

HERANÇA DA RESISTÊNCIA E MARCADORES RAPD LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA DA CULTIVAR MÉXICO 54 AO PATÓTIPO 63-19 DE *Phaeoisariopsis griseola*

Aloisio Sartorato¹; Sílvia Nietzsche²; Everaldo G. de Barros³ e Maurílio A. Moreira⁴

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das mais importantes leguminosas cultivada no Brasil. É hospedeira de inúmeras doenças causadas por fungos, bactéria, vírus e nematóides. A mancha angular, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., está distribuída em todo o país. As perdas na produção podem atingir até 70%. Entre os métodos de controle desta doença, a resistência genética é o mais importante por ser o mais econômico para o produtor e a mais segura para o ambiente. Entretanto, a grande variabilidade patogênica que o fungo apresenta dificulta o desenvolvimento de cultivares com esta característica. Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm sido utilizados para identificar e selecionar genótipos com genes de resistência a várias doenças. O objetivo deste estudo foi determinar a herança da resistência e identificar marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a genes de resistência à mancha angular.

O experimento foi conduzido nos laboratórios e casa de vegetação do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados os genitores, as populações F₁, F₂, e os retrocruzamentos do cruzamento entre as cultivares mesoamericanas México 54 (R) e Rudá (S) e o patótipo 63-19 de *P. griseola*. Dezoito dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com uma suspensão contendo 2×10^4 conídios.mL⁻¹ e incubadas por 48 hs em câmara úmida (22 ± 1 °C e 95% UR). As plantas foram então transferidas para casa de vegetação e doze dias após foi realizada a avaliação utilizando uma escala de 1 a 9 (CIAT, 1987). Plantas que apresentavam até 15% do grau 4 foram consideradas resistentes e, as demais, suscetíveis.

Na identificação do marcador RAPD foi utilizada a técnica denominada de "Bulked Segregant Analysis" (Michelmores et al., 1991). Cada bulk foi composto do DNA de oito plantas resistentes ou suscetíveis. O DNA foi extraído de folhas trifoliadas utilizando-se a técnica desenvolvida por Doyle & Doyle (1987). As amostras foram amplificadas pela técnica do RAPD segundo Williams et al. (1990). Cada ciclo de amplificação consistiu dos seguintes passos: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 60 s a 72 °C. Após 40 ciclos, as amostras foram submetidas por sete minutos a 72 °C e, finalmente, a 4 °C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (1,2%) contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo e imerso em TBE. As bandas de DNA foram visualizadas em luz UV e fotografadas com o sistema Eagle Eye II.

¹Pesquisador, Dr., Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO.

²Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, MG.

³Departamento de Biologia Geral & BIOAGRO, UFV.

⁴Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular & BIOAGRO, UFV.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste Chi-quadrado utilizando-se o fator de correção de Yates. A distância entre o marcador e o gene de resistência foi estimada com o programa MAPMAKER/EXP, versão 3.0, com um *lod score* mínimo de 3,0.

O ajuste de 3:1 (R:S) obtido na segregação da F₂, de 1:1 no retrocruzamento para o genitor suscetível e de 1:0 no retrocruzamento para o genitor resistente indica que a resistência da cultivar México 54 ao patótipo 63-19 de *P. griseola* é monogênica e dominante (Tabela 1).

Tabela 1. Herança e ligação genética entre os marcadores moleculares e o gene de resistência (R) da mancha angular ao patótipo 63-19 de *P. griseola* no cruzamento entre México 54 (resistente) e Rudá (suscetível).

Locos	Geração Analisada	Relação Esperada no F ₂	Relação Observada	χ^2	Probabilidade (%)	Distância Genética ^a
R	F ₂	3:1 ^b	125:42	0.006	90-95	-
R	BC _S	1:1 ^c	21:25	0.368	50-70	-
R	BC _R	1:0 ^d	29:0	0.00	100	-
N 02 ₍₈₉₀₎	F ₂	3:1	124:43	0.04	80-90	-
AC 14 ₍₂₄₀₀₎	F ₂	3:1	128:39	0.29	50-70	-
E 04 ₍₆₅₀₎	F ₂	3:1	125:42	0.005	90-95	-
R/N 02 ₍₈₉₀₎	F ₂	9:3:3:1 ^e	123:7:1:36	118.91	<0.0001	5.9
R/AC 14 ₍₂₄₀₀₎	F ₂	9:3:3:1	127:3:1:36	128.37	<0.0001	6.6
R/E 04 ₍₆₅₀₎	F ₂	9:3:3:1	116:9:9:33	84.89	<0.0001	11.8

^aDistância genética em centiMorgans (Haldane); ^{b,c,d}Relação esperada para herança monogênica dominante na progênie F₂ (3 resistente, R_: 1 suscetível, rr), no retrocruzamento para o genitor suscetível (1 resistente, Rr: 1 suscetível, rr) e no retrocruzamento para o genitor resistente (1 resistente, R_: 0 suscetível, rr), respectivamente. ^eRelação esperada para a segregação de dois genes independentes na progênie F₂ (R_/+;R_-:r1/+;rr/-).

Foram obtidas três bandas polimórficas de DNA em todos os indivíduos resistentes as quais não se apresentaram nos suscetíveis. Na Figura 1 são apresentadas as amplificações das bandas obtidas com os primers OP N02, OP AC14 e OP E04 ligadas em acoplamento com o gene de resistência. Na análise de co-segregação das 167 plantas, estes marcadores foram mapeados a 5,9, 6,6 e 11,8 cM do gene de resistência, com um *lod score* de 25,83, 24,90 e 19,03, respectivamente.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à mancha angular foram identificados apenas recentemente (Carvalho et al., 1997; Ferreira, 1998). *P. griseola* é um patógeno que apresenta grande variabilidade (Sartorato et al., 1991; Nietsche; 1997) e, provavelmente, um grande número de genes de virulência. Por este motivo, é razoável presumir que o feijoeiro comum deva possuir genes que confirmam resistência aos diferentes patótipos.

