH for 1 hour) and neutralization solution (1.0 M NaCl and 0.5 M Tris-HCl pH 7.2 for 1 hour). The DNA was then transferred by capillary from the gel to a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon membrane (Amersham Hybond™-N<sup>+</sup>, GE Healthcare®). Pre-hybridization, hybridization, and post-hybridization washes were carried out according to Sambrook and Russell (2001). The probe was labelled using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche®, Germany) and the hybridizing bands were detected using the DIG DNA Labeling and Detection Starter Kit version 19 (Roche®, Germany) according to fabricant's instructions. DIG-labeled hybrids are detected with an anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate and the substrates NBT (nitroblue tetrazolium salt) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt), which give a light blue precipitate. Hybridization was carried out with the probe of PCR product of the hph gene present in the plasmid pSM1 that had ~690 bp. For each egfp transformant, the number of integrated copies of the plasmid pSM1 was observed.

## Plant inoculation

Two susceptible and one resistant common bean genotypes were inoculated with two transformants. The genotypes were: BRS Estilo e CNFC 11965 (susceptible) and Pérola (resistant). The spore suspension and inoculation of common bean plants were prepared according to Pastor-Corrales and Abawi (1987). Spore suspension was performed by add 10 mL of distilled water to each PDA medium plate containing the fungus. Then, the fungal culture was scraped with a spatula to remove the mycelium containing spores. The mycelium and spores were passed through four layers of cheesecloth and the final spore suspension was diluted to  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ .

The experiment was carried out in a greenhouse at Experimental Area Diogo Alves de Melo, localized at Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil ( $20^{\circ}45'S$  e  $42^{\circ}51'W$ ). Seeds of each genotype were planted in trays containing substrate (Topstrato HT<sup>®</sup>, Mogi Mirim-SP, Brazil) for the inoculation. 10 days after the sowing, the plants were taken from the trays and their roots were washed in tap water. Approximately one-third of the root tips were cut, and the remaining roots were immersed for 5 min in the spore suspension of Fop race 2-egfp transformants. Inoculated seedlings were then transplanted into plastic pots (one seedlings per pot) filled with the same substrate. For each genotype were obtained 16 replications. Each pot was one repetition. The control plants consisted in four seedlings inoculated in the same way, but the roots were immersed in distilled water. Plants were grown at variable temperature ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ), irrigated every day or when necessary. All the pots were fertilized with urea as nitrogen source, 10 days post-inoculation (DPI). As soon as the symptoms appeared the plants were collected.

## Histopathological observation

Fluorescence Microscopy – Root hairs sampled from common bean were analyzed by a fluorescence microscopy. Each one of the root hairs examined was placed on a

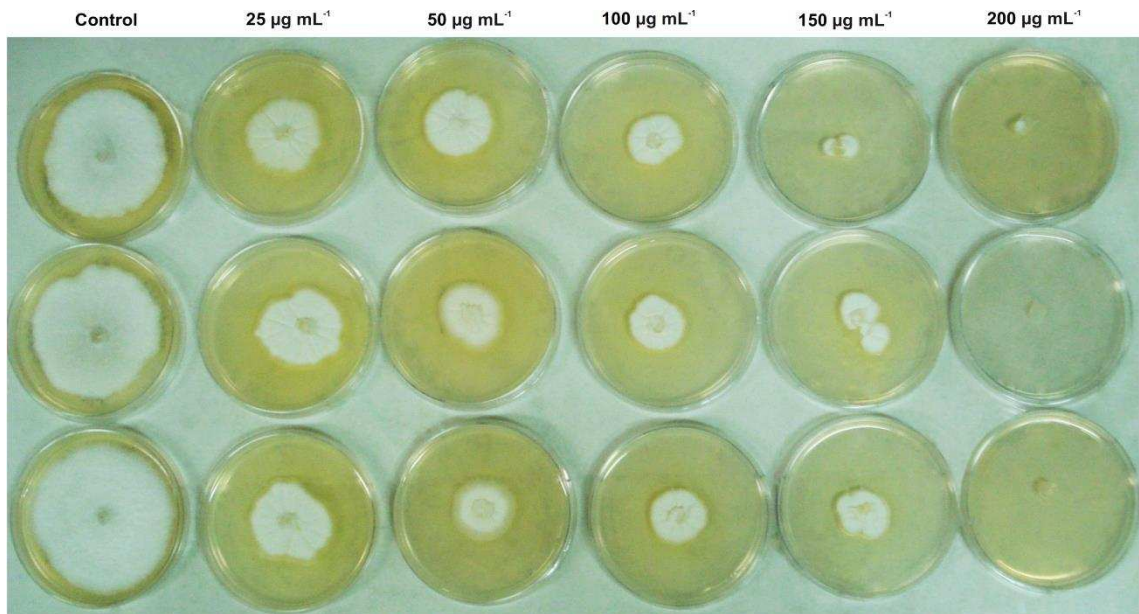
microscope slide with water and covered with a glass coverslip. The U-MWU2 filter was used for EGFP detection.

Confocal Laser Scanning Microscopy - Common bean stem and root sections were cut on a manual microtome (model LPC, Rolemberg and Bhering) and placed on a microscope slide with water and covered with a glass coverslip. The samples were visualized using a Zeiss Laser Scanning Microscopy (LSM) 510 Meta. Specific excitation and emission of the protein EGFP were effected by excitation at 488 nm (first dichroic optical filter HFT 488/543) with Argon laser (transmission 20%), collection of emitted light with a KP 545 nm filter, Plate for the second dichroic and None for the third channel. Images were acquired and emerged by the Zeiss LSM Image Browser and processed using Adobe Photoshop (version 6.0).

## **Results**

### Minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC assay had revealed that the growth of Fop race 2 WT was partially inhibited at  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  and completely inhibited at  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  of hygromycin B (Figure 1). Thus, the selection of transformants was performed with  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  hygromycin B.



**Figure 1** Assay of resistance of Fop race 2 to increasing concentration of hygromycin B antibiotic to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC).

#### Isolation and regeneration of protoplasts

Protoplast isolation of Fop race 2 was efficient with the combined use of enzymes Driselase and Lysing Enzyme resulting in the biggest number of protoplasts with 3 hours of digestion. Increasing this digestion time sharply decreased the number of protoplasts. About 90% of the mycelium formed a spherical state under observation at optical microscopy using a high-dry objective with a magnification power of 40X.  $10^6$  protoplasts  $\text{mL}^{-1}$  dilutions were obtained from 480 mg of mycelium in each replication. Regeneration capacity of fungal protoplasts showed good performance with 1M of Sorbitol, an osmotic stabilizer. The regenerated protoplasts showed intense mycelium growth, identical to those of the Fop race 2 WT.

