

# IDENTIFICAÇÃO DE QTLs LIGADOS A RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO EM *Phaseolus vulgaris*

Karla Rodrigues Couto<sup>1</sup>, Igor Almeida Lima<sup>1</sup>, Monik Evelin Leite<sup>1</sup>, João Bosco dos Santos<sup>2</sup>, Joaquim Geraldo Cáprio da Costa<sup>3</sup> e Adriane Wendland<sup>4</sup>

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar QTLs associados à resistência do feijoeiro ao cretamento bacteriano comum, a fim de auxiliar a seleção com marcadores. Foram utilizadas 100 progênies F<sub>2,3</sub>, oriundas do cruzamento CB9 11921(Resistente) x CNFC 10276 (Suscetível). A identificação de QTLs foi feita por meio de marcadores microssatélites (SSR), dois marcadores foram os primers PvM04TC323 e PvESTBR-102. Entretanto, estimou-se que estes marcadores estão localizados a 14,2cM e 14cM respectivamente do QTL de interesse, o que é distante para utilização na seleção assistida por marcadores. Porém, eles estão flanqueando o QTL e juntos são úteis para se realizar a seleção assistida. Nota-se que o QTL identificado explica quase a totalidade da variação fenotípica.

## Introdução

O cretamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, é a principal doença bacteriana da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil e causa danos principalmente no plantio das águas nas regiões mais quentes (PAULA JR. e ZAMBOLIM, 2006).

O constante uso de sementes contaminadas tem sido a causa do aumento do nível de inóculo nos campos de produção (PEREIRA et al., 2002). O controle desta bacteriose envolve a adoção conjunta de várias práticas culturais, como o uso de sementes sadias, rotação de culturas por 2 a 3 anos, aração profunda, controle de plantas daninhas e a incorporação dos restos culturais ao solo (SAETTLER, 1994). Dentre as possíveis estratégias de manejo integrado desta doença, a resistência genética é considerada uma importante alternativa, além de fácil adoção pelos agricultores devido aos baixos custos e por ser ecologicamente segura, reduzindo, ou até mesmo evitando, o uso indiscriminado de defensivos agrícolas (CNPAP, 1998). Há evidências que cultivares com maiores níveis de resistência horizontal à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nos folíolos e na vagem atenuam o desenvolvimento de epidemias e podem produzir sementes com menores taxas de infecção, mesmo sob condições ambientais favoráveis ao cretamento bacteriano comum (MARINGONI et al. 1995).

Para auxiliar na seleção de linhagens mais resistentes, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar QTLs associados à resistência ao cretamento bacteriano comum.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, onde foram utilizadas 100 progênies F<sub>2,3</sub>, obtidas do cruzamento CB9 11921(Resistente) x CNFC 10276(Suscetível). A inoculação da bactéria foi realizada pelo “método da tesoura”, sendo feitos dois cortes em cada metade do limbo da folha primária, com tesoura embebida em suspensão bacteriana à concentração de 10<sup>8</sup> ufc/mL. A avaliação da severidade de doença foi feita em cada metade dos folíolos e foram avaliadas dez plantas por progênie, sendo dadas quatro notas por planta resultando e em 40 notas por progênie. Utilizou-se uma escala diagramática com 7 notas, em que: 0 - ausência de doença até 6 – folha amarelecida e necrosada (Figura 1).

<sup>1</sup> Mestrando(a) em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: karlarcouto@yahoo.com.br, igorlimaalmeida@yahoo.com.br, monik\_leite@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: jbsantos@ufla.br.

<sup>3</sup> Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Santo Antonio de Goiás, GO, CEP 75375-000. E-mail: caprio@cnpaf.embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Santo Antonio de Goiás, GO, CEP 75375-000. E-mail: adrianew@cnpaf.embrapa.br

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e Embrapa Arroz e Feijão.

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O DNA total das 100 progênies foi extraído, pelo método do CTAB (PEREIRA et al., 2007).

A identificação de QTLs foi feita por meio de marcadores microssatélites (SSR) específicos para o feijoeiro. Foi utilizado o método do “*bulk*” segregante (BSA) proposto por Michelmore et al., (1991), o DNA das 32 plantas mais resistentes e das dez plantas mais suscetíveis foi misturado equitativamente para constituírem os dois *bulks* contrastantes, um resistente e outro suscetível. Juntamente com os *bulks* foram avaliados também dois indivíduos mais resistentes e dois mais suscetíveis, para auxiliar na identificação de híbridos dentro dos *bulks*. Foram utilizados 349 pares de primers.

