

MON
581.169
Y5-ZC
TES/MEM

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À MANCHA
ANGULAR E MAPEAMENTO DE CARACTERES
IMPORTANTES NO MELHORAMENTO DO FEIJOEIRO
COMUM**

GISMAR SILVA VIEIRA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

DIRBI/UFU



1000182498

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das
exigências para obtenção do
Título de Mestre em Genética
e Bioquímica.

**UBERLÂNDIA - MG
Março - 1997**

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À MANCHA
ANGULAR E MAPEAMENTO DE CARACTERES
IMPORTANTES NO MELHORAMENTO DO FEIJOEIRO
COMUM**

GISMAR SILVA VIEIRA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Tese apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das
exigências para obtenção do
Título de Mestre em Genética
e Bioquímica.**

**UBERLÂNDIA - MG
Março - 1997**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA
Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37
38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

1 - TÍTULO DA TESE: Controle Genético da Resistência à Mancha Angular e Mapeamento de Caracteres Importantes no Feijoeiro Comum

2 - ALUNO: Gismar Silva Vieira

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

4 - DATA: 10 03 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Luiz Ricardo Goulart Filho

Titular Fernando Cesar Juliatti

Titular Siu Mui Tsai

Suplente Julio Cesar Viglione Penna

Suplente João Bosco dos Santos

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 15:15 Término - 16:00

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 16:00 Término - 17:15

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

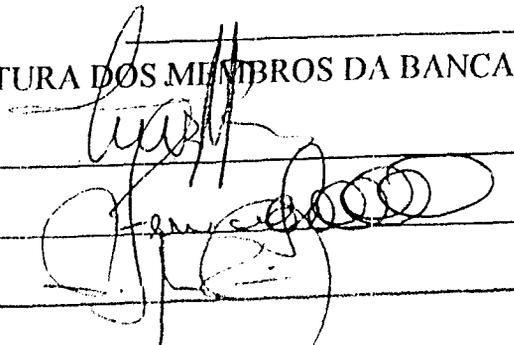
3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

11 - RESERVADO AO COLEGIADO



DEDICO

Dedico este trabalho aos meus pais , os quais não mediram esforços e incentivos para que eu conseguisse estudar.

À minha esposa Elenice, pela compreensão e integração na minha luta.

Ao meu filho Vinícius que é só alegria e fonte inspiração na minha vida.

Agradecimentos

À Deus pela energia fornecida a cada dia para que eu cumpra a minha missão designada.

À Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio ao curso

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Warwick Estevam Kerr, o qual não mediu esforços para implantação deste curso de pós-graduação.

À todos Professores que contribuíram para a minha formação a nível de Mestrado.

Ao Dr. Aloisio Sartorato em nome do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e feijão (EMBRAPA-CNPAP), por ter nos enviado o material biológico para esta pesquisa.

Ao Professor Luiz Ricardo Goulart Filho, pela orientação, atenção, amizade, liberdade, confiança e estímulos dispensados.

Ao Professor Fernando César Juliatti pelas sugestões e informações que só contribuíram para melhor este trabalho.

À Professora Siu Mui Tsai pela sua disponibilidade e dedicação sempre presente quando solicitada.

À Professora Amélia Hamaguchi pelas críticas e sugestões na correção final do texto.

Aos Técnicos, Roberto, Manoel, Francisco Raimundo, Paulo, Adílio e Aires pelas ajudas no decorrer deste curso.

Aos funcionários da horta, Srs. João e Joaquin pelos serviços prestados.

Em especial agradeço aos colegas do curso de Mestrado: Marta, Robson, Christiane, Terezinha, Adelmo, Adailton, Vanessa, Syomara, Aparecida Célia, César, Rosana, Vivian, Veridiana, Paula, Fábio, Juarez, Maurício Borges, Vania, Gislene, Geraldo e alunos de graduação em Agronomia, Ciências Biológicas e Veterinária, que são eles: Warlei, Marcelo, Cristina, Juliana, Mirian, Kleber, Gustavo, Wânia, Bárbara, Eduardo, Graciele, Gisele, Keilah, por contribuírem pelo ótimo ambiente compartilhado.

BIOGRAFIA DO AUTOR

GISMAR SILVA VIEIRA, filho de Gilberto José Vieira e Maria das Dores Vieira, natural de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, nasceu em 16 de março de 1968.

Graduou-se no curso de Engenharia Agrônômica, de março de 1989 a dezembro de 1993, pela Universidade Federal de Uberlândia –UFU, Estado de Minas Gerais.

Foi bolsista de Iniciação Científica, do curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, instituído pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de março de 1992 a fevereiro de 1994

Em setembro de 1994 iniciou o curso de Mestrado em Genética e Bioquímica, na Universidade Federal de Uberlândia – UFU, concluindo-o em março de 1997.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
CAPÍTULO I- HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO Á MANCHA ANGULAR	
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1.1 INTRODUÇÃO.....	01
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	08
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
1.5 CONCLUSÕES.....	18
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO- 2 MAPEAMENTO DE CARACTERES IMPORTANTES PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO	
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
2.1 INTRODUÇÃO.....	26
2.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
2.5 CONCLUSÕES.....	58
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Esquema de cultivares diferenciadoras universais de mancha angular para determinação da origem do isolado de <i>P. griseola</i> Sacc., proposta pelo CIAT (1995).....	11
2. Resposta de 46 cultivares do feijoeiro inoculadas com o isolado monospórico de <i>P. griseola</i> . UFU-Uberlândia MG, 1996.....	13
3. Teste do Chi-Quadrado para Avaliação da Resistência à Mancha Angular do Feijoeiro. UFU-Uberlândia, 1997.....	16
4. Mapas de ligações existentes para <i>Phaseolus vulgaris</i> a partir de marcadores genéticos utilizando populações F ₂ ou populações avançadas.....	38
5. Análise genética por Chi-quadrado de 16 marcadores estudados com respectivos; dados sobre o número de indivíduos, segregação esperada e probabilidade. Uberlândia, 1997.....	45
6. Comparação de médias e variâncias para peso, comprimento e largura de sementes de feijão provenientes do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Uberlândia 1997.....	49
7. Contraste de médias dentre populações para: peso, comprimento e largura de sementes de feijão provenientes do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Uberlândia 1996.....	49
8. Herdabilidade no sentido amplo , número de genes ou blocos gênicos envolvidos nas características referentes a tamanho de semente e Heterose. Uberlândia 1996.....	50
9. Correlações entre as características peso, comprimento e largura de sementes de feijões nas populações. Uberlândia 1996.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Distribuição da frequência de reação nas cultivares de ambos “Pools” genéticos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ao isolado monospórico de <i>P. griseola</i> Pg-UFU1.....	15
2. Folhas inoculadas dos descendentes do cruzamento AND 277xRosinha G2.....	17
3. Proteínas de semente da população segregante AND 277 x Rosinha G2. As setas indicam em ordem decrescente de peso das proteínas: Spa, Spb e faseolina (Phs).....	53
4. Proteínas de semente da população segregante AND 277 x Rosinha G2. As setas indicam em ordem decrescente de peso as proteínas: Spa, Spb e faseolina (Phs) com ênfase no padrão codominante o que caracteriza a hibridação.....	53
5. Amplificação de indivíduos segregantes na população F ₂ do cruzamento AND 277 e Rosinha G2.....	55
6. Mapa de ligação construído a partir de marcadores: Morfológicos (V ^{lae} , C st , Cor), Bioquímicos (Phs, Spa e Spb), Moleculares (OPA-01a, OPI-19a e OPI-19b) e o gene de resistência do feijoeiro á mancha angular (<i>Als</i>).....	56

RESUMO

CAPÍTULO-1. VIEIRA, Gismar Silva, Herança Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à Mancha Angular (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc). Uberlândia: UFU, 1997, 1-23p (Tese de Mestrado em Genética e Bioquímica)

A mancha angular acomete o feijoeiro e sua importância esta sendo aumentada devido a diminuição do intervalo entre plantios, com uso de irrigações ou plantio de terceira época. O controle desta doença de forma mais eficaz é por meio da resistência genética. A literatura tem sido muito controversa quanto ao controle genético desta doença, variando de um a três genes envolvidos, com alguns casos apresentando dominância completa e outros sendo controlada por genes recessivos ou por ambos. Este trabalho teve a finalidade de esclarecer o tipo de herança, bem como quantificar o número de genes envolvidos no controle genético do feijoeiro a um isolado patogênico de *P. griseola* Sacc. Obteve-se a população segregante F₂ a partir do cruzamento do progenitor resistente de origem andina, AND 277 e de uma cultivar mesoamericana, Rosinha G2 de alta suscetibilidade. As características dos progenitores em relação à mancha angular, bem como a patogenicidade do isolado e sua origem evolutiva foram confirmadas, inoculando 46 cultivares, entre estas estavam algumas das diferenciadoras universais de mancha angular. As inoculações na concentração de 2×10^4 conídios por ml, foram realizadas ao entardecer e incubou-se as plantas por 48 horas com ausência de luz e alta umidade. O patógeno comportou-se como característico de mesoamericano de acordo com a infecção observada em algumas diferenciadoras universais e demais cultivares. Confirmou sua patogenicidade em populações segregantes F₂ bem como análise de chi-quadrado apresentou a resistência do feijoeiro como monogênica e dominância completa, sem efeitos citoplasmáticos. Os resultados obtidos, apresentam a cultivar AND 277 como uma ótima fonte de resistência á mancha angular. Uma vez que esta cultivar não apresenta genes de incompatibilidade genética, tem-se um genótipo em condições de ser utilizado em programas de melhoramento do feijoeiro, restando avaliar outras características agronômicas.

ABSTRACT

CAPÍTULO-1. Inheritance of Resistance Genetic in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Angular Leaf Spot (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.)

Angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.) is a serious disease of common bean and its importance is increasing due to the short periods between cultivations. Resistance is the only practical mean for controlling this disease; however, the genetic control of the resistance reported in the literature has been fairly controversial, showing one to three genes, both dominant and/or recessive, conditioning this resistance. The objective of this investigation was to establish the genetic control of resistance to angular leaf spot in common bean. An F₂ segregating population was obtained from a cross between a resistant Andean cultivar, AND 277, and a susceptible Middle American cultivar, Rosinha G2. The plant symptom severity as well as the pathogenicity and the pathogen origin were evaluated through the analysis of symptoms of 46 inoculated cultivars. Inoculations consisted of 2x10⁴ spores/ml and were applied in the evening. Inoculated plants remained in the dark for 48 hours with high humidity (>90%). The pathogen was classified as of Middle American origin. Chi-square data of symptom severity in the F₂ population demonstrated that resistance is conditioned by one gene with complete dominance and no maternal effects. The cv. AND 277 is completely resistant to the angular leaf spot Middle American strain, and also does not present genetic incompatibility in crosses with Middle American cultivars.

Universidade Federal de Uberlândia
BIBLIOTECA

1.1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do feijoeiro causada pelo fungo imperfeito *Phaeoisariopsis griseola* Sacc. é uma das principais doenças do feijoeiro. Embora alguns autores considerem-na como doença de final de ciclo e de importância secundária, para os plantios de “seca” e das “águas” (Vieira, 1994; Galli *et al.*, 1980). Provavelmente esta consideração no passado levou a maioria dos programas de melhoramento a não colocá-la em primeiro plano. Desta forma, não existem cultivares no mercado que apresentem resistência a este patógeno.

À medida que aumentam os prejuízos causados por esta doença, maior é o interesse, no melhoramento genético do feijoeiro para a resistência a este patógeno. Embora vários trabalhos tenham mostrado que o controle genético desta característica é monogênico, a quebra da resistência no campo é observada facilmente, o que implica dizer a existência de raças fisiológicas. De uma forma geral as cultivares andinas apresentam resistência aos isolados mesoamericanos e vice-versa (Guzmán *et al.*, 1995; Pastor-Corrales, 1995; Otoya *et al.*, 1995).

No Brasil, a grande maioria da área plantada é com cultivares mesoamericanas, e de acordo com trabalhos que mostram a co-evolução deste patógeno com as cultivares, devemos ter uma maior presença de raças mesoamericanas. Uma opção que está sendo seguida por vários locais é a introdução de genes de resistência a partir de cultivares resistentes de origem andina (Paula Júnior, 1995). Neste ponto, deve-se levar em conta o fato da incompatibilidade existente no cruzamento entre cultivares andinas com mesoamericanas, devido à possibilidade do encontro de dois genes dominantes e complementares, um de origem andina e outro de origem mesoamericana, os quais levam à letalidade total ou parcial dos descendentes (Singh & Gutierrez, 1984; Gepts & Bliss, 1985; Vieira *et al.*, 1989).

Botelho *et al.* (1993) e Sartorato *et al.* (1995) testaram a cultivar AND 277, respectivamente com 96 e 106 diferentes isolados, a qual apresentou resistência vertical completa a uma grande parte dos isolados, sendo portanto uma ótima candidata, tanto para estudos de herança como para a transferência de genes de resistência a *Phaeoisariopsis griseola* Sacc., desde que não apresente genes de incompatibilidade genética. Esta cultivar além de apresentar resistência vertical, também apresenta contrastes morfológicos, bioquímicos e moleculares em relação a cultivares mesoamericanas.

Este trabalho tem por objetivo estudar a resistência à mancha angular, frente a um isolado patogênico de *Phaeoisariopsis griseola* Sacc., esclarecer o tipo de herança e quantificar o número de genes envolvidos no controle genético da resistência desta importante doença do feijoeiro.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A Doença

A mancha angular é uma doença que apresenta uma distribuição generalizada em todos os locais onde se cultiva o feijoeiro. Os prejuízos causados por esta doença são influenciados por vários fatores, tanto ambientais, como culturais, genéticos e suas interações. De uma forma geral são mais prejudiciais para a cultura de acordo com o estágio em que inicia a infecção, sendo que quanto mais precoce a partir das duas primeiras semanas e quanto mais suscetíveis o hospedeiro, maior será o prejuízo (Santos Filho *et al.*, 1978; Sindhan & Bose, 1980; Brenes *et al.*, 1984; Sartorato, 1989). Anteriormente foi considerada uma doença de final de ciclo, tanto no Brasil quanto em outros países, o que nos últimos anos vem sendo mudado, pois os prejuízos com este patógeno vem aumentando tanto nos plantios tradicionais, quanto nos de inverno, ou terceira época (Galli *et al.*, 1980; Campos & Zak 1980, Sartorato & Rava, 1992; Vieira, 1994). Em 1995 foi realizado no CIAT, Colômbia, um Workshop cujo tema único foi a mancha angular do feijoeiro, onde foi discutido de uma forma geral esta doença, que a cada dia aumenta sua importância.

No Brasil a mancha angular está sendo um problema em várias regiões onde se cultiva o feijoeiro. Atualmente, segundo um questionário respondido por diversos produtores brasileiros, tem-se noção da importância desta doença, onde 87% das respostas, mencionaram a mancha angular como a mais importante, sendo superior até à antracnose com 70% e cretamento bacteriano com 63%, doenças importantes como ferrugem, fusariose e mesmo

virose como mosaico comum do feijoeiro foram classificadas como secundárias. A mancha angular foi reportada como a mais severa, com 93% das respostas, e antracnose com 78% (Thung, 1995). Em Santa Catarina, devido à grande variação climática, a mancha angular tem apresentado um comportamento irregular, de uma forma geral afeta todas as cultivares recomendadas a este Estado, porém tem aparecido no final do ciclo o que não tem causado grandes prejuízos (Hemp & Massigna, 1995). Em São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná e Goiás, esta doença, está sendo nas suas devidas proporções, um problema para a cultura do feijoeiro, o que tem estimulado os órgãos de pesquisas a buscarem em programas de melhoramento cultivares resistentes à mancha angular (Ito *et al.*, 1995; Paula Júnior, 1995; Sartorato & Caprio da Costa, 1995, Miranda *et al.*, 1995, Moda-Cirino & Oliari, 1995).

Em outros países esta doença também tem sido problemática. Na Colômbia foi observado que em regiões favoráveis ao desenvolvimento do fungo, os prejuízos podem chegar a 75%. Observou-se que quanto maior a densidade de plantio maior a intensidade de infecção, devido ao microclima nestas condições (Michel, 1995). O autor acredita que se deve buscar variedades resistentes e implementar um manejo integrado a fim se ter maior sucesso na cultura do feijoeiro. Na Costa Rica está entre as principais doenças e, provavelmente, é a mais importante na África (Araya & Mora, 1995; Buruchara *et al.*, 1995)

1.2.2 O Patógeno e sua multiplicação In vitro

São vários fatores que influenciam na sobrevivência de *P. griseola*, tais como: meios de cultura, temperatura, ausência ou presença de luz, umidade e interações entre estes. O tempo de incubação é definido como o tempo médio entre a inoculação e o aparecimentos dos primeiros sintomas da doença na planta. Para *P. griseola*, foi observada, em condições de campo, uma variação média de 7 a 11 dias, de acordo com os grupos de isolados utilizados e a cultivar (Sartorato, 1989).

O período de latência compreende o tempo decorrido entre a inoculação e a esporulação do patógeno, segundo Parlevit (1979), citado por Sartorato (1989). Quanto ao tempo de esporulação, a literatura é mais abrangente em experiências em laboratórios, com os mais diversos meios de cultura. Entre seis meios de cultura testados por Campos & Zak (1980), os meios TA (Tomate-Ágar) e V-8-a (conjunto de verduras mais agar) foram os que demonstraram maior crescimento micelial e esporulação. O que não foi observado por outros autores que obtiveram melhores resultados com um conjunto de verduras cozidas e CaCO₃,

após 20 dias de incubação (Santos Filho, 1976) ou com meio preparado com de folhas de feijão-dextrose-agar (Silveira, 1967; Sartorato, 1989). Juliatti *et al.* (1995) avaliaram um total de 9 meios de cultura para induzirem o crescimento micelial e esporulação “in vitro” de *P. griseola*, demonstrando que o melhor meio foi a base de carne, legumes, CaCO₃, juntamente com o complexo vitamínico Panvit, que teve um efeito positivo tanto no crescimento micelial quanto na esporulação do isolado utilizado. Outros meios tradicionalmente utilizados por outros pesquisadores não foram eficientemente produtivos. De certa forma, os dados apresentados na literatura mostram que o meio à base de folhas de feijão permite um menor período para a esporulação. Já o meio à base de legumes e CaCO₃ aparentemente oferece um maior número de esporos, embora demore mais tempo para obtê-los (Silveira, 1967; Sartorato, 1989; Santos Filho *et al.*, 1976, Juliatti *et al.*, 1995).

