

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR RAPD LIGADO AO GENE DE RESISTÊNCIA À RAÇA 63.39 DA MANCHA-ANGULAR DO FEIJOEIRO ⁽¹⁾

CLAUDIA FORTES FERREIRA ⁽²⁾, ALUÍZIO BORÉM ⁽³⁾, GERALDO ASSIS DE CARVALHO ⁽²⁾,
SILVIA NIETSCHÉ ⁽²⁾, TRAZILBO JOSÉ DE PAULA JÚNIOR ⁽²⁾,
EVERALDO GONÇALVES DE BARROS ⁽²⁾ & MAURÍLIO ALVES MOREIRA ⁽²⁾

RESUMO

O fungo *Phaeoisariopsis griseola* é o agente causador da mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), doença que se vem destacando no Estado de Minas Gerais. Com o intuito de identificar marcadores ligados ao gene de resistência à mancha-angular (raça 63.39 de *P. griseola*), executou-se, previamente, o estudo da herança da resistência. Avaliaram-se, quanto à segregação, as populações derivadas dos cruzamentos entre Rudá (progenitor suscetível - origem mesoamericana) e MAR-2 (progenitor resistente - origem mesoamericana). Foi obtida a segregação de 3:1 (plantas resistentes:suscetíveis) na geração F₂; 1:1, no retrocruzamento com Rudá, e 1:0, no retrocruzamento com MAR-2. Os resultados sugeriram a existência de um alelo dominante governando a resistência. Posteriormente, foram construídos *bulks* (grupos) de DNA, de indivíduos F₂ resistentes e suscetíveis à raça 63.39 (origem mesoamericana) do patógeno. Esses grupos foram amplificados com 400 iniciadores. Tal amplificação com o iniciador OPE-04 gerou um fragmento de, aproximadamente, 500 pb, o qual co-segregou com o gene de resistência. Na análise de co-segregação, verificou-se que esse marcador está ligado ao gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, a uma distância de 5,8 cM.

Termos de indexação: Marcadores RAPD, resistência, feijão, *Phaseolus vulgaris*, *Phaeoisariopsis griseola*.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 29 de outubro de 1998 e aceito em 20 de maio de 1999.

⁽²⁾ BIOAGRO - Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa (MG).

⁽³⁾ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa (MG). E-mail: borem@mail.ufv.br

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF RAPD MARKER LINKED TO THE RESISTANCE GENE FOR THE RACE 63.39 OF ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN

Phaeoisariopsis griseola is the causal agent of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) angular leaf spot, considered one of the most important bean diseases in the State of Minas Gerais, Brazil. Aiming at identifying RAPD markers closely linked to the angular leaf spot resistance genes (race 63.39 - mesoamerican origin), a previous study of their inheritance was carried out. Populations derived from the cross Rudá (susceptible) x MAR-2 (resistant) both mesoamerican genetic materials, were evaluated as to disease behaviour. F₂ generation presented segregation of 3:1 (resistant: susceptible); 1:1 for the backcross to the susceptible parent (Rudá) and 1:0, for the backcross to the resistant one (MAR-2). These results strongly suggested that one dominant gene is in charge of the pathogen resistance. Resistant and susceptible DNA bulks, extracted from the F₂ population, were set up and amplified with 400 primers. Bulks amplified with primer OPE-04 gave rise to a 500 bp fragment, which co-segregated with the resistance gene. Co-segregation analysis revealed that this marker is linked to the pathogen resistance gene, at a distance of 5.8 cM.

Index terms: RAPD markers, resistance gene, common bean, *Phaseolus vulgaris*, *Phaeoisariopsis griseola*.

1. INTRODUÇÃO

A mancha-angular do feijoeiro-comum, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, encontra-se distribuída em todas as regiões onde essa leguminosa é cultivada (Brenes et al., 1983). A doença pode levar a perdas até de 80% da produção, dependendo da suscetibilidade dos cultivares, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura (Cardona-Alvarez & Walker, 1956; Cole, 1966; Schwartz et al., 1981).

O controle da doença pode ser alcançado pelo tratamento químico e a utilização de variedades resistentes (Sartorato et al., 1996). Embora tais variedades sejam a medida de controle mais importante, sua aplicação pode ser dificultada em vista da grande variação patogênica dos isolados do fungo. Estudos da variabilidade do patógeno (Pastor-Corrales & Jara, 1995; Nietsche, 1997), bem como da co-evolução patógeno-hospedeiro (Guzmán & Gilbertson, 1995) se tornam, portanto, primordiais em programas que

visam à obtenção de variedades resistentes à mancha-angular, e são auxiliados pelo uso de marcadores moleculares.

Análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD vêm sendo amplamente utilizadas na identificação e seleção eficiente dos genótipos que carregam combinações específicas de genes de resistência (Haley et al., 1994b; Foolad et al., 1993).

Marcadores RAPD ligados a genes de resistência têm sido identificados em vários trabalhos, tornando disponível o desenvolvimento de cultivares do feijoeiro resistentes a doenças, como ferrugem (Haley et al., 1993 b), mosaico comum (Haley et al., 1994 a), antracnose (Adam-Blondon et al., 1994; Young & Kelly, 1994; Alzate-Marin et al., 1997) e mancha-angular (Carvalho et al., 1997).

Estudos anteriores desenvolvidos por Nietsche (1997) demonstraram a resistência da linhagem MAR-2 à raça 63.39 (uma das mais importantes no Estado de Minas Gerais) de *P. griseola*. No presente traba-

lho, objetivou-se identificar marcadores RAPD ligados ao gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, presente na linhagem MAR-2, a partir do cruzamento entre a variedade Rudá (suscetível) e a linhagem MAR-2 (resistente).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético e avaliação da doença

As características do material genético utilizado no presente trabalho encontram-se no Quadro 1.

Plantas F₂ originadas do cruzamento entre Rudá (suscetível) e MAR-2 (resistente), inoculadas com uma suspensão de 2 x 10⁴ conídios.mL⁻¹ da raça 63.39 de *P. griseola*, foram mantidas por 48 horas em câmara de nevoeiro a 20°C ± 1 e UR > 95%. Aos 18, 25 e 30 dias após a inoculação, foram avaliadas quanto à resistência da doença, utilizando uma escala proposta por Pastor-Corrales & Jara (1995). Plantas com notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com notas acima de 4, suscetíveis.

Com o intuito de identificar plantas F₂ homozigotas resistentes para serem usadas nos bulks (grupos), plantaram-se 10 sementes F₃ de 70 plantas F₂ resistentes selecionadas. As F₃ foram inoculadas e submetidas às mesmas condições descritas acima. Após sua avaliação, selecionaram-se 8 plantas resistentes da população F₂ (com notas 1) e 8 plantas suscetíveis (com notas de 7 a 9), para compor os grupos de DNA de plantas resistentes e suscetíveis respectivamente.

2.2 Construção dos bulks (grupos de DNA)

Foi utilizado o método descrito por Michelmore et al. (1991) para análises de grupos (*bulks*) segregantes - *Bulked Segregant Analysis* (BSA), e cujo procedimento básico envolve a separação por diferenças entre duas amostras de DNA, derivadas de uma população segregante, originada de um cruzamento simples (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Identificados os indivíduos homozigotos, os grupos resistente e suscetível foram formados e analisados pela técnica de RAPD para identificar bandas heteromórficas.

2.3 Extração e amplificação do DNA

O DNA foi extraído de folhas, seguindo o método descrito por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995). Amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), de acordo com Williams et al. (1990), utilizando-se *primers* (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) de seqüência definida, e o termociclador Perkin-Elmer 9600. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação do DNA (94°C, por 15 segundos); pareamento do *primer* à fita de DNA (35°C por 30 segundos), e extensão do fragmento pela *Taq* polimerase (72°C por 1 minuto). Após 40 ciclos, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens captadas com o sistema Eagle Eye II (Stratagene) de fotodocumentação.

Quadro 1. Principais características dos genótipos utilizados no presente trabalho

Progenitor	Fonte	Flor	Grão	Reação a <i>P.griseola</i>	Origem
Rudá	CIAT	Branca	Carioca	Suscetível	Mesoamericana
MAR-2	CIAT	Branca	Carioca	Resistente	Mesoamericana

2.4 Análise de segregação e ligação genética

As análises de segregação das bandas heteromórficas e da resistência das plantas F_2 foram realizadas pelo teste de qui quadrado (χ^2). As estimativas das freqüências de recombinação e das distâncias genéticas entre as bandas RAPD heteromórficas, foram realizadas com o auxílio do programa MAPMAKER/EXP (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992) com um LOD score mínimo de 3,0 (LOD-logaritmo dos odds = 3,0: a probabilidade de que haja ligação é 1.000 vezes maior de que não haja).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testaram-se 400 iniciadores, nove dos quais geraram bandas heteromórficas. Desses, o iniciador OPE-04 (GTGACATGCC) amplificou uma banda de, aproximadamente, 500 pb, que, quando testada nos indivíduos dos grupos (resistente e suscetível) esteve presente em todos os indivíduos resistentes e ausente em todos os suscetíveis (Figura 1). Essa banda segregou na proporção de 3:1 (plantas resistentes : plantas suscetíveis) na população F_2 constituída de 158 indivíduos (Quadro 2).

