**MAPEAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À NODULAÇÃO E
RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* EM *P. vulgaris* L. SOB
DOIS NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA**

ALESSANDRA ALVES DE SOUZA
Bióloga

Orientadora : Prof^a. Dr^a. SIU MUI TSAI

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia, Área de
concentração : Microbiologia Agrícola

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Souza, Alessandra Alves de

Mapeamento de regiões genômicas associadas à nodulação e resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em *P. vulgaris* L. sob dois níveis de adubação nitrogenada / Alessandra Alves de Souza. - Piracicaba, 1996.

79p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Bactéria fixadora de nitrogênio 3. Crestamento comum do feijoeiro 4. Feijão - Adubação nitrogenada 5. Feijão - Resistência a doença 6. Nitrogênio em feijão - Fixação 7. Rizóbio I. Título.

CDD 635.652

**MAPEAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À NODULAÇÃO E
RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* EM *P. vulgaris* L. SOB
DOIS NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA**

ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Aprovada em: 09/12/1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

Dr. Marcos Antônio Machado

Profª. Dra. Siu Mui Tsai

ESALQ/USP

Centro de Citricultura "Sylvio Moreira"/IAC

CENA/USP

Profª. Dra. Siu Mui Tsai

Orientadora

À minha mãe pelo carinho, incentivo e esforço desempenhado na minha educação e formação escolar.

Ao meu marido pela paciência, ajuda e toda felicidade que tem me dado.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

- À Profª Drª. Siu Mui Tsai, pela orientação, disponibilidade às discussões e pela estreita amizade com seus orientados, qualidades que tornaram mais agradáveis e compensadores estes anos de convivência.

- Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela importante e indispensável colaboração, estímulo à pesquisa, confiança na capacidade de trabalho das pessoas e pelas palavras de apoio nos momentos de dificuldade. Qualidades que me deram forças para que este trabalho se concretizasse.

- Aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do CENA/USP, pelo auxílio na execução dos trabalhos experimentais; e aos pesquisadores David Moon, Antônio Figueira e Cláudia Bellato pelas valiosas sugestões e discussões que possibilitaram o enriquecimento desta dissertação.

- Ao Dr. Paul Gepts da Universidade de Davis-Califórnia pelo fornecimento das sondas, linhagens recombinantes de feijoeiro e estirpe de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

- À equipe do laboratório de Biologia do Solo do IPA - PE, em especial ao Dr. Hélio Burity, que possibilitou minha introdução ao meio científico e constante estímulo no alcance de novos objetivos.

- Aos colegas de pós-graduação: Raquel, Wladecir, Júlio César, Gaspar, Cilson, Célia, Therese, Silvana, Cileide, Patrícia, Marilha e todos os outros conquistados durante este período. Com eles foram divididos momentos de angústia e de alegria, os quais tornaram estes anos inesquecíveis.

- Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O cretamento bacteriano comum.....	3
2.2. Fixação biológica de nitrogênio.....	7
2.3. Marcadores moleculares - RFLP.....	12
2.4. QTLs de resistência à doença.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Material vegetal.....	18
3.2. Condições experimentais.....	18
3.3. Avaliação do número de nódulos.....	19
3.4. Avaliação da reação à bacteriose.....	20
3.5. Genotipagem das linhagens recombinantes.....	21
3.6. Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Genotipagem	25
4.2. Efeito do nitrogênio na resistência à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	26
4.3. Detecção de QTLs de resistência à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	27

4.4. Efeito do nitrogênio no número de nódulos.....	37
4.5. Detecção de QTLs associados a número de nódulos.....	38
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1. Resistência ao crestamento bacteriano comum.....	46
5.2. Número de nódulos.....	49
5.3. Interação entre QTLs associados a número de nódulos e resistência ao crestamento bacteriano comum.....	52
6. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE.....	66

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1. Reação das linhagens recombinantes e linhagens parentais BAT-93 e Jalo EEP558 a <i>X. c. phaseoli</i> avaliada por área de lesão foliar nos tratamentos sem e com 5 mM NH_4NO_3	29
2. Reação das linhagens recombinantes e linhagens parentais BAT-93 e Jalo EEP558 a <i>X. c. phaseoli</i> avaliada por nota das lesões foliares nos tratamentos sem e com 5 mM NH_4NO_3	30
3. <i>Loci</i> marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com a resistência à <i>X. c. phaseoli</i> , sob condições de 0 e 5 mM NH_4NO_3	33
4. Interações significativas entre <i>loci</i> marcadores e nível de nitrogênio para área de lesão.....	35
5. Frequências observadas de genótipos parentais para <i>loci</i> marcadores significativamente associados com a resistência à <i>X. c. phaseoli</i>	36
6. Número de nódulos das linhagens recombinantes $F_{8,9}$ crescidas em condições de 0 e 5 mM NH_4NO_3	40
7. <i>Loci</i> marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com número de nódulos na ausência de NH_4NO_3	42

8. <i>Loci</i> marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com número de nódulos, sob condições de 5 mM NH_4NO_3	43
9. Frequências observadas de genótipos parentais para <i>loci</i> marcadores significativamente associados com número de nódulos.....	44

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Distribuição da frequência da área das lesões de <i>X. c. phaseoli</i> em linhagens recombinantes F _{8,9} . (A) SemN; (B) com 5mM NH ₄ NO ₃	31
2. Distribuição da frequência das notas das lesões de <i>X. c. phaseoli</i> em linhagens recombinantes F _{8,9} . (A) sem N ; (B) com 5 mM NH ₄ NO ₃	32
3. Interações entre <i>loci</i> marcadores e nível de nitrogênio (A) PAL-5; (B) D1367; (C) D1287.....	34
4. Distribuição da frequência do número de nódulos em linhagens recombinantes F _{8,9} do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558. (A) sem N ; (B) com 5 mM NH ₄ NO ₃	41
5. Mapa genético de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. proveniente de uma população F ₂ do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558 (GEPTS <i>et al.</i> , 1993) e localização de QTLs associados a número de nódulos e resistência à <i>X. c. phaseoli</i> sob condições de 0 e 5 mM NH ₄ NO ₃	45

MAPEAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À NODULAÇÃO E
RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* EM *P. vulgaris* L. SOB DOIS
NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA

Autora: ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. SIU MUI TSAI

RESUMO

Marcadores RFLPs foram utilizados para estimar efeitos fenotípicos de regiões genômicas (QTLs) de *P. vulgaris* L. associadas a resistência à bacteriose e ao número de nódulos, sob dois níveis de adubação nitrogenada (0 e 5 mM NH_4NO_3 em solução de Sarruge). Foram utilizadas 50 linhagens recombinantes F₈₋₉, oriundas do cruzamento entre BAT-93 (cv. resistente, baixo número de nódulos) e Jalo EEP558 (cv. suscetível, alto número de nódulos). A avaliação da reação à bacteriose foi feita por nota e área da lesão foliar causada pelo patógeno.

Análise de variância foi utilizada para avaliar o efeito do nitrogênio sobre a resistência ao cretamento bacteriano comum (CBC) e o número de nódulos (NN). Aplicando o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi verificada uma interação significativa entre níveis de N e linhagens, tanto para nota quanto para área de lesão. Foi verificado que a maioria das linhagens apresentou maior suscetibilidade à bacteriose em presença de N, entretanto, outras foram mais resistentes. A maioria das linhagens que cresceram sob 5 mM NH_4NO_3 apresentou uma acentuada redução no NN, enquanto que algumas linhagens e os parentais não sofreram influência deste nutriente.

Para detecção de ligação entre marcadores RFLPs e QTLs de resistência ao CBC e nodulação, foram empregadas análises de variância ($P < 0,01$) utilizando 53 *loci* marcadores distribuídos em 13 regiões genômicas. Para tal foi usado o estado alélico de

cada *locus* marcador como variável independente e as características fenotípicas (NN, nota e área de lesões) como variável dependente.

Para nota das lesões foram detectados oito associações significativas distribuídas em quatro regiões genômicas, explicando individualmente de 12 a 17 % da variação fenotípica. Para área das lesões foram detectados nove *loci* marcadores associados a resistência distribuídos em três regiões genômicas, explicando individualmente de 13 a 14 % da variação fenotípica. Em ambas avaliações, o QTL localizado no grupo de ligação D7 explicou a maior porcentagem da variação fenotípica, independente do nível de N utilizado. Na avaliação por área de lesão foi detectado um QTL apenas na ausência e outro apenas na presença de N-mineral, demonstrando que dependendo do nível de N, diferentes QTLs de resistência poderão ser detectados.

Na avaliação do NN, 13 associações significativas distribuídas em 7 regiões genômicas foram detectadas em condições de ausência de N. Na condição com N, foram detectadas apenas 4 associações significativas distribuídas em 4 regiões genômicas. No tratamento sem N os QTLs explicaram numa faixa de 10 - 18 % da variação fenotípica, enquanto que para o tratamento com N foram explicados 8 - 11 %. Apenas um QTL localizado no grupo de ligação D7 foi significativo em ambos níveis de N, demonstrando que houve uma forte influência do N-mineral na expressão de QTLs associados à esta característica.

O QTL localizado no grupo de ligação D7 indica ser de efeito principal para ambas características, pois além de ser significativo em condições de ausência e presença de nitrogênio, foi responsável pela maior porcentagem da variação fenotípica. O QTL localizado nesta região, associado ao marcador CHI (“chalcone isomerase”), foi significativo tanto para resistência quanto para nodulação. Porém foram os alelos de BAT-93 responsáveis pela resistência ao CBC e os de Jalo EEP558 por maior NN, sugerindo que pode ter ocorrido pleiotropia ou genes ligados responsáveis por estas características.

MAPPING GENOMIC REGIONS FOR NODULATION AND RESISTANCE TO
Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* IN *P. vulgaris* L. UNDER TWO LEVELS OF
MINERAL NITROGEN

Author: Alessandra Alves de Souza

Adviser: Siu Mui Tsai

SUMMARY

RFLP markers were used to identify genomic regions (QTLs) associated with Common Bacterial Blight (CBB) and to nodule number (NN) under two levels of mineral nitrogen (0 and 5mM NH_4NO_3 in Sarruge solution). Fifty $F_{8,9}$ recombinant lines, originating from BAT-93 (Low NN, Resistant to CBB) and Jalo EEP558 (High NN, Susceptible to CBB). The extent of CBB infection was assessed by a lesion score and lesion area.

Analysis of variance was used to statistically assess the effect of N on resistance to CBB and NN. Using the Tukey test, a positive correlation (5% probability) was demonstrated between recombinant lines and resistance to CBB. It was observed that while the majority of the $F_{8,9}$ population showed increased sensitivity to CBB in the presence of 5mM NH_4NO_3 , some individuals did show increased resistance. The majority of the $F_{8,9}$ population showed a decrease in NN at 5mM NH_4NO_3 , while only a minority and the both parents showed no effect.

Analysis of variance ($P < 0.01$) was used to look for linkages between the RFLP markers (covering 13 genomic regions) resistance to CBB and NN in attempts to identify QTLs. In the analyses the allelic state of the marker was the dependent character and the phenotypic characteristics (NN and CBB) the dependent variable.

Using lesion score eight significant marker associations were detected, distributed in four genomic regions which individually explained 12-17% of the phenotypic variation. Similarly using lesion area nine marker associations in three genomic regions were identified which individually accounted for 13-14% of the phenotypic variation. Both analyses identified one QTL, localised in linkage group D7, which individually contributed for the majority of the phenotypic variation observed and was apparently independent of the mineral N level used. Two QTLs were identified, one in the absence and the other in the presence of mineral N, demonstrating the effect of the level of mineral N on the identification of QTLs for resistance.

Analysis of the NN in the absence of mineral N revealed thirteen associated markers distributed in seven genomic regions (individually 10-18 % of the phenotypic variation) and in the presence of mineral N four markers distributed in four genomic regions (individually 8-11 % of the phenotypic variation). Only one QTL, in linkage group D7, was detected under both levels of mineral N, demonstrating the influence of mineral N levels on the detection of QTLs associated with nodule number.

In general the alleles from BAT-93 were responsible for the resistance to CBB and those from Jalo EEP558 for the increased nodule number. Interestingly, the coincident D7 QTLs, which were individually responsible for the greatest phenotypic variation for both resistance to CBB and NN (both in the presence and absence of mineral N) shared one common RFLP marker, CHI (Chalcone isomerase). Considering this QTL and other coincident QTLs for NN and resistance to CBB, it can be suggested that either the same genes or pleiotropic effects are involved in the expression of these phenotypes.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é de grande importância para o país, pois além de representar uma valiosa fonte protéica, possui outras propriedades alimentares desejáveis, como alto teor de fibra e efeito hipocolesterolêmico (TSAI *et al.*, 1992). A produtividade média do feijoeiro é baixa, cerca de 450 kg/ha. No entanto, em áreas altamente tecnificadas, esta produtividade chega a 2.500 kg/ha (FAO, 1990). A baixa produtividade do feijoeiro deve-se principalmente à sua suscetibilidade a mudanças climáticas e a uma série de doenças (ROSOLEM, 1987).

Dentre as doenças de origem bacteriana que afetam a cultura, o cretamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, é a que apresenta maior importância, pois tem sido encontrada em quase todas as regiões produtoras do país (RAVA & SARTORATO, 1994).

O feijoeiro, a exemplo de outras leguminosas, é hospedeira de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*. Esta simbiose é de grande importância para agricultura, pois estima-se que cerca de 90×10^6 t N₂ /ano são fixados em solos agricultáveis. No entanto, o uso de sementes inoculadas com rizóbio não tem utilização generalizada entre os produtores, pois a simbiose com o feijoeiro é mais sensível às condições ambientais. Há indicações de que a baixa efetividade desta simbiose deve-se ao fato dos programas de melhoramento do feijoeiro terem priorizado o aumento de características agronomicamente desejáveis, em detrimento de características essenciais como a fixação biológica de nitrogênio (BULISANI, 1987; FREIRE, 1992).

Alguns fatores podem ser limitantes à fixação biológica de nitrogênio. Dentre estes, a disponibilidade de nitrogênio mineral existente no solo é um dos que tem maior efeito sobre o estabelecimento da simbiose. Isto ocorre devido à inibição da nodulação provocada pela amônia e pelo nitrato. Este nutriente também parece ter um importante efeito sobre a interação planta-patógeno, pois vários autores mencionam que o aumento de

fertilizante nitrogenado pode aumentar ou diminuir a severidade da doença nas plantas (AGRIOS, 1988).