Diante das várias opções em meios, deve-se lembrar a possibilidade de existir interações entre estes e os isolados, sugerindo que não se deve generalizar qual deve ser utilizado e sim buscar informações sobre estas interações (Sato & Piza, 1993).

1.2.2.1 Co-evolução patógeno-hospedeiro

A Biologia Molecular associada a outras informações envolvendo patógeno e hospedeiro pode ser utilizada tanto para caracterizar a variabilidade genética de fitopatógenos, como para mostrar a co-evolução entre patógeno e hospedeiro. A implicação deste trabalho está no auxílio às estratégias a serem utilizadas no melhoramento visando resistência a este fitopatógeno (Guzmán *et al.* 1995; Pastor-Corrales, 1995). Guzmán *et al.* (1995) estudaram a co-evolução entre 62 isolados de *Phaeoisariopsis griseola* originados de três regiões (Malawi, Estados Unidos e Brasil), e diversos genótipos do feijoeiro de diferentes grupos de origem. Do lado do hospedeiro trabalhou-se com base na classificação por isoenzima e faseolinas com dois grupos; grupo 1 (andino) e 2 (mesoamericano). Inoculando-se hospedeiros com isolados de mesma origem ou grupo, observou-se que eram mais patogênicos à cultivares do mesmo grupo. Quando analisou-se estes isolados por meio de marcadores de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) percebeu-se que os 62 isolados poderiam ser divididos em dois grupos, que vem de encontro com a co-evolução patógeno hospedeiro. A grande variabilidade deste fungo é um fator limitante na obtenção de cultivares resistentes.

A utilização de técnicas moleculares permite o monitoramento da ocorrência das raças, verificando sua prevalência em regiões específicas, o que é uma informação essencial para o

direcionamento das cultivares a serem plantadas. Recomenda-se cultivares mesoamericanas ou que possuam genes de resistência desta origem, em locais onde prevalecem raças patogênicas andinas, e vice-versa nos locais que prevaleçam raças patogênicas mesoamericanas (Guzmán *et al.*, 1995; Pastor-Corrales, 1995; Otoyá *et al.*, 1995).

Uma aplicação prática, em parte, do uso das informações de co-evolução no controle da mancha angular é utilizada no continente Africano, que é a mistura de cultivares, o que ainda não é convencional em relação ao agricultor brasileiro (Trutmann & Pyndii, 1994). Desta forma os autores observaram que quando se utilizam substituições de uma variedade local, por uma resistente, há um controle na doença sem o uso de fungicidas, porém ressaltam que a cultivar a ser utilizada deve variar de local a local, uma vez que não obtiveram os mesmos resultados em diferentes locais com a mesma cultivar resistente. A escolha das cultivares pode ser feita com informações obtidas no monitoramento das raças, juntamente com a caracterização genética das cultivares, frente a diferentes isolados quanto a esta doença, completando assim a aplicação prática dos estudos de co-evolução.

1.2.3 Herança da resistência à mancha angular

Informações sobre a herança da resistência à mancha angular e o número de genes envolvidos são relativamente abundantes na literatura. Talvez pela falta de informações sobre a variabilidade genética do fungo ou pela variabilidade dos progenitores envolvidos nas avaliações feitas, observa-se divergências quanto a uma precisa determinação dos componentes genéticos do feijoeiro que lhe conferem resistência, bem como no número de genes envolvidos. Barros *et al.* (1957), com base em vários cruzamentos realizados na Colômbia, demonstraram que a resistência a esta doença era controlada diferentemente, ora por dois genes ou três genes recessivos e independentes em sua maioria, e em poucos casos dominante. Santos Filho *et al.* (1976) utilizando a cultivar resistente Caraota A-260, determinaram que a resistência era controlada por um gene recessivo. Singh & Saini, (1980), utilizando como fonte de resistência o *P. coccineus* cruzado com uma cultivar suscetível de *P. vulgaris*, verificaram que a herança à *P. griseola* é monogênica e recessiva. Sartorato *et al.*, (1993) determinaram em diversos cruzamentos simples, que a herança variou desde um gene dominante a dois genes independentes e complementares. Carvalho *et al.* (1996), em trabalho

preliminar, feito a partir do cruzamento da cultivar resistente AND 277 e a cultivar suscetível Carioca A285, determinou que a herança era monogênica e dominante.

Sartorato (1989) ressalta que para se ter um bom programa de melhoramento sustentável quanto a busca de genótipos resistentes à mancha angular deve buscar o máximo de informações na interação patógeno-hospedeiro bem como nas condições ambientais que influenciam nesta interação. Além do conhecimento na interação patógeno hospedeiro, deve se buscar esclarecer os componentes de resistência parcial, tais como período latente, frequência de infecção e período de infecção. Para uma aplicação prática, deve-se conhecer um ou dois componentes de resistência parcial de maior importância e utilizá-los para selecionar genótipos superiores (Habtu & Zadoks, 1995).

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Parte desta investigação foi realizada em Casa de Vegetação e no Laboratório de Genética Molecular pertencentes ao Departamento de Genética e Bioquímica, e parte em Casa de Vegetação, Câmara de inoculação e no Laboratório de Fitopatologia pertencente ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia.

1.3.1 Material Biológico

1.3.1.1 Cultivares, diferenciadoras, progenitores e populações segregantes

Os cruzamentos envolveram a cultivar Rosinha G2 como progenitor suscetível de acordo com várias publicações (Sartorato, 1989; Sartorato *et al.*, 1991; Sartorato & Rava, 1992; Sartorato *et al.*, 1993). Com exceção dos resultados apresentados por Otoyá *et al.*, (1995), onde apresentam uma co-evolução deste patógeno com o feijoeiro, esta cultivar apresentou resistência genética a alguns isolados de origem andina. A cultivar AND 277 foi escolhida previamente como progenitor resistente, de acordo com a literatura, a qual a colocava como ótima fonte de resistência vertical à mancha angular (Botelho *et al.*, 1993; Sartorato & Caprio da Costa, 1995).

Paula Júnior (1995) discute o fato de que em Minas Gerais praticamente toda área é plantada com cultivares de origem mesoamericana, e portanto uma boa fonte de resistência se encontra nas cultivares de origem andinas e que a cultivar AND 277 está entre as principais fontes utilizadas no Programa Estadual de Melhoramento do Feijoeiro de Minas Gerais.

As sementes híbridas, parentais e populações segregantes, foram plantadas em sacos plásticos escuros. Cada saco com capacidade para 3 litros de substrato, era composto de 3 partes de terra para 1 de esterco de galinha. A cada 30 kg da mistura do substrato foram acrescentados 70 gramas de calcário, e 80 gramas de adubo 4-30-16. No total foram plantados 300 sacos com uma semente em cada. Deste total 252 eram indivíduos da geração F₂, 15 de cada progenitor e 18 híbridos F₁ sendo 10 F₁ (Rosinha G2xAND 277) e 8 F₁ (AND 277x Rosinha G2)

1.3.1.2 Isolamento, multiplicação e determinação da patogenicidade do isolado de *Phaeoisariopsis griseola* Sacc.

Foi obtido um isolado patogênico de *P. griseola*, junto ao CNPAF, porém não monospórico. O isolado foi repicado para multiplicação e esporulação, no Laboratório de Fitopatologia da UFU, em meio alimento infantil Nestlé com carnes e legumes, mais o complexo vitamínico Panvit preparado de acordo com Juliatti *et al.* (1995). O primeiro passo foi conseguir uma cultura monospórica deste isolado. Após 28 dias o isolado estava em plena esporulação. Colocou-se 10 ml de água ultrapura e autoclavada nos tubos para suspensão dos conídios, os quais eram diluídos posteriormente de acordo com a contagem em hemacitômetro. Retirou-se alíquotas da suspensão diluídas, contendo alguns esporos, os quais foram colocados em uma lâmina coberta com uma camada aproximadamente 2 mm de ágar-ágar 3% e levados a estereomicroscópio para separar conídios isolados. Isolou-se pequenos cubos da cobertura de ágar, contendo esporos isolados, e estes foram “semeados” no meio alimento infantil, a onde observou-se o desenvolvimento de colônias monospóricas.

O teste de patogenicidade do isolado foi feito frente aos progenitores, e diferenciadoras e demais cultivares, perfazendo um total de 46, representando os dois grandes centros de origem do feijoeiro, andino e mesoamericano. O ensaio foi em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, com uma semente por recipiente.

Uma vez obtido o isolado monospórico, este foi repicado, tanto em placas de petri, quanto em tubos de ensaio. Em alguns tubos o complexo vitamínico Panvit foi substituído por Suplevit-EMS e Protovit-Roche, na mesma proporção, para crescimento e esporulação. O fungo foi transferido para Laboratório de Genética Molecular e mantido em câmara de crescimento B.O.D a temperatura de ≈ 24 °C por aproximadamente 28 dias.

1.3.2 Inoculações e avaliações

Para retirar os esporos, acrescentou-se 10 ml de água desionizada em cada tubo de ensaio, passava-se um pincel suavemente sobre as colônias para retirada de uma suspensão de esporos, sem os danificarem, filtrava-os por meio de uma camada de gaze. Homogeneizava este filtrado agitando-o suavemente, para a contagem dos esporos com auxílio de um hemacitômetro (câmara de Neubaer) e microscópio. A concentração do inóculo utilizada foi de 2×10^4 esporos por ml de acordo com diversos autores (Santos Filho *et al.*, 1976; Buruchara *et al.*, 1988; Sartorato, 1989; Lacerda *et al.*, 1994).

Uma vez homogeneizado o inóculo contendo os esporos, acrescentou-se 200 µl de Tween 20 (Polyoxyethileno monoolato de sorbitan) a cada 500 ml da mistura de conídios em água, para se ter maior aderência dos esporos às folhas. Neste momento as plantas apresentavam o início do 2^o par de folhas trifolioladas, as quais recebiam por meio de um pulverizador manual, uma névoa do inóculo, em ambas faces da folha, tomando-se cuidado para não aplicar em excesso.

As plantas foram inoculadas ao entardecer, quando apresentavam a primeira ou a segunda folha trifoliolada completamente expandida, irrigadas com aspersão e cobertas com plástico escuro para manutenção da alta umidade e ausência de luz por 48 horas. Durante este tempo as temperaturas máximas e mínimas foram registradas após serem conferidas em um termômetro de máxima e mínima, o qual permaneceu junto as plantas neste período. A média das máximas temperaturas foi de 25 °C e a das mínimas de 21 °C.

Após 15 a 20 dias após as inoculações iniciou-se as primeiras avaliações, que foram realizadas de acordo com escalas diagramáticas de avaliações, com base no tamanho de lesões e área foliar (%) infectada com mancha angular, utilizadas por Sartorato (1989).

1.3.3.1 Análises estatísticas para avaliações das cultivares e para determinação do controle genético da resistência ao fungo *P. griseola*.

As 46 cultivares inoculadas foram avaliadas por meio de análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1 e 5% de probabilidade. Todas análises foram processadas pelo software SAS.

1.3.3.2 Origem evolutiva do isolado monospórico

Apesar de não incluir todas as cultivares diferenciadoras da mancha angular, determinadas pelo CIAT, entre as 46 cultivares avaliadas estavam algumas que são diferenciadoras de ambos centros de origem. O que permite determinar a sua origem evolutiva, no entanto não permite dar um número ao isolado monospórico obtido e denominado como *Pg-UFU1*.

A origem do isolado é determinada de acordo com sua interação com 12 cultivares diferenciadoras, sendo 6 andinas e 6 mesoamericanas (Tabela 1). A forma de avaliação apresentada pelo CIAT é similar à apresentada por Habgood (1970), onde de acordo com uma numeração em progressão geométrica de razão 2, iniciando-se de 1 para primeira cultivar e 32

para a última numa ordem fixa. Inicia-se com as 6 cultivares andinas, e depois as 6 mesoamericanas. A progressão é interrompida quando muda o grupo de diferenciadoras. À cada cultivar diferenciadora que um determinado isolado colonizou adiciona-se o número da mesma, de forma que o número da raça é obtido pelo somatório dos números das cultivares infectadas por ele. A definição da origem é dada de acordo com o somatório obtido em cada grupo de diferenciadoras, em comparação entre os resultados obtidos, de forma que o maior determina a origem. O número máximo que pode ser obtido em cada centro de origem é 63. Como exemplo e orientando-se pela Tabela 1, um isolado que receber o número 31-15 infectou as cultivares andinas; A, B, C, D e E, (1, 2, 4, 8 e 16) e mesoamericanas; G, H, I e J (1, 2, 4 e 8). Como 31 é maior que 15 o isolado é determinado como andino.

Tabela 1. Esquema de cultivares diferenciadoras universais para determinação da origem do isolado, proposta pelo CIAT (1995).

Grupos	Cultivares	A	B	C	D	E	F	Isolado	
								* andino	* mesoamericano
andino	Timoteo	A	1	x			1		-
	G 11796	B	2	x			2		-
	Bolon Bayo	C	4	x			4		-
	Montcalm	D	8	x		x	8	x	8
	Amendoin	E	16	x			16		-
	G 5686	F	32	x			32		-
mesoamericano	Pan 72	G	1						
	G 2858	H	2				-	x	2
	Flor de Mayo	I	4				-	x	4
	Mexico 54	J	8				-	x	8
	BAT 332	K	16				-		-
	Cornell 49242	L	32				-		-
$\Sigma A - \Sigma M^{**}$							63-0		8-15

* As colunas marcadas com "x" representam as cultivares diferenciadoras infectadas.

**Cada isolado ou raça recebe um número, o qual é a somatória dos números na respectiva ordem das diferenciadoras andinas (A) e mesoamericana (M), para os dois exemplos teóricos nesta tabela a Raça andina seria Raça 63-0 e a mesoamericana seria Raça 8-15

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Patogenicidade e origem evolutiva do isolado *Pg*-UFU1 e avaliações de 46 cultivares

A metodologia descrita para obter o isolado monospórico, embora mais trabalhosa do que a descrita por Sartorato (1989), possibilitou obter um isolado monospórico de alta confiabilidade o que deu suporte para estudos de patogenicidade e herança da resistência. Em relação aos isolados monospóricos obtidos posteriormente junto ao CNPAF, não apresentaram um bom desempenho no meio alimento infantil, tendo um bom crescimento micelial, porém observou-se uma insignificante produção de esporos. Uma possível explicação para este mal desempenho talvez seja o fato de que o meio de cultura anterior (composto de folhas de feijoeiro) foi substituído por meio alimento infantil, uma vez que há interação entre o meio de cultura e o isolado (Sato & Pizza, 1993)

Os resultados obtidos com a inoculação de *P. griseola* nas 46 cultivares de acordo com análise de variância foram significativos. A comparação entre médias pelo teste de Tukey, detectou diferenças significativas entre as cultivares (Tabela 2). Em relação ao isolado, sua patogenicidade e sua capacidade de separar as cultivares em resistentes e suscetíveis, ficou evidente, onde algumas demonstraram uma resistência vertical completa, incluindo entre estas a cultivar AND 277, e outras foram extremamente suscetíveis, destacando-se a cultivar Rosinha G2 com maior nota média (Tabela 2). Os resultados obtidos com o isolado *Pg*-UFU1, em relação aos progenitores confirmam o que foram determinados por diversos autores que mostram a alta suscetibilidade da cultivar Rosinha G2 (Sartorato, 1989; Sartorato *et al.*, 1991; Sartorato & Rava, 1992; Sartorato *et al.*, 1993), assim como a ótima resistência vertical da cultivar AND 277 (Botelho *et al.*, 1993; Sartorato & Caprio da Costa, 1995; Paula Júnior, 1995). Portanto este isolado se mostra ideal, para a determinação da herança da mancha angular a partir dos progenitores escolhidos.

Tabela-2. Resposta de 46 cultivares de feijoeiro inoculadas com o isolado monospórico de *P. griseola*. UFU-Uberlândia MG, 1996.

CULTIVARES	CENTRO DE ORIGEM	NOTA MÉDIA	VARIACÃO DA NOTA	Tukey	
				5%	1%
Rosinha G2	mesoamericano	3,67	3-4	a	A
IPA 10	mesoamericano	3,33	3-4	ab	AB
Mulatinho	mesoamericano	2,67	2-3	bc	ABC
Onix	mesoamericano	2,67	2-3	bc	CDE
Ipanema	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Cornell 49242*	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Ouro Negro	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Diamante Negro	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Rio Tibagi	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Jalo EEP558	andino	2,00	2-2	cde	CDE
São José	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Bico de Ouro	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Goiano Precoce	andino	2,00	2-2	cde	CDE
EMGOPA 201-Ouro	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Vitória	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
IPA-6	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Grande Rio	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Xamego	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Enxofre	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Aporé	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Carioca	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
IAPAR 31	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
IRAI	andino	2,00	2-2	cde	CDE
IAPAR 14	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Carioca MG	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
MD 820	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
IAPAR 57	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Corrente	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Emgopa Rubi	mesoamericano	2,00	2-2	cde	CDE
Roxo 90	andino	1,67	1-2	def	CDE
Bagajo	andino	1,67	1-2	def	CDE
RG1342CH60	mesoamericano	1,67	1-2	def	CDE
Ouro Branco	andino	1,33	1-2	ef	DE
Mex 279	mesoamericano	1,33	1-2	ef	DE
Safira	mesoamericano	1,33	1-2	ef	DE
C.C.2	mesoamericano	1,00	1-1	f	E
Novo Jalo	andino	1,00	1-1	f	E
Amarelinho	andino	1,00	1-1	f	E
Jalo Precoce	andino	1,00	1-1	f	E
Roxo RG	andino	1,00	1-1	f	E
BAT 93	mesoamericano	1,00	1-1	f	E
MEX 54*	mesoamericano	1,00	1-1	f	E
G5686*	andino	1,00	1-1	f	E
AND 277	andino	1,00	1-1	f	E

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 0,98187 - D.M.S. 1% = 1,09935

*Diferenciadoras Universais da Mancha Angular do Feijoeiro

Notas: 1= sem lesões. 2= lesões angulares e/ou irregulares, necróticas, até 2,0mm, de 1 a 5% de área infectada. 3= lesões angulares ou irregulares, necróticas, até 2,10 a 3,00mm, ou cobrindo 10 a 20% de área infectada. 4= lesões angulares, necróticas, > 3,1mm, ou de 40 a 60% de área infectada

Quanto ao isolado *Pg*-UFU1, a Figura 1 nos mostra a distribuição das cultivares de ambos os centros de origem quanto à reação ao *P. griseola*, suscetíveis e resistentes. No entanto, as cultivares mesoamericanas tiveram notas média maiores, e poucas apresentaram resistência vertical completa (5.88%), enquanto que as andinas na sua maioria foram resistentes, algumas apresentando resistência vertical completa (50%), nos períodos avaliados. Apesar de não ter sido inoculado todas diferenciadoras, existem basicamente 3 fatos que apontam este isolado como mesoamericano uma vez que: a) foi coletado no Brasil e de acordo com Paula Júnior (1995), há neste país uma prevalência de cultivares mesoamericanas, b) de acordo com a Tabela-2 e Figura-1 o isolado foi mais patogênico às cultivares mesoamericanas, c) dentre as cultivares diferenciadoras universais utilizadas, foi capaz de infectar a cultivar Cornell-49242 o que lhe dá no mínimo na determinação de raça o número 32, mas não infectou a cultivar G5686. Mesmo que seja patogênico as demais diferenciadoras andinas, a somatória dos números só será 31, o que lhe caracterizaria como mesoamericano. Para determinação do número da raça do isolado *Pg*-UFU1 é necessária a inoculação deste em todas diferenciadoras.