#### The transformants and Southern Blotting analysis

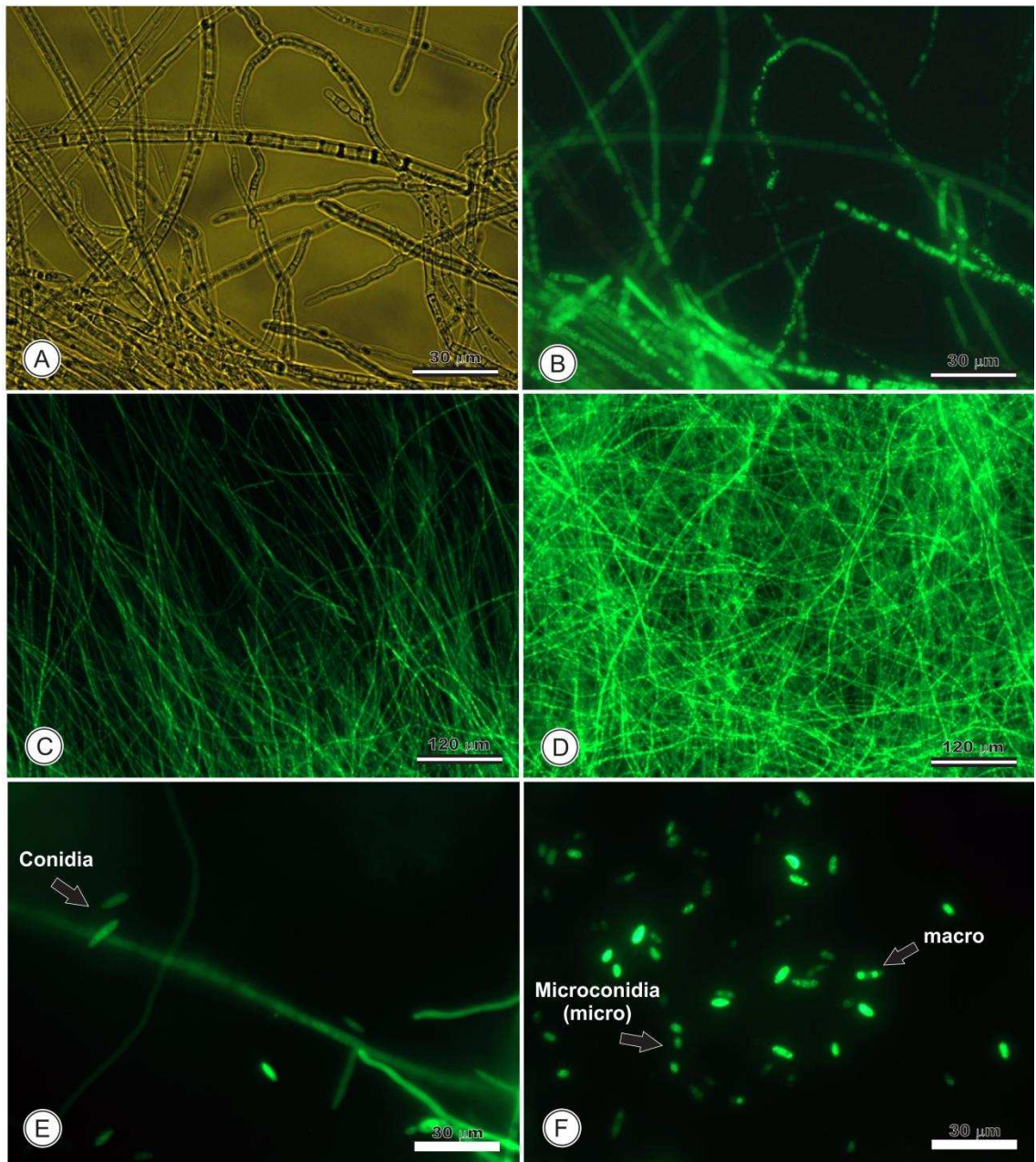
The transformants colonies of Fop race 2 became visible four days after transformation, when they produced abundant mycelium. From a total of 200 hygromycin-resistant colonies that growth in the selective medium (PDA +  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

hygromycin B), 60 colonies were able to express the EGFP. EGFP protein was easily detectable in the cytoplasm from mycelial cells, and in the spores of the fungus Fop race 2 (Figure 2 A - F).

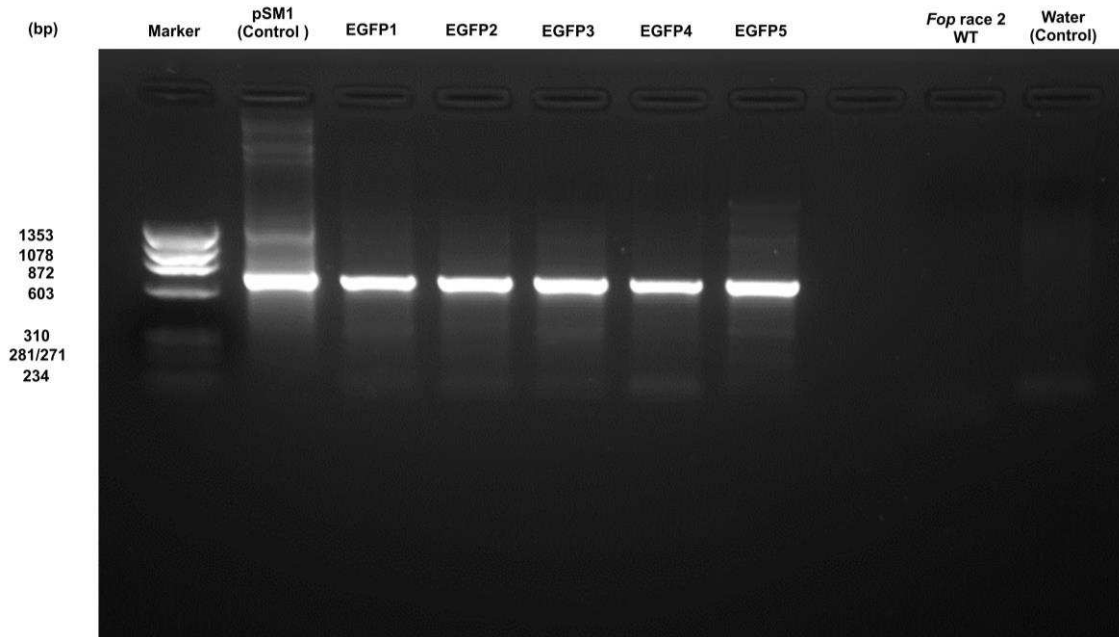
Stability of egfp-Fop race 2 transformants was tested by six consecutive transferences of a 9 mm diameter plug (ten days old) of each putative transformant to selective medium alternated with common medium. After this procedure, from a total of 60 colonies we selected five hygromycin resistance colonies (EGFP1, EGFP2, EGFP3, EGFP4 and EGFP5), for posterior use. These colonies had growth, asexual structures and morphology similar to Fop race 2 WT. Furthermore, they also showed a uniform and strong fluorescence EGFP.