Utilizando o programa MAPMAKER/EXP (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992), verificou-se que a freqüência de recombinação entre o gene

e o marcador foi de 5,35% e a distância entre eles, de 5,8 cM, com um LOD score calculado de 37,4.

Marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a genes de resistência têm sido identificados, tornando disponível o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças do feijoeiro. Miklas et al. (1993) identificaram o primeiro marcador RAPD OA14₁₁₀₀ fortemente ligado ao gene *UP-2* conferindo resistência à ferrugem-do-feijoeiro, não encontrando nenhum recombinante. Haley et al. (1993) identificaram um marcador ligado a 2,15 cM do bloco de genes de resistência à ferrugem-do-feijoeiro, a partir do cruzamento entre BBL-47 (progenitor suscetível) e B190 (progenitor resistente) utilizando o marcador OF10₉₇₀. Com o objetivo de identificar marcadores ligados ao gene *I* (resistência ao BCMV), Haley et al. (1994 a), utilizando o marcador OW13₆₉₀, verificaram que ele estava ligado ao gene a uma distância de 1,3 a 5,0 cM, em cinco populações segregantes. Young & Kelly (1994) marcaram o gene *Are*, responsável por resistência à antracnose do feijoeiro, empregando o marcador OQ4₄₄₀, a uma distância de 2,0 cM. Um segundo marcador ligado ao mesmo gene *Are* foi encontrado por Adam-Blondon et al. (1994), que, usando o marcador RAPD R₀H₂O, observaram que este estava ligado a 0,5 cM de distância.

Estudos realizados por Alzate-Marin et al. (1997), com o objetivo de marcar genes de resistência à antracnose do feijoeiro, demonstraram que os indivíduos F_2 derivados do cruzamento de

Quadro 2. Teste do χ^2 para segregação 3:1 de bandas do marcador RAPD OPE-04 na população F_2 do cruzamento de Rudá (suscetível à raça 63.39 de *Phaeoisariopsis griseola*) x MAR-2 (resistente à raça 63.39 de *P. griseola*)

Plantas	Resistente	Valor	Suscetível
Razão esperada.....	3	–	1
Freqüência observada	122	–	36
Qui quadrado (χ^2)	–	0,4134	–
Probabilidade	–	0,5-0,7	–
Porcentagem de recombinação/distância, % ..	–	5,35% / 5,8 cM	–

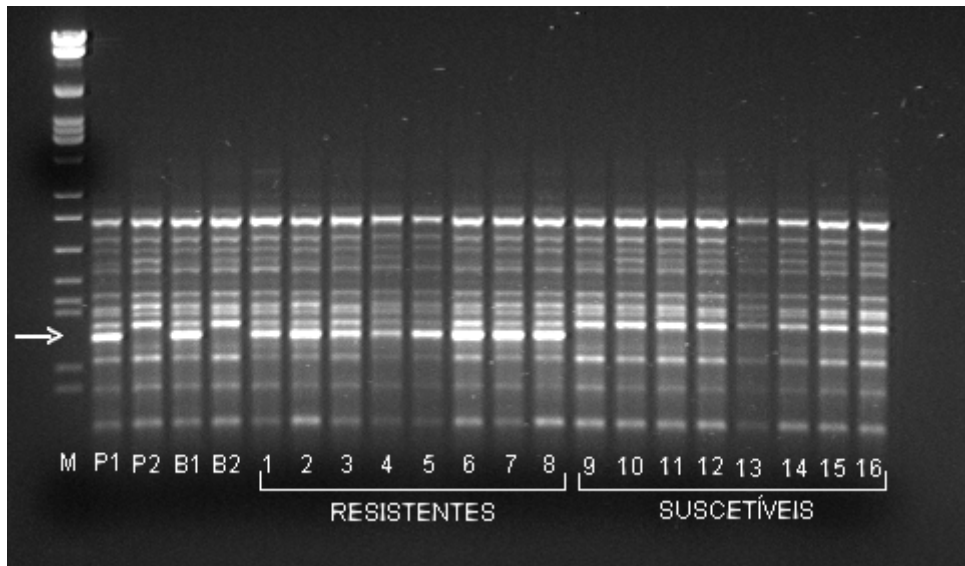


Figura 1. Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o *primer* OPE-04 do DNA dos progenitores MAR-2 e Rudá (P1 e P2 respectivamente) e dos *bulks* resistente e suscetível (B1 e B2 respectivamente). Indivíduos do *bulk* resistente (1 a 8) e do *bulk* suscetível (9 a 16). M = fago λ -cut digerido com enzimas *EcoRI*, *Bam HI* e *Hind III*)

Michelite (progenitor suscetível) e AB 136 (progenitor resistente), quando testados com o *primer* Z 04, geraram uma banda ligada a 2,8 cM do gene de resistência.