De acordo com Guzmán *et al.* (1995); Pastor-Corrales, (1995); e Otoyá *et al.*, (1995), este isolado é mesoamericano, no entanto, o fato deste infectar cultivares andinas é esperado, uma vez que são plantadas comercialmente no Brasil cultivares de ambos centros e de acordo com a co-evolução descrita pelos autores acima, isto é esperado.

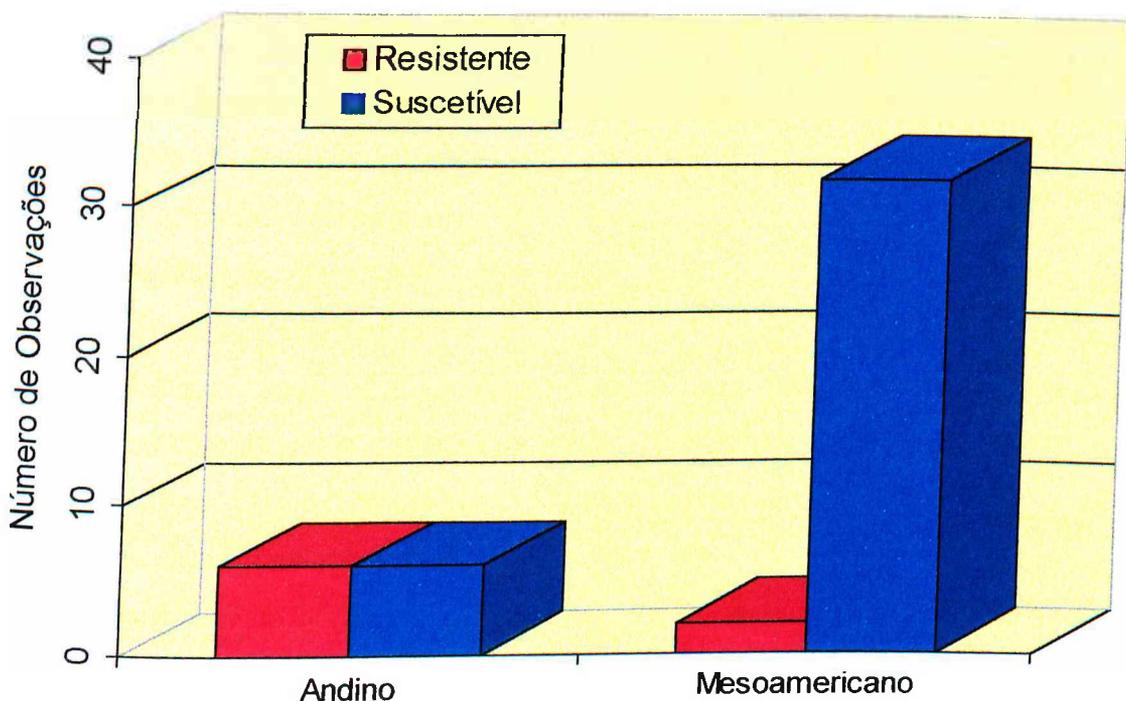


Figura-1. Distribuição da frequência de reação nas cultivares de ambos "pools" gênicos de *Phaseolus vulgaris* ao isolado monospórico de *P. griseola* Pg-UFU1. Uberlândia, MG. 1996.

1.4.2 Herança do feijoeiro à mancha angular

Não existe incompatibilidade genética entre o cruzamento de AND 277 e Rosinha G2, o que informa que a cultivar AND 277 apresenta o genótipo quanto a letalidade $dl_1dl_1dl_2dl_2$, o que a coloca como uma ótima fonte para transferência de genes de resistência (Singh & Gutierrez, 1984; Gepts & Bliss, 1985; Vieira *et al.*, 1989).

Os híbridos foram confirmados com base em caracteres contrastantes entre os progenitores, morfológicos (hábito de crescimento, cor de flor, cor de vagem) e bioquímicos (faseolinas S e T). Estes indivíduos manifestaram as características dominantes de ambos os progenitores ou codominantes no caso das proteínas de reserva. O perfil eletroforético, neste caso em que ocorreu um contraste a nível de proteína de reserva, permite descobrir se realmente há uma hibridação ou uma autofecundação, isto mesmo antes da germinação. A confirmação da hibridação é um ponto importante, uma vez que as características relacionadas com a semente são na maioria maternas, o que implica dizer que dependendo

das características dos progenitores, e quem foi utilizado como parental receptora, a segregação só será observada na geração F₃.

As condições ambientais tanto internamente, quanto externamente, foram favoráveis para o aparecimento de sintomas em diferentes fases do desenvolvimento (Figura-2), que foram observados aproximadamente duas semanas após a inoculação. Verificou-se entre os indivíduos inoculados que, dos 185 F₂, 140 foram resistentes e 45 suscetíveis, segregando numa proporção fenotípica próxima a 3:1, apresentando um chi-quadrado não significativo, com uma probabilidade entre 0,20 e 0,30. O fato de apresentar uma probabilidade relativamente baixa, não deprecia o resultado obtido, uma vez que para estas análises foram utilizadas apenas duas classes (resistentes e suscetíveis), portanto apenas um grau de liberdade. O gene dominante que controla esta resistência foi pouco influenciado pelo ambiente como evidenciada pela não variação da reação dos progenitores e geração F₁. Quanto ao carácter da resistência, de acordo com as inoculações nos híbridos, afirma-se que é dominante, e que não houve variações entre os híbridos, o que mostra que não existe influência de efeitos citoplasmáticos (Tabela 3).

Os resultados demonstram que a herança da resistência à mancha angular é monogênica e dominante, o que corrobora alguns resultados já descritos (Cardona-Alvarez, 1962, Carvalho, 1995). A cultivar AND 277, entre outras característica, apresenta-se como ótimo material genético para estudos com marcadores moleculares associados à resistência.

Tabela-3. Teste do chi-quadrado para avaliação da resistência à mancha angular do feijoeiro. UFU-Uberlândia, 1996.

Populações	N ^o de Plantas inoculadas	Freq. Obs	Freq. Obs	Freq. Esp	Freq. Esp	χ^2	P
		Resistentes	Suscetíveis	Resistentes	Suscetíveis		
AND 277	8	8	0	8	0		
Rosinha G2	11	0	11	0	11		
F ₁ (AND 277 X RG2)	7	7	0	7	0		
F ₁ (RG2 X AND 277)	7	7	0	7	0		
F ₂ (RG2 X AND 277)	185	145	40	138,75	46,25	1.126	0,30-0,20

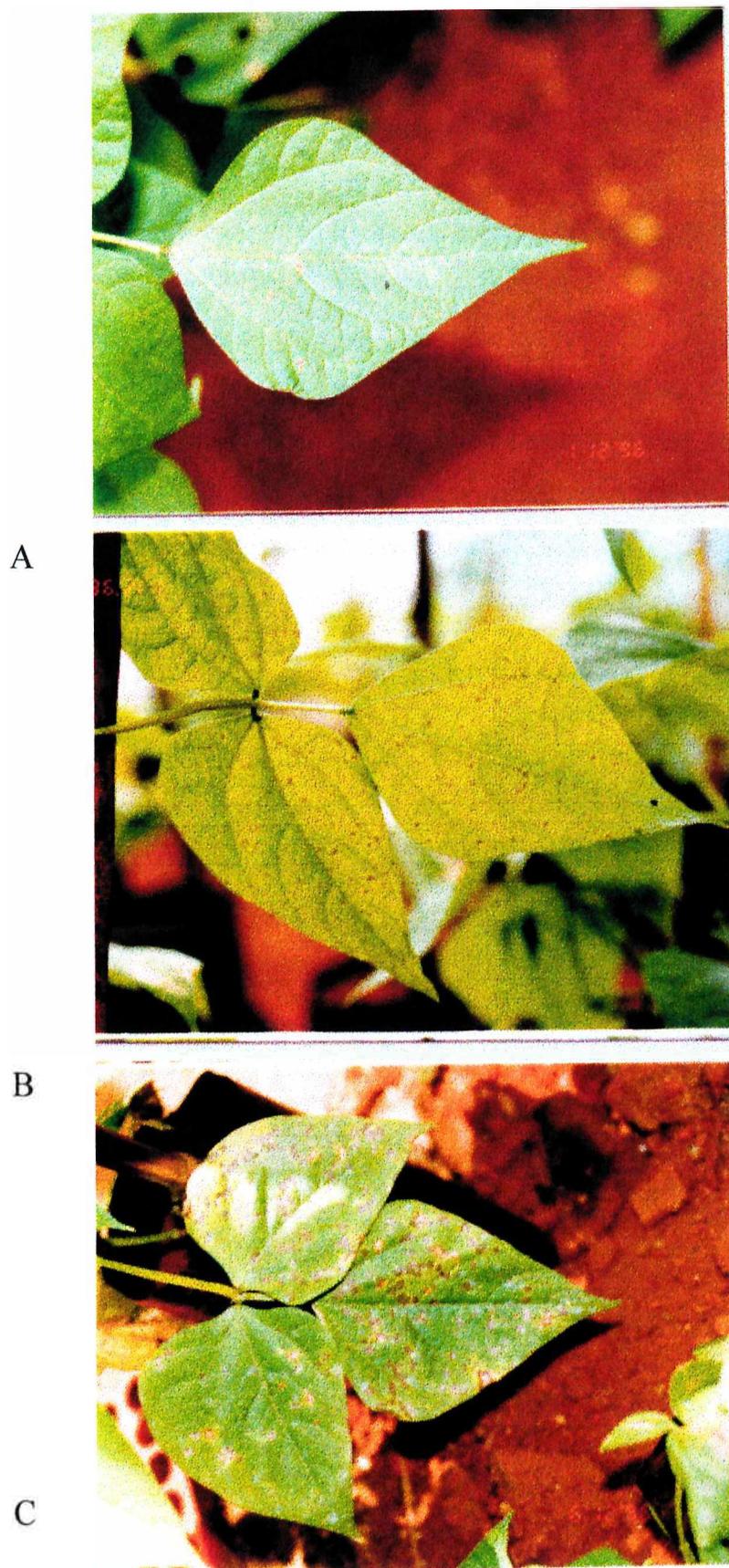


Figura-2. Folhas inoculadas dos descendentes do cruzamento AND 277xRosinha G2.
A) Folha F₁ apresentando-se sadia 20 dias após a inoculação com *P. griseola*
B) Folha F₂ no início da infecção por *P. griseola*, 12 dias após a inoculação.
C) Folha F₂ aos 20 dias pós inoculação com *P. griseola*.

1.5 CONCLUSÕES

O isolado monospórico de *Phaeoisariopsis griseola* Sacc., obtido nesta instituição e denominado neste trabalho *Pg-UFU1*, foi caracterizado dentro do contexto de co-evolução como mesoamericano.

A cultivar AND 277 apresenta uma boa resistência vertical ao isolado *Pg-UFU1* de *P. griseola* estudado. Não apresenta gene de incompatibilidade genética, uma vez que a cultivar Rosinha G2 o apresenta, sendo uma ótima fonte de resistência à mancha angular, tornando-se assim, um ótimo material genético para programa de melhoramento, com a finalidade de incorporar genes de resistência andinos à cultivares mesoamericanas, no entanto, é necessário avaliar outras características agronômicas.

A cultivar Rosinha G2 mostrou-se muito suscetível, à mancha angular, embora passou outras características de interesse agronômica.

A herança da resistência à mancha angular do feijoeiro, ao isolado *Pg-UFU1*, tendo como fonte de resistência da cultivar AND 277, é monogênica e de dominância completa, não apresentando efeitos citoplasmáticos.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAYA, R. & MOURA, F. 1995. Estado actual de la investigacion sobre mancha angular del frijol comun (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.) en Costa Rica. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-14, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colômbia.
- BARROS, O.; CARDEÑOSA & SKILES, R.L. 1957. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colombia. **Phytopathology** 47:3.
- BRENES, B.; CHAVES, G.M.; & ZAMBOLIN, L. 1983. Estimativa de perdas no rendimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causada pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) **Fitopatol. bras.** 8:599.
- BOTELHO, S.A.; SARTORATO, A. & RAVA, C. 1995. Varibilidade patogênica de *Isariopsis griseola* no feijoeiro comum. **XVIII Congresso Paulista de Fitopatologia**. Piracicaba - SP. p-699
- BURUCHARA, R. A.; GATHURU, E.M. & MUKUNYIA, D.M. 1988. Disease progress of angular leaf spot caused by *Isariopsis griseola* Sacc. and its implications on resistance of some bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Acta Horticultura** 218:321-327.
- BURUCHARA, R.; GRIDLEY, H. & AGGARWAL, V. 1995. Overview of research on angular leaf spot in Africa. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-2, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- CAMPOS, A.; J. & ZAK.; L.F. 1980. Estudio de algunas características de *Isariopsis griseola* Sacc., agente causal de la mancha angular del frijol. **Agrociencia**, Champigo, 39:41-48
- CARDONA-ALVAREZ, C. 1958. Herencia de la resistencia a la "mancha angular" en el frijol. In: **IV Reunión Latinoamericana de Fitotecnia**, Santiago, Chile, p. 235-236.
- CARVALHO, G.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; ALZETE-MARIN, A.L.; FALEIRO, F.G.; NIETSCH, S.; FERREIRA, C.F; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. 1996. Inheritance of resistance of accession AND 277 to angular leaf spot in common bean. **Rev. Bras. Genet.** 19:(3)-Suplement p-327.
- GALLI, F. *et al.* 1980. **Manual de Fitopatologia, vol. II - Doenças das Plantas Cultivadas**. Editora Agronômica Ceres Ltda. p. 309 - 33.

- GEPTS, P. & BLISS, F.A. 1985. F₁ hybrid weakness in the common bean. **J. Hered.** 76:447-450
- GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R. JOHNSON, W.C. TEMPLE, S.R. MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; & GEPTS, P. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with in the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology** 85:600-607.
- HABGOOD, R.M. 1970. Designation of physiology races of plant pathogens. **Nature** 227:1268-1269.
- HABTU, A. & ZADOKS, J.C. 1995. Components of partial resistance in *Phaseolus* beans against an Ethiopian isolate of bean rust. **Euphytica** 83: 95-32.
- HEMP, S & MASSIGNMA, A.M. 1995. Considerações sobre cultura do feijão e a ocorrência de mancha angular [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.] no Estado de Santa Catarina-Brasil. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-4, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- ITO, M.F.; CARBONELL, S.A.M.; CASTRO, J.L. & DUDIENAS, C. 1995. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-5, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- JULIATTI, F.C.; GONÇALVES, P.R.; SANTOS, C.C.F dos.; JÚNIOR, M.L.; SANTOS, J.B. dos. & LEITE, E.A. 1995. Isolamento, crescimento micelial e esporulação "in vitro" de *Phaeoisariopsis griseola* Sacc. **Ciênc. e Prát.** 19(2):219-225
- LACERDA, J. T.; COELHO, R.S.B; MARIANO, R.L.R. & MENEZES, M. 1993. Variabilidade patogênica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no Estado de Pernambuco. **Summa Phythopatologica**, 20:93-96
- MICHEL, C.R. 1995. Manejo integrado de la mancha angular del frijol en Bolivia. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-11, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- MIRANDA, P.; FELIX DA COSTA, A.; COELHO NETTO, R.A.; PIMENTEL, M.L.; TAVARES FILHO, J.J. & OLIVEIRA, L.R. 1995. Ocorrência de mancha angular em Pernambuco. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-9, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.

04373/92

- MODA-CIRINO, V. & OLIARI, L. 1995. Breeding for angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) resistance in *Phaseolus vulgaris* at Parana State. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-10, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- OTOYA, M.M.; MAYA, M.M.; PASTOR-CORRALES, M.A. and MAYER, J.E. 1993. Molecular analysis of virulence evolution in the fungal bean pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaeoisariopsis griseola*. In: ROCA, W.M; MAYER, J.E.; PASTOR-CORRALES, M.A. & TOHME, J. 1993. **BARN - Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network**. 431p CIAT, p 261-273. Cali, Colombia.
- PASTOR-CORRALES, M.A. 1995. La diversidad en virulencia y molecular de *Phaeoisariopsis griseola*, su evolución con el frijol común y las implicaciones para el mejoramiento del frijol por resistencia a la mancha angular. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-13, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- PAULA JÚNIOR, T.J. 1995 Mancha angular do feijoeiro no Estado de Minas Gerais, Brasil. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans**. p-6, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- SANTOS FILHO, H.P.; FERRAZ, S. & VIEIRA, C. 1976. Resistência à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Ceres** 23(123):226-230.
- SANTOS FILHO, H.P.; FERRAZ, S. & SEDIYAMA, C.S. 1978. Influência da época de inoculação de *Isariopsis griseola* Sacc., sobre três cultivares de feijoeiro. **Fitopatol. bras.** 3:175-180.
- SARTORATO, A. 1989. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc.** Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba, SP. 131 p.
- SARTORATO, A. & RAVA, C.A. 1992. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatol. bras.** 17:247-251.
- SARTORATO, A. & CAPRIO DA COSTA, J.G. 1995. Principais resultados de pesquisa obtidos com mancha angular no CNPAF no período de 1980-1995. **International**

- Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans.** p-7-8, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; MENTEN, J.OM. & BERGAMIN FILHO, A. 1991. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatol. bras.** 16:43-45.
- SARTORATO, A.; ZIMMERMANN, M.J.O.; RAVA, C.A. & CARNEIRO, J.E.S. 1993. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo. V 13, n1, p-30 jan/mar.
- SATO, E.T. & PIZA, S.M. de T. 1993. Crescimento micelial e esporulação de *Isariopsis griseola* em diferentes meios de cultura. *In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO*, 4, Londrina-IAPAR, p-50
- SILVEIRA, G.A. 1967. **Evaluación de la resistencia de frijol a la mancha angular, algunos aspectos fisiológicos de *Isariopsis griseola* Sacc. y patogenicidad de algunas cepas colectadas en Costa Rica.** Turrialba,. 59p (Mestrado - Universidade de Costa Rica).
- SINDHAN, G.S. & BOSE, S.K. 1980. Epidemiology of angular leaf spot of french bean caused by *Phaeoisariopsis griseola*. **Indian Phytopathology**, 33:64-68
- SINGH, A.K. & SAINI, S.S. 1980. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica** 29:175-176
- SINGH, S.P. & GUTIERREZ, J. 1984. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. **Euphytica** 33:337-345.
- THUNG, M. 1995. Shift in bean-disease importance due to changes in cultural practices and in seed preferences in Brazil. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans.** p-3, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.
- TRUTMANN, P. & PYNDJI, M.M. 1994. Partial replacement of local common bean mixtures by high yielding angular leaf spot resistant varieties to conserve local genetic diversity while increasing yield. **Ann. Appl. Biol.** 125:45-52

- VIEIRA, A.L.; RAMALHO, M.A.P & SANTOS, J.B. dos. 1989. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. **Brazil. J. Genetics** 12(12):169-171
- VIEIRA, C. 1994. Principais doenças do feijoeiro. *In*: Feijão de inverno. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v.17, n. 178, p.43-46.