P. vulgaris é uma espécie diplóide ($2n = 22$), autógama e com genoma em torno de 1.200 cM (655 Mpb) (VALLEJOS *et al.*, 1992). Três mapas genéticos do feijoeiro já foram construídos: um por VALLEJOS *et al.* (1992), cobrindo 960 cM do genoma, constituído por 11 grupos de ligação; outro por NODARI *et al.* (1993), cobrindo 1.056 cM com 15 grupos de ligação, sendo atualmente convertido para 13 grupos de ligação (GEPTS *et al.*, 1993); e o último por ADAM-BLONDON *et al.* (1994), cobrindo 567,5 cM do genoma com de 12 grupos de ligação.

NODARI *et al.* (1993) investigaram fatores genéticos controlando interações entre o feijoeiro e as bactérias *X. c. phaseoli* e *Rhizobium tropici*. Foi utilizada uma população F_3 originada do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558, contrastantes para número de nódulos e resistência à bacteriose. Foram encontrados 4 QTLs (“Quantitative Trait Loci”) para cada uma das características, explicando 50% da variação fenotípica para nodulação e 75% para resistência ao crestamento bacteriano comum. Um QTL localizado no grupo de ligação D7 foi associado tanto para número de nódulos quanto para resistência à bacteriose, podendo ser devido a genes ligados ou um mesmo gene de efeito pleiotrópico. Os autores sugerem que outros experimentos devam ser conduzidos utilizando outros isolados das bactérias, diferentes estágios de desenvolvimento das plantas e principalmente outras populações e outros ambientes.

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito fenotípico de QTLs que controlam o número de nódulos e resistência à *X. c. phaseoli* em linhagens recombinantes F_{8-9} do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558, sob efeito de dois níveis de N-mineral (0 e 5 mM NH_4NO_3).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O crestamento bacteriano comum

Bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são bastonetes gram-negativos, com um único flagelo polar. Suas colônias apresentam coloração amarela e aparência mucosa, sendo estritamente aeróbias com crescimento ótimo entre 25-30°C. Produzem um polissacarídeo denominado xantana, o qual é utilizado como emulsificante, estabilizante, geleificante, etc.(SNEATH *et al.*, 1986). Este gênero apresenta cinco espécies: *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis* e *X. ampelina*. A espécie *X. campestris* destaca-se por apresentar um grande número de hospedeiros de dezenas de famílias, entre elas leguminosas, crucíferas, gramíneas, euforbiáceas, solanáceas, etc. As reações em diversos hospedeiros, juntamente com outras características bioquímicas, permitiram a separação de mais de cem patovares (SNEATH *et al.*, 1986). O patovar *X. c. phaseoli*, é patogênico ao feijoeiro (*P. vulgaris*), feijão aycote (*P. coccineus* L.), caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp. ssp. *unguiculata*), soja (*Glicine max* (L) Merrill), e outras leguminosas (RAVA e SARTORATO, 1994).

X. c. phaseoli é o agente causal da doença denominada crestamento bacteriano comum (CBC), que tem sido incluída entre as principais doenças do feijoeiro devido a sua ampla distribuição, efeito prejudicial na produtividade e dificuldade de controle (VALARINI & MENTEN, 1991). Sintomas da doença manifestam-se em toda parte aérea da planta, afetando folhas, vagens e sementes (RAVA & SARTORATO, 1994). A disseminação ocorre através de sementes contaminadas, onde a bactéria pode sobreviver tanto no seu interior quanto superficialmente, até mesmo em genótipos tolerantes, podendo, desta forma, ser introduzida facilmente em áreas indenes (SEATTLER, 1991). Estudos epidemiológicos de campo demonstraram que um nível de infecção das sementes de apenas 0,5 % pode ocasionar séria epidemia na cultura

(WALLEN & SUTTON¹, 1965 citado por RAVA & SARTORATO, 1994). Temperaturas entre 28 e 30°C e alta umidade podem favorecer o progresso rápido da doença no campo. Esta bactéria pode ser facilmente disseminada através da chuva, vento, solo, contato entre folhas, água de irrigação, homem, animais e insetos (SEATTLER, 1991).

O controle do CBC pode ser obtido através do uso de sementes livre do patógeno, rotação de cultura e eliminação de ervas daninhas, que podem servir como fonte de inóculo. O emprego de cultivares resistentes é o método mais prático e econômico de controle (COYNE & SCHUSTER 1974; RAVA, 1984). O controle químico não é completamente efetivo ou não é viável economicamente para a cultura do feijoeiro (SILVA *et al.*, 1989).

No Brasil, esta doença foi detectada pela primeira vez no Estado do Pará e atualmente é encontrada em quase todas as regiões produtoras (RAVA, 1984). O mesmo autor trabalhando com diferentes isolados de *X. c. phaseoli*, provenientes de várias regiões do mundo, demonstrou que a maioria dos isolados do Brasil apresentaram maior agressividade em relação aos demais, o que já havia sido anteriormente observado por VALLADARES-SANCHEZ *et al.* (1979).

Um aspecto controvertido no melhoramento da resistência do feijoeiro à *X. c. phaseoli* é a interação isolados x hospedeiros. Diferenças significativas entre isolados x hospedeiros foram observadas por RAVA (1984); SCHUSTER *et al.* (1983) e VALADARES-SANCHES *et al.* (1979), demonstrando que determinado cultivar resistente a um isolado, não é necessariamente resistente a outro. Entretanto, alguns trabalhos mencionam que a utilização de apenas um isolado altamente agressivo é suficiente para discriminar o grau de resistência dos cultivares e que a interação isolados x hospedeiros apresenta escassa significação prática para o melhoramento. (RAVA *et al.*, 1989; RAVA & ROMEIRO, 1990).

¹WALLEN, V.R. & SUTTON, D.M. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field beans in Ontario. Canadian Journal of Botany, Ottawa, vol. 43, p.437-466, 1965.

Fatores ambientais também podem interferir na suscetibilidade de alguns cultivares. Em experimentos de campo conduzidos em dois locais de Nebraska: Lincoln e Scottsbluff, VALLADARES-SANCHEZ *et al.* (1983) encontraram interações significativas entre genótipos x locais. Foram testados seis genótipos para resistência à *X. c. phaseoli*, dois destes genótipos, “Guali” e “Tacarigua” foram mais suscetíveis em Lincoln do que em Scottsbluff. Os autores atribuem este resultado as altas temperaturas noturnas encontradas em Lincoln, e alertam que em trabalhos que visem a avaliação da reação de germoplasmas para este patógeno, os experimentos devem ser conduzidos em diferentes ambientes, pois ocorrem efeitos genéticos significativamente diferentes de um local para o outro.

A resistência à *X. c. phaseoli* proveniente de *Phaseolus acutifolius* e *Phaseolus coccineus* foi transferida com sucesso para *P. vulgaris*. Contudo, muitas das fontes originais ou derivadas de resistência são pouco adaptadas a climas tropicais (SILVA *et al.*, 1989). Essa baixa adaptação torna o cultivar selecionado mais suscetível ao patógeno. A maior suscetibilidade em climas tropicais é atribuída a menor exposição das plantas a luz e a indução de florescimento precoce. Com isto conclui-se que a luminosidade interfere na resistência ou suscetibilidade dos cultivares (WEBSTER *et al.*, 1983). Dados concordantes foram apresentados por MOHAMED & COYNE (1995), onde o cultivar suscetível testado PC-50 de florescimento precoce foi ainda mais suscetível em fotoperíodo curto que em fotoperíodo longo, e os cultivares resistentes XAN-159 e BAC-6 desenvolveram resposta de hipersensibilidade, caracterizada por rápida clorose da folha e desfolhação, mais rapidamente em fotoperíodo longo que em fotoperíodo curto. Germoplasma suscetíveis à *X. c. phaseoli* nos trópicos pode mostrar menor intensidade da doença em altas latitudes, possivelmente devido à resposta fisiológica que a planta apresenta em diferentes ambientes. No entanto, o mecanismo de ação do fotoperíodo na reação da planta à *X. c. phaseoli* não é conhecido (MOHAMED & COYNE, 1995). A precocidade de alguns cultivares parece estar relacionada com a resistência à *X. c. phaseoli*, desta forma VALLADARES-SANCHEZ *et al.* (1979) mencionam que genes que determinam tolerância ao CBC estão ligados a genes que controlam maturidade tardia da planta, pois não encontraram nenhum segregante para precocidade e tolerância à *X. c.*

phaseoli nos cruzamentos entre diferentes genótipos de *P. vulgaris*. Entretanto, resultados contraditórios foram apresentados por COYNE & SCHUSTER (1974) que afirmam que o gene que controla a precocidade pode ser transferido por retrocruzamento e re combinado para tolerância a *X. c. phaseoli*. Desta forma, subentende-se que dependendo dos parentais utilizados para o melhoramento, pode-se obter cultivares com precocidade e resistência à *X. c. phaseoli*.

Diferenças de suscetibilidade foram encontradas em folhas e vagens de *P. vulgaris* e *P. coccineus* (VALLADARES-SANCHEZ *et al.*, 1979). *P. coccineus* mostrou-se resistente nas folhas e suscetível nas vagens, enquanto que em *P. vulgaris*, esta reação mudou conforme o cultivar testado. Resultados similares foram encontrados por SCHUSTER *et al.* (1983) com o cultivar BAT-93 (CIAT), que apresentou folhas resistentes e vagens suscetíveis para a maioria dos isolados testados. Já o cultivar BBSR-130 apresentou folhas suscetíveis para um isolado e vagens moderadamente resistente para todos os isolados. ARNAUD-SANTANA *et al.* (1994) também encontraram baixas correlações entre resistência à *X. c. phaseoli* em folhas e vagens e em folhas e sementes, porém, detectaram correlações entre resistência em vagens e sementes. Estes resultados sugerem que diferentes reações em diferentes partes das plantas são controladas por diferentes genes. Desta forma, deve-se selecionar fontes tolerantes em folhas e em vagens, tanto para reduzir a doença quanto para evitar a transmissão da bactéria através de sementes de vagens infectadas (ARNAUD-SANTANA *et al.*, 1994; VALLADARES-SANCHEZ *et al.*, 1979; 1983). Entretanto, alguns autores encontraram alto coeficiente de correlação entre a reação de doença das folhas e vagens, porém, mencionam que esta associação pode ser devido a efeitos pleiotrópicos de um mesmo gene ou genes ligados controlando reações em diferentes partes da planta. (RAVA *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 1989).

Phaseolus acutifolius apresenta resistência ao CBC, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade na forma de pequenas lesões necróticas em folhas e vagens. Em gerações F₁, F₂ e F₃ de dois cruzamentos de *P. acutifolius*, foi descrito um gene dominante responsável pela resistência à *X. c. phaseoli* (DRIJFHOUT & BLOK, 1987). Embora a resistência à *X. c. phaseoli* em *P. acutifolius* seja pouco complexa, isto parece

não ocorrer em *P. vulgaris*, mesmo para cultivares derivados de *P. acutifolius*, como é o caso de PI 207.262, Great Northern, Jules e BAT-93. *P. vulgaris* apresenta resistência poligênica (ARNAUD-SANTANA *et al.*, 1994; COYNE & SCHUSTER, 1974; DRIJFHOUT & BLOK, 1987; VALLADARES-SANCHEZ *et al.*, 1979; 1983), embora em alguns genótipos haja evidências da presença de resistência monogênica (SILVA *et al.*, 1989).

NODARI *et al.* (1993) identificaram quatro regiões genômicas como responsáveis por 75% da variação fenotípica para a resistência ao CBC. A aditividade foi o principal modo de ação gênica. Foram utilizadas 70 famílias F₃ do cruzamento entre BAT-93 (moderadamente resistente ao CBC) e Jalo EEP558 (suscetível). Efeito gênico aditivo também foi encontrado por RAVA *et al.* (1987) e VALLADARES-SANCHEZ *et al.* (1983).

Segregação transgressiva para resistência e suscetibilidade foi observada em populações originadas de cruzamentos entre cultivares de feijão resistentes e suscetíveis ao CBC (VALLADARES-SANCHEZ *et al.*, 1979; SILVA *et al.*, 1989). Uma das possibilidades levantadas para este fenômeno é a presença de alelos de resistência no parental suscetível ou vice-versa. Estes resultados sugerem que resistência pode ser obtida em segregantes transgressivos derivados de alguns cruzamentos entre germoplasma suscetível e resistente.

2.2. Fixação biológica de nitrogênio

O feijoeiro, a exemplo de outras leguminosas, apresenta a capacidade de associar-se simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium*, resultando no desenvolvimento de nódulos nas raízes e fixação do nitrogênio atmosférico. Tanto a nodulação, como a própria fixação, são etapas finais de uma série de interações complexas entre planta e bactéria (COLETTA FILHO, 1993).

Espécies de *Rhizobium* são caracterizadas com base nos seus aspectos fenotípicos como: morfologia da colônia, crescimento em meio seletivo, espectro de

hospedeiros e várias características metabólicas e genotípicas (VINCENT, 1970). As espécies de *Rhizobium* capazes de nodular o feijoeiro são *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium tropici*. A primeira espécie apresenta três biovars: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, sendo que esta última foi recentemente classificada como *Rhizobium etli*. O *Rhizobium tropici* além do feijoeiro nodula outras espécies de leguminosas, principalmente forrageiras (PIÑERO *et al.*, 1988).

Os principais critérios de seleção de estirpes de *Rhizobium* para serem utilizadas como inoculantes é a eficiência simbiótica, adaptação às condições locais e competitividade com as estirpes nativas do solo (FREIRE, 1992). Desta forma, *R. tropici* apresenta-se bastante promissor para ser utilizado como inoculante na cultura do feijoeiro, pois além de ter demonstrado eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) entre genótipos de feijoeiro (COLETTA FILHO, 1993), 80 a 100% do rizóbio nativo no Brasil pertence a esta espécie, o que demonstra seu enorme grau de adaptabilidade (HUNGRIA, 1993).