Carvalho et al. (1997) identificou o marcador RAPD H13₍₄₉₀₎ ligado ao gene de resistência presente na linhagem AND 277 e o designou de *Phg-1*. Consequentemente, sugere-se que o gene identificado no presente trabalho com os marcadores RAPD N02₍₈₉₀₎, AC14₍₂₄₀₀₎ e E04₍₆₅₀₎, seja designado *Phg-2*.

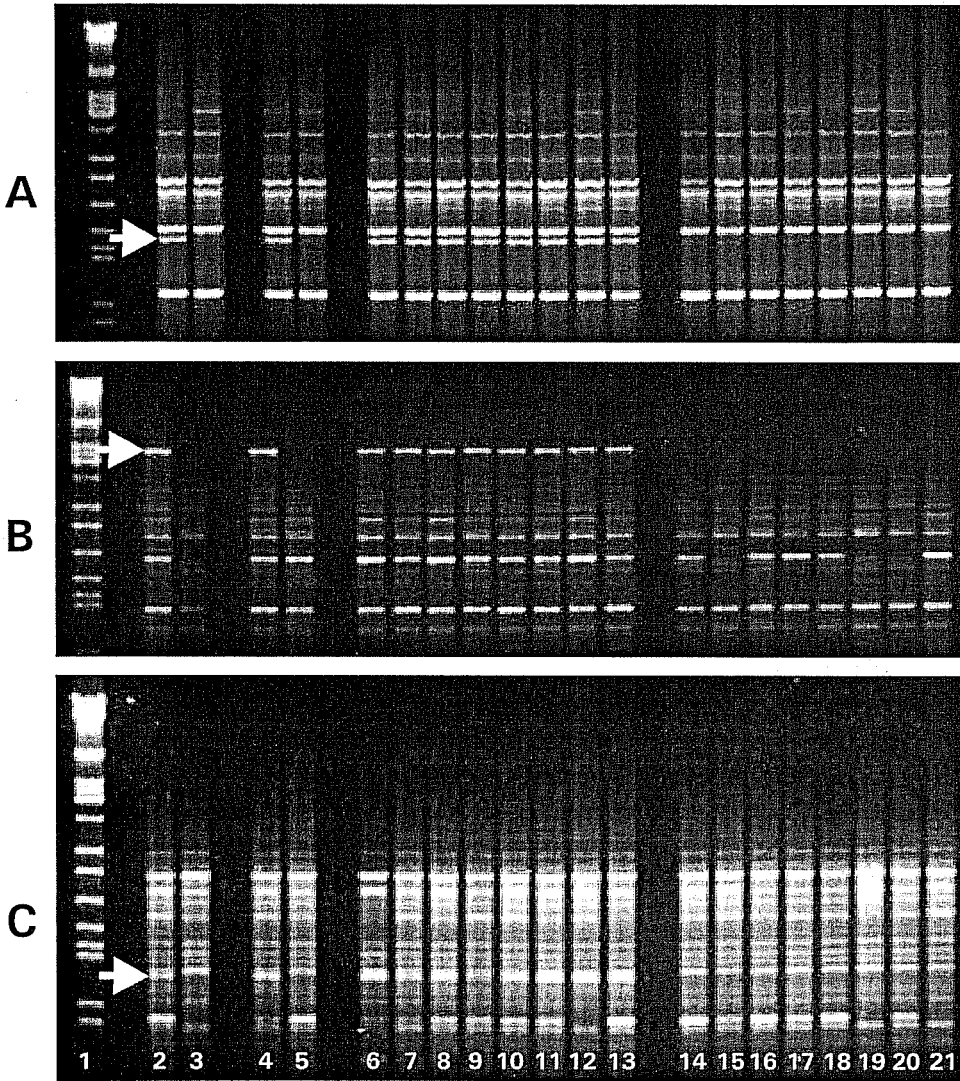


Fig. 1. Produto de amplificação obtidos com os primers OP N02 (A), OP AC14 (B) e OP E04 (C). Colunas 1 = DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*; 2 = cultivar resistente (México 54); 3 = cultivar suscetível (Rudá); 4 = bulk resistente; 5 = bulk suscetível; 6-13 = plantas F₂ resistentes e, 14-21 = plantas F₂ suscetível. A seta indica a banda de DNA polimórfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, G.A.; NIETSCHÉ, S.; ALZATE-MARIN, A.L.; FERREIRA, C.F.; PAULA JR., T.J.; FALEIRO, F.G.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 22:255, 1997.
- CIAT (Cali, Colombia). **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. SCHOONHOVEN, A. van; PASTOR-CORRALES, M.A. (compilers). Cali, 1987. 54p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15, 1987.
- FERREIRA, C.F. **Herança da resistência do feijoeiro à mancha-angular e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência**. Viçosa: UFV, 1998. 38p. (Tese Mestrado).
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, J.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings National Academy Science USA** 88:9828-9832, 1991.
- NIETSCHÉ, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa: UFV, 1997. 47p. (Tese Mestrado).
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; MENTEN, J.O.M.; BERGAMIN FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 16:43-46, 1991.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18:6531-6535, 1990.