A análise dos resultados foi feita pelo aplicativo computacional GQMOL (CRUZ, 2007). Também foi realizada uma análise de variância por ponto, semelhante ao procedimento usado por Ferreira (1995), associando as marcas encontradas com as notas médias relativas à severidade de doença de cada progênie.

## Resultados e Discussão

A seleção assistida por marcadores moleculares para caracteres quantitativos tem mostrado pouca eficiência, exceto para os caracteres que possuem QTLs de grande efeito (BERNARDO 2008). Por exemplo, Yu et al. (2004) relatou o microssatélite X53603, que amplifica uma região dentro do alelo da nitrato redutase, que explica 70% da variação da resistência derivada de *P. acutifolius*. Infelizmente, esse microssatélite foi testado nos *bulks* e não apresentou polimorfismo, indicando que a resistência das progênies utilizadas neste trabalho não é derivada de *P. acutifolius*. Ibarra-Perez et al. (2005) também obteve sucesso na seleção de QTLs de grande efeito para resistência ao cretamento bacteriano utilizando marcadores SCAR.

Entre os primers SSR utilizados, os resultados permitem identificar dois possíveis marcadores, o primer PvM04 TC323, *Forward* 5'-GGTTCCTCCTCCTTCTGC-3' - *Reverse* 5'-GCGCCGTCTTTTTGGTAGT-3', (Figura 2) e o primer PvESTBR-102, *Forward* 5'-ATCCAGATGAGTGGGTTTCAGT-3' - *Reverse* 5'-TCGTACACCTCCTCGAATACCT-3' (Figura 3). A avaliação foi realizada com a ajuda do aplicativo computacional GQMOL (CRUZ, 2007) e mostrou que esses dois marcadores estão localizados a 14,2 cM e 14cM do QTL de interesse. Entretanto, a distância entre os dois marcadores é de 18 cM o que indica que eles provavelmente estão flanqueando o QTL de resistência. Assim, apesar de cada um estar relativamente distante do QTL o uso dos dois permite o uso na seleção assistida com eficiência.

Para o primer PvM04 TC323 quatro progênies avaliadas para severidade de doença como resistentes apresentaram marca de suscetibilidade. Entre essas quatro progênies, três também apresentaram a marca para suscetibilidade para o primer PvESTBR-102. Esse resultado sugere que pode ter havido algum escape na inoculação da bactéria.

Os resultados das Análises por pontos indicam que quase a totalidade da variação fenotípica é explicada pelo QTL ( $R^2$ ), confirmado por ambos marcadores (Tabela 1). Observa-se que o efeito do QTL no controle da doença é aditivo e principalmente dominante.

## Conclusões

O uso conjunto dos marcadores, PvM04 TC323 e PvESTBR-10, é eficiente para seleção assistida no melhoramento de plantas.

## Agradecimentos

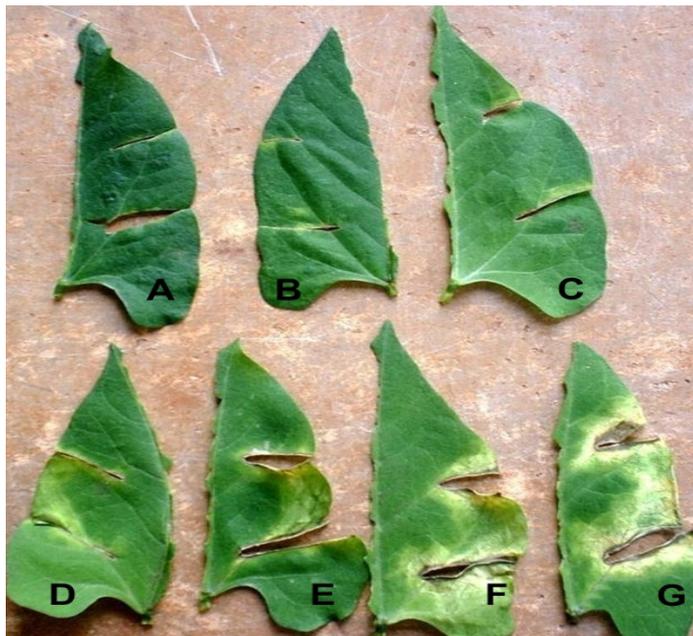
Embrapa Arroz e Feijão, CNPq e Fapemig.