A eficiência da FBN varia com a bactéria, a planta e as condições ambientais. Leguminosas forrageiras usualmente fixam mais nitrogênio do que as produtoras de grãos, devido a necessidade de maior demanda por carboidratos necessários para o enchimento de grãos (FREIRE, 1992). Dentre as leguminosas produtoras de grãos, o feijoeiro é uma das que apresenta menor eficiência simbiótica, pois a quantidade de N₂ fixado não é suficiente para suprir todas as necessidades fisiológicas da planta, ocorrendo senescência dos nódulos no período de enchimento dos grãos (PEREIRA *et al.*, 1984). Supõe-se que esta baixa eficiência simbiótica seja decorrente dos programas de melhoramento do feijoeiro ter visado materiais de ciclo exageradamente curtos e sem busca a resposta à simbiose, ou em detrimento desta característica devido a prioridade de outras características agronomicamente desejáveis. Isto resultou na introdução de materiais de sistema radicular precário, altamente sensíveis à pequena variação de umidade, de nodulação tardia e/ou precoce senescência dos nódulos e curto período de fixação (BULISANI, 1987; FREIRE, 1992). Alguns fatores podem ser limitantes à FBN, comprometendo o processo simbiótico. Dentre estes fatores, a disponibilidade do N-

mineral contido no solo é um dos que têm maior efeito sobre a FBN. O nitrato pode inibir a nodulação após sua redução a nitrito, pois este parece inibir a síntese do ácido indol acético necessário ao encurvamento do pêlo absorvente para a formação do nódulo. O excesso de nitrato diminui a intensidade da deformação dos pêlos absorventes, a adesão do rizóbio à parede do pêlo absorvente e o número de cordões de infecção, ao mesmo tempo que aumenta o número de abortos dos eventos iniciais da infecção. Também reage com a leghemoglobina inativando-a. Na forma de amônia, o nitrogênio inibe a síntese e a atividade da nitrogenase (FRANCO & NEVES, 1992; PEREIRA & ARAÚJO, 1983).

Entretanto, alguns autores concordam que pequenas doses de N podem ser benéficas para a simbiose, propiciando um melhor desenvolvimento inicial das plantas e permitindo uma melhor nodulação. Isto pode ser explicado, segundo PEREIRA & ARAÚJO (1983), pela maior disponibilidade de aminoácidos livres para a formação dos nódulos e para a síntese de clorofila na parte aérea. Neste sentido, vários são os trabalhos que procuram determinar os níveis adequados de N-mineral para otimizar a simbiose, embora, muitos dos resultados ainda são controversos.

TSAI *et al.* (1993) encontraram efeito sinérgico da FBN em feijoeiro, sob efeito de baixas doses de N, ocorrendo estímulo na formação dos nódulos, maior atividade da nitrogenase e crescimento da planta. Os autores acreditam que um balanço adequado de nutrientes no solo é essencial para obtenção de uma alta fixação de N_2 e produção de feijão. Efeito sinérgico entre N e FBN também foram descritos em soja e caupi (EAGLESHAM *et al.*, 1983). Entretanto, resultados contraditórios foram encontrados por RICE *et al.* (1990) em soja inoculada sob efeito de 5 mM de NH_4NO_3 . Os autores observaram uma queda drástica, cerca de 85 %, na concentração de ureídeos, forma pela qual o N advindo da fixação é transportado através do xilema para parte aérea da planta. Resultados similares foram obtidos por HERRIDGE & PEOPLES (1990) também em soja inoculada, onde o fertilizante nitrogenado teve um efeito negativo sobre os ureídeos e sobre a proporção de N derivado da fixação. CECCATTO (1994) também relata uma diminuição drástica na FBN, em todas as variedades de feijoeiro estudadas, quando foram utilizados níveis superiores a 4 mM de NH_4NO_3 . Em doses menores, entretanto, foi observado um estímulo na fixação de N_2 .

HUNGRIA & NEVES (1986) afirmam que existe grande variabilidade genética entre e dentro de espécies de leguminosas quanto à capacidade de fixar nitrogênio biologicamente, o que representa um material inesgotável para seleção genética. Neste sentido, alguns trabalhos foram e estão sendo feitos para buscar uma melhor resposta do feijoeiro à simbiose com *Rhizobium*. CLAIR & BLISS (1991) utilizaram uma população originada do retrocruzamento entre um cultivar com alta capacidade de fixação de N_2 e outro comercial, utilizado como parental recorrente, com baixa capacidade de fixação de N_2 . Encontraram segregação transgressiva para o N_2 fixado em alguns híbridos F_3 do retrocruzamento. Cinquenta por cento das famílias F_3 foram superiores ao parental comercial no N_2 fixado, indicando um progresso superior ao parental recorrente original. As características agronômicas favoráveis foram mantidas nas famílias F_3 e uma delas foi superior ao parental com boa FBN na fixação do N_2 , indicando que a recombinação intrapopulacional produziu melhora na fixação de N_2 , e que o ganho de seleção para o aumento da FBN vai depender da combinação dos parentais utilizados para o melhoramento.

A seleção de cultivares para o melhoramento da FBN podem ser feitas através de vários parâmetros de seleção, dentre eles o número de nódulos é recomendado por alguns autores por apresentar rápida discriminação e correlação com a eficiência simbiótica. PEREIRA *et al* (1993) realizaram 3 ciclos de seleção recorrente através do cruzamento entre 10 cultivares de feijão, para selecionar aquelas com maior número de nódulos. Esta característica correlacionou-se com outras características da nodulação. As médias de N total da parte aérea das linhagens selecionadas para maior número de nódulos no 1º e 2º ciclo de seleção foram significativamente maiores que os parentais, e estas plantas fixaram mais N_2 quando cresceram em baixas concentrações de N no campo. Desta forma os autores concluíram que o número de nódulos é um importante componente da simbiose e que a seleção para seu aumento pode resultar em linhagens capazes de fixar mais N_2 atmosférico. Estes resultados concordam com os de COLETTA FILHO (1993), que também sugere o uso do número de nódulos como parâmetro de seleção para avaliar a eficiência da FBN.

PEREIRA *et al* (1993) relataram que o número de nódulos é uma característica determinada por um ou poucos genes de efeitos relativamente pronunciados. NODARI *et al.* (1993), entretanto, encontraram a mesma característica localizada em 4 regiões diferentes no mapa genômico do feijoeiro, atribuindo desta forma ser uma característica quantitativa. No mesmo trabalho foram encontrados heterose para o número de nódulos em plantas F_1 , originadas do cruzamento entre parentais contrastantes para esta característica, e segregação transgressiva em plantas F_3 , demonstrando a herança poligênica desta característica. Segregação transgressiva para aumento do número de nódulos foi atribuído a efeitos positivos dos alelos do parental com baixo número de nódulos. Segregação transgressiva para aumento da eficiência da FBN, também foi encontrado por CLAIR & BLISS (1991).

Na interação *Rhizobium*-leguminosa, o processo de infecção apresenta semelhanças com a infecção e expressão de sintomas de patógenos nas plantas hospedeiras. VANCE (1983) relata algumas das etapas desta semelhança, como: a necessidade de um hospedeiro; a penetração no interior da planta; a resposta da planta à penetração; o redirecionamento do metabolismo da planta hospedeira; e as alterações morfológicas resultantes da interação. SPRENT (1994) defende a idéia que o *Rhizobium* tem um ancestral que foi inicialmente parasita e que situava-se no interior do cordão de infecção quando estava parasitando o hospedeiro. Posteriormente, começou a fornecer alguns benefícios à planta, até que a bactéria liberou-se do cordão de infecção tornando-se uma nova espécie mutualística.

PEREIRA *et al* (1993) mencionam que apesar da semelhança entre infecção por *Rhizobium* e infecção por microrganismos patogênicos, o melhoramento priorizou o aumento da resistência aos microrganismos patogênicos, entretanto, muito pouco foi feito para aumentar a suscetibilidade ao *Rhizobium*. Porém, há suposições de que esta semelhança entre o *Rhizobium* e fitopatógenos, seja também a nível genético, ou seja, onde alguns genes seriam responsáveis por ambas características, e desta forma o melhoramento da FBN poderia também melhorar o acesso de alguns patógenos às plantas (NODARI *et al.* 1993).

2.3. Marcadores moleculares - RFLP

Marcadores moleculares atualmente representam uma ferramenta fundamental para o avanço tecnológico de muitas áreas da Biologia. Apresentam características de relevante importância para o estudo genético e melhoramento de plantas, principalmente em relação a características quantitativas de interesse agrônomo.

Dentre os marcadores genéticos baseados na composição de DNA, destaca-se o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição - RFLP ("Restriction Fragment Length Polimorphism"). Tais polimorfismos são revelados através da digestão do DNA com enzimas de restrição sítio-específicas, e utilização de sondas de DNA que detectam fragmentos homólogos de DNA (CAMARGO, 1995). Os RFLPs possuem várias aplicações de importância para programas de melhoramento, tais como: identificação de variedades, identificação e mapeamento de genes, identificação de regiões genômicas que contém um QTL ("Quantitative Trait Locus", região genômica que exerce um efeito significativo em uma característica quantitativa), seleção de recombinantes, etc (BECKMANN & SOLLER, 1983).

Marcadores RFLPs são fenotipicamente neutros, ou seja, não influenciam na expressão dos poligenes. Além disto, possuem alto nível de polimorfismo, apresentam alelos codominantes, contendo maior quantidade de informação genética por *locus* e não exibem efeitos epistáticos ou pleiotrópicos, possibilitando o uso de poucos marcadores segregantes em uma única população para o mapeamento de poligenes (TANKSLEY, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

As características agrônomicas de maior interesse em programas de melhoramento geralmente são poligênicas e quantitativas, onde há uma variação fenotípica contínua. Para a maioria das características quantitativas, poucas informações existem sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos *loci* que controlam sua expressão (TANKSLEY, 1993).

O requisito básico para a detecção de poligenes com marcadores moleculares é a existência de desequilíbrio de ligação entre alelos dos *loci* marcadores e alelos dos poligenes. Este desequilíbrio pode ser obtido experimentalmente em populações

F₂, F₃, retrocruzamentos, linhagens recombinantes, etc. (CAMARGO, 1995; TANKSLEY, 1993). Após obtenção da população, a etapa seguinte consiste em classificar os indivíduos da população com relação ao seu genótipo no *locus* marcador (genotipagem), e através de análises estatísticas identificar se há diferenças significativas ou não entre os genótipos e a característica quantitativa de interesse. Estas características são determinadas através de avaliações fenotípicas da população. Em caso significativo, infere-se que o *locus* marcador em questão está ligado a região genômica que contém um QTL (CAMARGO, 1995).

A técnica de mapeamento de QTLs por meio de RFLPs tem contribuído substancialmente para o conhecimento das características genéticas dos genes envolvidos na resistência de plantas a fitopatógenos (CAMARGO, 1995); na expressão diferenciada de QTLs de acordo com a influência do ambiente (PATERSON *et al.*, 1991b); na construção de mapas genéticos (BECKMANN & SOLLER, 1983); e no estudo genético de outras características quantitativamente herdadas de interesse ao melhoramento genético de plantas.

2.4. QTLs de resistência à doença

A expressão de características quantitativas são geralmente bastante influenciadas pelas variações dos ambientes, consistindo como uma das principais dificuldades para o mapeamento de QTLs de resistência à fitopatógenos.

O efeito do ambiente na expressão de QTLs é constatado em vários trabalhos. Em tomateiro, por exemplo, avaliando-se QTLs para o tamanho do fruto, concentração de sólidos solúveis e pH, foram detectados vinte e nove QTLs para estas características em três ambientes. Destes, porém, apenas quatro QTLs foram comuns aos três ambientes (PATERSON *et al.*, 1991a). BUBECK *et al.* (1993), buscando resistência à mancha cinzenta das folhas em milho, avaliaram três populações F₃, em três ambientes distintos. Os QTLs encontrados para resistência diferiram entre populações e ambientes. Apenas uma região foi comum às três populações. De maneira análoga, CAMARGO *et al.* (1995) avaliaram resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Brassica*

oleracea em dois ambientes diferentes (campo e casa-de-vegetação). Foram detectados quatro QTLs para resistência em condições de casa-de-vegetação, porém apenas dois destes também foram detectados em campo. Resultados contraditórios foram encontrados no trabalho de FERREIRA *et al.* (1995), onde localizaram um QTL para resistência à canela preta em *Brassica napus*, apenas nos experimentos de avaliação da doença em cotilédones e hastes. No experimento de campo, este QTL não teve contribuição para resistência, surgindo duas outras regiões não detectadas em cotilédones e hastes.

Além do efeito do ambiente sobre a expressão diferenciada de QTLs, há indicações que diferentes QTLs de resistência podem ser expressos em fases distintas do processo infeccioso. YOUNG *et al.* (1993) detectaram três QTLs de resistência à oídio em feijão mungo. Dois QTLs foram detectados aos 65 dias após o plantio e um outro apenas aos 85 dias após o plantio. Os autores sugerem que o terceiro *locus* pode ser responsável por uma resistência tardia, podendo ter ocorrido interferência do ambiente, visto que o experimento foi conduzido em apenas um ambiente ou que determinados genes desempenham respostas diferenciadas após o tempo de inoculação. Aos 65 dias, os dois QTLs responsáveis pela resistência continham o alelo do parental resistente, enquanto que aos 85 dias o terceiro QTL continha o alelo do parental suscetível contribuindo para resistência. De maneira análoga, YU *et al.* (1995) trabalhando com genes de tomate que controlam reação de hipersensibilidade a *X. campestris* pv. *vesicatoria*, demonstraram que um dos genes responsáveis por esta reação apresentou um efeito máximo entre 16 e 32 horas após inoculação com o patógeno, enquanto que outros apresentaram efeito nos intervalos entre 24 a 32 horas. Com estes resultados, observa-se que genes de resistência são expressos diferenciadamente conforme o tempo de inoculação com o patógeno.

Diferentes localizações de QTLs de resistência após diferentes dias de inoculação com o patógeno também foram avaliados por SANDBRINK *et al.* (1995), quando estudaram a resistência ao cancro bacteriano em tomate, doença anteriormente considerada de herança qualitativa. As avaliações de patogenicidade foram realizadas aos 19, 26, 33, 41, 48 e 59 dias após inoculação com o patógeno. Foram encontrados QTLs de resistência no cromossomo 1 aos 59 dias de avaliação, no cromossomo 6 aos 26 dias, no cromossomo 8 aos 48 dias e no cromossomo 10 aos 48 e 59 dias após inoculação com o

patógeno. Um outro QTL localizado no cromossomo 7 foi atribuído por estar envolvido nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença, pois neste estágio os marcadores desta região apresentaram valores quase significativos ($P = 0,005$). Resultados deste estudo também indicam a presença de um alelo de resistência proveniente do parental suscetível. Uma das sugestões dos autores é que este alelo é expresso em combinação com alelos do parental resistente. Resultado semelhante foi encontrado por DIRLEWANGER *et al.* (1994), onde a linhagem de *Pisum sativum* L. suscetível a ferrugem apresentou um alelo de resistência em um QTL.

Para estes resultados, em que diferentes QTLs são detectados conferindo resistência, os autores atribuem que diferentes genes de resistência podem ser expressos devido a diferenças nos estágios de desenvolvimento das plantas e/ou da doença, influência do ambiente ou ainda devido a variações na virulência das populações do patógeno. Baseado nos efeitos do ambiente interagindo na expressão dos QTLs, YOUNG *et al.* (1993) afirmam que para se ter certeza do efeito de um determinado QTL de resistência à patógenos, deve-se testá-lo em diferentes ambientes e com diferentes isolados.