The integration of the hygromycin B phosphotransferase gene (hph) into genome of the transformants EGFP1, EGFP2, EGFP3, EGFP4, and EGFP5, was supported by PCR analysis. The primers hph1 and hph2 amplified 690 bp fragments that corresponded to the hygromycin B-resistant gene (hph gene). The five stable transformants expressing EGFP were confirmed by the PCR reaction (Figure 3).

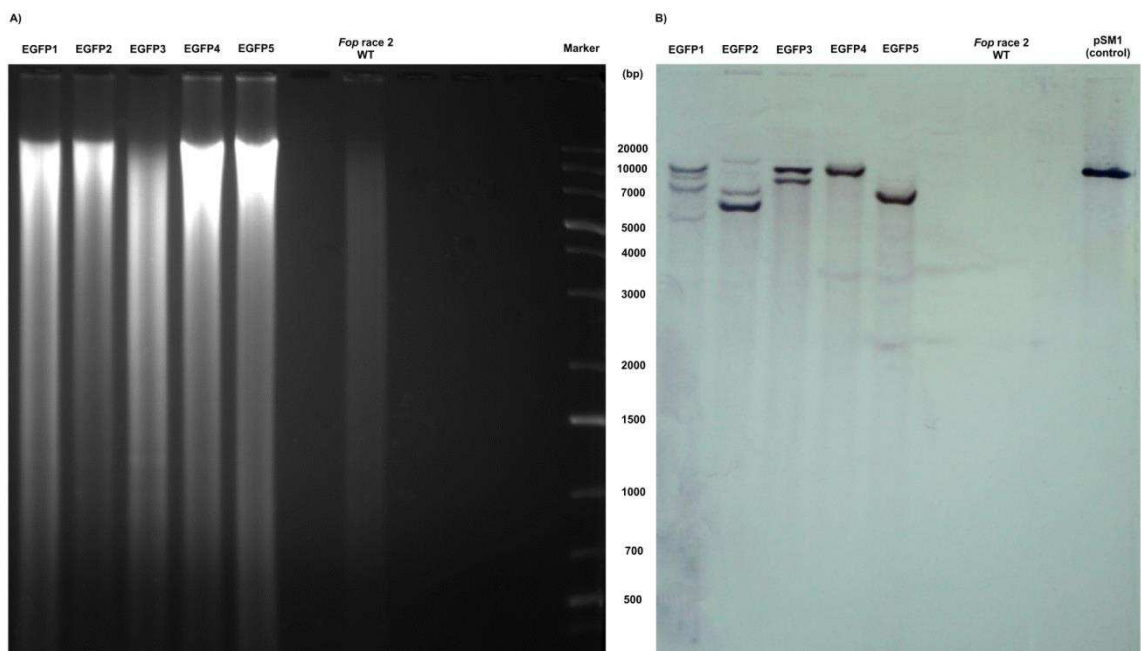
Southern blotting hybridization showed that in all cases the plasmid integrated into genomic DNA in one (EGFP4 and EGFP5) or more positions (EGFP1, EGFP2 and EGFP3) (Figure 4). Thus, single or multiple integrations of plasmid were detected in the five transformants, and the hybridization pattern confirmed that all the integrations occurred randomly in the genome of the fungus.



**Figure 2** Microscope images of the transformant mycelium of Fop observed under white light (A) and UV fluorescent light using the filter U-MWU2 (B). Fluorescence microscopy of Fop mycelium showing bright green fluorescence characteristic of EGFP expression. The EGFP expression is distributed throughout the mycelial cytoplasm (C and D) and even in the spores: macro and microconidia (E and F).



**Figure 3** PCR confirmation of the presence of the *hph* gene in hygromycin-resistant Fop race 2 transformants. The PCR analysis was carried out using genomic DNA and the *hph1* and *hph2* primers, which amplified a 690 bp fragment. Lane 1: DNA molecular size marker  $\phi$ X174/HaeIII; positive control with the pSM1 plasmid vector (lane 2); selected hygromycin-resistant Fop race 2 transformants.



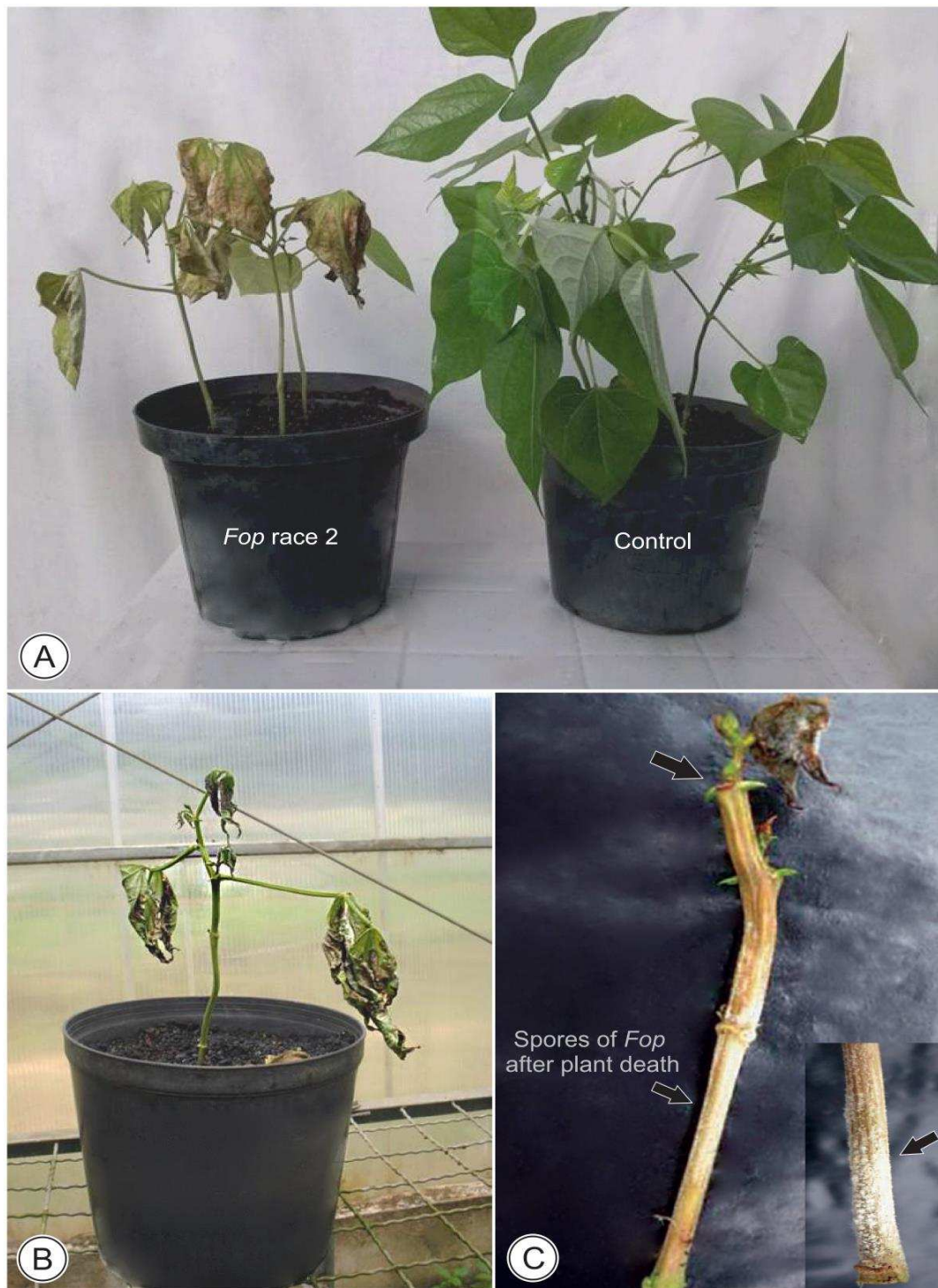
**Figure 4** (A) Genomic DNA digested with HindIII. DNA from putative transformants EGFP1, EGFP2, EGFP3, EGFP4, and EGFP5; Fop race 2 WT DNA and Marker: DNA molecular size marker; O'GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fermentas, United States). (B) Southern blotting analysis. The profile of integrations and the corresponding sizes of the hybridized DNA fragments are shown as bands. DNA from transformants EGFP1, EGFP2, EGFP3, EGFP4, and EGFP5; Fop race 2 WT DNA and pSM1 plasmid DNA (control).