## Referências

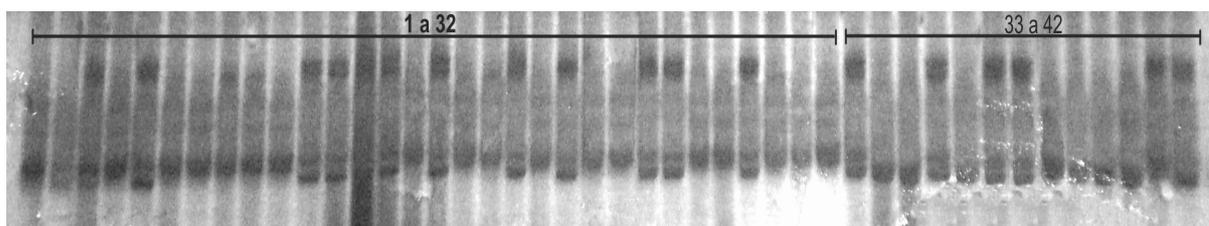
- BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*, v.48, p.1649-1664, 2008.
- CRUZ, C. D. Programa para análises de dados moleculares e quantitativos – GQMOL. Viçosa: UFV, 2007.
- FERREIRA, D. F. Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação. 1995. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Piracicaba, 1995.
- IBARRA-PEREZ, F.J.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; NAVARRETE-MAYA, R.; FERNANDEZ-ERNANDEZ, P.; ZANADATE, R.; KELLY, J.D. Use of SCAR Markers as a Tool to Verify Presence of CBB Resistance QTL in Breeding Populations of Common Bean. *Ann. Report of the Bean Improv. Coop.*, v. 48, p. 100-101, 2005.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Presença de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, n.3, p.449-457, Set. 1995.
- MICHELMORE, R. W.; MEYERS, B. C. Clusters of resistance in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, Plainview, v. 8, n. 11, pg. 1113-1130, Nov. 1998.
- O PORTAL DA EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Melhoramento Genético do Feijoeiro Comum para Resistência a Doenças. Embrapa Arroz e Feijão, 1998. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/emfoco/anteriores/pqfoco12.pdf> . Acesso em 11 mai 2009.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão. Viçosa: UFV, 2006. p.359-414.
- PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B. dos; ABREU, A. de F.B de; COUTO, K.R. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 5, p. 707-713, 2007.
- PEREIRA, L.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; MAFFIA, L.A.; NASSER, L.C.B. Incidência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) do Distrito Federal. In: *Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes*, 7. 2002. p. 61.
- SAETTLER, A.W. Bacteriosis comum. In: PASTORCORRALES; SCHWARTZ, H.F. Problemas de producción del frijol em los trópicos. *Cali: CIAT*, 1994. cap.11, p.303- 329.
- YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Hered.* 91(6):429–434. 2000.

**Tabela 1.** Resumo das análises de variância por marcador.

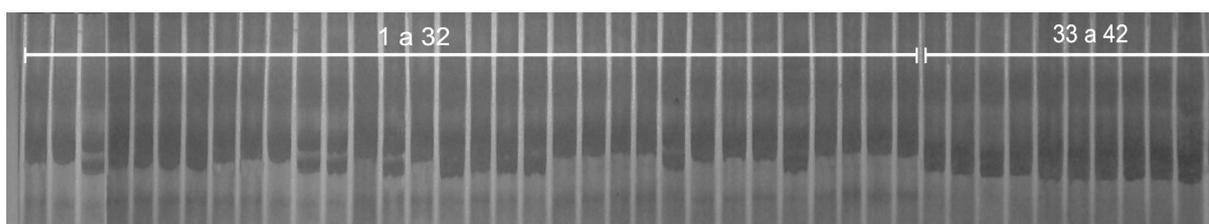
		PvM04 TC323	PvESTBR-102
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>QM</b>
Genótipos	2	555,526237**	553,99905**
Aditivo	1	60,846352**	45,69332483**
Dominante	1	1050,206122**	1047,772272**
Erro	95	0,738715642	0,770866947
Total	99		
		R <sup>2</sup> 94,06%	R <sup>2</sup> 93,80%



**Figura 1.** Escala diagramática de notas para severidade da doença, sendo: A- nota 0, B- nota 1, C- nota 2, D- nota 3, E- nota 4, F- nota 5 e G- nota 6.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, reação SSR com o primer PvM04 TC323, sendo de 1 a 32 indivíduos do *bulk* resistente, e de 33 a 42 indivíduos do *bulk* suscetível.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, em reação SSR com o primer PvESTBR-102, sendo de 1 a 32 indivíduos do *bulk* resistente, e de 33 a 42 indivíduos do *bulk* suscetível.