Os parâmetros de avaliação da reação a doença em uma população podem ou não se correlacionar com os QTLs de resistência detectados. CAMARGO *et al.* (1995), detectaram dois QTLs para resistência à podridão negra em *Brassica oleracea*, avaliando por escala de notas e medida da área de lesão em campo e casa-de-vegetação, respectivamente. Com este resultado, os autores demonstraram que os mesmos QTLs foram responsáveis pela resistência utilizando ambos tipos de avaliações. Entretanto, FERREIRA *et al.* (1995) não encontraram correlações entre QTLs de resistência à canela preta em *Brassica napus*, nas avaliações por nota e área das lesões em cotilédones e hastes. Quando avaliaram apenas cotilédones, as medidas se correlacionaram, sendo encontrados QTLs nos mesmos grupos de ligação para todas as avaliações. No entanto, na avaliação da haste, não houve correlação entre nota e área de lesão, encontrando-se, na avaliação por nota, um novo QTL não detectado nas outras avaliações.

Um fato bastante comum nos trabalhos que envolvem QTLs de resistência é a detecção de QTLs de efeito principal. Esses QTLs explicam proporções significativas da variação fenotípica e, geralmente, mantêm-se consistentes em diferentes ambientes, sendo

por isto bastante promissores para programas de melhoramento. Neste sentido, NEWCOMBE *et al.* (1996) procuraram detectar QTLs de resistência de efeito principal à ferrugem em híbridos de *populus*. Os sintomas foram avaliados durante dois anos consecutivos em três experimentos em câmaras de crescimento, em campo e em discos foliares em laboratório. Foi detectado apenas um QTL de efeito principal para esta característica. Os QTLs mapeados conferindo resistência normalmente são em número reduzido (CAMARGO, 1995). Entretanto, QTLs de efeito principal para a resistência apresentam-se algumas vezes em número ainda mais reduzido (BUBECK *et al.*, 1993; CAMARGO *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1994; DIRLEWANGER *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995; LANDRY *et al.*, 1992; YU *et al.*, 1995).

Alguns trabalhos envolvendo QTLs de resistência e QTLs para outras características agronomicamente importantes, foram estudadas em *P. vulgaris*. NODARI *et al.* (1993) relataram QTLs controlando interações bacterianas simbióticas e patogênicas com o feijoeiro. A interação simbiótica foi realizada com o *Rhizobium tropici*, responsável pela fixação biológica de nitrogênio. A interação planta-patógeno foi estudada pela associação com *X. c. phaseoli*, agente causal do CBC. Para avaliar fenotipicamente estas duas características, foram contados nódulos formados pelo rizóbio e atribuído nota as lesões causada pelo patógeno. Foram usadas 70 famílias F₃ provenientes do cruzamento entre um cultivar resistente a bacteriose e com pouca capacidade de nodulação (BAT-93) e outro suscetível com boa nodulação (Jalo EEP558). Foram encontrados quatro QTLs para ambas características, explicando 50 e 75% da variação fenotípica para número de nódulos (NN) e resistência ao CBC, respectivamente. Um destes QTLs, localizado no grupo de ligação D7, associou-se a ambas características, contribuindo com 17% da variação fenotípica para NN e 35% para resistência ao CBC. Os autores atribuem que o fato do QTL para NN e resistência ao CBC estarem no grupo de ligação D7, pode ser devido a genes ligados ou efeitos pleiotrópicos. Mencionam também que são necessários estudos adicionais para determinar se os QTLs identificados neste trabalho serão encontrados em outras populações, com outros isolados e em outros ambientes.

Também em feijoeiro ADAM-BLONDON *et al.* (1994) localizaram no mapa genômico de *P. vulgaris* genes de resistência à *Colletotrichum lindemuthianum*,

agente causal da antracnose, e genes relacionados ao mecanismo de defesa das plantas. Os autores relataram 2 QTLs de resistência nos grupos de ligação P1 e P4. Dentre os genes responsáveis pela defesa da planta, foram mapeados a quitinase (Ch), a lipoxigenase (Lox), a fenilalanina amonia liase (PAL 2) e duas glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HyP2-13 e HyP4-1). A fenilalanina amonia liase (PAL 1), foi anteriormente mapeada por NODARI *et al.* (1993), sendo localizada no grupo de ligação D1.

Recentemente, FREYRE *et al.*² fizeram uma correlação com todos os mapas genéticos construídos para *P. vulgaris*. Alguns marcadores apresentaram correlações com os grupos de ligação de outros mapas, sendo então agrupados em um único grupo de ligação, no entanto vários outros não se correlacionaram. Este resultado já havia sido observado anteriormente por ADAM-BLONDON *et al.* (1994), o qual sugere que uma das explicações para a não correlação entre os marcadores seja a distância genética entre os parentais utilizados para cruzamento e construção do mapa.

²publicação via internet : <http://agronomy.ucdavis.edu/agronomy/mapdata2.htm>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foi utilizada uma população de 50 linhagens recombinantes F₈₋₉ de *P. vulgaris* obtidas do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558, cedidas pelo Dr. Paul Gepts da Universidade de Davis-Califórnia. As linhagens parentais foram utilizadas como controles em todos os experimentos. O cultivar BAT-93 foi desenvolvido pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), é de origem mesoamericana, apresenta resistência ao mosaico comum, ferrugem, antracnose e é moderadamente resistente ao CBC. Apresenta baixa capacidade de nodulação com bactérias do gênero *Rhizobium*. O cultivar Jalo EEP558 foi desenvolvido pela estação experimental de Patos de Minas em Minas Gerais, é de origem andina e apresenta resistência apenas à mancha angular das folhas. Exibe, no entanto, alta capacidade de nodulação (GEPTS *et al.*, 1993).

3.2. Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, no período de setembro a dezembro de 1995. Utilizou-se vasos de Leonard (CIAT, 1988) modificados com capacidade de 1,5 litro, contendo uma mistura de areia e vermiculita, pH=6,9, numa proporção de 1:1 (v:v). Os vasos foram previamente desinfetados com álcool a 70% e o substrato foi autoclavado 1h, durante 3 dias consecutivos, à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm.

As sementes foram previamente desinfetadas por imersão em álcool a 70% por 3 min, hipoclorito de sódio (NaClO) comercial 10 % por 3 min. e em seguida lavadas 7 vezes em água destilada (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). Foram semeadas duas sementes

em cada vaso. Os parentais foram utilizados como controle nos tratamentos com e sem N-mineral inoculados com *Rhizobium* e *Xanthomonas*; com *Rhizobium* e sem *Xanthomonas* e sem *Rhizobium* e com *Xanthomonas*. Após a germinação, foi procedido o desbaste ficando apenas 1 plântula por vaso.

Foram utilizados tratamentos com e sem N-mineral, onde cada tratamento foi composto por quatro repetições distribuídas em blocos ao acaso. A unidade experimental utilizada foi de uma planta por vaso para avaliação do número de nódulos e duas folhas por planta para avaliação da área e nota das lesões foliares. Para o tratamento sem N foi fornecido semanalmente 100 ml de solução nutritiva modificada de SARRUGE (1975) diluída 3:1 (Apêndice 1). Para o tratamento com N, as mesmas condições foram mantidas, entretanto a solução nutritiva foi composta de 5 mM de NH_4NO_3 .

A casa-de-vegetação foi mantida a temperatura aproximadamente de 28°C e com irrigação por gotejamento para aumentar a umidade do ar.

3.3. Avaliação do número de nódulos

Para a avaliação do número de nódulos foi utilizada a estirpe UMR-1899 de *Rhizobium tropici*, fornecida pela seção de Microbiologia do CENA/USP, com a identificação de CM-01. A estirpe primeiramente foi cultivada em placas de Petri contendo meio sólido YM (VINCENT, 1970), para obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, estas colônias foram transferidas para Erlenmeyer contendo meio líquido YM e colocados em agitador até atingirem uma concentração de 10^9 u.f.c./ml. A concentração do inóculo foi verificada pelo método do número mais provável - NMP (CIAT, 1988).

Com auxílio de uma seringa hipodérmica foram introduzidos 20 ml do inóculo em cada vaso 4 dias após germinação. Em seguida, foi adicionada uma camada de areia autoclavada para proteger a região inoculada. Após 28 dias, a parte aérea foi cortada e as raízes cuidadosamente envolvidas em papel absorvente, colocadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria a 10°C para posterior contagem dos nódulos. A média do

número de nódulos nos tratamentos com e sem nitrogênio foi utilizada para avaliar o efeito do N na nodulação e identificar QTLs associados a estas características.

3.4. Avaliação da reação à bacteriose

Para a avaliação da resistência utilizou-se a estirpe W-18 de *X. campestris* pv. *phaseoli*, cedida pelo Dr. Paul Gepts da Universidade de Davis-Califórnia. A estirpe foi cultivada em meio sólido 523 (Apêndice 2). Colônias isoladas foram colocadas para crescimento em meio líquido, sob agitação por 48h. Após este período, procedeu-se a contagem das células pelo método do NMP (CIAT, 1988), onde foi verificado um número de 10^8 u.f.c./ml.

A inoculação das plantas foi realizada 19 dias após a germinação, período em que a primeira folha trifoliolada encontrava-se completamente expandida. A mesma consistiu em um corte de 0,6 cm em dois folíolos da primeira folha trifoliolada, com uma tesoura previamente mergulhada no inóculo (RAVA, 1984). Depois de 13 dias foram efetuadas as avaliações das linhagens em resposta a inoculação.

Foram utilizados dois critérios de avaliação, um por nota e outro com base na área da lesão (cm²). A nota das lesões foram dadas por três observadores. A escala de notas adotada foi de 0-6 (RAVA, 1984), de acordo com os sintomas das plantas, conforme segue abaixo:

- 0-ausência de sintomas
- 1-clorose descontínua nos cortes
- 2-clorose contínua nos cortes
- 3-clorose nos cortes e murcha do bordo da folha compreendido entre os cortes sem, entretanto, ultrapassar a nervura lateral
- 4-clorose e murcha que ultrapassam a nervura lateral
- 5-clorose e murcha até o nível interno dos cortes
- 6-clorose avançando em torno de 1 cm no interior da folha, e murcha da área cortada.

Para medir a área das lesões, foi colocada uma folha de transparência sobre a região afetada e, com auxílio de uma caneta de retroprojektor, tracejou-se a área lesionada. Estas transparências foram então submetidas a um medidor de área portátil (Licor, modelo LI-3000 A) para determinar a área da lesão em cm².

As médias das notas e área das lesões das linhagens nos ensaios com e sem N, foram utilizadas para avaliar o efeito do N na reação à doença e localizar os QTLs de resistência à bacteriose.

3.5. Genotipagem das linhagens recombinantes

Para genotipagem das linhagens, foram utilizados 53 *loci* marcadores distribuídos em 13 grupos de ligação. Destes, 11 foram genotipados neste trabalho (Apêndice 3), sendo eles : PAL-5 (fenilalanina amonia liase) , D1308, CHS (“chalcone sintase”), D1461, D1492, D1390, PHS (faseolina), D1861, D1831, Bng 204 e Bng 191. As demais foram obtidas por publicação via internet pelo Dr. Paul Gepts³ (Apêndice 4).

Setenta linhagens F₇₋₈ do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558 foram plantadas na casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, para produção de sementes e coleta das folhas para extração de DNA. As folhas coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em freezer -80°C para subsequente extração.

DNA genômico dos parentais e das linhagens foram extraídos de 3-5 g de tecido foliar usando o método CTAB, descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995), modificado para RFLP. As modificações feitas no protocolo de extração de DNA foram em relação à quantidade das soluções utilizadas, pois o protocolo original é indicado para técnica de RAPD onde são necessárias apenas 50-200 mg de tecido fresco, enquanto que para RFLP são necessários alguns gramas de tecido. O DNA precipitado foi

³ <http://agronomy.ucdavis.edu/gepts/gepts.htm>

ressuspenso em 200 µl de H₂O milli-Q e a quantificação foi feita em espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia), em comprimento de onda 260 nm. Aliquotas de 5 µg de DNA foram digeridos “overnight” a 37°C com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III e *Hae* III (GIBCO BRL), determinadas previamente por apresentarem polimorfismo com as sondas utilizadas no mapa genômico do feijoeiro (NODARI *et al.*, 1992). Fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % em TAE (Tampão tris-acetato) durante 14 horas a 16 volts. O “Southern blotting” foi feito de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989), utilizando membrana de nylon “hybond” (Amersham). A fixação do DNA foi realizada em estufa à 80°C por 2 horas.

A extração dos plasmídeos, contendo o inserto utilizado como sonda, foi feita de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Após a extração do plasmídeo, o inserto foi separado por digestão com 5 U da enzima *Pst* I por 2 horas à 37°C. Através de separação eletroforética, o inserto foi identificado por seu peso molecular e isolado.

Aproximadamente 100 ng do inserto foram utilizados para marcação pelo método não radioativo utilizando dUTP incorporado com digoxigenina (dig-dUTP). O nucleotídeo foi incorporado à sonda via “random priming”. Após adição dos componentes do “kit” de marcação da Boehringer Mannheim Biochemica, a sonda foi colocada em estufa com temperatura de 37°C por 20 horas, para a obtenção de uma concentração final de aproximadamente 260 ng.

A pré-hibridização e hibridização da sonda na membrana foram efetuadas em estufa de hibridização a 42°C, conforme SAMBROOK *et al.* (1989), em solução contendo 50% de formamida, 5x Denhardt's (5g “ficoll”(400), 5g “polyvinylpyrrolidone”, 5g BSA (FV) e 500 ml de H₂Odd, estoque de 50x), 100µg de DNA fragmentado de esperma de salmão, 5x SSC (175,3g NaCl, 88,2g Citrato de Sódio, pH 7,0, completa para 1 litro de H₂Odd, estoque 20x) e 0,5% SDS. Foram feitas três lavagens a 65°C com 2x SSC e 0,1% SDS por 10 min., 0,5x SSC e 0,1% SDS por 30 min.(15 e 15) e 0,1x SSC e 0,1 % SDS por 30min. A sonda marcada foi detectada pela adição de anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina. O substrato luminol PPD (agente quimioluminescente para fosfatase alcalina - CSPD) foi utilizado na proporção de 1:100, para promover a reação de quimioluminescência e sensibilizar filmes de raio-x. A

membrana foi exposta ao filme de raio-x (Kodak X-OMAT) por aproximadamente 8-10 horas. Depois da revelação, efetuou-se a genotipagem das linhagens, identificando-se com a letra B as linhagens com alelos de BAT-93 e com J as com alelos de Jalo EEP558. O teste do qui-quadrado foi aplicado para verificar possíveis distorções das proporções genotípicas esperadas (1:1, no caso de linhagens recombinantes).