## Pathogenicity

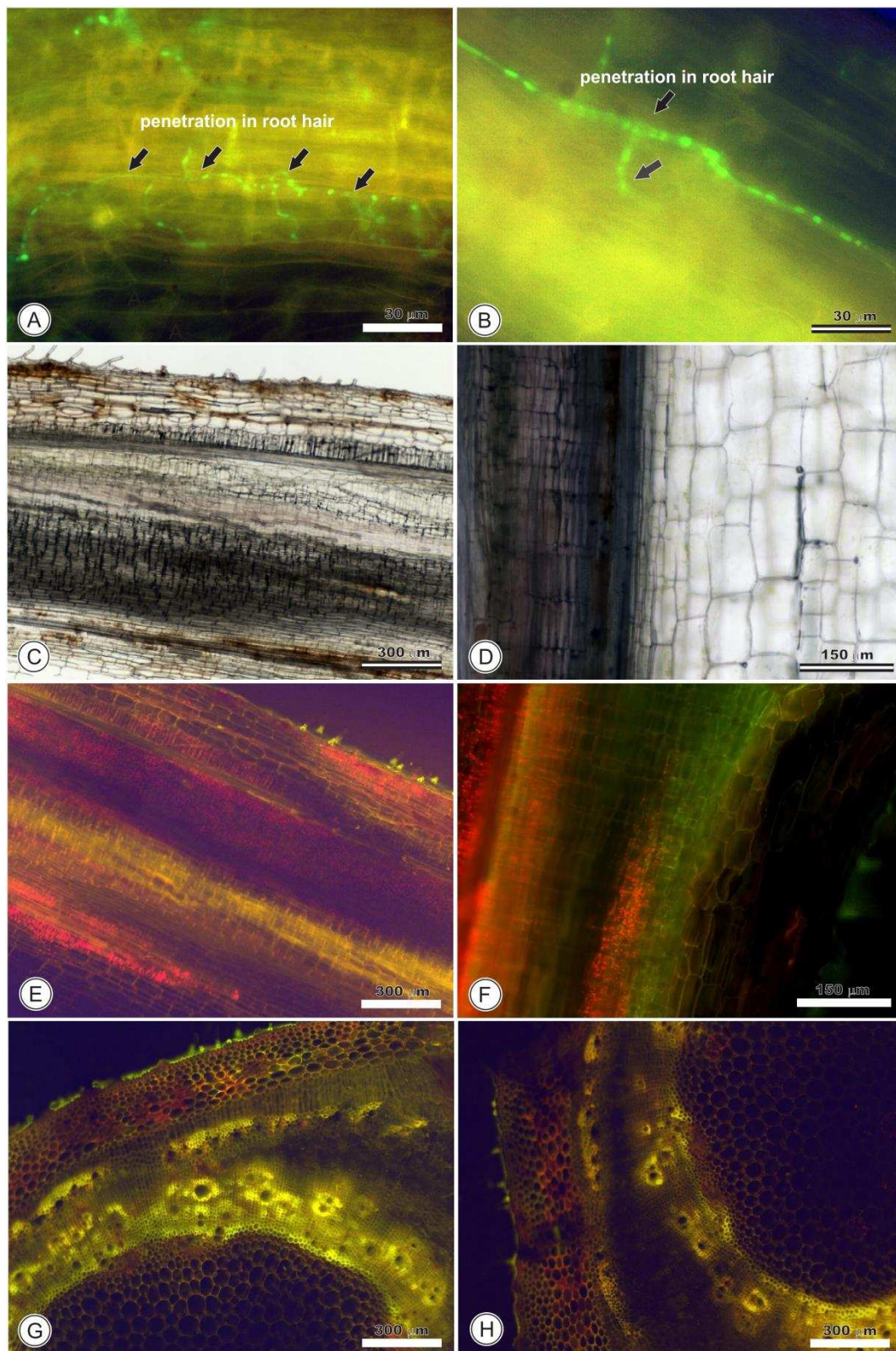
It was not observed any morphological, structural difference or on growth characteristics between the transformants and the race 2 WT; all of them cultivated on PDA. The transformants EGFP4 and EGFP5 that have only one copy of the plasmid in their genome were selected for inoculation in common bean genotypes. When inoculated on common bean susceptible genotypes BRS Estilo and CNFC 11965, the transformants EGFP4 and EGFP5 were able to cause Fusarium wilt symptoms, similar to that caused by the wild type. At 25 DPI the transformants caused wilting, leaf fall and browning, followed by plant death (Figure 5A-B) with the stem covered with pinkish masses of Fop conidia (arrow in Figure 5C). The colonization of EGFP4 and EGFP5 transformants was not visualized on plants of the resistant cultivar Pérola. On this genotype, the plants did not show any symptoms.

## egfp-Fop race 2 colonization in common bean tissues

The colonization by EGFP4 and EGFP5 in roots and stems from common bean was analyzed on different DPI using the fluorescence and confocal microscope. By using the fluorescence microscope, we could visualized that the transformants colonized roots systems from both susceptible genotypes in a similar way: first colonizing root surface and subsequently penetration into the root hair epidermal cells. After penetration, at 6 DPI, egfp-Fop started the colonization with the hyphae growth throughout the intercellular spaces of epidermal cells of roots hair (Figures 6A and B). The infection progressed to the main root, stem, and vascular cylinder. By fluorescence microscope observations, we could observe the presence of common bean autofluorescence comparative to white light (Figure 6C - H). For this reason, from now on, we started using the confocal microscope.