Carvalho et al. (1997), em estudos efetuados a partir da população F_2 do cruzamento entre Rudá (progenitor suscetível) e AND 277 (progenitor resistente), identificaram um marcador ligado a 5,7 cM do gene de resistência à raça 63.23 de *P. griseola*, utilizando o iniciador OPH-13. Foi testado em seu trabalho o iniciador OPE-04 (comunicação pessoal), não se obtendo resultados satisfatórios. Isso é um forte indicador de que, possivelmente, o gene de resistência presente em MAR-2 e AND-277 sejam diferentes, necessitando de outros trabalhos para confirmação e gerando dados interessantes do ponto de vista de piramidação de genes de resistência do feijoeiro a diferentes raças de um patógeno.

O marcador identificado no presente trabalho, bem como os reportados na literatura relacionados a

outras doenças do feijoeiro, demonstram a importância da utilização do marcador RAPDs nos programas de melhoramento que visam à resistência a doenças. Com isso, piramidação de genes se torna uma estratégia de controle bastante adequada, possibilitando que cultivares sejam resistentes a diferentes doenças e a diferentes raças do mesmo patógeno. O uso dos marcadores moleculares, portanto, tornam-se verdadeiras ferramentas no monitoramento da introgressão da resistência em variedades de interesse, tornando disponível não somente a piramidação de genes como também auxiliando no melhor entendimento dos mecanismos genéticos presentes nas fontes de resistência.

4. CONCLUSÃO

A análise de RAPD permitiu a identificação do marcador OPE-04 ligado ao gene de resistência à raça 63.39 de *P. griseola*, a uma distância de 5,8 cM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, **18**(2):265-273, 1995.
- ADAM-BLONDON, A.; SEVIGNAC, M.; BANNEROT, H. & DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *are*, a simple dominant gene conferring resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in french bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **88**:865-870, 1994.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CARVALHO, G.A.; MENARIM, H.; BAÍA G.S.; PAULA JUNIOR, T.J.; BARROS E.G. & MOREIRA M.A. Identification of RAPD markers associated with resistance to anthracnose in common bean. *Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, **40**(40):130-131, 1997.
- BRENES, B.M.; CHAVES, G.M. & ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **8**:599-602, 1983.
- CARDONA-ALVAREZ, C. & WALKER, J.L. Angular leaf spot of bean. *Phytopathology*, St. Paul, **46**(11):610-615, 1956.
- CARVALHO, G.A.; NIETSCH, S.; ALZATE-MARIN, A.L.; FERREIRA, C.F.; PAULA JUNIOR., T.J.; FALEIRO, F.G.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **22**:255-257, 1997.
- COLE, H. Angular leaf spot associated with severe defoliation of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Disease Reporter*, Beltsville, **50**:494, 1966.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**:13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, EMBRAPA, 1995. 220p.
- FOOLAD, M.R.; JONES, R.A. & RODRIGUES, R.L. RAPD marker for constructing intraspecific tomato gene maps. *Plant Cell Reports*, Berlin, **12**:293-297, 1993.
- GUZMÁN, P. & GILBERTSON, R.L. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology*, St. Paul, **85**(5):600-607, 1995.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K. & KELLY, J.D. Identification and application of RAPD marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. *Phytopathology*, St. Paul, **84**(2):157-160, 1994a.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K. & KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Science*, Madison, **34**:1061-1066, 1994 b.
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; BYRUM, J. & KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **86**:505-512, 1993.
- LANDER, E.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. & NEWBURGH, L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experiment and natural populations. *Genomics*, Dulceth, **1**:174-181, 1987.
- LINCOLN, S.E.; DALY, M. & LANDER, E. *Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0*. 2.ed. Cambridge, Whitehead Institute Technical Report, 1992.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, J. & KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, **88**:9828-9832, 1991.
- MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R. & KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **85**:745-749, 1993.
- NIETSCH, S. Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris*. Viçosa, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PASTOR-CORRALES, M.A. & JARA, C.E. La evolución de *P. griseola* con el frijol comum en América Latina. *Fitopatologia Colombiana*, Cali, **19**(1):15-23, 1995.
- SARTORATO, A.; RAVA, A.C. & RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAUJO, R.; RAVA, C.A.; STONE, L.F. et al. *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba, POTAFOS, 1996. p. 296.
- SCHWARTZ, H.F.; CORREA-VICTORIA, F.; PINEDA, D.P.A.; OTOYA, M.M. & KATHERMAN, M.J. Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. *Plant Disease*, St. Paul, **65**:494-496, 1981.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Eynshan, **18**:6531-6535, 1990.
- YOUNG, R.A. & KELLY, J.D. A RAPD marker for the *Are* anthracnose resistance gene in beans. *Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, **37**:77-78, 1994.