3.6. Análises estatísticas

Para avaliar o efeito do nitrogênio sobre a bacteriose, foi utilizada análise de variância do tipo fatorial tendo linhagens, níveis de N e blocos como efeitos principais (Apêndice 5 e 6). As análises dos tratamentos com e sem N para número de nódulos foram feitas separadamente devido a heterogenidade dos dados quando avaliados em conjunto (Apêndice 7 e 8). Os valores de número de nódulos foram transformados para a obtenção de normalidade dos dados (Apêndice 9 a 14). Médias das linhagens foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Estas análises foram efetuadas com o programa SANEST.

Para a detecção de ligação entre marcadores RFLPs e QTLs de resistência e nodulação, comparou-se estatisticamente, para cada marcador, as médias das linhagens homozigotas para alelos de BAT-93 com as médias das linhagens homozigotas para alelos de Jalo EEP558, para as características área de lesão, nota da lesão e número de nódulos nos tratamentos com e sem N. Para tal, foi utilizada análise de variância ($P < 0,01$) do tipo fatorial, tendo estados alélicos de cada *locus* marcador (alelos de BAT-93 ou Jalo EEP558), níveis de nitrogênio e blocos como efeitos principais. O número de nódulos foi transformado por extração de raiz quadrada para a obtenção de normalidade e homogeneidade de variância. A detecção de QTLs associados a número de nódulos foi feita por análise de variância ($P < 0,01$) separadamente para os tratamentos com N e sem N. Havendo diferenças significativas, entre as classes genotípicas, inferiu-se que o marcador RFLP em questão estava ligado a

um QTL de resistência ou nodulação (EDWARDS *et al.*, 1987). Estas análises foram efetuadas com o programa STATISTICA versão 3.0.

A porcentagem da variação fenotípica foi feita pela análise de regressão linear de cada marcador significativo. Para determinar a porcentagem da variação fenotípica total foi considerado um único marcador de maior valor R^2 por grupo de ligação e somado aos demais marcadores dos diferentes grupos de ligação.

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem

Os marcadores utilizados para RFLPs eram provenientes da biblioteca genômica *Pst* I de feijoeiro obtidos por NODARI *et al.* (1992) e cedidas pelo Dr. Paul Gepts.

Foram utilizados 53 marcadores RFLPs para genotipagem das linhagens. Entretanto, como citado anteriormente, 11 foram genotipados neste trabalho (Apêndice 3). Dentre eles, os marcadores D1308 e D1390 apresentaram polimorfismo com a enzima de restrição *Eco* RI, os marcadores CHS e D1461 com a enzima de restrição *Eco* RV, D1492 e D1861 com a enzima de restrição *Hae* III e D1861 com *Hind* III. As enzimas de restrição utilizadas foram as indicadas por NODARI *et al.* (1992).

O marcador PHS apresentou polimorfismo com a enzima de restrição *Eco* RI. Os resultados da genotipagem deste marcador foram compatíveis aos de GEPTS³ (publicação via internet). Entretanto, este utilizou da técnica de isoenzima para genotipagem desta proteína.

O marcador PAL-5 (EDWARDS *et al.* 1985), após teste utilizando algumas enzimas de restrição para detectar polimorfismo entre as linhagens e os parentais, apresentou melhor polimorfismo com a enzima *Eco* RI.

Além dos marcadores da biblioteca genômica de feijoeiro obtidas por NODARI *et al.* (1992) dois marcadores do mapa genômico de VALLEJOS *et al.* (1992), cedidas pelo CIAT, também foram utilizadas, por mapearem próximas às sondas do grupo de ligação D7 (GEPTS *et al.*, 1993). Para estas sondas, realizou-se teste prévio com DNA das linhagens parentais digeridos com várias enzimas de restrição, com finalidade de detectar polimorfismo entre eles. A sonda Bng 204 apresentou polimorfismo com a enzima *Dra* I e a Bng 191 com *Eco* RV.

4.2. Efeito do nitrogênio na resistência à *X. campestris* pv. *phaseoli*

A área de lesão entre linhagens variou de 1,47 - 12,46 cm² no tratamento sem N e 1,51 - 13,56 cm² no tratamento com N. O parental BAT-93 apresentou área de lesão média de 4,20 e 4,22 e Jalo EEP558 de 10,80 e 9,54 nos tratamentos sem e com N, respectivamente (Tabela 1). Na avaliação feita por nota, também foi observado ampla faixa de variação entre linhagens, indo de 1,75 a 6,0 para o tratamento sem N e 2,50 a 6,00 com N (Tabela 2). Os parentais apresentaram uma variação de 3,05 e 2,83 para BAT-93 e 5,33 e 5,11 para Jalo EEP558 nos tratamentos sem e com N, respectivamente. Os controles feitos com os parentais inoculados com *X. campestris* pv. *phaseoli* e não inoculados com *Rhizobium*, não foram analisados devido a problemas de contaminação com *Rhizobium*.

Houve interação significativa entre níveis de nitrogênio x linhagens, tanto nas avaliações por nota quanto por área de lesão. Esta interação demonstrou que algumas linhagens foram mais suscetíveis ao patógeno sob adubação nitrogenada e vice-versa. Aproximadamente 54 % das linhagens foram mais suscetíveis ao patógeno na presença de nitrogênio. As demais ou foram mais resistentes na ausência de nitrogênio ou não sofreram influência deste nutriente (Tabela 1 e 2).

Apesar da interação demonstrar uma variação quanto a resistência ou suscetibilidade ao patógeno das linhagens na presença de 5 mM NH₄NO₃, houve uma maior frequência de linhagens apresentando maior suscetibilidade à bacteriose no tratamento com N (Figura 1 e 2).

Nas Figuras 1 e 2 observa-se que algumas linhagens foram mais resistentes que BAT-93 e outras mais suscetíveis que Jalo EEP558. Entretanto, segregação transgressiva foi observada apenas para suscetibilidade ao CBC, onde na avaliação por área de lesão no tratamento com N, as linhagens 138 e 109 foram mais suscetíveis que o parental suscetível Jalo EEP558 (Tabela 1).

4.3. Detecção de QTLs de resistência à *X. campestris* pv. *phaseoli*

Análises de variância ($P < 0,01$) usando estados alélicos de cada *locus* marcador como variável independente, e reação à bacteriose, avaliados por notas das lesões com e sem N, como variável dependente, identificaram oito associações significativas (Tabela 3) distribuídas em 4 regiões genômicas : uma no grupo de ligação D1, uma no grupo de ligação D2, uma no D5 e cinco no grupo de ligação D7.

Foi utilizada análise de regressão linear para identificar a contribuição de cada QTL dos grupos de ligação associados à resistência. Foram encontrados valores de 12, 15, 13 e 17 % para os grupos D1, D2, D5, e D7, respectivamente (Tabela 3). Não houve interação significativa entre QTLs e níveis de nitrogênio, indicando que os mesmos QTLs de resistência foram detectados com e sem 5 mM de NH_4NO_3 .

Alelos de Jalo EEP558 conferiram resistência nos *loci* marcadores D1308 localizado no grupo de ligação D1 e D1367, localizado no grupo de ligação D2. Os demais *loci* marcadores localizados nos grupos de ligação D5 e D7 apresentaram QTLs de resistência conferidos pelos alelos de BAT-93 (Tabela 3).

A mesma análise utilizada para nota das lesões, foi utilizada para área das lesões, usando cada *locus* marcador como variável independente e área de lesão com e sem N como variável dependente. Nove *loci* marcadores foram associados com resistência, distribuídos em 3 regiões genômicas: cinco no grupo de ligação D1, um no D2 e três no grupo de ligação D7. A contribuição de cada QTL localizados nos três grupos de ligação foi de 14, 13 e 14%, respectivamente. Estes marcadores foram significativos independente do nível de N utilizado, indicando que os mesmos QTLs estiveram envolvidos com a resistência em ambos níveis de N.

Para área das lesões, BAT-93 contribuiu com alelos de resistência para todos marcadores, exceto D1367, localizados no grupo de ligação D2. Neste caso, alelos de Jalo EEP558 conferiram resistência sob adubação nitrogenada.

Foram verificadas interações significativas entre alelos marcadores e nível de N para três marcadores. O gene da fenilalanina amônia liase - PAL-5 (EDWARDS *et al.*, 1985), ainda não mapeado, apresentou interação altamente significativa ($P < 0,01$),

onde os alelos de Jalo EEP558 conferiram resistência na ausência, mas não na presença de N (Figura 3A). Através da análise de regressão foi observado que o QTL, na ausência de N, contribuiu com 16% da variação fenotípica (Tabela 4). Interações significativas, porém, ao nível de 5% de probabilidade, também foram encontrados em outros dois *loci* marcadores (D1367 e D1287), localizados no grupo de ligação D2. Para estes marcadores, também foram alelos de Jalo EEP558 que contribuíram para a resistência. Pela análise de regressão identificou-se a presença de um QTL explicando 17 % da variação fenotípica apenas no tratamento com N, não sendo encontrado para o tratamento sem N (Tabela 4, Figura 3B e C).

Os QTLs de resistência detectados neste trabalho estão representados na figura 5. Foram explicados 59 % da variação fenotípica sob condições de 0 e 5 mM de NH_4NO_3 . Na ausência de N mineral foram explicados 75 % da variação fenotípica, e na presença de 5 mM de NH_4NO_3 , considerando $P < 0,05$, foram explicados 76 % da variação fenotípica. A porcentagem da variação fenotípica foi feita considerando um único marcador de maior valor R^2 por grupo de ligação e somado aos demais marcadores nos diferentes grupos de ligação.

Na Tabela 3 pode-se observar que alguns marcadores foram significativos apenas na avaliação por nota (D1308, D1080, Bng 204 e D1107) e outros apenas por área de lesão, como os do grupo de ligação D1. Porém, correlação significativa ($r = 0,66$) foi encontrada entre estes parâmetros.

A proporção mendeliana esperada entre os marcadores moleculares e os genótipos foi de 1:1, ou seja, 50% das linhagens com os alelos de BAT-93 e 50% com os alelos de Jalo EEP558, para cada marcador analisado. Para testar a hipótese nula de segregação esperada foi aplicado um teste qui-quadrado com os marcadores significativos para nota e área de lesão. Distorções das proporções mendelianas foram observados em dois marcadores do grupo de ligação D1 (D1315 e D1327) e um do grupo de ligação D7 (D1107) (Tabela 5).

Tabela 1 - Reação das linhagens recombinantes e linhagens parentais BAT-93 e Jalo EEP558 a *X. c. phaseoli* avaliada por área de lesão foliar nos tratamentos sem e com 5 mM NH_4NO_3 .

LINIAGENS	Área de lesão		LINIAGENS	Área de lesão	
	(cm²)			(cm²)	
	Sem N			Com N	
101	12,46	a	138	13,56	a
Jalo EEP558	10,80	ab	109	12,96	ab
131	10,43	abc	141	12,41	abc
109	10,27	abcd	105	10,67	abcd
115	8,95	abcde	101	10,45	abcde
141	8,56	abcdef	Jalo EEP558	9,54	abcdef
127	7,63	abcdef	161	8,57	abcdefg
111	7,57	abcdef	103	8,48	abcdefg
146	7,16	abcdef	146	7,74	abcdefgh
105	7,09	abcdef	116	7,66	abcdefgh
171	6,08	abcdef	123	7,29	abcdefgh
159	6,02	abcdef	131	7,12	abcdefgh
116	5,98	abcdef	107	6,99	abcdefgh
137	5,93	abcdef	136	6,79	bdefgh
154	5,70	bdef	154	6,56	bdefgh
107	5,65	bdef	139	6,47	bdefgh
56	5,46	bdef	171	6,32	bdefgh
123	5,38	bdef	137	6,12	cdefgh
161	5,31	bdef	170	5,71	defgh
103	5,01	bdef	104	5,68	defgh
63	4,90	bdef	129	5,68	defgh
120	4,86	bdef	132	5,62	defgh
68	4,79	bdef	115	5,34	defgh
139	4,65	bdef	159	5,07	defgh
169	4,56	bdef	120	5,01	defgh
138	4,50	bdef	172	4,95	defgh
172	4,26	bdef	176	4,77	defgh
BAT-93	4,20	bdef	111	4,73	defgh
129	3,74	cdef	BAT-93	4,22	defgh
144	3,74	cdef	149	3,95	efgh
160	3,55	def	68	3,94	efgh
132	3,52	ef	56	3,92	efgh
81	3,05	ef	127	3,84	efgh
176	3,04	ef	155	3,76	efgh
104	3,02	ef	160	3,48	fgh
136	2,90	ef	125	3,44	fgh
155	2,67	ef	169	2,80	gh
170	2,65	ef	117	2,57	gh
108	2,37	ef	63	2,27	gh
149	2,28	ef	144	2,26	gh
125	1,74	f	81	1,65	h
117	1,47	f	108	1,51	h

(média de 4 repetições) Teste Tukey 5 % DMS = 3,29 para comparação de médias na horizontal
C.V. = 42 %

Tabela 2 - Reação de linhagens recombinantes e linhagens parentais BAT-93 e Jalo EEP558 a *X. c. phaseoli* avaliada por nota das lesões foliares nos tratamentos sem e com 5 mM NH_4NO_3 .