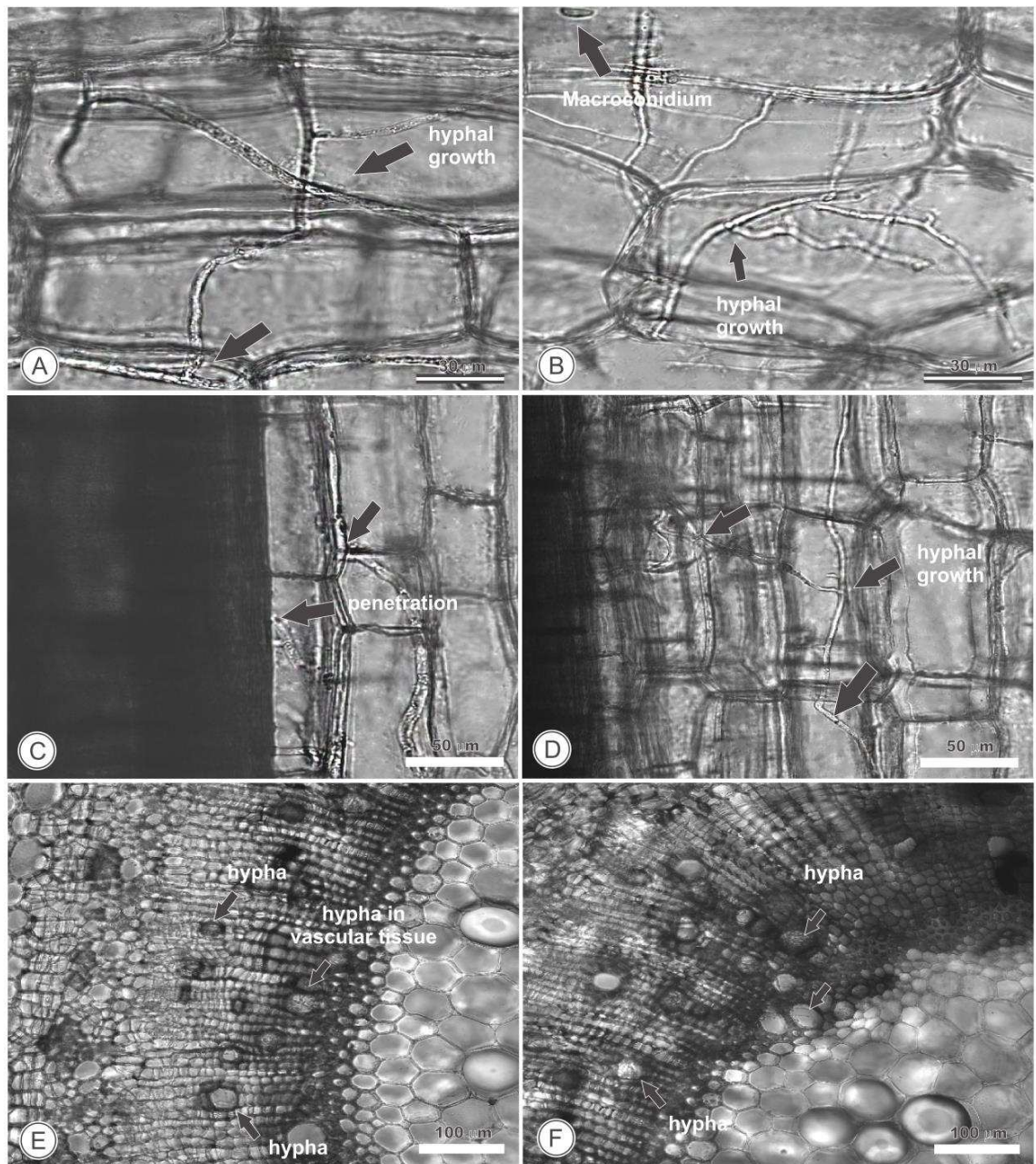
**Figure 5** (A) Plants of susceptible cultivar BRS Estilo inoculated with *Fop* race 2 transformants (EGFP4 or EGFP5) (left pot) and plants control (right pot) at 20 days post-inoculation. (B) Wilt shoot and necrosis of leaves of susceptible line CNFC 11965 at 25 days post-inoculation. (C) Plant death with falling leaves, apex necrosis and sporulation of the pathogen in susceptible cultivar BRS Estilo at 25 days post-inoculation.



**Figure 6** Fluorescence microscope images of penetration and colonization of Fop race 2 EGFP4 into root hair of susceptible cultivar of common bean (A and B). Fluorescence images of longitudinal sections of common bean stems under white light (C and D) and UV Fluorescent light (E and F) where evidences common bean tissues autofluorescence. Transverse sections with intense autofluorescence (G and H).

Observing the susceptible genotypes tissues by using the confocal microscope, the progress of root colonization to stem was observed from two to five DPI, based on tissues sections from different plants at different times from the same genotype. The colonization of vascular cylinder was observed only at 19 DPI. At 21 DPI, the colonization of parenchyma cells expanded into the vascular cylinder (Figure 7A-F). At 25 DPI the plant apex showed severe necrosis and then the plant death. In common bean tissues of the resistant cultivar Pérola, no fungal growth was observed in any DPI.

The detection of EGFP expression by the fungus occurred up to 11 DPI, totaling 26 days without hygromycin B selection pressure, dated from spores' germination to the 11<sup>o</sup> day post-inoculation. The expression of green fluorescent protein in root hairs occurred up to 11 DPI. Sequentially, in the stem parenchyma cells were not possible to observe EGFP expression (Figure 7A - F). Nevertheless, after stem re-isolation on selective medium, few colonies grew slowly and weakly produced the EGFP protein. Besides that, the fluorescence of these colonies was not anything like that strains after the mitotic stability and before the common bean inoculation. On the other hand, we can confirm the presence of EGFP4 and EGFP5 in host tissues due to plant wilting and presence of mycelial cells and conidia during plant colonization process (Figure 7A - F).



**Figure 7** Confocal images of the longitudinal sections of common bean stems. Common bean stem parenchyma cells with colonization of Fop race 2 EGF4 transformant (**A** and **B**). Colonization of parenchymatic cell with mycelial growth in direction to vascular tissue (**C** and **D**). Hypha growth in vascular tissue (xylem vessels) of transverse sections of common bean stems (**E** and **F**).

## Discussion

Vascular wilts are widespread and destructive manifesting symptoms of wilting that progress to falling leaves, vascular browning, and necrosis followed by plant death. The fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* occurs in almost all producing areas of

common bean worldwide affecting the grain yield and farmers economic stability. Studies that aimed elucidate the infection process and the dynamics of colonization of common bean by Fop provide relevant information to understand the pathosystem. These informations could be applied in Fop control by antagonistic microorganisms and adoption of new mechanisms of resistance to the development of resistant cultivars. Our work reports the isolation and analysis of Fop transformants expressing the EGFP protein and its use to follow common bean colonization process.

## MIC

To select transformants of Fop race 2 the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Hygromycin B, a common dominant selectable marker, was determined. Previously, in other studies with many formae speciales of *Fusarium oxysporum*, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of hygromycin B was sufficient to inhibit wild type colony growth (Nonomura et al., 2001; Zvirin et al., 2010; Lakshman et al., 2012). In contrast, in our study Fop race 2 was completely inhibited on concentration at 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of hygromycin B (Sigma-Aldrich) in PDA medium.