RESUMO

CAPÍTULO-2 VIEIRA, Gismar Silva. Mapeamento de Caracteres Importantes para o Melhoramento Genético do Feijoeiro. Uberlândia: UFU, 1997, 24-67p (Tese de Mestrado em Genética e Bioquímica)

A aplicação de técnicas de Melhoramento Genético depende entre outras, de informações básicas da Genética. Estudos de ligação são importantes, na escolha da melhor metodologia a ser utilizada em um processo de seleção ou melhoramento. Com a finalidade de realizar uma análise genética e mapeamento de caracteres importantes para o melhoramento do feijoeiro procedeu-se esta investigação. A partir do cruzamento entre a cultivar AND 277 de origem andina e Rosinha G2 de origem mesoamericana, obteve-se as progênes F_1 e F_2 para estudos: a) agronômicos, (gene de resistência à mancha angular - *Als*), b) morfológicos, (hábito de crescimento, cor de semente, flor e vagem, escurecimento da corona, peso, largura e comprimento da semente), c) bioquímicos, (faseolina, e *Spa* e *Spb*) e d) moleculares (marcadores de RAPD). Para peso, comprimento e largura, verificou uma alta herdabilidade, com 4,98, 2,89, e 1,46 genes, respectivamente. As demais informações genéticas foram mapeadas pelo programa "Software" Mapmaker 3b, e a estrutura do grupos foi montada de acordo com LOD score 3.0-0.3 cM, o qual as dividiu em três grupos de ligações. O grupo I apresentou uma extensão mapeada de 95,9 cM incluindo duas marcas moleculares (RAPDs) ligados ao *Als* e ao gene *C*, que determina coloração na semente. No grupo II mapeou-se 57,06 cM o que compreendeu um RAPD mais os genes *V*, que determina cor de flor mais o gene *Cor* que é responsável pela coloração escura na corona. O grupo III ficou restrito as características bioquímicas estudadas, porém foi determinado uma distância de 1,7 cM entre *Spa* e *Spb* o que não havia sido relatado. O hábito de crescimento (*HC*) e demais locos, de acordo com o número de marcadores estudados, não correlacionaram com nenhuma característica estudada.

ABSTRACT

CAPÍTULO-2 Genetic Mapping of Important characters for the Genetic Improvement of Common bean.

The application of techniques of molecular Genetic Improvement depends on basic information in Genetics. Connection studies are important, in the choice of the best methodology to be used in a selection process or improvement. With the purpose of accomplishing a genetic analysis and mapping important characters in the improvement of the common bean genome this investigation was proceeded. F₁ and F₂ generations of the cross between cv. AND 277 (Andean origin) and Rosinha G2 (Middle American), was obtained to investigate the following characters: a) agronomic, (resistance gene to the angular leaf spot - Als), b) morphologic, (growth habit, seed color, flower and bean, darkness of the corona, weight, width and length of the seed), c) biochemical, (phaseolina, *Spa* and *Spb*) and d) molecular (RAPD markers). For seed weight, length and width, it was verified a high broad sense, heritability, with 0.48, 0.47 and 0.60, respectively, It was estimated 4.98, 2.89 and 1.46 genes, controlling these seed characters, respectively. The other genetic information were mapped using the Mapmaker 3b software, and the structure of the groups was set up in agreement with LOD score 3.0-0.3 cM, which divided them in three groups. The group I presented a region of 95.9 cM mapped including two molecular markers (RAPDs) linked to Als and the C gene, that determines color seed. In the group II, 57.06 cM was mapped including one RAPD marker and the *V*, and *Cor* genes, conditioning respectively flower and corona color. The group III was restricted to the biochemical markers, *Phs*, *Spa* and *Spb*, with a distance of 31.0 cM between *Phs* and *Spa*, and a distance of 1.7 cM between *Spa* and *Spb*, which had not been determined in the literature. The growth habit and other locis, in agreement with a number of studied markers, did not correlate with any studied character.

2.1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie importante na alimentação humana. Cultivado em praticamente todo o mundo, tem sido utilizado como fonte protéica e energética. É consumido das mais diversas formas e partes da planta, principalmente em países subdesenvolvidos. De forma geral, o grande consumo do feijoeiro é para complementar alimentações a base de arroz, milho, trigo, banana, mandioca e outros (Singh, 1986).

Doenças, pragas e deficiências nutricionais limitam fortemente a estabilização e a produtividade das variedades de feijão existentes. Com plantios de terceira época nos quais o produtores utilizam mais tecnologia, e as condições climáticas são desfavoráveis à doenças importantes como, algumas viroses, um progresso substancial tem sido observado. Existem dificuldades impostas às pesquisas que limitam a habilidade de resolver alguns dos principais problemas na produção de feijão. Dentre eles, um dos principais problemas é a quebra da resistência à doenças e o uso inadequado de fontes de tolerância e ou resistência (CIAT, 1990; Vieira, 1994).

No Brasil se cultiva feijoeiro tanto de origem andina (grupo manteiga), quanto de origem mesoamericana (carioca, jalinho, preto e outros de sementes pequenas). Em Minas Gerais, e possivelmente em todo o país, há uma predominância de cultivares mesoamericanas (Paula Júnior, 1995).

Os cruzamentos entre cultivares andinas com mesoamericanas, apresentam resultados ricos em informações genéticas, tanto a níveis morfológicos, bioquímicos, moleculares como agronômicos. Do ponto de vista básico estas informações têm sido utilizadas para gerarem mapas de ligações saturados de marcadores, especulações da origem, isolamento geográfico e outros. Estes mapas são aplicados diretamente na orientação em programas de melhoramento, assim como os pontos de referências neles obtidos podem identificar genes de resistência a patógenos, alterações em características quantitativas, como peso e tamanho de semente, nodulação e outras (Zimmermann *et al.*, 1988; CIAT, 1990; Vallejos *et al.*, 1992; Nodari *et al.*, 1993a; Nodari *et al.* 1993b; Jung *et al.*, 1996).

Até o momento a biologia molecular tem sido uma ótima ferramenta para estudos de diversidade genética, marcadores moleculares associados a genes de segregação Mendeliana e atualmente está sendo empregada para estudos de loco de características quantitativas (QTLs) assistindo o melhoramento genético de várias espécies vegetais (Nodari *et al.* 1993b; Edwards

& Page, 1994; Miklas *et al.*, 1996). O estudos destes locos partem do princípio que, embora a característica seja quantitativa, mas geralmente há um gene principal que é responsável pela maior manifestação da característica, e neste caso, o que se busca é associar um marcador molecular a este gene maior e, em consequência, tratar uma característica quantitativa como uma qualitativa embora não tenha herdabilidade igual a 1, pois este gene representa a maior parte e não todo loco.

É importante enfatizar que o feijão por ser uma espécie diplóide, com reprodução por autogamia, presença de diversas espécies silvestres, e uma ampla distribuição geográfica, satisfaz condições que o torna uma planta modelo para estudos de transferência genética, bem como expressão gênica, comportamento do genoma, evolução e mapeamento genético.

A finalidade desta investigação foi obter uma população contrastante oriunda de cultivares dos dois grandes "pools" gênicos do feijoeiro, a qual permitisse realizar uma análise genética envolvendo caracteres: morfológicos, bioquímicos, moleculares e agrônômicos, associando-os a grupos de ligação em um mapa genético. Estas informações podem ser úteis no melhoramento do feijoeiro, facilitando a seleção assistida por marcadores moleculares.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Morfológicos

2.2.1.1 Hábito de crescimento

Basicamente o hábito de crescimento do feijoeiro é dividido em dois grupos; indeterminado e determinado. Aparentemente o tipo determinado não apresenta variações, mas com um pouco de cuidado nas observações percebe-se que existem plantas com hábito determinado apresentando poucas ramificações ou várias, Evans, (1973) citada por Debouck, (1991). Quanto ao tipo indeterminado tem-se uma divisão que agrupa o tipo prostrado com um grande número de ramificações e o tipo trepador com poucas ramificações, acredita-se que ao longo de milhares de anos os agricultores primitivos selecionaram estes diferentes hábitos, principalmente de acordo com a forma de plantio; em monocultura ou consorciada. Um terceiro grupo dentro do tipo indeterminado e raro entre as coleções mundiais é o tipo arbusto com poucos ramos e eretos (Debouck, 1991). A nomenclatura usual é a classificação em tipos; I, II, III e IV, onde o tipo I é determinado e os demais são indeterminados, correspondendo respectivamente ao que foi descrito acima (Zimmermann *et al.*, 1988).

Embora tenham variações quanto ao hábito de crescimento, a diferença entre indeterminado e determinado é controlada geneticamente por apenas um gene dominante para o tipo indeterminado (Norton, 1915, citado por Debouck, 1991).

2.2.1.2 Cor no Feijoeiro

Cor da flor, hipocótilo, talo e sementes têm sido estudadas por muitos pesquisadores alguns dos genes que controlam estas características têm efeito pleiotrópico ou estão intimamente ligados. Cardenas R. (1963, 1964) citado por Debouck (1991), descreve que a cor rosa das flores é determinada pela presença do gene *R* e a cor branca é pelo alelo recessivo *r*. Quando o gene *I* esta presente com o gene *R* a cor passa para violeta. Provavelmente, de acordo com as publicações de diversos autores, o gene *R* que o autor se refere é o mesmo V^{Iae} que outros atribuem a cor rosa e o gene *I* deve ser o gene *P*, porém a cor não passa de rosa para violeta com a presença do gene *I* (*P*) e sim com a presença gene *P* mais o gene *V* (Debouck, 1991). A cor do hipocótilo é controlada por dois genes complementares e dominantes (*M* e *N*). Entretanto o gene *r* quando presente teve efeito em um gene *M* ou *N*,

responsáveis pela cor do hipocótilo e nenhuma planta de flor branca produziu hipocótilo escuro (Debouck, 1991).

Estudos de Moraes & Vieira (1968) e Vieira (1969) sobre a herança de cor de flor, sementes e vagens, mostram que o gene *t* determina flor branca e coloração parcial nas sementes (café). O gene *T* e alelos *V^{lae}* e *v* produzem flor rosa e branca, respectivamente.

Vieira & Shands (1965) obtiveram uma mancha violeta acastanhada na base do estandarte na cultivar Rico 23, esta mancha é controlada geneticamente por um simples gene dominante (*Mf*), independentemente da cor da flor. Esta expressão no entanto foi suprimida pelo alelo recessivo *p* na cultivar White Kidney. Mais uma vez percebe-se que apesar de algumas características separadamente sejam monogênicas, quando se refere a cor no feijoeiro o loco *P* esta sempre presente, onde na presença e ausência de cor seja qual for a parte estudada.

Nodari *et al.*, (1993a), a partir do cruzamento entre duas cultivares, uma andina com flor rosa e outra mesoamericana com flor branca, apresentaram dados que comprovam que a cor da flor é monogênica ou pelo menos controlada geneticamente por um loco dominante, que embora apresentasse uma distância de aproximadamente 45 cM, estava no mesmo grupo de ligação que o loco *Cor* o qual controla escurecimento da corona da semente no feijoeiro. Cor de flor pode ser estudada como uma característica monogênica, porém é influenciada por três diferentes genes *P*, *T*, e *V*. Nodari *et al.* (1993a), a partir dos resultados obtidos afirmaram que os genes *P* e *T* devem ser excluídos, uma vez que quando presentes induzem simultaneamente uma completa ou parcial ausência de pigmentação nas sementes respectivamente, o que não foi observado. Quanto ao gene *V*, também não foi possível associá-lo ao gene *FC*, pois este não está ligado ao loco *Cor* (Lamprecht, 1961, citado por Nodari *et al.*, 1993a). Neste caso, resta apenas o loco *C*. Porém a população estudada mostra que as características cor de flor (*FC*) e *Cor* estão distantes 45 cM, neste caso, foi sugerido que se faça cruzamentos testes para que se possa descobrir qual o gene que realmente controla, nesta população, a cor da flor.

Bassett (1995) em dois cruzamentos envolvendo linhagens com o mesmo "background" genético porém com uma diferença, onde uma apresentava flor rosa e corona escura e outra flor branca e corona clara. No primeiro cruzamento encontrou apenas duas classes; flores rosa e corona escura e flor branca e corona clara, numa segregação de 3:1 respectivamente com probabilidade de 0,12. O que lhe permitiu dizer que existe uma forte ligação entre estes dois

genes ou efeito pleiotrópico. Quanto ao segundo cruzamento também foi encontrado as mesmas duas classes, porém a segregação 3:1 não foi aceita $p < 0.001$. O autor concluiu que a segregação destes genes não é independente, havendo ligação ou os dois caracteres sofrem efeitos de um simples loco *V*. A presença de "background" genético de *P. coccineus* nos progenitores é a justificativa de Bassett (1995) pela segregação não esperada. Finalmente, o autor com sua vasta experiência afirma que entre os diversos genótipos por ele estudados nunca foi encontrado um que apresentasse flor branca e corona escura, ou flor rosa e corona clara.

2.2.1.3 Tamanho de sementes

O tamanho de semente, assim como a faseolina, é uma característica altamente associada com a origem do feijoeiro (Gepts *et al.*, 1986a). As isoenzimas Adh-1 e Got-2 estão ligadas a regiões genômicas responsáveis por vários fatores do tamanho da semente (peso, comprimento e largura), por outro lado estas proteínas não estão ligadas ao grupo de ligação da faseolina (Vallejos & Chase, 1991a). Estas informações básicas permitem especular quanto a base genética do feijoeiro, uma vez que características independentes conseguiram permanecer juntas durante sua evolução, se dividindo em dois grandes centros de origem, a partir de estudos tanto de faseolina quanto de tamanho de semente.

Produtividade é o objetivo final de todo programa de melhoramento, apesar do tamanho de semente ser um componente, nem sempre é possível selecioná-lo positivamente, pois esta característica apresenta correlação negativa com alguns componentes primários de produtividade do feijoeiro. Sabe-se que é um caracter de alta herdabilidade, no entanto, quanto ao número de genes envolvidos há variadas informações (Santos, *et al.*, 1985; Gepts *et al.*, 1986a; Reis *et al.*, 1981; Mesquita *et al.*, 1990).

2.2.2 Bioquímicos

Os marcadores obtidos sejam por uma reação enzimática diferenciada entre indivíduos, ou por uma proteína constitutiva polimórfica, são caracteres de interesse em estudos de genética e evolução como: estudos de diversidade genética, estudos de ligações associadas a características importantes e outros. Desta forma os marcadores bioquímicos, juntamente com outros, têm contribuído para elucidação de vários estudos genéticos. No feijoeiro muito se

tem estudado em relação a isoenzimas e proteínas de reserva, com enfoque maior para a faseolina (Gepts *et al.*, 1986a; Vallejos *et al.*, 1991).

A origem do feijoeiro e centro de domesticação ainda não tem um ponto final quanto ao local exato de início. A teoria mais aceita, visto estudos morfológicos, bioquímicos e arqueológicos, é que existam dois grandes centros de origem, um andino, o qual apresenta cultivares com sementes médias e grandes e faseolina "T", "C", "H", abrangendo desde o norte da Argentina até o norte da Colômbia, e o centro mesoamericano caracterizado por cultivares de sementes miúdas (<25 mg) e faseolina tipo "S", "Sb", "M", e tem como área geográfica a América Central até o sul dos Estados Unidos. Esta divisão não é fixa, onde encontram tanto cultivares com faseolina ou mesmo com tamanho de sementes variados dentro do mesmo centro (Gentry 1969; Berglund-Brücher & Brücher, 1976; Gepts *et al.*, 1986a; Gepts, 1990; Koenig *et al.*, 1990; Kaplan, 1981; Singh *et al.*, 1991).

Gepts & Bliss (1986), estudando feijão silvestre exclusivamente da Colômbia, sugeriram que este país é o encontro dos dois grande centros de origem de domesticação do feijoeiro. Debouck *et al.*, (1993), estenderam as pesquisas feitas anteriormente até o Equador e norte do Peru, pois estes países ainda não tinham sidos descritos. Os resultados foram similares aos de Gepts & Bliss (1986), acrescentando a estes uma extensão do ponto de encontro para mais estes dois países, uma vez que nestes também encontrou-se formas intermediárias de ambos os centros, sugerindo estudar mais regiões. No entanto, Tohme *et al.* (1996) utilizaram a técnica de AFLP, para estudarem genótipos silvestres de todas as regiões de domesticação do feijoeiro, e foi observado que realmente os genótipos Colombianos apresentaram maior variabilidade genética, a ponto de apresentarem uma distância genética superior à observada entre linhagens andinas e mesoamericanas, e não observou uma divisão clara em apenas dois grandes grupos de domesticação, como nos trabalhos com dados morfológicos, bioquímicos e até mesmo por moleculares (Gepts *et al.*, 1986a; Gepts, 1990; Singh *et al.*, 1991b; Singh *et al.*, 1991c; Becerra Velasquez & Gepts, 1994).