LINHAGENS	Nota da lesão		LINHAGENS	Nota da lesão	
	Sem N			Com N	
109	6,00	a	101	6,00	a
101	5,83	a	109	6,00	a
154	5,78	a	171	6,00	a
141	5,75	ab	138	5,75	ab
115	5,50	abc	141	5,75	ab
137	5,41	abcd	132	5,55	abc
127	5,41	abcd	159	5,44	abcd
105	5,33	abcd	123	5,41	abcd
Jalo EEP558	5,33	abcd	146	5,41	abcd
159	5,33	abcde	103	5,33	abcd
169	5,16	abcdef	161	5,33	abcd
161	5,16	abcdef	170	5,33	abcd
131	5,08	abcdef	116	5,33	abcd
132	5,00	abcdef	176	5,33	abcd
116	4,95	abcdef	105	5,22	abcde
107	4,83	abcdefg	Jalo EP558	5,11	abcde
111	4,83	abcdefg	137	5,08	abcdef
171	4,78	abcdefg	111	5,00	abcdefg
138	4,75	abcdefg	127	4,67	abcdefgh
146	4,74	abcdefg	169	4,66	abcdefgh
63	4,55	abcdefg	104	4,61	abcdefgh
123	4,50	abcdefgh	115	4,58	abcdefgh
103	4,33	abcdefgh	129	4,55	abcdefgh
129	4,25	abcdefghi	154	4,50	abcdefgh
139	4,25	abcdefghi	131	4,39	abcdefgh
160	4,08	abcdefghi	139	4,33	abcdefgh
172	4,00	abcdefghij	120	4,25	abcdefgh
68	3,91	abcdefghij	160	4,16	abcdefgh
120	3,83	abcdefghij	125	4,00	abcdefgh
104	3,83	abcdefghij	68	3,74	abcdefgh
170	3,49	bdefghij	172	3,72	bdefgh
176	3,41	odefghij	107	3,66	bdefgh
56	3,25	odefghij	149	3,66	bdefgh
149	3,22	defghij	56	3,58	bdefgh
BAT-93	3,05	efghij	155	3,41	odefgh
136	3,04	efghij	63	3,33	odefgh
144	2,91	fghij	81	3,22	defgh
108	2,67	ghij	108	3,00	efgh
81	2,66	ghij	BAT-93	2,83	fgh
125	2,25	hij	117	2,78	gh
155	2,00	ij	136	2,66	h
117	1,75	j	144	2,50	h

(média de 4 repetições) Teste Tukey 5% DMS = 1,12 para comparação de médias na horizontal.

Escala de notas : 0 = resistente 6 = suscetível

C.V. = 18 %

Figura 1 - Distribuição da frequência da área das lesões de *X. c. phaseoli* em linhagens recombinantes F₈₋₉. (A) Sem N; (B) Com 5 mM NH₄NO₃. (média de 4 repetições)

Figura 2 - Distribuição da freqüência das notas das lesões de *X. c. phaseoli* em linhagens recombinantes F₈₋₉. (A) Sem N; (B) Com 5 mM NH₄NO₃. (média de 4 repetições)

Tabela 3 - Loci marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com a resistência à *X. c. phaseoli* sob condições de 0 e 5 mM NH_4NO_3 .

Grupo de ligação	Marcador	Área de lesão (cm ²)						Nota da lesão					
		Sem N		Com N		R ²	P	Sem N		Com N		R ²	P
		BB ^a	JJ ^b	BB	JJ			BB	JJ	BB	JJ		
D1	D1315	4,60	5,81	4,51	6,04	0,09	0,009	4,10	4,42	4,08	4,56	ns	0,04ns
	D1327	4,39	5,89	5,36	6,67	0,11	0,005	4,09	4,46	4,22	4,72	ns	0,02ns
	D1308	5,86	4,17	5,90	6,25	ns	0,12ns	4,55	3,92	4,61	4,41	0,12	0,008
	D1291	4,70	5,98	5,02	7,48	0,14	<0,001	4,17	4,51	4,37	4,80	ns	0,02ns
	P2027	4,63	5,76	5,12	7,35	0,12	<0,001	4,09	4,50	4,37	4,82	ns	0,02ns
	D1630	4,92	5,74	5,39	7,20	0,09	0,004	4,20	4,49	4,45	4,77	ns	0,06ns
D2	D1367	5,69	5,20	7,08	4,70	0,13	0,002	4,46	4,25	4,88	4,17	0,15	0,009
D5	D1080	4,85	5,81	5,72	6,36	ns	0,09ns	4,00	4,60	4,20	4,76	0,13	0,001
D7	CHI	4,45	6,65	6,01	6,57	0,13	0,009	3,91	4,67	4,36	4,76	0,16	0,002
	PHS	4,56	5,85	5,36	6,57	0,14	0,007	4,03	4,59	4,22	4,76	0,14	0,001
	D1861	4,12	6,42	4,89	6,72	0,14	<0,001	3,96	4,84	4,28	4,77	0,17	>0,001
	Bng204	4,66	6,99	6,45	6,10	ns	0,07ns	4,14	5,21	4,57	5,06	0,17	>0,001
	D1107	5,15	7,12	5,99	7,14	ns	0,02ns	4,29	5,33	4,49	5,11	0,10	0,009

CHI = “chalcone isomerase”; PHS = Faseolina

a = Homozigotos para alelos de BAT-93 ; b = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

ns = não significativo

R² = Regressão linear

P = valores significativos ao nível de 1% de probabilidade

ÁREA DE LESÃO (cm²)

Figura 3. Interações entre *loci* marcadores e nível de nitrogênio. (A) PAL-5; (B) D1367; (C) D1287. BB = Média das linhagens com alelos de BAT-93; JJ = Média das linhagens com alelos de Jalo EEP558

Tabela 4 - Interações significativas entre *loci* marcadores e nível de nitrogênio para área de lesão.

Grupo de ligação	Marcador	Sem N				Com 5 mM de NH_4NO_3			
		BB ^a	JJ ^b	R ²	P	BB	JJ	R ²	P
D2	D1367*	5,69	5,20	ns	0,40ns	7,08	4,70	0,17	0,001
	D1287*	5,37	5,35	ns	0,97ns	6,77	4,46	0,16	0,001
-	PAL-5**	5,89	4,14	0,16	<0,001	5,57	6,25	ns	0,42ns

PAL-Fenilalanina amônia liase

a = Homozigotos para alelos de BAT-93; b = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$

ns = não significativo

R² = Regressão linear

P = valores significativos ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 5 - Frequências observadas de genótipos parentais para *loci* marcadores significativamente associados com a resistência à *X. c. phaseoli*.

Grupo de ligação	Marcador	Genótipos F ₈₋₉		χ^2 (1:1)
		BB ^a	JJ ^b	
D1	D1315	9	23	6,53*
	D1327	11	24	4,83*
	D1308	24	16	1,60 (ns)
	D1291	20	18	0,10 (ns)
	P2027	17	20	0,24 (ns)
	D1630	20	18	0,10 (ns)
D2	D1367	19	16	0,26 (ns)
	D1287	21	15	1,00 (ns)
D5	D1080	14	23	2,19 (ns)
D7	CHI	17	15	0,13 (ns)
	PHS	15	22	1,32 (ns)
	D1861	14	17	0,29 (ns)
	Bng 204	18	09	3,00 (ns)
	D1107	30	04	19,88**
-	PAL-5	16	18	0,12 (ns)

a = Homozigotos para alelos de BAT-93

b = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

*** e **** = Frequências observadas diferem da esperada (1:1) a 5 e 1%, respectivamente.

ns = não significativo

4.4. Efeito do nitrogênio no número de nódulos

A média do número de nódulos (NN) das linhagens e dos controles com e sem N estão representados na Tabela 6. A média do número de nódulos das linhagens no tratamento com N variou de 55,26 - 270,08. Os parentais BAT-93 e Jalo EEP558 apresentaram média de 127,65 e 270,08 nódulos, e os controles BAT-93 e Jalo EEP558 não inoculados com *X. c. phaseoli* obtiveram média de 149,69 e 244,90 nódulos, respectivamente. Para o tratamento sem N houve um expressivo aumento do número de nódulos na maioria das linhagens, variando de 95,64 - 392,03 nódulos. O parental BAT-93 obteve média de 167,62 nódulos e o Jalo EEP558 de 267,92 nódulos. Os controles não inoculados com *X. c. phaseoli* obtiveram 182,51 e 347,65 nódulos para BAT-93 e Jalo EEP558, respectivamente. No tratamento com N, o controle Jalo EEP558 não inoculado com *X. c. phaseoli* apresentou maior NN que o inoculado, entretanto, os demais controles não apresentaram diferenças significativas em relação aos parentais inoculados com *X. c. phaseoli*.

A maioria das linhagens sob efeito de 5 mM de NH_4NO_3 apresentou menor NN que as que cresceram na ausência deste nutriente. Entretanto, algumas linhagens e os parentais não sofreram influência do N-mineral (Tabela 6, Apêndice 15).

Apesar de haver uma variação quanto ao número de nódulos das linhagens e dos parentais nos tratamentos com e sem 5 mM de NH_4NO_3 , houve uma maior frequência de linhagens apresentando menor número de nódulos no tratamento com N, que no tratamento sem N (Figura 4).

Várias linhagens apresentaram NN menor que o parental BAT-93 (Tabela 6; Apêndice 15; Figura 4), porém, nenhuma obteve valores significativamente inferiores ao BAT-93, em ambos níveis de N. O mesmo foi observado para o parental Jalo EEP558 no tratamento sem N, onde apesar de algumas linhagens apresentarem maior NN (Tabela 6; Apêndice 15; Figura 4), os valores não foram significativamente superiores ao Jalo EEP558. No tratamento com N nenhuma linhagem foi superior ao Jalo EEP558.

4.5. Detecção de QTLs associados a número de nódulos

Análise de variância ($P < 0,01$) usando o estado alélico de cada *locus* marcador como variável independente e número de nódulos transformados (Apêndice 15) do tratamento sem N como variável dependente, identificaram 13 associações significativas distribuídas em 7 regiões genômicas: três no grupo de ligação D1, duas no D2, três no D5, duas no D6 e uma no grupo de ligação D7, D8 e D9 (Tabela 7; Figura 5).

Através de análise de regressão linear identificou-se a contribuição da variação fenotípica de cada QTL associado ao NN. Para os grupos de ligação D1, D2, D5, D6, D7, D8 e D9 a contribuição foi de 10, 14, 18, 14, 18, 11 e 13 %, respectivamente. A maior porcentagem da variação fenotípica foi explicado pelos marcadores ACO2, localizado no grupo de ligação D5, e CHI localizado no grupo de ligação D7.

Marcadores localizados nos grupos de ligação D5 e D8 apresentaram maior NN conferidos pelos alelos de BAT-93. Nos demais marcadores foram os alelos de Jalo EEP558 que contribuíram para maior NN (Tabela 7).

Para o tratamento com 5 mM de NH_4NO_3 foram encontrados apenas 4 associações significativas, distribuídas em 4 regiões genômicas: D1, D3, D5 e D7 (Tabela 8; Figura 5). A contribuição de cada QTL foi de 9, 9, 8 e 11 %, respectivamente. O marcador CHI localizado no grupo de ligação D7 explicou a maior porcentagem da variação fenotípica.

Alelos de BAT-93 conferiram maior NN nos *loci* marcadores localizados nos grupos de ligação D1 e D3, e alelos de Jalo EEP558 nos grupos de ligação D5 e D7.

O marcador CHI foi associado ao número de nódulos em ambos níveis de N e explicou maior porcentagem da variação fenotípica (Tabelas 7 e 8). Isto demonstra que o QTL localizado nesta região tem importante efeito sobre esta característica.

Distorções das proporções mendelianas foram observadas em apenas 1 marcador (D0096) localizado no grupo de ligação D6. Os demais marcadores

segregaram de acordo com as proporções esperadas 1:1, no caso de linhagens recombinantes (Tabela 9).

Figura 4 - Distribuição da freqüência do número de nódulos em linhagens recombinantes F_{8,9} do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558. (A) Sem N; (B) com 5 mM NH₄NO₃.

Tabela 7 - Loci marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com número de nódulos na ausência de NH_4NO_3 .

Grupo de ligação	Marcador	Número de nódulos		P	R ²
		BB ^a	JJ ^b		
D1	D1291	13,57	14,77	0,006	0,10
	P2027	13,54	14,63	0,010	0,09
	D1630	13,59	14,75	0,009	0,10
D2	D1367	13,55	14,78	0,007	0,11
	D1287	13,37	15,06	< 0,001	0,14
D5	D1492	14,73	13,40	0,002	0,12
	ACO2	14,39	12,70	< 0,001	0,18
	D1157	14,76	13,29	0,001	0,13
D6	D1086	13,33	15,00	< 0,001	0,14
	D0096	13,53	15,20	< 0,001	0,14
D7	CHI	13,22	15,25	< 0,0001	0,18
D8	D1505	14,70	13,48	0,005	0,11
D9	D1101	13,36	14,87	< 0,001	0,13

ACO2 = Aconitase; CHI = “chalcone isomerase”

a = Homozigotos para alelos de BAT-93 ; b = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

R² = Regressão linear

P = valores significativos ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 8 - Loci marcadores significativamente associados ($P < 0,01$) com número de nódulos, sob condições de 5 mM NH_4NO_3 .

Grupo de ligação	Marcador	Número de nódulos		P	R^2
		BB ^a	JJ ^b		
D1	D1308	12,20	10,61	0,001	0,09
D3	D1132	12,63	11,10	0,001	0,09
D5	D1251	11,04	12,38	0,005	0,08
D7	CHI	10,90	12,54	0,001	0,11

CHI = “chalcone isomerase”

a = Homozigotos para alelos de BAT-93 ; **b** = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

R^2 = Regressão linear

P = valores significativos ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 9 - Frequências observadas de genótipos parentais para *loci* marcadores significativamente associados com número de nódulos.

Grupo de ligação	Marcador	Genótipos F _{8,9}		χ^2 (1:1)
		BB ^a	JJ ^b	
D1	D1308	27	17	2,27 (ns)
	D1291	23	21	0,09 (ns)
	P2027	20	23	0,21 (ns)
	D1630	23	21	0,09 (ns)
D2	D1367	21	19	0,10 (ns)
	D1287	25	18	1,14 (ns)
D3	D1132	16	24	1,60 (ns)
D5	D1492	22	23	0,02 (ns)
	ACO2	20	18	0,10 (ns)
	D1157	23	16	1,26 (ns)
	D1251	22	20	0,09 (ns)
D6	D1086	24	20	0,36 (ns)
	D0096	27	13	4,90 *
D7	CHI	20	17	0,24 (ns)
D8	D1505	23	20	0,21 (ns)
D9	D1101	23	20	0,21 (ns)

a = Homozigotos para alelos de BAT-93

b = Homozigotos para alelos de Jalo EEP558

***** = Frequências observadas diferem da esperada (1:1) ao nível de 5 %.

ns = não significativo

Figura 5 - Mapa genético de *P. vulgaris* proveniente de uma população F₂ do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558 (GEPTS et al., 1993) e localização de QTLs associados a número de nódulos e resistência à *X. c. phaseoli*, sob condições de 0 e 5 mM NH₄NO₃.

5. DISCUSSÃO

5.1. Resistência ao crestamento bacteriano comum

Com base nos resultados com e sem N, observou-se que algumas linhagens e os parentais não sofreram influência do nitrogênio aplicado. Provavelmente, a quantidade de N utilizado não foi suficiente para promover uma boa discriminação entre estas linhagens. Entretanto, algumas linhagens foram mais resistentes e outras mais suscetíveis à bacteriose na presença de 5 mM de NH_4NO_3 . Porém, maior frequência foi observada para suscetibilidade das linhagens na presença de N. O efeito do N-fertilizante, tanto no aumento quanto na redução da severidade da doença nas folhas, já foi anteriormente descrito por alguns autores (JOHNSTON & MACLEOD, 1987; JORDAN & STICHCORBE, 1986; ZEBARTH & SHEARD, 1991). Há indícios que o aumento do nível de nitrogênio pode tornar a planta mais suscetível ou mais resistente. Esta reação vai depender da fonte de N utilizado como fertilizante e da especificidade da interação planta-patógeno (AGRIOS, 1988; WALKER, 1972).