## Isolation and regeneration of protoplasts

A number of  $10^7$  protoplasts  $\text{mL}^{-1}$  of Fop race 2 WT were obtained in 3 hours of enzyme digestion. However, when we increased this time, the number of protoplasts declined. The bursting of protoplasts might be caused by injury to membranes by protease present in Lysing Enzyme. Some authors have reported that proteolytic activity present in some enzymes can affect protoplastization efficiency and protoplasts integrity (Liu and Zhu, 2000; Patil et al., 2015). The osmotic stabilizer used in the protoplastization (NaCl 0.7 M pH 6) could keep favorable conditions for the enzymatic digestion and maintained protoplasts integrity until new cell wall could regenerate (Singhvi et al., 2013; Zhao et

al., 2014). Sorbitol benefited protoplast regeneration in solid medium proved by abundant mycelial growth in two days. Sorbitol has been successfully used in fungi protoplasts regeneration (Sarrocco et al., 2007; Morocko-Bicevska and Fatehi, 2011; Feng et al., 2012). The protoplasts obtained were used in fungal transformation procedure.

#### Transformation and Southern Blotting

*Fusarium oxysporum* have been transformed by various authors to study host-pathogen interaction and their host colonization process (Lagopodi et al., 2002; Visser et al., 2004; Sarrocco et al., 2007; Paparu et al., 2009; Zvirin et al., 2010; Li et al., 2011; Lakshman et al., 2012).

The EGFP detection were easily visualized by fluorescent microscopy where was possible to notice fungal structures expressing the fluorescent protein. The *egfp* gene encodes a protein that is produced in the cell cytoplasm, providing it's visualization in the structures of the fungus, as mycelium, spores (macro or micro conidia), and cell wall. Microconidia with strong fluorescence proved that the fluorescence persisted along the fungi reproduction.

After the transformation, *egfp*-Fop race 2 transformants were tested for genetic stability of integrated plasmid. The transformants continued to express *egfp* gene, even after six transfers for new PDA medium with and without hygromycin B. This result indicated that these are stable transformants. Besides, these transformants had growth characteristics, asexual structures and morphology similar to Fop race 2 WT, and could be used at common bean inoculations.

Southern blotting hybridization from transformants EGFP1 to EGFP5 showed single plasmid integration in the transformants EGFP4 and EGFP5; and the others three transformants showed two or three copies of the plasmid were inserted. In general, many copy of the plasmid should be integrated in the fungus mediated by PEG/CaCl<sub>2</sub>

transformation system using heterologous genes, but we could see in this study that single integration can also be obtained. Some studies that transformed *Fusarium oxysporum* by PEG/CaCl<sub>2</sub> obtained single integration of egfp gene and stable transformants (Pietro and Roncero, 1998, Nonomura et al., 2001, Visser et al., 2004, Sarrocco et al., 2007).

#### Common bean autofluorescence

On the fluorescence microscope images, when we follow the fungus infection and colonization process, we could observe the presence of common bean autofluorescence. The intense bright red and green colors of the main root and sections of stem tissues characterized this phenomenon. There is no information about common bean anatomy and autofluorescence in the literature. At fluorescence microscope, it was not possible eliminate the common bean autofluorescence. However, at confocal microscope, the adoption of filters that restrict the wavelength of excitation and emission to nearly EGFP values (488 nm and 525 nm, respectively) eliminated that autofluorescence.

#### Fluorescence of egfp-Fop transformants

In this study, the Fop race 2 transformants isolates led the common bean to death at 25 days. However, when considering the use of the disease severity scale of Pastor-Corrales and Abawi (1987), the authors related that Fop takes 21 days to kill susceptible genotypes. So, we found that Fop race 2 and its respectively transformants required more time to kill the plant.

Using confocal microscopy images we observed that Fop race 2 transformants had a narrow intercellular colonization in the parenchyma cells and it was slow to reach the xylem vessels. Besides, the fluorescent fungal structures were hampered and we suggest that a long time exposition of EGFP to laser excitation altered the fluorescent protein (Lippincott-Schwartz et al., 2003). This phenomenon called as photobleaching has been

previously reported (White and Stelzer, 1999; Heikal et al., 2001; Bogdanov et al, 2012). The photobleaching is a possible reason for the absence of EGFP protein visualization of the fungal structures in common bean tissues after 11 DPI. In studies with fluorescence microscopy, the brightness and the photostability are desirable characteristics of fluorescent proteins for successful applications (Bogdanov et al, 2012). Furthermore, the weak intercellular colonization of Fop race 2 transformants in the parenchyma cells of the root, crown and in the xylem vessels, could influence the EGFP observation.

Niño-Sánchez et al. (2015) using two Fop isolates that differed in aggressiveness and were transformed to express the GFP protein, conducted assays to evaluate the patterns and dynamics of the fungal colonization of common bean in hydroponic system. The weakly aggressive isolate showed a stronger growth in the intercellular spaces of the parenchyma cells of the root and then the hypocotyl, but it was less efficient colonizer of the xylem vessels. On the other hand, the highly aggressive isolate presented a quickly initial colonization stage of parenchymal cells and after restricted its growth to the xylem vessels. At 21 DPI, plants inoculated with the highly aggressive strain were almost dead and showed complete necrosis of the crown region and extensive necrosis of the xylem vessels of the hypocotyl. For the weakly isolate, at the same time, the plants had some chlorosis, necrotic crown and some symptoms of necrosis in the xylem system of the hypocotyl. Observing that the weakly isolate patterns of colonization was predominant parenchymal, we can compare this colonization dynamics with our isolate Fop race 2, that was mainly by the parenchyma cells.

Once the hyphae and others structures of the fungus were observed using confocal in the bean tissues, the absence of fluorescence in Fop race 2-egfp transformants did not prevent fungus visualization and to follow the colonization process.

## egfp-Fop race 2 colonization of common bean tissues

The infectious process of EGFP4 and EGFP5 transformants consisted of spore germination and penetration through injuries made in bean roots. The hyphae growth in epidermal root hairs was observed at 6 DPI. Oren et al. (2003) and Lagopodi et al. (2002) also observed that the first contact between *Fusarium oxysporum* and their hosts begins predominantly by root hairs. From the 6<sup>th</sup> to the 11<sup>th</sup> DPI, the colonization expanded from root parenchyma cells to the xylem vessels, where the pathogen remained in growth and sporulation. Many factors can facilitate Fop infection on field conditions. Some of them are natural injuries, nematodes, soil pests and pathogens, compacted and soaked soil. These factors can benefit pathogen development and disease incidence in common bean fields.