A faseolina além de sua grande importância nos estudos de origem e evolução, é um ponto bastante relatado nos estudos de ligações e mapeamento. Existem vários motivos que fazem com que esta proteína seja tão estudada, tais como: é um ponto de referência entre vários estudos de ligações, é a proteína de reserva mais importante (30-50%), está intimamente associada a origem do feijoeiro, está associada a incompatibilidade genética do feijoeiro quando se intercroza genótipos dos dois centros, tem sido padronizado por diferentes

procedimentos tanto a extração quanto a eletroforese, sendo um bloco gênico pode ser estudada como um caráter de herança simples, não tem sua expressão influenciada pelo ambiente, está ligada a vários caracteres agrônômicos, morfológicos importantes no feijoeiro, a outras proteínas de reserva e a isoenzimas (Gentry, 1969; Berglund-Brücher & Brücher, 1976; Ma & Bliss, 1978; Singh & Gutierrez, 1984; Gepts & Bliss, 1985; Gepts *et al.* 1986a; Kaplan, 1981; Brow *et al.* 1981a; Koenig *et al.* 1990; Gepts, 1990; Singh *et al.*, 1991; Vallejos & Chase, 1991a; Chase *et al.*, 1991; Koeng & Gepts, 1992; Vallejos *et al.*, 1992).

2.2.3 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são aplicados em programas de melhoramento para reduzirem o número de retrocruzamentos, e/ou cruzamentos dialélicos, ligações a genes de resistência, controle de qualidade por “fingerprinting”, incorporações de genes e monitorar introduções de genes de plantas silvestres. A utilização de marcadores moleculares apresenta várias vantagens sobre marcadores morfológicos convencionais tais como: exibem neutralidade fenotípica sem influência ambiental, são herdados em dominância ou codominância, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como adultos, apresentam resultados positivos quanto ao melhoramento de características quantitativas (Beckmam & Soller, 1983; Tanksley & Hewitt, 1988; Tanksley *et al.*, 1989; Lander & Botstein, 1989; Haley, 1994b). Estas opções permitem teoricamente um número infinito de marcadores a serem analisados em uma população. Existem três métodos básicos de marcação molecular: RFLP, RAPD, e AFLP, ambos detectam polimorfismos em seqüências específicas do DNA, empregando técnicas diferenciadas, mas utilizando das variações genômicas existentes entre indivíduos.

2.2.3.1 Marcadores Moleculares RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).

O polimorfismo ou contraste genético gerado nos marcadores tipo RFLPs, está especificamente em regiões com variações na seqüência de nucleotídeos de uma espécie, e estas variações coincidem com uma região específica de reconhecimento por uma endonuclease. Ao colocar o DNA genômico de diferentes indivíduos, na presença de uma determinada enzima, ocorre a restrição de ambos, no entanto na região que diferencia geneticamente os indivíduos, que é o sítio de restrição, ocorrem cortes diferenciados devido

as perdas dos sítios por inserções ou deleções de regiões genômicas relacionadas aos sítios de restrição, que é percebido quando este DNA fragmentado é passado para uma membrana, por um processo descrito por Southern (1975), e hibridizado com um fragmento genômico (sonda), previamente clonado em bactéria, e marcado. Obtém-se o material para a revelação com autoradiografia, e de acordo com a restrição e homologia entre a sonda e o DNA na membrana observa-se marcas genéticas, iguais ou diferentes, de um indivíduo para outro, o que quando diferente, é um RFLP, o qual pode conter ou não uma informação genética importante ou simplesmente um ponto para ser mapeado.

No início da década de 90 surgiu independentemente e simultaneamente duas publicações do uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), gerando fragmentos polimórficos. Interessante que mesmo partindo de uma literatura básica diferenciada os dois grupos conseguiram demonstrar a síntese de DNA *in vitro* gerando polimorfismo sem nenhum conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos, utilizando genomas completamente diferentes (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Com o tampão e os compostos básicos para a reação enzimática da Taq DNA polimerase mais oligonucleotídeos iniciadores ("primers"), os quais têm homologia parcial ou total com regiões genômicas, consegue-se um padrão polimórfico de acordo com o reconhecimento de parte do genoma pelo "primers". Neste caso o resultado é uma amplificação casual de uma determinada seqüência de nucleotídeos, isto ocorre de forma dominante, ou seja são amplificadas seqüências de indivíduos tanto homozigotos quanto heterozigotos, e o polimorfismo é observado ao comparar amplificações de diferentes indivíduos. Um ponto básico que separa as duas técnicas é a quantidade de nucleotídeos de cada "primer", onde Welsh & McClelland (1990) utilizaram acima de 20 nucleotídeos e Williams *et al.*, (1990) com "primers" menores (10 nucleotídeos). As técnicas receberam denominações diferentes, sendo AP-PCR (Arbitrary Primers Polymerase Chain Reaction) e RAPD (Random Amplified Polymorphims DNA), respectivamente.

Em pouco tempo esta técnica se difundiu em todo o mundo, ganhando informações importantes quanto a estudos de otimização das reações, sequenciamento de DNA de regiões importantes das mais diversas espécies, o que permitiu direcionar as amplificações obtendo os mais diversos diagnósticos e marcadores associados a genes de interesse.

A Biologia Molecular se constitui hoje numa das mais importantes ferramentas para se integrar aos programas de melhoramentos das mais diversas culturas. Utilizando desta

técnicas pode-se: entender melhor a interação patógeno hospedeiro, mapear genes de resistência, obter marcadores moleculares que segreguem associados a genes de resistência ou suscetibilidade, estudar a diversidade genética de patógenos e hospedeiros e retirar importantes informações para o programa de melhoramento, estudos de coevolução entre patógeno e hospedeiros, outras informações de grande importância. (Michelmore *et al.* 1991; Guzmán *et al.*, 1993, Neema *et al.*, 1993)

Adam-Blondon *et al.* (1994) utilizando tanto marcadores de RAPD e RFLP ligados ao gene dominante (*Are*), responsável pela resistência do feijoeiro à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em linhagens isogênicas e sua progênie com diferente “backgrounds” genéticos, conseguiram identificar genótipos resistentes e suscetíveis. Os marcadores RAPD mais próximos aos gene *Are* foram melhor estudados por meio de “primers” específicos amplificando uma região denominada SCAR (“Sequence characterized amplified region”). Outros resultados utilizando RFLP e RAPD também foram encontrados por (Chunwongse *et al.*, 1994) na localização cromossomal de marcadores moleculares ligados ao gene (*Lv*), que confere resistência ao tomateiro ao míldio.

Michelmore *et al.* (1991) apresentaram uma metodologia que utiliza marcadores moleculares, RAPD e RFLP, de forma eficiente e rápida na identificação de características genéticas de alta herdabilidade, dominante ou recessiva, trabalhando com análise de “bulks” de populações segregantes (BSA). Os autores aplicaram esta metodologia na cultura da alface e conseguiram demonstrar polimorfismo associados aos alelos de resistência em “bulks” segregantes resistentes e suscetíveis. Carvalho (1995) identificou marcadores RAPD ligados a genes de resistência ao cancro da haste em soja, utilizando também o método BSA. Outros resultados foram obtidos por Miklas *et al.* (1993) e Haley, *et al.* (1994a) em feijão em relação a resistência a ferrugem do feijoeiro.

Uma outra função na utilização de marcadores moleculares é facilitar a investigação na resposta do hospedeiro em relação aos componentes de resistência. Freymark *et al.* (1994), conseguiram demonstrar que a resistência genética estava associada a um loco de característica quantitativa (QTLs), e que a severidade e número de lesões envolvem genes de ação aditiva, dominância parcial e sobredominância e que o tamanho das lesões estão associados a QTLs nos cromossomos 7L e 5L e que no cromossomo 7L o gene é recessivo.

Quando o caráter ligado a resistência envolve diferentes genes, e entre estes ocorrem relações epistáticas, a utilização de marcadores moleculares tipo RAPD ligado a cada gene

pode auxiliar na piramidização de genes e desta forma ter uma maior eficiência no programa de melhoramento (Haley, *et al.* 1994b).

Os RAPDs são casuais e processados de maneira rápida, o que permite utilizar o mesmo “primer” em diferentes espécies e em menos tempo, no entanto os RFLPs são mais específicos, pois são obtidos do próprio genoma estudado, o que lhes garantem maior repetibilidade.

2.2.3.3 Marcadores Moleculares tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

O polimorfismo obtido a partir de fragmentos cortados com enzimas de restrição e amplificados (AFLP) é a tecnologia mais recente para se estudar genomas de procariotos e eucariotos. Esta técnica consiste em agrupar a praticidade e velocidade do RAPD com o uso de enzimas específicas de restrição, o que a torna mais confiável e rápida (Lin & Kuo, 1995).

Para obter polimorfismo parte-se de um de DNA de altíssima qualidade, o qual será digerido por duas enzimas de restrição, uma de sítio raro e outra de sítio freqüente. Como se conhece a seqüência de nucleotídeos de cada sítio, sintetiza-se artificialmente fragmentos de DNA com 20 a 25 nucleotídeos além dos complementares ao sítio de cada enzima, estes são denominados adaptadores. Os adaptadores se ligam às extremidades dos fragmentos cortados por homologia ao sítio de restrição. Os primers utilizados na amplificação dos fragmentos polimórficos são constituídos em parte do sítio de restrição e parte do adaptador. Inicialmente é gerado um grande número de fragmentos cortados pelas enzimas, os quais são ligados aos adaptadores formando os moldes para a síntese *in vitro* de um grande número de fragmentos cortados. Feita esta amplificação inicial, é necessário realizar uma seleção, a qual é feita geralmente em duas etapas. Na primeira utiliza novos oligonucleotídeos iniciadores de reação com acréscimo de uma base na extremidade 3' em relação aos anteriores, desta forma teoricamente $\frac{1}{4}$ de fragmentos são selecionados. A segunda seleção parte do mesmo princípio, no entanto acrescentando mais dois nucleotídeos, e procede a reação, o resultado será visualizado posteriormente em autoradiografias ou coloração por Nitrato de Prata (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Cho *et al.*, 1996).

O polimorfismo gerado pelo fragmentos de AFLP é o somatório obtido por alterações em relações de sítios de restrição, tais como: deleção, inserção, mutação de ponto, inversões, mais as alterações provocadas com adição de nucleotídeos específicos nos “primers”. A

visualização tanto pode ser feita por autoradiografias quando se utiliza iniciadores de reações, marcados com radioatividade ou com fluorescência, ou mesmo em gel de poliacrilamida corado com Nitrato de Prata. Esta técnica já esta sendo empregada em várias espécies, sendo recomendada para estudos genéticos de espécies de base genética estreita, mapas de ligações e estudos de diversidade genética (Lin & Kuo, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Meksem *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 1996; Tohme *et al.*, 1996;).

2.2.4 Mapeamento

A localização física do genes em grupos de ligações é de grande importância na genética básica e aplicada. Na maioria dos mapas, estes grupos representam o número haplóide de cromossomos. De forma lógica, percebe-se que o número de genes em um determinado indivíduo é bem superior ao número básico de cromossomos, aumentando a probabilidade de dois genes estarem ligados. Anteriormente não se tinha esta idéia, ou melhor, o que se conhecia era apenas as leis primordiais de Mendell. No entanto várias estudos genéticos não podiam ser explicados por estas leis uma vez que não ocorria segregação independente, o que só foi elucidado mais com a teoria do crossing-over e ligação entre genes. Mais tarde, Thomas Morgan (1911) relacionou a frequência de recombinação com distâncias físicas entre genes, onde quanto maior a distância entre genes, maior a frequência de recombinação e menor a chance de estar no mesmo cromossomo ou grupo de ligação.

Estes conhecimentos são fundamentais para construir os mapas físicos. A aplicação da localização dos genes ou marcadores genéticos no mapa permitem aos geneticistas e melhoristas, manipularem os genomas direcionando o método de melhoramento ou número de cruzamentos a serem realizados.

Atualmente existem bons programas de computadores que auxiliam e desenvolvem, a partir de informações genéticas básicas, mapas saturados de pontos, o que seria trabalhoso elaborar manualmente, assim como foi feito com primeiros mapas, os quais tinham basicamente marcadores fenotípicos.

Bassett (1991) revisou vários estudos de ligações de caracteres fenotípicos no feijoeiro e fez uma análise crítica do que está relatado nesta área. Vários estudos ainda precisam ser realizados para explicar melhor vários pontos duvidosos. As publicações são empíricas onde cada autor denomina o gene que esta sendo estudado, de forma que tem-se o mesmo gene

com diferentes denominações, o que dificulta ainda mais estes estudos. Outras complicações de natureza genética como: efeitos pleiotrópicos, epistasia, genes modificadores e outros, também estão presentes. Finalmente, Bassett (1991), apresenta um mapa de ligação originado de dados de ligações publicadas, com 13 grupos de ligações, onde o ideal seria 11, para conseguir esta meta o autor sugere o uso de marcadores moleculares, uma vez que para algumas características morfológicas ainda não foi possível uma recombinação entre estas, o que mostra a limitação dos marcadores morfológicos.

O mapeamento de genes de resistência à doenças é um ponto importante na estratégia de melhoramento de uma cultura, tais informações auxiliam no direcionamento dos cruzamentos a serem feitos e pode se estimar a probabilidade de haver recombinação favorável entre genes de interesse. Landry *et al.* (1992) apresentaram um mapa genético de *Brassica oleracea* baseado em marcadores moleculares (RFLP), os quais relacionam com a seqüência mapeada dos genes de resistência à raça 2 de *Plasmodiophora brassicae*, analisados por marcadores moleculares em população F₂ segregante, oriunda do cruzamento entre linhagens resistentes e suscetíveis a raça 2. Outra forma de se construir mapas genéticos é a partir de ligações entre: marcadores morfológicos, RFLP, RAPD, Isoenzimas e genes de resistência às doenças (Kenard *et al.*, 1994). O mapeamento pode demonstrar a interação entre planta e patógeno. Nodari *et al.* (1992) e Nodari *et al.* (1993b) trabalhando com 152 marcadores genéticos em populações segregantes de ambos "pools" gênicos, conseguiram demonstrar que a resistência ao crestamento bacteriano comum (CBC), e pouca nodulação, são características relacionadas e o mesmo pode ser dito com alta nodulação e baixa resistência ao CBC. Porém para caracterizar genes de resistência não é necessário um mapa de todo o genoma, um conhecimento da região em que se encontra o gene já é suficiente para obter informações importantes no mapeamento de genes de resistência (Maisonneuve *et al.*, 1994). O mapeamento também pode ser feito por meio de um gene que codifica uma proteína, desde que esta proteína confira resistência a um determinado patógeno (Martin *et al.*, 1993)

Recentemente o feijoeiro tem adquirido um grande número de informações genéticas graças à associação de técnicas moleculares, programas computacionais específicos para o mapeamento. Isto levou a obter diversos mapas de ligações no feijoeiro, utilizando desde marcadores fenotípicos apenas, até a mistura de todos os marcadores disponíveis (Tabela 4).

Tabela 4. Mapas de ligações existentes para *Phaseolus vulgaris* a partir de marcadores genéticos utilizando populações F₂ ou populações avançadas.

Autores	Natureza dos Marcadores	N ^o de locos	Grupos de ligações	Extensão do Mapa (cM).
Bassett, 1991	Fenotípicos	-	13	-
Vallejos <i>et al.</i> , 1992	Morfológicos, Bioquímicos e RFLPs	145	11	963
Nodari <i>et al.</i> , 1993	Morfoagronômicos, Bioquímicos e RFLPs e de RAPD	143	15	827
Neema <i>et al.</i> , 1993	Morfoagronômicos, Bioquímicos, RFLPs e RAPD	161	12	-
Jung <i>et al.</i> , 1996	Morfoagronômicos, RAPD	84	8	545

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Material Biológico

A cultivar Rosinha G2 é caracterizada morfológicamente como: hábito de crescimento indeterminado (III), flor branca, vagem madura rosa, sementes pequenas e rosadas, folha redonda, com presença de corona escura, apículo curto e curvo, 4 a 7 sementes por vagens. A cultivar AND 277 apresenta: flor rosa, hábito de crescimento determinado (I), semente com listras vermelhas, grande e sem presença de corona escura, vagens maduras verdes com estrias, folhas grandes, trianguladas e compridas, apículo longo e curvo, duas a quatro sementes por vagem. Estas cultivares são de Centros de origem distintos de uma forma geral apresentam vários contrastes morfológicos, que nesta investigação foram estudados geneticamente: hábito de crescimento, cor de flor, escurecimento de corona, cor de vagem madura, cor da semente, peso, comprimento e largura de sementes, três proteínas de reserva, ampliações ao acaso de fragmentos polimórficos do DNA pela PCR e o gene de resistência à mancha angular (dados retirados do Capítulo 1).

2.3.2 Morfológicos

De uma forma geral os caracteres morfológicos são pouco influenciados pelo ambiente e são de herança Mendeliana. Os hábitos de crescimento indeterminado e determinado são relativamente fáceis de discernir, no entanto, dentro do tipo indeterminado há três subdivisões. Nesta investigação será discriminado dentre a população segregante duas classes determinado (I) e indeterminado (III).

Cor no feijoeiro tanto, na semente, flor e vagens, é uma característica mais complexa, para estudos genéticos. Em geral são poucos genes, porém uma grande variação de interações epistáticas e pleiotrópicas dificultam os estudos de determinação do número de genes e mapeamento de ligação, além de muitos genes que influenciam nestas características apresentarem um série alélica extensa, com suas diversas interações (Bassett, 1991; Souza *et al.*, 1992; Bassett, 1995; Bassett, 1996).

2.3.2.1 Tamanho, peso, comprimento e largura das sementes

O tamanho da semente é uma característica de peso literalmente e de grande importância no melhoramento. A população segregante AND 277 x Rosinha G2 apresentou

grande variação em tamanho de semente. Foi medido o comprimento, largura e pesado 270 indivíduos F_2 resultantes deste cruzamento. Para medir as sementes utilizou-se um paquímetro, onde o comprimento foi obtido de uma extremidade a outra e a largura refere-se a distância entre os lados com o hilo separando os dois lados do cotilédone. Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelo "Software" SAS (1992), por meio de análise de variância desbalanceada, juntamente com dados de 18 indivíduos F_1 , e progenitores.

O número de genes de cada parâmetro avaliado foi calculado pela metodologia de Wright citada por Ramalho *et al.* (1993). Para o cálculo da herdabilidade no sentido amplo e estimativas dos erros associados à herdabilidade utilizou-se as formas descritas por Vello & Vencovsky (1974). A heterose foi calculada pela diferença da média do F_1 em relação aos progenitores.