Foi encontrada segregação transgressiva apenas para suscetibilidade à *X. c. phaseoli*, onde duas linhagens foram mais suscetíveis no tratamento com N que o parental Jalo EEP558. Estes resultados diferem dos de NODARI *et al.* (1993), que não encontraram nenhum segregante transgressivo em população F_3 . Entretanto, segregação transgressiva para resistência e suscetibilidade ao CBC já foi anteriormente encontrada por outros autores (COYNE & SCHUSTER, 1974; VALLADARES-SANCHEZ *et al.*, 1979; SILVA *et al.*, 1989). Uma das possibilidades para ocorrência de segregação transgressiva é a presença de alelos de suscetibilidade no parental resistente e vice-versa. Isto foi observado com os marcadores PAL-5, onde na ausência de N os alelos de BAT-93 contribuíram para suscetibilidade e D1367 e D1287, localizados no grupo de ligação D2, onde os alelos de BAT-93 contribuíram para suscetibilidade na presença de N.

Alguns destes marcadores foram significativos apenas por nota ou área de lesão. Porém, correlação significativa foi encontrada entre estes parâmetros, indicando que os dois tipos de avaliação para reação a bacteriose podem ser utilizados para mapear QTLs de resistência. Estes resultados coincidem com os de CAMARGO *et al.* (1995), que também encontraram os mesmos QTLs de resistência em *Brassica oleracea* nas avaliações por nota e área de lesão.

Quatro QTLs de resistência localizados no grupo de ligação D1, D2, D5 e D7 foram detectados neste trabalho, independente do nível de N utilizado. NODARI *et al.* (1993) também detectaram 4 QTLs de resistência ao CBC, localizados nos grupos de ligação D2, D5, D7 e D9. A diferença entre estes trabalhos na detecção de QTLs em grupos de ligação diferentes ou diferente localização destes QTLs dentro de um mesmo grupo de ligação, deve-se provavelmente a mudanças ambientais e/ou pela utilização de linhagens recombinantes.

O QTL localizado no grupo de ligação D7 demonstra ser um QTL de efeito principal pois, além deste trabalho, foi detectado também por NODARI *et al.* (1993) e BOSCARIOL *et al.* (1996a), explicando nos três trabalhos uma maior porcentagem da variação fenotípica. O QTL localizado nesta região, contém o *locus* marcador faseolina (PHS), que é uma das principais proteínas de reserva da semente de feijão. Esta proteína também é denominada de vicilina, glicoproteína II, globulina I, eufaseolina e α -globulina (OSBORN, 1988). A priori, nenhuma função de defesa contra patógenos foi atribuída a esta proteína. Entretanto, dois outros trabalhos também detectaram QTLs de resistência em feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* localizados na região da faseolina (NODARI *et al.*, 1993; BOSCARIOL *et al.*, 1996a ; BOSCARIOL *et al.*, 1996b).

A CHI e a PAL, ambas envolvidas na via metabólica dos fenilpropanóides, também foram associadas a QTLs de resistência. As enzimas envolvidas nesta via biossintética possuem uma forte influência sobre a determinação das interações de compatibilidade ou incompatibilidade entre o patógeno e o hospedeiro. Na reação de incompatibilidade, ocorre uma rápida ativação de genes que codificam algumas destas enzimas, ao contrário da reação de compatibilidade, onde os genes não

são ativados ou o são mais lentamente (MEIER *et al.*, 1993; ESNAULT *et al.*, 1993; JAKOBEK *et al.*, 1993; ORCZYK *et al.*, 1996). Estes genes são regulados diferenciadamente em raízes, parte aérea, folhas e flores. Sua indução ocorre devido a injúria mecânica, infecção com patógenos, intensidade de luz e estresse ambiental (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989). Dentre os fatores de estresse ambiental, baixas concentrações de nitrogênio no solo parecem induzir a produção de flavonóides nas raízes de leguminosas (DIXON & PAIVA, 1995).

O gene P que condiciona a presença ou ausência de flavonóides, localizado no grupo de ligação D7, possivelmente está relacionado ao QTL de resistência localizado nesta região. Apesar de não ter sido utilizado como marcador, associações significativas foram detectadas com marcadores localizados acima e abaixo deste gene.

Interações significativas foram encontradas entre nível de N e três *loci* marcadores. O marcador PAL-5 apresentou interação altamente significativa ($P < 0,01$), enquanto os outros *loci* marcadores (D1367, D1287) apresentaram interações significativas apenas ao nível de 5 % de probabilidade. Possivelmente, utilizando níveis superiores a 5 mM de NH_4NO_3 , um maior nível de significância seria detectado nestes dois marcadores, ou mesmo em outros marcadores. Isto sugere que, dependendo da quantidade de N utilizado como fertilizante, diferentes QTLs de resistência à *X. campestris* pv. *phaseoli* poderão ser detectados. A influência do ambiente na expressão de características quantitativas é bastante conhecido, e vários trabalhos mencionam a detecção de diferentes QTLs de resistência devido a mudança ambiental (BUBECK *et al.*, 1993; NEWCOMBE *et al.*, 1996; PATERSON *et al.*, 1991a).

Distorções das proporções mendelianas esperadas foram observadas em dois marcadores do grupo de ligação D1 e um no grupo de ligação D7. Distorções mendelianas são comumente encontradas em trabalhos envolvendo populações segregantes ou linhagens recombinantes (BENTOLILA *et al.*, 1992; FAURÉ *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 1992; VICENTE & TANKSLEY, 1991). Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995), distorções podem ter uma base genética ou serem apenas reflexo de uma amostra pequena de indivíduos genotipados. Os mesmos autores

sugerem que, para detecção de QTLs, devem ser analisados apenas marcadores que segregam de acordo com as proporções mendelianas esperadas.

5.2. Número de nódulos

Comparando o número de nódulos das linhagens crescidas nos tratamentos com e sem 5 mM de NH_4NO_3 , observou-se que a maioria das linhagens sofreram uma redução da nodulação no tratamento com N. Entretanto, algumas linhagens e os parentais não sofreram efeito inibitório da nodulação sob 5 mM de NH_4NO_3 , exceto o parental Jalo EEP558 não inoculado com *X. c. phaseoli*, que apresentou maior número de nódulos no tratamento sem N. Como revisado anteriormente, o efeito do nitrogênio pode ser limitante para a nodulação, atingindo etapas cruciais para formação dos nódulos e fixação biológica do nitrogênio (FRANCO & NEVES, 1992; PEREIRA & ARAÚJO, 1983). CECCATO (1994) demonstrou que a partir de 4 mM de NH_4NO_3 , ocorre uma diminuição drástica da FBN em vários cultivares de *P. vulgaris*, inclusive BAT-93 e Jalo EEP558. Por outro lado pequenas doses deste nutriente podem estimular a nodulação (EAGLESHAM *et al.*, 1983; TSAI *et al.*, 1993).

O número de nódulos dos parentais não foi afetado pela inoculação com *X. c. phaseoli*, pois os valores entre eles não diferiram estatisticamente. Isto possivelmente ocorreu porque quando *X. c. phaseoli* foi inoculada, os nódulos já estavam estabelecidos nas raízes. Porém, o parental Jalo EEP558 não inoculado com *X. c. phaseoli*, no tratamento sem N, apresentou maior número de nódulos que o Jalo EEP558 inoculado com o patógeno. Neste caso, provavelmente houve interferência do patógeno na nodulação, sugerindo que as linhagens com alelos de Jalo EEP558 para número de nódulos, podem ter sofrido uma redução da nodulação no tratamento sem N, provocada pela interação com o patógeno.

Apesar de algumas linhagens apresentarem menor NN que BAT-93 e maior NN que Jalo EEP558, nenhuma segregação transgressiva foi detectada. Como

mencionado anteriormente, segregação transgressiva ocorre possivelmente devido a presença de alelos de alta nodulação no parental de baixa nodulação e vice-versa. Isto foi observado nos marcadores D1308, localizado no grupo de ligação D1, D1132 no grupo de ligação D3 e com os marcadores do grupo de ligação D5 e D8. Nestes marcadores foram os alelos de BAT-93 que conferiram maior números de nódulos. Entretanto, os marcadores D1308 e D1132 apresentaram alelos de BAT-93 conferindo maior número de nódulos apenas no tratamento com N e os marcadores do grupo de ligação D5 e D8 apenas no tratamento sem N. Desta forma, segregação transgressiva, embora esperada, provavelmente não foi detectada devido ao pequeno tamanho da população utilizada para estudo. Estes resultados não concordam com os de NODARI *et al.* (1993), que encontraram segregação transgressiva tanto para maior quanto para menor número de nódulos. Esta diferença deve-se provavelmente ao tamanho e a natureza das populações usadas, visto que NODARI *et al.* (1993) utilizaram uma população segregante F_3 e neste trabalho foi utilizada uma população de linhagens recombinantes F_{8-9} , além da influência do ambiente sobre esta característica.

Um QTL associado ao marcador CHI, localizado no grupo de ligação D7, foi detectado em ambos os tratamentos e explicou a maior porcentagem da variação fenotípica. NODARI *et al.* (1993) também detectaram um QTL associado a número de nódulos localizado no grupo de ligação D7 que explicou a maior porcentagem da variação fenotípica, entretanto, os marcadores associados ao QTL diferiram deste trabalho.

Os marcadores localizados nos grupos de ligação D1 e D3 associados ao NN no tratamento com N, também foram detectados por NODARI *et al.* (1993). Entretanto, nenhum marcador associado ao NN no tratamento sem N foi compatível com os detectados por NODARI *et al.* (1993), provavelmente porque este utilizou solução nutritiva contendo nitrogênio em seus experimentos.

No tratamento sem N foram detectadas várias regiões genômicas associadas ao NN, ao passo que, no tratamento com N apenas 4 marcadores foram significativamente associados ao NN. Este resultado provavelmente foi devido ao efeito inibitório do nitrogênio sobre a nodulação. Desta forma, devido a utilização de uma

dose sub-deletéria para formação dos nódulos na maioria das linhagens, poucos genes tiveram efeito sobre esta característica. Em condições de ausência deste nutriente, como não ocorreu inibição na formação dos nódulos, possivelmente houve uma maior expressão de QTLs de nodulação. Isto indica que dependendo da dose de N utilizada, diferentes QTLs associados ao NN poderão ser detectados.

Os marcadores ACO2 e CHI explicaram a maior porcentagem da variação fenotípica no tratamento sem N. Aconitase é uma enzima envolvida no ciclo de Krebs, responsável pela transformação reversível do citrato em isocitrato (LEHNINGER, 1993). Em *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, a aconitase I e II foram utilizadas como isoenzimas para trabalhos de filogenia (GARVIN & WEEDEN, 1994; PAREDES & GEPTS, 1995). Em espinafre, esta enzima foi relacionada como precursora para a formação de glutamato e glutamina, que são os principais produtos fotossintéticos de assimilação do nitrato (HANNING & HELDT, 1993). Em nódulos, o ciclo de Krebs está envolvido na via metabólica do carbono fixado não fotossinteticamente. Esta via tem importante função na formação de esqueletos de carbono para assimilação da amônia, transporte e crescimento celular. Em alfafa, por exemplo, foi estimado que 25 % do carbono requerido para assimilação do nitrogênio fixado foi proveniente da fixação não fotossintética do CO₂ (CHRISTELLER *et al.*, 1977; VANCE *et al.*, 1983). Entretanto, nada é relatado sobre o envolvimento dos intermediários do ciclo de Krebs na formação dos nódulos.

A CHI foi responsável pela maior porcentagem da variação fenotípica nos tratamentos com e sem N. Esta enzima está envolvida na via metabólica dos fenilpropanóides, e é uma das principais precursoras da síntese de flavonóides (MEHDY & LAMB, 1987). Estes compostos funcionam como sinais derivados da planta hospedeira que se ligam ao produto protéico do gene da nodulação Nod D do *Rhizobium*, ativando-o através de uma mudança na conformação. Nessa estrutura ativada, a proteína Nod D se liga a seqüências de nucleotídeos que precedem os genes estruturais comuns *nodABC*, iniciando a transcrição genética de fatores Nod necessários para o estabelecimento da simbiose (ELIZABETH & SENGUPTA-GOPALAN, 1991; HAHNBROCK & SCHEEL, 1989; HUNGRIA, 1994). Desta forma, evidencia-se que a

formação dos nódulos está altamente relacionada com a produção de flavonóides pelo hospedeiro. No entanto, determinadas condições ambientais podem interferir na síntese de flavonóides e comprometer o estabelecimento da simbiose, como por exemplo um alto nível de N disponível no solo (DIXON & PAIVA, 1995).

Para o tratamento sem N, foram detectadas 7 regiões genômicas explicando 98 % da variação fenotípica. Este valor é considerado muito alto frente ao tamanho da população estudada. Uma das possibilidades para este resultado é ter ocorrido epistase, ou seja, um determinado QTL teve uma ação de dominância sobre outro QTL. Desta forma, a contribuição da variação fenotípica total seriam as dos QTLs que tiveram ação epistática. Entretanto, testes de epistasia devem ser feitos para confirmar esta hipótese. Outra possibilidade seria ter ocorrido erro do tipo I, ou seja, a detecção de falsos QTLs. Para o tratamento com N, a contribuição da variação fenotípica total foi de 37 %. NODARI *et al* (1993) utilizando uma população de 70 famílias F₃ mantidas sob baixo nível de N, detectaram QTLs explicando 50 % da variação fenotípica.

Distorções das proporções mendelianas foram observadas no marcador D0096, localizado no grupo de ligação D6. Desta forma, este marcador não foi associado a um QTL conferindo NN, apesar de um marcador não distorcido, também localizado no grupo de ligação D6 (D1086) próximo a este ter sido significativamente associado ao NN.

5.3. Interação entre QTLs associados a número de nódulos e resistência ao crestamento bacteriano comum

Três regiões genômicas foram associadas a QTLs de resistência e NN (Figura 5). No grupo de ligação D1, os marcadores D1291, P2027 e D1630, associados ao NN em condições de ausência de N, foram também associados a resistência. Para estes marcadores, os alelos do parental BAT-93 contribuíram para resistência ao CBC e os do Jalo EEP558 para maior NN. Um outro marcador, D1308, localizado no grupo de

ligação D1, foi associado a NN em condições de presença de N e resistência ao CBC. Neste caso os alelos de BAT-93 conferiram alto NN e resistência ao CBC. Estes resultados indicam que esta região genômica pode conter múltiplos QTLs que afetam diferentes características de acordo com as condições ambientais. Marcadores desta região associados a NN e resistência não foram detectados por NODARI *et al.* (1993).