At this stage of disease development the plant shoot were completed wilting resulting of the colonization process. This wilt became severe with the disease progress which is speed up by the upward mycelial growth in conducting vessels, and the flow of crude sap that carries conidia distributing them throughout the plant (Abawi, 1989; Pereira et al, 2013). Obstruction of conducting vessels contributed to plant death, which came forth from 24 DPI. It was possible to observe the spores on the surface of the dead plant that, under field conditions, can contribute to infect neighboring plants and to spread the disease.

At the beginning of the infection in root hairs, intercellular colonization of root system was observed by the pathogen. Later on, the intercellular mycelial growth was predominant in the colonization of stem parenchyma cells. The preferential growth of hyphae along the intercellular in initial disease resembles other formae speciales of *Fusarium oxysporum* as described by Lagopodi et al. (2002) and Li et al. (2011). On the other hand, the intracellular growth in late stages of the disease had also been reported by other authors in *Fusarium oxysporum* (Lagopodi et al, 2002; Olivain et al., 2006).

This study can contribute to the development of more effective control measures against this phytopathogen, by add informations about the main development stages exhibited by Fop in common bean cultivars. One example of the contribution of these informations is providing the main development stage of the pathogen for biological control application with antagonists isolates to decreasing disease severity. This application were related by Forsyth et al. (2006) and Olivain et al. (2006) with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* and with *Trichoderma* (Hilaire et al., 2015). Further studies should be conducted to compare dynamics of the colonization of common bean by Fop in others genotypes and with others isolates.

### **Conclusions**

- i) The PEG/CaCl<sub>2</sub>-mediated transformation is an efficient method for insertion of exogenous DNA and obtaining stable transformants from protoplasts of Fop;
- ii) Based on the visualization of common bean colonization process by Fop race 2, 6 days post-inoculation (DPI), the fungus grew on the root hair epidermis, and on parenquimatic cells at 11 DPI, in a intercellular way. At 19 DPI, the fungus reached xylem vessels blocking the water and minerals passage for shoots resulting in wilt and plant death in 25 DPI.

## References

ABAWI GS. 1989. Root rots. In: Schwartz HF, Pastor-Corrales MA (Eds.) Bean production problems in the tropics. 2nd Ed. Cali Colombia. CIAT. p. 105-157.

ABAWI GS, PASTOR-CORRALES MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali Colombia, CIAT.

ABOUL-SOUD MAM, YUN BW, HARRIER LA, LOAKE GJ. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia* 158: 475-482.

ALVES-SANTOS FM, CORDEIRO-RODRIGUES L, SAYAGUÉS JM, MARTÍN-DOMÍNGUEZ R, GARCÍA-BENAVIDES P, CRESPO MC, DÍAZ-MÍNGUEZA JM, ESLAVA AP. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51: 605-11.

ARMSTRONG G, ARMSTRONG JK, 1963. *Fusarium* wilt of Bean in South Carolina and some host relations of the Bean *Fusarium*. *Plant Disease Reporter* 47: 1088-91.

BISHOP C, COOPER RM, 1983. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological plant pathology* 23: 323-43.

BOGDANOV AM, KUDRYAVTSEVA EI, LUKYANOV KA. 2012. Anti-fading media for live cell GFP imaging. *PLOS One* 7: e53004.

BRICK, MA, BYRNE PF, SCHWARTZ HF, OGG JB, OTTO K, FALL AL and GILBERT J. 2006. Reaction to three races of *Fusarium* wilt in the *Phaseolus vulgaris* Core Collection. *Crop Science* 46: 1245-1252.

CASTELLANI A, 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 65-72.

CHALFIE M, KAINE S. 1998. GFP - Green Fluorescent Protein properties, applications and protocols. Wiley-Liss, New York, 385 p.

CROSS H, BRICK MA, SCHWARTZ HF, PANELLA LW, BYRNE PF, 2000. Inheritance of resistance to Fusarium wilt in two common bean races. *Crop Science* 40: 954-958.

FENG HT, SUN ZG, LI HJ, QIN O, TANG C, FU R, LIU Y, LI P, ZHENG A. 2012. Preparation, purification and regeneration optimizing research of protoplasts from *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Microbiology Research* 6 (13): 3222-3230.

FORSYTH LM, SMITH LJ, AITKEN EAB. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. *Mycological Research* 110: 929-935.

HEIKAL AA, HESS ST, WEBB WW. 2001. Multiphoton molecular spectroscopy and excited-state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid-base specificity. *Chemical Physics* 274: 37-55.

HILAIRE KT, ANTOINE BB, FAUSTIN SD, SOULEYMANE C, LAURENT KK, TCHOA K, DAOUDA K. 2015. Biopotential of some *Trichoderma* spp. against growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causal agent of cotton wilt. *British Microbiology Research Journal* 10 (5). Doi: 10.9734/BMRJ/2015/20518.

KENDRICK J, SNYDER W, 1942. Fusarium yellows of Beans. *Phytopathology* 32: 1010-1014.

LAGOPODI AL, RAM AF, LAMERS GE, PUNT PJ, VAN DEN HONDEL CAM, LUGTENBERG BJJ, BLOEMBERG GV. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 172-179.

LAKSHMAN DK, PANDEY R, KAMO K, BAUCHAN G, MITRA A. 2012. Genetic transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* with *Agrobacterium* to study pathogenesis in *gladiolus*. *European Journal of Plant Pathology* 133: 729-738.

LI C, CHEN S, ZUO C, SUN Q, YE Q, YI G, HUANG B. 2011. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology* 131:327-340.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, ALTAN-BONNET N, PATTERSON GH. 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature cell biology Suppl*: S7-14.

LIU W, ZHU WM. 2000. Production and regeneration of *Trichosporon cutaneum* protoplasts. *Process Biochemistry* 35:659–664.

LIU LP, DENG ZN, QU JW, YAN JW, CATARA V, LI DZ, LONG GY, LI N. 2012. Construction of EGFP-labeling system for visualizing the infection process of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in planta. *Current Microbiology* 65 (3): 304-312.

LORANG JM, TUORI RP, MARTINEZ JP, SAWYER TL, REDMAN RS, ROLLINS JA, WOLPERT TJ, JOHNSON KB, RODRIGUEZ RJ, DICKMAN MB, CIUFFETTI LM. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1987-1994.

MANSOURI S, WIJK RV, REP M, FAKHOURY AM. 2009. Transformation of *Fusarium virguliforme*, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. *Journal of Phytopathology* 157 (5): 319-321.

MOROČKO-BIČEVSKA I, FATEHI J. 2011. Infection and colonization of strawberry by *Gnomonia fragariae* strain expressing green fluorescent protein. *European Journal of Plant Pathology* 129: 567-577.

NEMLI S, KUTLU B, TANYOLAC B. 2015. Determination of the population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions using lipoxygenase and resistance gene analog markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 59: 107-115.

NIÑO-SÁNCHEZ J, TELLO V, CASTILLO VC, THON MR, BENITO EP, DÍAZ-MÍNGUEZ JM. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology* 6 (234): 1-13.