2.3.2 Bioquímicos

2.3.3.1 Extração de Proteínas de Reserva

A extração das glicoproteínas, segundo Romero. *et al.* (1975), foi feita em em solução de baixo pH, com modificações no tempo de extração. Extraiu-se as proteínas de reserva de 18 indivíduos F_1 e 270 F_2 e progenitores. Inicialmente, seccionou-se as sementes reservando a parte que contém o embrião, para o plantio, retirou-se o tegumento para posterior maceração dos cotilédones, e em seguida adicionou a solução de extração (NaCl 0,5 M, Ác. Ascórbico 0,25 M) na proporção de 2 ml para cada 100 mg. O extrato permaneceu em agitação constante por uma hora, protegida de luminosidade. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 20 minutos à 4°C. Retirou-se o sobrenadante e acrescentou 5 vezes o volume deste com água destilada e deionizada gelada. Padronizou-se uma retirada de 250 µl do sobrenadante independentemente do volume total, para que as centrifugações fossem em microtubos. Repetiu-se centrifugações por mais duas vezes. Para ressuspender o pelete acrescentou-se 250 µl NaCl 0,5 M. Armazenando o extrato à -20°C para posterior análise em eletroforese de poliacrilamida em diferentes concentrações (PAGE).

2.3.3.2 Eletroforese em SDS-PAGE e detecção.

Para obter as subunidades protéicas, promoveu a desnaturação com alta temperatura (95°C) na presença de β - Mercaptoetanol, e a separações foram feitas em géis desnaturantes e

descontínuos de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo Laemmli (1970). A eletroforese foi em gel de poliacrilamida, em diferentes concentrações (8, 10 e 12%), por um período de 3 horas e trinta minutos a uma corrente elétrica constante de 25 mA. Após esta etapa, os géis foram retirados das placas de vidro e colocados em uma solução corante com Comassie Brilliant Blue (B250R), por período mínimo de 40 minutos. Em seguida, colocou-se os géis em uma solução descorante (alcool a 50% mais ácido acético a 10%). Os géis ou eram secados imediatamente em papel celofane ou eram colocados em uma solução fixadora com ácido acético de acordo com a necessidade.

2.3.3.3 Análise das Proteínas de Reserva

Foram analisadas três proteínas de reservas, Spa, Spb e faseolina (Pha), as quais foram caracterizadas quanto ao peso molecular, como descrito por Brown *et al.*, (1981a) e Vallejos & Chase (1991a). Vallejos & Chase (1991b) observaram que embora a segregação esperada para proteínas seja codominante (1:2:1), entre algumas estudadas não foi possível diferenciar o heterozigoto do homozigoto, neste caso adotou-se apenas duas classes e a segregação esperada 3:1, agrupando T/T e T/S em uma classe e S/S na outra, respectivamente. Da mesma maneira foi realizado com as proteínas Spa 82,8/82,8, Spa 82,8/79,1 e 79,1/79,1, e Spb 58,5/58,5, 58,5/53,3 e 53,3/53,3 kDa, todas com segregação esperada de 3:1. A faseolina apesar de ser um bloco gênico altamente ligado é considerado como um único loco, o que permitiu estudá-lo como uma característica Mendeliana (Brow *et al.*, 1981b).

2.3.4 Moleculares

2.3.4.1 Extração de DNA

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é possível mesmo a partir de DNA de baixa pureza, porém certamente a repetibilidade dos resultados é mais eficiente quando se parte de uma amostra pura. Atualmente os protocolos publicados, em relação a extração de DNA vegetal, em sua maioria utilizam como extrator o tampão com o detergente catiônico CTAB (Cationic Hexadecil Trimethyl Ammonium Bromide), porém há uma grande variação em detalhes nos passos de protocolo para protocolo. Para a realização deste trabalho extraiu-se DNA do feijoeiro com pequenas modificações aos procedimentos descrito por: Saghai-Maoof *et al.* (1984), Doyle & Doyle, (1990) e Vilarinhos *et al.*, (1994) com algumas adaptações para

extração em micro centrífuga, pois a grande maioria se refere a macro extrações. Inicialmente coletou-se folhas novas e imediatamente pesou-se 0.2 grama de tecido fresco e os colocou em gral de porcelana. Macerou-se as folhas com N₂ líquido até se obter um pó extremamente fino. Em seguida o macerado foi transferido para um microtubo de capacidade para 2 ml, resfriado previamente também por N₂ líquido, e imediatamente acrescentou-se 900 µl do tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM, pH 8.0, 1,5 % de CTAB e H₂O), pré-aquecido a 65 °C. As amostras foram incubadas a 65 °C por 60 a 90 minutos, sendo levemente agitadas a cada 15 minutos. Após passado este tempo, retirou-se as amostras do banho-maria e adicionou-se 600 µl de clorofórmio:alcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente. A agitou-se suavemente por inversão durante aproximadamente 5 minutos. Os microtubos foram balanceados e centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo procedendo novamente a extração com clorofórmio e alcool isoamílico. O DNA foi precipitado com adição de 2/3 de isopropanol gelado (-20 °C) sobre o sobrenadante e centrifugado à 4000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pelete foi lavado com etanol 80%, incubando-o a 37 °C por 30 minutos. Em seguida o pelete foi secado a vácuo e dissolvido em 200 µl de tampão TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA 0.10 mM, pH 8.0) e incubado com RNAse em uma concentração final de 10 µg/ml à 37 °C até sua completa dissolução, por uma hora aproximadamente. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria e verificada a relação DNA/proteína pela absorbância medida a 260/280nm, respectivamente de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Para concentração de trabalho, o DNA foi diluído em água ultrapura e padronizado para uma concentração de 10 ng/µl e armazenado em ultrafreezer a -80 °C para serem posteriormente utilizados nos estudos moleculares.

2.3.4.2 Amplificação do DNA via Reação em Cadeia da Polimerase, pela Técnica do RAPD

A reação em cadeia da polimerase foi realizada de acordo com Williams *et al.* (1990) com algumas modificações. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: a reação final de cada indivíduo partiu de uma unidade de Taq DNA polimerase (CENBIOT/RS), 1X o tampão de reação [10 mM TRIS-HCL (pH 8.0), 50 mM KCl, 2,0 mM de MgCl₂] e 100 µM de cada dNTP (dinucleotídeo tri-fosfato). Aproximadamente 20 ng de

DNA genômico e 8 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciadores de reações (primers) foram acrescentados juntamente com água ultrapura (Barnstead - NANOpure Bioresearch Deionization System) para um volume final de 25 µl. Ao microtubo de reação acrescentou-se 20 µl de óleo mineral para evitar a evaporação no momento das reações.

No total testou-se 26 primers escolhidos entre os Kits (A a Z), obtidos da Operon Technologies, Inc. e sendo que apenas 4 foram estudados na população ANDxRosinha G2, que foram OPA-01 (5' CAGGCCCTTC 3'), OPA-02 (5' TGCCGAGCTG 3'), OPD-19 (5' CTGGGGACTT 3') e OPI-19 (5' AAAGTGCGGG3'). Estes "primers" foram escolhidos por estarem associados a regiões genômicas polimórficas, de acordo com análises preliminares.

As amplificações ocorreram em um termociclador (PTC-100, MJ Research), programado para três ciclos iniciais de 1 minuto/94°C, 1 minuto/35°C. 2 minutos/72°C mais 34 ciclos de 10 segundos/94°C, 20 segundos/40°C. 2 minutos/72 °C, com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C, de acordo com Young & Kelly (1996).

2.3.4.3 Visualização e Análise dos Fragmentos Amplificados

Os fragmentos gerados nas amplificações foram corados com Brometo de Etídeo (0,2 µg/ml) e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. A separação das regiões amplificadas, foi realizada ou em agarose a 1,2% e tampão de gel de eletroforese de TBE 0,5X (Tris-HCl, EDTA e Ácido Bórico) de acordo com Sambrook *et al.* (1989), ou por gel de poliacrilamida a 8% com TBE 1X. A agarose apresenta a vantagem de ter maior praticidade, facilidade em se montar o gel, e a fácil visualização, isto quando acrescenta no gel Brometo de Etídeo, o que permite precisar com antecedência se a amplificação foi positiva ou não em pouco tempo de eletroforese, em quanto que a poliacrilamida exige maior habilidade ao manipulá-la, não permite interromper a eletroforese para uma eventual visualização, mas por outro lado tem um maior poder de resolução, e pode ter suas informações registradas tanto em fotografia de Polaróide assim como o próprio gel quando este é corado por Nitrato de Prata, de acordo com o procedimento de Blum *et al.* (1987). Neste estudo foram utilizadas ambas as formas de visualização dos fragmentos amplificados, com uma predominância da agarose.

2.3.5 ESTUDOS DE LIGAÇÕES

Uma vez caracterizados os locos estudados dos indivíduos da geração segregantes uma matriz de dados foram tabulados e analisados em grupos de ligações. Para o agrupamento dos

locos utilizou-se a versão 3.0b do programa "Mapmaker" (Lander *et al.* 1987). Para o cálculo das frequências de recombinações utilizou-se a função Kosambi (1944).

Os locos foram considerados ligados quando apresentaram uma distância genética de no máximo 35 cM. Para isto foi preestabelecido que se agrupasse somente locos que atendessem o comando de um LOD score igual ou acima de 3.0 e uma frequência de recombinação de 0.3.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes que se proceda uma análise visando o mapeamento genético é necessário que se realize uma análise dos desvios dos locos em relação as proporções esperadas. A Tabela 5 abaixo evidencia que 81,25% dos locos que foram estudados geneticamente apresentaram resultados esperados e aceitáveis. Dois marcadores de RAPD e o locus *Cor* apresentaram uma baixa probabilidade. Ferreira & Grattapaglia (1995) recomenda que uma vez que os marcadores de RAPD são dominantes deva repetir as amplificações dos indivíduos que não amplificaram. Quanto ao loco *Cor* Nodari *et al.*, (1993a) também encontrou valor de Chi-quadrado alto para esta característica.

Tabela 5. Análise genética por Chi-quadrado de 16 marcadores estudados com os respectivos dados sobre o número de indivíduos, segregação esperada e probabilidade. Uberlândia, 1997.

Loco	Nº Indivíduos	Segregação	F. obs.	F. esp.	χ^2	P
OPA-01a	137	3:1	52:85	34,25:102,75	12,265	<0,001*
OPA-01b	148	3:1	44:104	37:111	1,555	0,20-0,10
OPA-02	113	3:1	38:75	28,25:84,75	4,486	0,05-0,0*1
OPD-19a	113	3:1	28:85	28,25:84,75	0,003	>0,95
OPD-19b	113	3:1	25:88	28,25:84,75	0,498	0,50-0,40
OPI-19a	116	3:1	28:88	29:87	0,0459	0,90-0,80
OPI-19b	116	3:1	29:87	29:87	0,000	1,00
<i>Phs</i>	270	3:1	75:195	67,75:202,25	1,111	0,30-0,25
<i>Spa</i>	251	3:1	61:190	62,75:188,25	0,065	0,80-0,75
<i>Spb</i>	251	3:1	57:194	62,75:188,25	0,703	0,50-0,30
<i>ALS</i>	185	3:1	40:145	46,25:138,75	1,126	0,30-0,20
<i>HC</i>	205	3:1	57:148	51,25:153,75	0,860	0,50-0,30
<i>V</i> (<i>v^{lae}</i>)	186	3:1	53:133	46,5:139,5	1,211	0,30-0,10
<i>Cst</i> ou <i>Rst</i>	145	3:1	41:104	36,25:108,75	0,820	0,50-0,30
<i>Cor</i>	142	3:1	91:51	106,5:35,5	9,023	0,01-0,001*
Vagem (<i>cor</i>)	161	9:7	97:64	90,56:79,44	1,046	0,50-0,30

* Locos que apresentaram um desvio significativo em relação à proporção esperada.

2.4.1. Morfológicos

2.4.1.1 Hábito de Crescimento

O hábito de crescimento se mostrou como ótimo marcador morfológico para confirmar a hibridação. É uma característica controlada geneticamente por apenas um gene entre determinado e indeterminado, com dominância completa para o tipo indeterminado, apresentando um χ^2 não significativo de 0,86 e uma probabilidade entre 0,50 e 0,30 para uma segregação 3:1 (Tabela 5). Os resultados são compatíveis com a literatura, no entanto quando se estuda geneticamente a segregação entre indeterminado tipo II e tipo III deve-se tratar os dados como uma característica quantitativa (Norton, 1915, citado por Debouk, 1991; Jung *et al.*, 1996).

2.4.1.2 Cor da flor

Koenig & Gepts (1989) obtiveram uma segregação esperada de 3:1 para cor de flor envolvendo uma cultivar andina com flor rosa e genótipo $V^{lae} V^{lae}$ e outra mesoamericana com flores violeta (VV). Nesta investigação, a partir da F_2 segregante para flor rosa e branca, obteve-se uma segregação esperada de 3 flores rosas para uma branca, com um χ^2 não significativo igual a 1.211 e uma probabilidade entre 0,30 e 0,10 (Tabela 5).

2.4.1.3 Cor da semente

A cor vermelha da semente do feijoeiro é dependente dos genes precursores P e Gri , e do loco R , o qual segundo Lampreth, (1947) citado por Vieira (1967), apresenta sete alelos. A presença de estrias vermelhas na semente é devido ao alelo R^{st} . Bassett (1995) denominou todos alelos R como C e desta forma o complexo "C" que controla cor de semente ficou com uma extensa série alélica. Os resultados obtidos mostram que a presença de estrias vermelhas na semente foi dominante sobre a ausência destas. Esta característica segregou numa proporção de três sementes vermelhas para uma rosada com chi-quadrado de 0,82 e uma probabilidade entre 0,50 e 0,30 do resultado obtido ser devido a presença de um gene dominante (Tabela 5).

2.4.1.4 Cor da corona

Enquanto Bassett (1995) não encontrou recombinantes entre cor de flor rosa e corona escura os progenitores AND 277 ($V^{lae}V^{lae} cor cor$) e Rosinha G2 ($Cor Cor vv$) apresentam exatamente estas características. O gene que determina corona escura (Cor) e a cor rosa nas flores (V^{lae}) estão ligados. Nodari *et al.*, (1993a) determinou que o gene Cor estava ligado a um gene que estava controlando a cor das flores (FC), na população estudada, a qual apresentava características idênticas à resultante do cruzamento AND 277 com Rosinha G2, com uma diferença, onde a cultivar andina por eles estudada era a que apresentava o gene Cor . Os resultados obtidos por Nodari *et al.*, (1993a) lhes permitiram afirmar que estes locos estão ligados, embora não puderam afirmaram que FC é o locos V . Bassett (1995), estudando estas mesmas características não encontrou nenhum recombinante entre estas e sugere que estes genes estão intimamente ligados ou o controle de ambas características é feito pelo gene V . Os dados obtidos permitem afirmar que são dois genes ligados, e que o gene dominante para cor de flor é o alelo V^{lae} (Tabela 5 e Figura 6).

2.4.1.5 Cor da Vagem na Maturidade Fisiológica.

O cruzamento da cultivar AND 277, que apresenta vagens verdes na maturidade fisiológica, com a cultivar Rosinha G2 que tem vagens rosas, gerou descendentes F_2 que apresentaram a seguinte variação da cor: verde, rosa claro e rosa. Frag & Clayberg (1980) analisaram geneticamente uma população segregante envolvendo dois progenitores que fenotipicamente tinham as mesmas características dos envolvidos nesta investigação. Obtiveram uma variação de cor das vagens na população F_2 segregante de 5 rosa escuro: 4 rosa claro: 7 verde o que indicou uma segregação resultante da interação de dois genes dominantes e complementares onde o duplo heterozigoto apresenta uma coloração mais fraca do que os outros genótipos.

No total foram analisados 137 indivíduos da população segregante do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Para maior segurança e facilidade na coleta dos dados, adotou-se distribuir os dados em apenas duas classes, presença da cor rosa (rosa e rosa claro) e verde. O resultado esperado de acordo com Frag & Clayberg (1980) foi uma segregação 5:4:7 e que neste caso se resume a 9:7. Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que este ajuste apesar de implicar na perda de um grau de liberdade, devido à redução de uma classe, não influenciou no resultado, confirmando o que já havia sido obtido por Frag & Clayberg, (1980). A cor das

vagens, de uma forma geral, envolve mais de dois genes e o estudo de todas interações acaba sendo complicado. Outra dificuldade encontrada é o fato de não se ter um padrão de nome ou sigla para cada gene, e de acordo com cada autor há variações nos nomes dos genes envolvidos e em alguns casos o mesmo gene apresenta nomes diferentes o que dificulta ainda mais os estudos destes caracteres morfológicos (Bassett, 1991).

2.4.1.6 Tamanho, peso e largura de semente

A análise de variância com os dados de todas gerações, incluindo os cruzamentos recíprocos, apresentou significância em todos parâmetros de tamanho avaliados. As médias das gerações, (Tabela 6) foram contrastadas e comparadas pelo teste de Tukey a 5% e não foi observado diferenças significativas entre os híbridos e seus respectivos progenitores maternos (Tabela-7). Estes resultados demonstraram que o tamanho da semente, seja em peso, comprimento ou largura na geração F_1 , é determinado pelo progenitor feminino ou há efeito materno. Mesquita *et al.* (1990) descreveram que o desenvolvimento da semente sofre grande influência do tegumento, o qual é tecido maternal, sendo uma barreira física, e que embora não exista diferença no número de sementes de um progenitor a outro, mas há no tamanho da semente. Vallejos & Chase (1991a) discutem o efeito materno no feijoeiro e encontraram um gene o qual denominaram de Ssz-1 que reverte entre 30 e 50% o efeito maternal, o que não é comum. Estes autores especulam o fato de que entre os progenitores estudados há introduções de outros *Phaseolus*, pois a literatura mostra não só para feijão mas para outras espécies o efeito materno claramente influenciando no tamanho da semente.

Tabela-6. Comparação de médias e variâncias para peso, comprimento e largura de sementes de feijão F₂, provenientes do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Uberlândia 1996.