NONOMURA T, MATSUDA Y, TAKASUGI M, OOTANI T, HASEGAWA T, MYAJIMA K, HATASA T, TOYODA H, 2001. A monitoring system for green fluorescent protein gene-transformed *Fusarium oxysporum* in melon seedlings. *Journal of General Plant Pathology* 67: 273-280.

OLIVAIN C, HUMBERT C, NAHALKOVA J, FATEHI J, HARIDON FL, ALABOUVETTE C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately in the soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1523-1531.

- OREN L, EZRATI S, COHEN D, SHARON A, 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1695-1701.
- PAPARU P, MACLEOD A, DUBOIS T, COYNE D, VILJOEN A. 2009. Efficacy of chemical and fluorescent protein markers in studying plant colonization by endophytic non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *BioControl* 54: 709-722.
- PASTOR-CORRALES MA, ABAWI G. 1987. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant disease* 71: 990-993.
- PATIL NS, PATIL SM, GOVIDWAR SP, JADHAV JP. 2015. Molecular characterization of intergeneric hybrid between *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma harzianum* by protoplast fusion. *Journal of Applied Microbiology* 118: 390-398.
- PAULA JUNIOR TJ, WENDLAND A (Eds.). 2012. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Epamig, Viçosa, Brazil.
- PAULA JÚNIOR TJ, VIEIRA RF, TEIXEIRA H, LOBO JUNIOR M, WENDLAND A. 2015. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO JES, PAULA JÚNIOR TJ, BORÉM A. (Ed.). *Feijão: do plantio à colheita*. Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 270-299.
- PECCHIA S, ANNÉ J. 1989. Fusion of protoplast from antagonistic *Trichoderma harzianum* strains. *Acta Horticulture*. 255: 303-312.
- PEREIRA AC, CRUZ MFA, PAULA-JÚNIOR TJ, RODRIGUES FA, CARNEIRO JES, VIEIRA RF, CARNEIRO PCS. 2013. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Tropical Plant Pathology* 38: 323-328.

PIETRO AD, RONCERO IG. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *MPMI* 11 (2): 91-98.

PÖGGELER S, MASLOFF S, HOFF B, MAYRHOFER S, KÜCK U. 2003. Versatile egfp reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Current genetics* 43: 54-61.

RAMALHO MAP, ABREU AFB, CARNEIRO JES, WENDLAND A, PAULA JUNIOR TJ, VIEIRA RF, DEL PELOSO MJ, LOBO JUNIOR M, PEREIRA AC. 2012. Murcha-de-fusário. In: PAULA JUNIOR TJ AND WENDLAND A, editors, *Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças*. Epamig, Viçosa, Brazil. p 127-138.

RIBEIRO R, HAGEDORN D. 1979. Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 69: 859-61.

RONQUILLO-LOPEZ MG, GRAU CR, NIENHUIS J. 2010. Variation in reaction to *Fusarium* spp. identified in a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population developed for field-based resistance to root rot and wilt. *Crop Science* 50: 2303-2309.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T, 1987. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory NY, USA.

SAMBROOK J, RUSSELL D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory NY, USA.

SAREMI H, AMIRI M, ASHRAFI J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology* 10: 14954-14961.

SARROCCO S, FALASCHI N, VERGARA M, NICOLETTI F, VANNACCI G. 2007. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *Journal of Plant Pathology*: 47-54.

SINGHVI M, GAIKAIWARI S, DIGAMBAR G. 2013. Protoplast formation and regeneration in *Acetobacter pasteurianus*. *American Journal of Bioengineering and Biotechnology*: 21:37-43.

SPECHT CA, DIRUSSO CC, NOVOTNY CP, ULLRICH RC. 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical biochemistry* 119: 158-163.

TOLEDO-SOUZA EDD, SILVEIRA PMD, CAFÉ-FILHO AC, LOBO JUNIOR M. 2012. *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 1031-1037.

TOLEDO NMV, ROCHA LC, DA SILVA AG, CANNIATTI BRAZACA SG. 2013. Interaction and digestibility of phaseolin/polyphenol in the common bean. *Food chemistry* 138: 776-780.

VENARD C, VAILLANCOURT L. 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* 97: 438-447.

VISSER M, GORDON TR, WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ, VILJOEN A. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of *Fusarium* wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. *Australasian Plant Pathology* 33: 69-75.

WHITE J, STELZER E. 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in Cell Biology* 9: 61-65.

ZHAO Y, JIANG C, YU H, FANG F, YANG J. 2014. Genome shuffling of *Aspergillus glaucus* HGZ-2 for enhanced cellulase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174: 1246-1259.

ZVIRIN T, HERMAN R, BROTMAN Y, DENISOV Y, BELAUSOV E, FREEMAN S, PERL-TREVES R. 2010. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2. *Plant Pathology* 59: 576-585.

## CONCLUSÕES GERAIS

A redução do crescimento, caráter estimado pela redução da altura e da massa fresca de parte aérea da planta, apresenta potencial para ser usado na seleção de linhagens no melhoramento genético do feijoeiro para resistência à murcha-de-fusarium. Esse caráter é governado por um conjunto de genes diferentes daqueles que determinam a resistência à doença mensurada pela nota de severidade. Considerando os caracteres produtividade de grãos, resistência à murcha-de-fusarium e redução do crescimento simultaneamente, a população segregante oriunda do cruzamento entre VC 25 / CVIII 8511 e VC 25 / Pérola é promissora visando o melhoramento do feijoeiro.

A resistência do feijoeiro à murcha-de-fusarium é dominante e governada por um gene de efeito maior e poligenes. Os altos valores de herdabilidade é indício de que com a seleção, maiores ganhos podem ser proporcionados. A partir de retrocruzamentos, a introgressão do gene dominante de efeito maior pode ser realizada com sucesso. Por um programa de seleção recorrente os poligenes também podem ser incorporados em linhagens elites do programa. Outros trabalhos poderam elucidar se os poligenes estão envolvidos na redução do crescimento da planta, retratada no primeiro capítulo.

A partir da visualização do processo de infecção e colonização do feijoeiro-comum por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), protoplastos foram transformados pela metodologia de PEG/CaCl<sub>2</sub> para expressão do gene *egfp*. Com base na visualização do processo de colonização do feijoeiro por Fop raça 2, seis dias após a inoculação (DPI) o fungo colonizou a epiderme de pelo radicular da raiz, e em células parenquimáticas adjacentes aos 11 DPI, de um modo intercelular. Aos 19 DPI, o fungo atingiu vasos do xilema bloqueando a passagem de água e minerais para parte aérea resultando em murcha e morte da planta aos 25 DPI.

## **APOIO FINANCEIRO**

Esta tese foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) projeto **APQ-01073-13** intitulado “ Transformação De Isolados Com GFP Para Estudo Da Infecção Do Feijoeiro Com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Visando Melhoramento Para Resistência À Murcha-De-Fusário ” sob coordenação do Professor PEDRO CRESCÊNCIO SOUZA CARNEIRO, coorientador da aluna RENATA OLIVEIRA BATISTA autora desta tese.