Populações	Peso (mg)		Comprimento (cm)		Largura (cm)	
	Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
AND 277	449,16a*	7440,84	1,41a	0,0091	0,56a	0,00346
Rosinha G2	178,60b	2898,92	0,95b	0,0122	0,38b	0,00815
F1 ANDxRG2	471,07a	2016,90	1,50a	0,0101	0,53a	0,00104
F1 RG2xAND	235,95b	3892,01	1,06b	0,0081	0,45a	0,01203
F2ANDxRG2	247,62a	7004,52	1,05a	0,0198	0,54a	0,00858

*Populações seguidas pela mesma letra na vertical, não diferiram estatisticamente pelo contraste a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela -7. Contraste de médias entre populações para peso, comprimento e largura de sementes de feijão provenientes do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Uberlândia 1996.

Comparações	Peso	Comprimento	Largura
AND 277 vs Rosinha G2	***	***	***
AND 277 vs F ₁ ANDxRG2	ns	ns	ns
AND 277 vs F ₁ RG2xAND	***	***	ns
AND 277 vs F ₂ ANDxRG2	***	***	***
Rosinha G2 vs F ₁ ANDxRG2	***	***	***
Rosinha G2 vs F ₁ RG2xAND	ns	ns	ns
Rosinha G2 vs F ₂ ANDxRG2	***	***	***

***Estatisticamente significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns. Estatisticamente não houve diferença significativa a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Vallejos & Chase (1991a) verificaram que há um grande número de genes no controle genético do tamanho da semente, com efeitos similares, ou existe um gene maior e outros de efeitos menores segregando nas progênies. Reis *et al.* (1981) avaliaram peso e comprimento de duas populações contrastantes nestas características, ambas se mostraram variadas porém de herança quantitativa, sendo 1,73 e 11,22 genes para comprimento e 1,4 e 5,5 para peso, de acordo com a respectiva população. Para ambas populações os resultados obtidos apresentaram alta herdabilidade tanto para comprimento quanto para peso. A geração F₂ do cruzamento AND 277 x Rosinha G2 apresentou 4,98, 2,89 e 1,459 genes para peso, comprimento e largura, respectivamente (Tabela 8). Estes números foram calculados de acordo com a fórmula de Wright, e estão de acordo com a literatura (Reis *et al.* 1981; Vallejos & Chase, 1991a). Foram obtidos também altos valores para herdabilidade nos três parâmetros de tamanho avaliados. Tanto número de genes, herdabilidade e heterose são calculados com base nos dados apresentados na Tabela 6. Estes resultados indicam que estas características, de grande interesse agrônomo, apresentam viabilidade ao ser selecionada em um programa de melhoramento. A heterose é calculada pela diferença da média dos híbridos em relação a média dos progenitores (MP); no entanto, quando presente o efeito maternal, este valor fica próximo da diferença entre a média dos progenitores, de acordo com o progenitor feminino utilizado, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Herdabilidade no sentido amplo, número de genes ou blocos gênicos e Heterose envolvidos nas características determinantes do tamanho de semente. Uberlândia 1996.

	AND 277 x Rosinha G2		
	Peso	Comprimento	Largura
Herdabilidade	0,487 ±0,1418	0,476 ±0,1301	0,601 ±0,1266
N ^o de genes	4,98	2,89	1,459
Heterose ¹	157,41	0,32	0,06
Heterose ²	-77,93	-0,12	-0,02

$$^1\text{Heterose} = F_{1(\text{AND}277 \times \text{RG}2)} - \text{MP}$$

$$^2\text{Heterose} = F_{1(\text{RG}2 \times \text{AND}277)} - \text{MP}$$

De uma forma geral observou-se altas correlações fenotípicas entre os parâmetros de tamanho de semente avaliados. A Tabela-9 mostra que para comprimento e largura os valores de correlações foram mais baixas, alguns embora negativos, porém não significativos. Não há

uma explicação lógica para este fato observado, a cultivar AND 277 apresenta uma alta correlação entre estes parâmetros, o que não é observado na cultivar Rosinha G2 (RG2). O parâmetro peso está altamente correlacionado com o comprimento da semente variando entre as populações de 0,59 a 0,99.

Tabela 9. Correlações entre as características peso, comprimento e largura de sementes de feijões nas populações segregantes (F₂) do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. Uberlândia 1996.

		Comprimento	Largura
AND 277	Peso	0,93*	0,87*
	Comprimento		0,81*
Rosinha G2	Peso	0,73*	0,66*
	Comprimento		0,24ns
F1 (AND** X RG2)	Peso	0,59*	0,33*
	Comprimento		-0,27ns
F1 (RG2xAND)	Peso	0,99*	0,96*
	Comprimento		0,98*
F2 (ANDxRG2)	Peso	0,93*	0,68*
	Comprimento		0,64*

*. ns. Correlações estatisticamente, significativas e não, respectivamente.
 **. O primeiro progenitor de cada cruzamento foi utilizado como feminino.

2.4.2 Marcadores Bioquímico

No total foram extraídas proteínas de 270 indivíduos F₂ mais 18 híbridos e os progenitores. O padrão eletroforético destas proteínas pode ser observado diretamente no gel de poliacrilamida (Figura-3). Ambas apresentam três subunidades, visualmente, dependendo da concentração do gel e do tempo de eletroforese. A faseolina T/T (andina) é caracterizada eletroforéticamente por apresentar uma subunidade de maior peso em relação a S/S (mesoamericana); já a primeira subunidade da faseolina tipo S é maior que a segunda do tipo T. O híbrido apresenta um padrão intermediário, com as subunidades mais agrupadas o que em alguns casos, dependendo da concentração de proteína colocada, dificulta a diferenciação entre T/T e T/S. As três regiões estudadas permitem determinar com certeza se o cruzamento realmente resultou numa hibridação e isto pode ser verificado antes do plantio das sementes (Figura-4).

O estudo de ligação dos diversos locos estudados confirmam que realmente as proteínas da semente estão no mesmo grupo de ligação assim como foi obtido por Vallejos *et al.* (1991b) e Vallejos *et al.* (1992). Contudo; Vallejos *et al.* (1992) determinaram uma distância

de aproximadamente 27 cM entre o locus da faseolina e das proteínas de reserva Spa e Spb. No entanto não encontraram recombinantes entre estas duas últimas. Já Vallejos & Chase (1991b), estudando especificamente o grupo de ligação da faseolina, calcularam uma distância de 41 cM para estas proteínas. Neste trabalho a análise realizada com 251 indivíduos permitiu obter uma distância de 31,9 cM entre a faseolina e Spa, e uma distância de 1,7 cM entre Spa e Spb. Realmente Spa e Spb estão muito próximas, e talvez os recombinantes encontrados foram possíveis devido ao maior número de indivíduos amostrados, pois Vallejos *et al.* (1992) trabalharam com pouco mais de 100 indivíduos.

Marcadores Bioquímicos

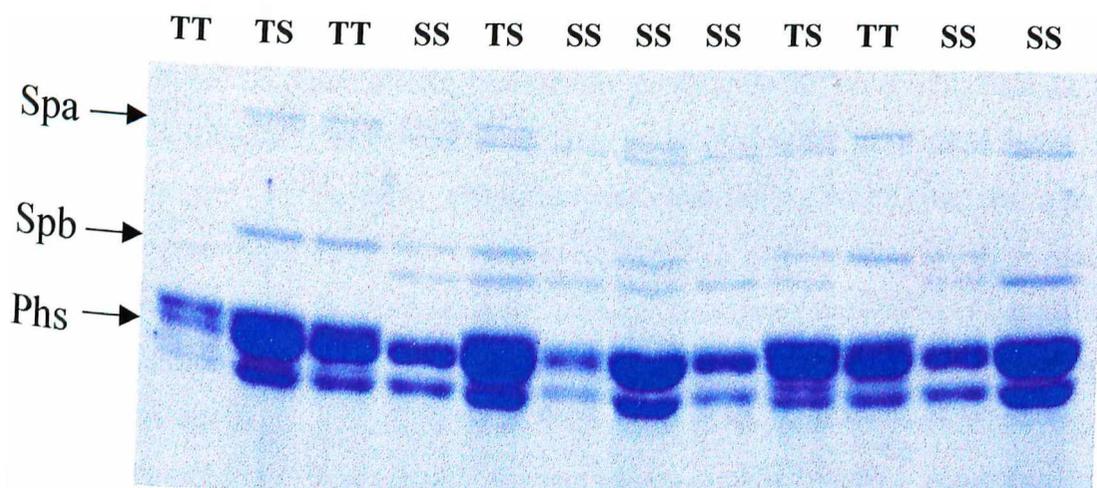


Figura 3- Proteínas de semente da população segregante AND 277 x Rosinha G2. As setas indicam em ordem decrescente de peso as proteínas: Spa, Spb e faseolina (Phs).

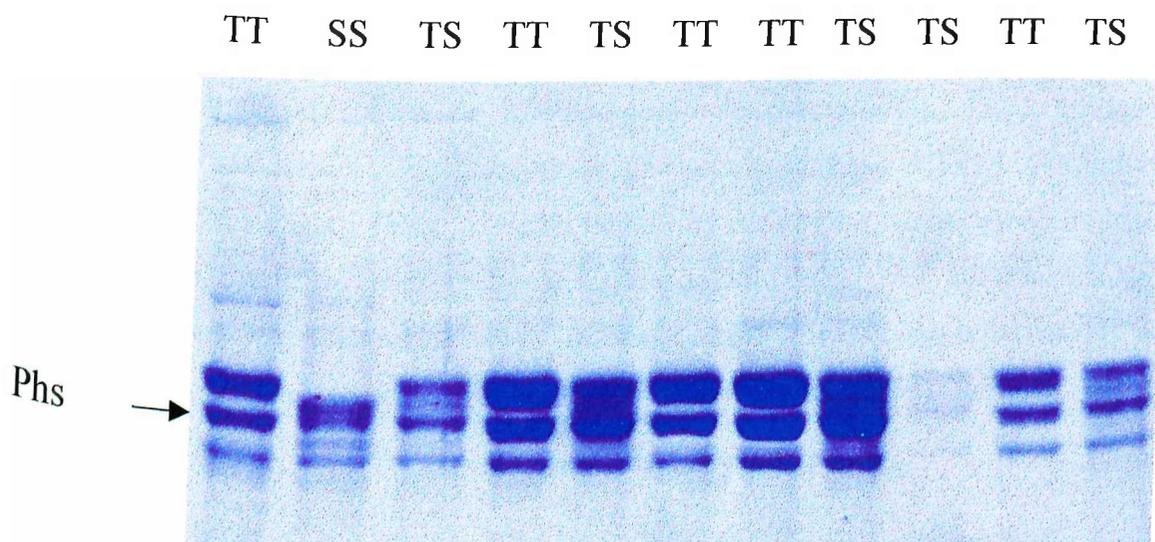


Figura 4- Proteínas de semente da população segregante AND 277 x Rosinha G2. A seta indica o polimorfismo da faseolina (Phs) com ênfase no padrão codominante o que caracteriza a hibridação.

2.4.1 Marcadores Moleculares

No total foram testados 26 oligonucleotídeos iniciadores (primers) da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos amplificaram, apenas 2 não apresentaram amplificação de regiões genômicas polimórficas, perfazendo um total de 30 locos polimórficos. De acordo com diversos trabalhos, envolvendo estudos moleculares de cultivares dos dois grandes centros de origem do feijoeiro andino e mesoamericano, verifica-se um alto nível de polimorfismo, em torno de 80 % (Nodari *et al.*, 1992; Nodari *et al.*, 1993a). A análise destas ampliações é de grande interesse para estudos genéticos, pois além da possibilidade de associar uma determinada região polimórfica amplificada a uma característica genética ou morfológica já analisada, os resultados contribuem para elaborar um mapa de ligação, o que é de grande importância tanto do ponto de vista básico quanto aplicado. Até o momento foram estudados na população segregante 7 fragmentos polimórficos amplificados. O trabalho é lento e apresenta algumas dificuldades práticas, pois o número de indivíduos analisados na população é variado, porém acima de 100 indivíduos. Estas regiões polimórficas são apresentadas na Figura-5 onde se percebe a amplificação polimórfica e o padrão dominante do RAPD, onde os indivíduos que não apresentam homologia com os "primers" não amplificam a região em estudo. Com exceção do primer OPA-01a, todos apresentaram segregações mendelianas. É recomendado que se reamplifique o DNA dos indivíduos que deram negativos quanto à amplificação, devido ao caráter dominante, onde os heterozigotos também são amplificados (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As informações moleculares obtidas foram correlacionadas com outras características analisadas até o momento, caminhando para a construção de um mapa de ligação do feijoeiro (Figura-6).

Marcadores Moleculares

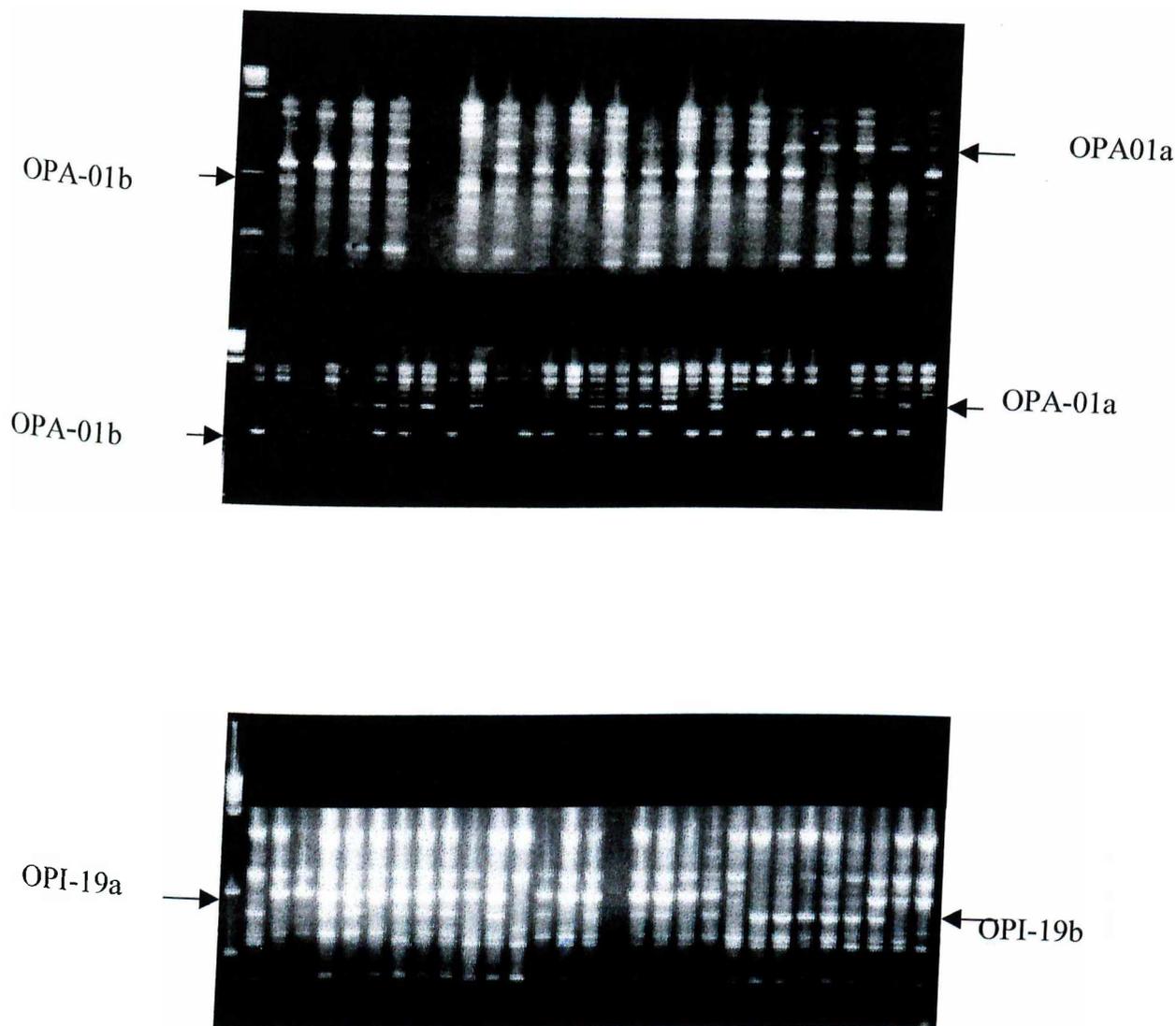
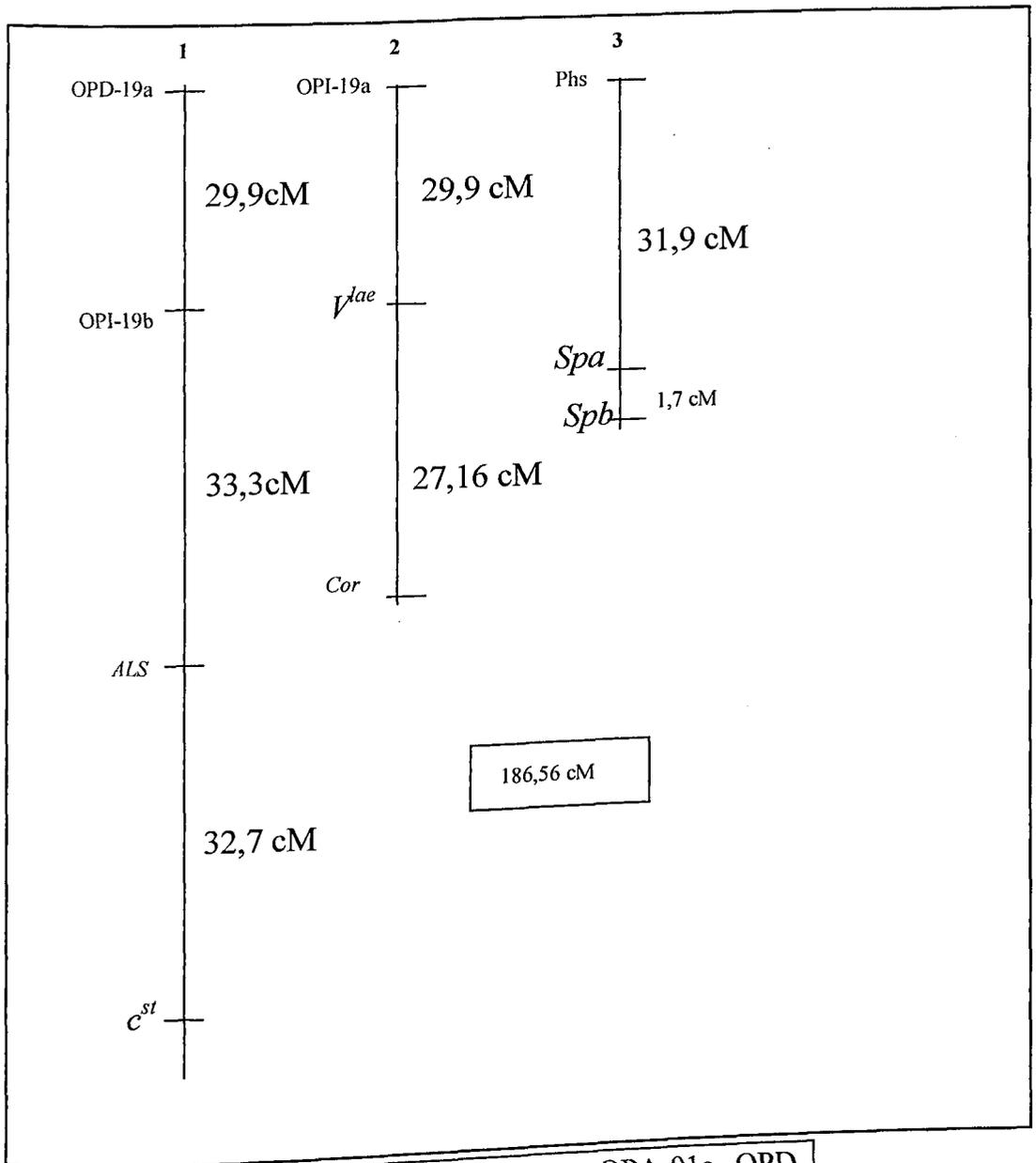


Figura 3- Amplificação do DNA por RAPD de indivíduos segregantes na população F_2 do cruzamento AND 277 x Rosinha G2. As setas indicam regiões genômicas polimórficas.



O marcadores monogênicos, OPA-01a, OPD-19b, OPA-01b, OPA-02, e *HC* não estão ligados aos grupos de ligação estudados até o momento.

Figura-6. Mapa de ligação construído a partir de marcadores: Morfológicos (V^{lae} , C^{st} , Cor), Bioquímicos (Phs, Spa e Spb), Moleculares (OPA-01a, OPI-19a e OPI-19b) e o gene de resistência do feijoeiro à mancha angular (ALS). Distâncias foram calculadas utilizando a função Kosambi e o programa de mapeamento MAPMAKER versão 3.0b e LOD 3.0.

2.4.4 Mapeamento

Grupos de ligações foram estabelecidos entre 15 locos de acordo com análise feita com o programa Mapmaker, versão 3b. Foram obtidos os seguintes grupos de ligações (Figura-6).

Grupo 1-

Este grupo de ligação compreende os seguintes locos: região amplificada pelos "primers" OPD-19a e OPI-19a, gene de resistência à mancha angular do feijoeiro (*ALS*) e o gene que determina a presença de estrias avermelhadas na semente (C^{st}), perfazendo um total de 95,90 cM.

Grupo 2-

Este grupo apresenta como locos ligados a segunda amplificação do "primer" OPI-19b, o gene de cor de flor *V* (V^{lae}) e o gene que determina o escurecimento da corona na semente do feijoeiro (*Cor*), totalizando 57,06 cM.

Grupo 3-

O terceiro agrupamento de ligações gênicas envolve o bloco gênico da faseolina (*Phs*) e mais duas proteínas de reserva *Spa* e *Spb*, com um total de 33,6 cM.

Não foi possível estabelecer ainda nenhuma ligação entre os marcadores monogênicos OPD-19b, OPD-01b, OPA-02 e o gene que determina o hábito de crescimento (*HC*) assim como com os genes que determinam a cor da vagem.

2.4.5 Aplicação Destas Informações no Melhoramento do Feijoeiro

Os resultados obtidos com os parâmetros de tamanho de semente indicam que há uma alta herdabilidade. Embora seja de maior interesse para o melhoramento o cálculo da herdabilidade no sentido restrito e não amplo, os dados obtidos permitiram apenas o cálculo no sentido amplo, uma vez que não foram realizados retrocruzamentos. Os valores foram altos, o que possibilita prever que no sentido restrito o também será. Reis *et al.* (1981) obtiveram altos valores de herdabilidade mesmo quando calcularam 11,22 genes para comprimento. De forma geral estes autores observaram menores valores para herdabilidade para o peso de semente.

O estudo ligações agrupou duas características de grande importância para o feijoeiro que são cor de semente com resistência à mancha angular.

2.5 CONCLUSÕES

A população segregante resultante do cruzamento entre uma cultivar de origem andina, AND 277 e outra mesoamericana, Rosinha G2, apresentou uma grande variabilidade para realizar uma análise genética com os mais diversos contrastes genéticos.

Os caracteres morfológicos: hábito de crescimento, cor de flor e cor de semente de semente, escurecimento de coroa, apresentaram segregação 3:1, com dominância para hábito de crescimento indeterminado, flor rosa e semente com presença de estrias vermelhas e coroa escura.

A cor da vagem madura é controlado por dois genes numa proporção de 9 vagens com presença da cor rosa para 7 vagens verdes quando na maturidade fisiológica.

Os parâmetros estudados de tamanho de semente mostraram que estas características embora quantitativas apresentam uma alta herdabilidade, o que indica que podem ser explorados com sucesso em programas de melhoramento genético.

As proteínas de reserva, faseolina (*Phs*), *Spa* e *Spb* confirmaram que realmente estão no mesmo grupo de ligação, porém com distância de 31,9 cM ente *Phs* e *Spa*. Ao contrário que diz a literatura *Spa* e *Spb* não estão no mesmo loco, no entanto estão intimamente ligadas, com um distância de 1,7 cM.

Os estudos de mapeamento feito com auxílio do programa Mapmaker, mostrou que entre os 15 locos analisados existem 3 grupos ligações, mapeando um total de 186,56 cM do genoma do feijoeiro. Destes 15 locos analisados 5 não foram ligados com os demais, o que indica que para uma maior definição das ligação é necessário estudar um número maior de locos.

No grupo denominado número 1 se encontra dois marcadores fenotípicos de importância para o feijoeiro que são cor de semente (C^{st}) e resistência à mancha angular do feijoeiro, juntamente com dois locos polimórficos resultantes das ampliações dos "primers" OPA-01a e OPI-19b.

As informações quanto às ligações encontradas no grupo 1 são de relevante importância, uma vez que o gene de mancha angular embora ainda não tenha sido relacionado a grupos nenhum grupo de ligação, no entanto esta ligado ao locos *C* de cor de semente, o qual foi bastante estudado geneticamente e desta forma fica relativamente mais fácil conseguir um locos mais próximo ao gene de resistência à mancha angular no feijoeiro.

No grupo 2 se confirmou que os gene *Cor* e *V* estão realmente ligados e que na verdade são dois genes e não apenas 1 com já foi descrito.

No grupo três foi confirmada a ligação entre as proteínas de reserva, o que já era esperado.

Se faz necessário explorar mais esta população, uma vez que apresenta várias informações genéticas. Na busca de apresentar uma mapa altamente saturado e quem não sabe até obter com um marcador moleculares que possam se associarem intimamente a genes de importância agrônômica poucos conhecidos em estudos de ligações como o gene de resistência à mancha angular e/ou hábito de crescimento.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H & DRON, M. 1994. SCAR, RAPD & RFLP Markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theor. Appl. Genet.** **88**: 865-870.
- BASSETT, M.J. 1991. A revised linkage map of common bean. **HortScience** **26**(7):834-836.
- BASSETT, M.J. 1995. The dark corona character in seedcoats of common bean cosegregates with the pink flower allele v^{lae} . **J. Amer. Soc.** **120**(3): 520-522.
- BASSETT, M.J. 1996. New genes, *stp* and *atp^{hbv}*, for flower and seedcoat pattern in common bean. **J. Amer. Soc.** **121**(3): 388-392.
- BECERRA VELASQUEZ, L. & GEPTS, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centers of origin. **Genome** **37**:256-263.
- BECKMANN, J.S. & SOLLER, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.** **67**:35-43.
- BERGLUND-BRÜCHER, O. & BRÜCHER, H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. **Econ. Bot.** **30**:257-272.
- BLUM, H.; BEIR, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** **8**:93-99.
- BROW, J.W.S.; MA, Y.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1981a. Genetic variation in subunits of globulin-1 storage protein of french bean. **Theor. Appl. Genet.** **59**:83-88.
- BROW, J.W.S.; MA, Y.; OSBORNE, T.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1981b. Linkage relationships between genes controlling seed proteins in french bean. **Theor. Appl. Genet.** **60**:251-259.
- CARVALHO, G. A. S.M. 1995. **Marcadores RAPD Ligados a Genes de Resistência ao Cancro da Haste da Soja**. Universidade Federal de Viçosa.
- CHASE, C.D.; ORTEGA, V.M. & VALLEJOS, C.E. 1991. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. **Theor. Appl. Genet.** **81**:806-811.

- CHO, Y.C.; BLAIR, M.W.; PANAUD, O. & MCCOUCH, S.R. 1996. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. **Genome** 39:373-378
- CHUNWONGSE, J.; BUNN, T.B.; CROSSMAN, C. & JIANG, J. 1994. Chromosomal Localization and molecular-marker tagging of the powdery mildew resistance gene (Lv) in tomato. **Theor. Appl. Genet** 89:76-79.
- CIAT, 1990. Research constraints provisionally identified by CIAT. **Workshop on Advanced Phaseolus Beans Resarch Network**, 11-14 de setembro, 1990. Cali, Colombia.
- DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C. & GEPTS, P. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. **Econ. Bot.** 47(4):408-423.
- DEBOUCK, D.G. 1991. Systematics and morphology In: Common beans: research for crop improvement. *Edited by* VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O. CAB, Oxon, U.K. pp 55-118.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, L.H. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12(1):13-15
- EDWARDS, M.D. & PAGE, N.J. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through though computer simulation. **Theor. Appl. Genet.** 88:376-382.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. PP 220 (Documento 20)
- FRAG, H. & CLAYBERG, C.D. 1980. Inheritance of purple pod color in *Phaseolus vulgaris*. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** 21-23
- FREYMARK, P.J.; LEE, M.; MARTINSON, C.A. & WOODMAN, W.L. 1994. Molecular-marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.): Components of resistance. **Theor. Appl. Genet.** 88:305-313.
- GENTRY, H.S. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Econ. Bot.** 23:55-69.

- GEPTS, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabacea) beans. **Econ. Bot.** **44**(3):28-38.
- GEPTS, P. & BLISS, F.A. 1985a. F₁ hybrid weakness in the common bean. **J. Hered.** **76**:447-450.
- GEPTS, P. & BLISS, F.A. 1986b. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Econ. Bot.** **40**(4):469-478.
- GEPTS, P.; OSBORN, C.T.; RASHKA, K. & BLISS, F.A. 1986a. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Econ. Bot.** **40**(4):451-468.
- GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, S.R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; & GEPTS, P. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with in the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology** **85**:600-607.
- HALEY S.D.; AFANADOR, L. MIKLAS P.N.; STAVELY, J.R. & KELLY, J.D. 1994a. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. **Theor. Appl. Genet.** **88**:337-342.
- HALEY S.D.; AFANADOR, L. & KELLY, J.D. 1994b. Identification an application of a random polymorphic DNA marker for the *I* gene (Potyvirus Resistance) in common bean. **Phytopathology** **84**:157-160.
- JUNG, G.; COYNE, D.P.; SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J.; ARNAUD-SANTANA, E.; BOKOSI, J.; ARIYARATHNE, H.M.; STEADMAN, J.R.; BEAVER, J.S. & KAEPLER, S.M. 1996. Molecular marker associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** **121**(5):794-803.
- KAPLAN, L. 1981. What is the origin of the common bean? **Econ. Bot.** **35**:240-254.
- KENNARD, W.C. POETTER, K.; DIJKHUIZEN, A.; MEGLIC, V.; STAUB, J.E. & HAVEY, M.J. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. **Theor. Appl. Genet.** **89**:42-48.

- KOENIG, R. & GEPTS, P. 1989. Segregation and linkage of genes for seed proteins, isozymes, and morphological traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Hered.** **80**(6):455-459.
- KOENIG, R. SINGH, S.P & GEPTS, P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae). **Econ. Bot.** **44**(1):50-60.
- KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.** **12**:171-175.
- LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **222**:680-685
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. & NEWBURG, L. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics** **1**:174-181.
- LANDER, E. S. & BOTSTEIN, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** **121**:185-199.
- LIN, J.J. & KUO, J. 1995. AFLP™ : A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. **Focus** **17**:66-70.
- MA, Y. & BLISS, F.A. 1978. Seed proteins of common bean. **Crop. Sci.** **18**:431-437.
- MAISONNEUVE, B.; BELLEC, Y.; ANDERSON, P. & MICHELMORE, R.W. 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Latuca serriola* to clusters of resistance genes. **Theor. Appl. Genet.** **89**:96-104.
- MARTIN, G.B. BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R. WU, T. EARLE, E.D.; & TANKSLEY. S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science** **262**:1432-1436.
- MEKSEM, K. LEISTER, D.; PELEMAN, J.; ZABEAU, M.; SALAMINI, F. & GEBHARDT C. 1995. A high-resolution map of vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. **Mol. Gen. Genet** **249**:74-81.

- MESQUITA, I.A.; RAMALHO, M.A.P. & SANTOS, J.B. dos. 1990. Efeito materno na determinação do tamanho da semente do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciênc. Prát.** **14(3):**283-290.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers Linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. **Proc. Natl Acad. Sci.** **88:**9828-9832.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E; STONE, V.; BEAVER, J.S.; MONTOYA, C. & ZAPATA, M. 1996. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Sci.** **36:**1344-1351
- MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; & KELLY, J.D. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theor. Appl. Genet.** **85:**745-749.
- MORAES, C.F. de & VIEIRA, C. 1968. Hereditariedade da cor das vagens de *Phaseolus vulgaris* L., II **Rev. Ceres** **15(86):**199-209.
- NEEMA, C. SICARD, D.; ADAM, A.F.; BUCHET, S. CATTAN, I. & DRON, M. 1993. Genetic variation within natural host-pathogen populations: *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum*. **CIAT**, p. 251-260.
- NODARI, R.O.; KOINANGE, E.M.K.; KELLY, J.D. & GEPTS, P. 1992. Towards an integrated linkage map of common bean.I. Development of genomic DNA probes and levels of restriction length polymorphism. **Theor. Appl. Genet.** **84:**186-192.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L. & GEPTS, P. 1993a. Towards an integrated linkage map of common bean2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theor. Appl. Genet.** **85:**513-520.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUSMÁN, P.; GILBERTSON, R.L. & GEPTS, P. 1993b. Towards an integrated linkage map of common bean III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria Interactions. **Genetics** **134:**341-350.
- PAULA JÚNIOR, T.J. 1995. Mancha angular do feijoeiro no Estado de Minas Gerais, Brasil. **International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans.** p-6, Nov. 20-24, CIAT, Cali, Colombia.

- RAMALHO, MA.P.; SANTOS, J.B. dos & ZIMMERMANN, M.J. de O. 1993. **Genética quantitativa em plantas autógamas: Aplicações ao melhoramento do feijoeiro.** Goiânia: UFG 271p.
- REIS, W.P.; RAMALHO, MA.P. & PINTO, C.A.B.P. 1981. Herança do tamanho da semente do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Prát.** 5(1):66-71.
- ROMERO, J.; SUM, S.M.; McLEESTER, R.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1975. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.** 56:776-779.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A. & ALLARD, R.W. 1984. **Proc. Nat. Ac. Sci.** 81:8014-8018
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning, 2nd ed., 3 vols.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, E.U.A. 1989.
- SANTOS, J.B. dos; VENCOVSKY, R. & RAMALHO, M.A.P. 1985. Controle genético da produção e seus componentes primários em feijoeiro. **Pesq. Agrop. Brasil.** 20(10):1203-1211.
- SINGH, S.P. 1986. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabacea). **Econ. Bot.** 40:451-468
- SINGH, S.P. & GUTIÉRREZ, J.A. 1984. Geographical distributions of the DL_1 and DL_2 genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed, and their significance to breeding. **Euphytica** 33:337-345.
- SINGH, S.P.; GEPTS, P. & DEBOUCK, D. 1991a. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Econ. Bot.** 45(3):379-396.
- SINGH, S.P.; NODARI, R. & GEPTS, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: I. allozymes. **Crop Sci.** 31: 19-23.
- SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C. & GEPTS, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II. marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop. Sci** 31: 23-29
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Molec. Biol.** 98:503-511. 1975.

- SOUZA, E.A. de; CARVALHO, J.A. de; RAMALHO, M.A.P. & SANTOS, J.B. dos. 1992. Constituição genotípica de algumas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) relativa à cor das flores. **Ciênc. Prát.** **18**(1):82-84.
- TANKSLEY, S.D. & HEWITT, J.D. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato - a re-examination. **Theor. Appl. Genet.** **75**:811-823. 1988.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology** **7**:257-264.
- THOMAS, C.M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D.A.; NORCOTT, K.A. CHADWICK, B.P. & JONES, J.D.G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. **Plant J.** **8**(5):785-794
- TOHME, J.; GONZALEZ, D.O.; BEEBE, S. & DUQUE, M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Sci.** **36**:1375-1384
- VALLEJOS, C.E. & CHASE, C.D. 1991a. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. **Theor. Appl. Genet.** **81**:413-419.
- VALLEJOS, C.E. & CHASE, C.D. 1991b. Extended map for the phaseolin linkage group of *Phaseolus vulgaris* L. **Theor. Appl. Genet.** **82**:353-357.
- VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S. & CHASE, C.D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics** **131**:733-740.
- VELLO, N.A. & VENCOVSKY, R. 1974. Variância associadas às estimativas de variâncias genéticas e coeficientes de herdabilidade. In: **Relatório Científico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 1974. P. 238-248.
- VIEIRA, C. & SHANDS, H. 1965. A genetically controlled blotch on bean flowers. **Crop Sci.** **5**(4):371.
- VIEIRA, C. 1994. Principais doenças do feijoeiro. In: **Feijão de inverno. Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v.17, n. 178, p.43-46.
- VILARINHOS, A.D.; BARROS, E.G.; PAIVA, E.; SEDIYAMA, C.S & MORREIRA, M.A. 1994. Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Rev. Bras. Genet.** **17**:287-290.

- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** **18**:7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.K.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** **18**:6531-6535. 1990.
- YOUNG, R.A. & KELLY, J.D. 1996. RAPD Markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** **121**(1): 37-41
- ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M. & YAMADA, T. **Cultura do Feijoeiro - Fatores que Afetam a Produtividade**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, SP. 1988.