Um QTL localizado no grupo de ligação D2 também foi associado a resistência e NN em condições de ausência de nitrogênio. Nesta região, alelos de Jalo-EEP558 conferiram resistência e maior NN. NODARI *et al.* (1993) detectaram QTLs de resistência ao CBC no grupo de ligação D2 associados a marcadores localizados abaixo dos detectados neste trabalho. Entretanto, nenhum QTL de nodulação foi detectado nesta região, sugerindo que este QTL está associado a NN de acordo com o ambiente, e que neste caso foi apenas na ausência de N.

No grupo de ligação D1, na presença de N, os alelos do BAT-93 conferiram resistência e maior NN. No grupo de ligação D2 os alelos do Jalo EEP558 conferiram resistência e maior NN na ausência de N. Estes resultados sugerem que pode ter ocorrido uma recombinação dos genes responsáveis por estas duas características nestas regiões. Entretanto, estes resultados são encontrados apenas em condições de ausência ou presença de N, demonstrando o efeito ambiental sobre estas características.

O QTL localizado no grupo de ligação D7, na região da CHI, também foi associado a ambas características, porém, em ambos níveis de N. Nesta região, foram os alelos de BAT-93 que conferiram resistência ao CBC e os de Jalo EEP558 maior NN, sugerindo que pode ter ocorrido efeito pleiotrópico ou genes ligados. Resultados semelhantes foram obtidos por NODARI *et al.* (1993) que detectaram QTLs associados a ambas características no grupo de ligação D7, entretanto, em diferentes marcadores.

Como mencionado anteriormente, flavonóides funcionam como sinais para interação leguminosa-*Rhizobium*. Entretanto, alguns compostos da via dos fenilpropanóides são induzidos como resultado da resposta de defesa da planta em interações com patógenos (ELIZABETH & SENGUPTA-GOPALAN, 1991). Há indicações que flavonóides podem tanto ativar quanto ter um efeito deletério para o

Rhizobium e *Xanthomonas* (NODARI *et al.*, 1993). Vários estádios do desenvolvimento dos nódulos assemelham-se a interações planta-patógeno (VANCE, 1983).

O grupo de ligação D7 explicou a maior porcentagem da variação fenotípica para ambas características em ambos níveis de N, o que também foi observado por NODARI *et al.* (1993), o que indica ser um QTL consistente para ambas características. Entretanto, outros trabalhos devem ser conduzidos para confirmação destes resultados, pois como foi observado, a influência do ambiente tem um forte efeito na expressão de QTLs, e a detecção de QTLs de efeito principal deve ser segura para futuros programas de melhoramento do feijoeiro.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se:

1. A maioria das linhagens que cresceram sob 5 mM de NH_4NO_3 foram mais suscetíveis à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e apresentaram menor número de nódulos;
2. Foram detectados 4 QTLs de resistência à *X. c. phaseoli* independente do nível de N utilizado. Um QTL foi detectado na ausência e outro na presença de N. Isto demonstra que dependendo do nível de N utilizado, diferentes QTLs de resistência poderão ser detectados;
3. Foram detectados 7 QTLs para número de nódulos em condições de ausência de N e 4 QTLs na presença de 5 mM de NH_4NO_3 . Demonstrando também que o nível de N utilizado pode interferir na detecção de QTLs associados a número de nódulos;
4. O QTL localizado no grupo de ligação D7 demonstra ser de efeito principal para resistência à *X. c. phaseoli* e número de nódulos, pois além de ser significativo em condições de ausência e presença de N, foi responsável pela maior porcentagem da variação fenotípica. O QTL detectado nesta região, associado ao marcador CHI, foi significativo tanto para resistência quanto para nodulação. Porém, foram os alelos de BAT-93 responsáveis pela resistência à *X. c. phaseoli* e os de Jalo EEP558 pelo maior NN, sugerindo que pode ter ocorrido pleiotropia ou genes ligados responsáveis por estas características;
5. Houve correlação significativa entre os parâmetros de avaliação por nota e área de lesão, indicando que ambos parâmetros poderão ser utilizados para detecção de QTLs de resistência à *X. c. phaseoli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F.; SEVIGNAC, M.; DRON, M. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. *Genome*, v.37, p.915-924, 1994.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, California: Academic Press, 1988, 803p.
- ARNAUD-SANTANA, E.; COYNE, D.P.; ESKRIDGE, K.M.; VIDAVER, A.K. Inheritance; low correlation of leaf, pod, and seed reactions to common blight disease in common beans; and implications for selection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v.191, n.1, p.116-121, 1994.
- BECKMANN, J.S. & SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. *Theor Appl Genet*, v.67, p.35-43, 1983.
- BENTOLILA, S.; HARDY, T.; GUITTON, C.; FREYSSINET, G. Comparative genetic analyses of F₂ plants and anther culture derived plants of maize. *Genome*, v.35, p.575-582, 1992.
- BOSCARIOL, R.L.; SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência de *Phaseolus vulgaris* a dois isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. XXIX Congresso brasileiro de fitopatologia. **Resumos. Fitopatologia Brasileira** (suplemento 21), v. 4, p. 334, 1996a.
- BOSCARIOL, R.L.; SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A. Mapping resistance QTLs of *Phaseolus vulgaris* to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. 42º Congresso nacional de genética. **Resumos. Revista Brasileira de Genética** (suplemento), v. 19, n. 3, p. 310, 1996b.
- BUBECK, D.M.; GOODMAN, M.M.; BEAVIS, W.D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci.*, v.33, p.838-847, 1993.

- BULISANI, E.A. Feijão: fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargil, 1987. 326p.
- CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência oligogênica. In: 12º ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, vol. 12, Piracicaba, 1995. **Resistência genética de plantas a doenças**. Piracicaba: Departamento de Genética - ESALQ/USP, 1995. p.57-64.
- CAMARGO, L.E.A.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in field and greenhouse. **Phytopathology**, v. 85, n. 10, p.1296-1300, 1995.
- CECCATO, V.M. Nodulinas e atividade enzimática em feijoeiro de origem mesoamericana e andina, 1994. 61p. Tese (mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- CHEN, F.Q.; PREHN, D.; HAYES, P.M.; MULROONEY, D.; COREY, A.; VIVAR, H. Mapping genes for resistance to barley stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*). **Theor. Appl. Genet.** v.88, p.215-219, 1994.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; SUTTON, W.D. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. **Plant Physiology**, v. 60, p. 47-50, 1977.
- CIAT. (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico: Simbiosis legumonosa-rizobio. Cali, Colombia, 1988, 178p.
- CLAIR, D.A. & BLISS, F.A. Intrapopulation recombination for ¹⁵N-determined dinitrogen fixation ability in common bean. **Plant Breeding**. v.106, p. 215-225, 1991.
- COLLETA FILHO, H.D. Avaliação da fixação biológica do N₂ em genótipos de feijoeiro. Piracicaba, 1993. 72p. Tese (mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. Inheritance and linkage relations of reaction to *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson (Common Blight), stage of plant development and plant habit in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, v.23, p.195-204, 1974.
- DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P.G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; VIENNE, D. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theor. Appl. Genet*, v.88, p.17-27, 1994.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, v. 7, p.1085-1097, 1995.
- DRIJFHOUT, E. & BLOK, W.J. Inheritance of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Euphytica*, v.36, p.803-808, 1987.
- EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEEGER, R. Fertilizer-N effects on N₂ fixation by cowpea and soybean. *Agronomy Journal*, v.75, p. 61-66, 1983.
- EDWARDS, K.; CRAMER, C.L.; BOLWELL, G.P.; DIXON, R.A.; SCHUCH, W.; LAMB, C.J. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.82, p.6731-6735, 1985.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigation of quantitative-trait loci in maize. I. Number, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, v. 116, p.113-125, 1987.
- ELIZABETH, M. & SENGUPTA-GOPALAN, C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *The Plant Cell*, v. 3, p.299-308, 1991.
- ESNAULT, R.; BUFFARD, D.; BREDAS, C.; SALLAUD, C.; EL TURK, J.; KONDOROSI, A. Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 6, n. 5, p.655-664, 1993.
- FAO. QUARTELI BULLETIN OF STATISTICS, Rome, v.4, n.3, p.56, 1990.

- FAURÉ, S.; NOYER, J.L.; HORRY, J.P.; BAKRY, F.; LANAUD, C.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D. A molecular marked-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). **Theor. Appl. Genet.**, v. 87, p.517-526, 1993.
- FERREIRA, E.F. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20).
- FERREIRA, M.E.; RIMMER, S.R.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Mapping loci controlling *Brassic napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. **Phytopathology**, v. 85, n.2, p.213-217, 1995.
- FRANCO, A.A. & NEVES, M.C.P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1992. cap.16, p.219-230
- FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1992. cap.9, p.121-140.
- GARVIN, D.F.; WEEDEN, N.F. Isozyme evidence supporting a single geographic origin for domesticated tepary bean. **Crop Sci.**, v. 34, n.5, p. 1390-1395, 1994.
- GEPTS, P.; NODARI, R.; TSAI, S.M.; KOINANGE, E.M.K.; LLACE, V.; GILBERTSON, R.; GUZMAN, P. Linkage mapping in common bean. **Annu. Rupt. Bean Improve**, v.36, p.24-38, 1993.
- HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p.347-369, 1989.
- HANNING, I. & HELDT, H.W. On function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1147-1154, 1993.
- HERRIDGE, D. F. & PEOPLES, M.B. The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. **Plant Physiology**, v.93, p.495-503, 1990.

- HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio: aspectos fisiológicos e genéticos do rizóbio. In: IV Reunião Nacional de Pesquisa de feijão. **Resumos**. Londrina, IAPAR, 1993, p.178.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **R. bras. Ci. Solo**, v.18, p. 339-364, 1994.
- HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA/CNPAP, Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos 46).
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.21, n.2, p.127-140, 1986.
- JAKOBEK, J.L.; SMITH, J.A.; LINDGREN, P.B. Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, v. 5, p.57-63, 1993.
- JOHNSTON, H. W. & MACLEOD, J. Response of spring barley to fungicides, plants growth regulators, and supplemental nitrogen. **Can. J. Plant Pathol.**, v. 9, p.255-259, 1987.
- JORDAN, V.W.L. & STINCHCOMBE, G.R. Interactions between fungicide, plant growth regulator, nitrogen fertiliser applications, foliar disease and yield of winter barley. **Ann. Appl. Biol.**, v. 108, p.151-165, 1986.
- LANDRY, B.S.; LINCOLN, S.E.; ETOH, T. A genetic for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). **Genome**, v.35, p.409-420, 1992.
- LEHNINGER, A.L. O ciclo do ácido cítrico. In: LEHNINGER, A.L. **Princípios da Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. cap. 16, p. 311-331.
- LIN, S.Y.; IKEHASHI, H.; YANAGIHARA, S.; KAWASHIMA, A. Segregation distortion via male gametes in hybrids between indica and japonica or wide-compatibility varieties of rice (*Oriza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 84, p.812-818, 1992.

- MEHDY, M.C. & LAMB, C.J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. **EMBO Journal**, v.6, n.6, p.1527-1533, 1987.
- MEIER, B.M.; SHAW, N.; SLUSARENKO, A.J. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 4, p.453-466, 1993.
- MOHAMED, F.M & COYNE, D.P. Photoperiod sometimes influences common bacterial blight disease of common beans. **HortScience**, v.30, n.3, p.551-553, 1995.
- NEWCOMBE, G.; BRADSHAW, H.D.; CHASTAGNER, G.A.; STETTLER, R.F. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* sp. *deltoidea* in a hybrid poplar pedigree. **Phytopathology**, v.86, p.87-94, 1996.
- NODARI, R.O.; KOINANGE, E.M.K.; KELLY, J.D.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 1. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. **Theor. Appl. Genet.**, v. 84, p.186-192, 1992.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, v.134, p.341-350, 1993.
- ORCZYK, W.; HIPSKIND, J.; NEERGAARD, E.; GOLDSBROUGH, P.; NICHOLSON, R.L. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase in sorghum in response to inoculation with *Bipolaris maydis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, p.55-64, 1996.
- OSBORN, C.T. Genetic control of bean seed protein. **CRC Critical reviews in plant sciences**, v. 7, n. 2, p. 93-111, 1988.
- PAREDES, O.M. & GEPTS, P. Extensive introgression of middle american germoplasm into chilean common bean cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, n. 1, p.29-41, 1995. Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, 1993-7/95.
- PATERSON, A.H.; DAMON, S.; HEWITT, J.D.; ZAMIR, D.; RABINOWITCH, H.D.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; TANKSLEY, S.D. Mendelian factors underlying

- quantitative trait in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, v.127, p.181-197, 1991a.
- PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA Markers in plant improvement. In: SPARKS, D.L., ed. **Advances in agronomy**. Orlando: Academic Press, 1991b. v.46, p.39-90.
- PEREIRA, P.A.A. & ARAÚJO, R.S. Fixação biológica de nitrogênio. In: CURSO DE PRODUÇÃO DE FEIJÃO, 2., Goiânia, 1983. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF/CIAT, 1983. p. 1-23.
- PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.; STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.19, n.7, p.811-815, 1984.
- PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIECIK, K.A.; BLISS, F.A. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Plant and Soil**, v.148, p.203-209, 1993.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Appl. Environmental Microbiology**, v.54, p.2825-2832, 1988.
- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.19, n. 4, p. 445-448, 1984.
- RAVA, C.A. & ROMEIRO, R.S. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* quanto a patogenicidade em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Summa Phytopathologica**, v.16, p.225-232, 1990.
- RAVA, C.A. & SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A. & RAVA, C.A., ed. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 300p. (EMBRAPA-CNPAF. Documento 50).
- RAVA, C.A.; SARTORATO A.; ROMEIRO, R.S. Avaliação de cultivares de feijoeiro quanto a resistência a *Xanthomonas campestris* bv *phaseoli* em condições de campo e de casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, v.16, p.83-91, 1989.

- RAVA, C.A.; ZIMMERMANN, M.J.O.; ROMEIRO, R.S. Inheritance of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye in *Phaseolus vulgaris* L. **Rev. Brasil. Genet.**, v.10, n.4, p.709-727, 1987.
- RICE, C. F.; LUKASZEWSKI, K. M.; WALKER, S. BLEVINS, D.G.; WINKLER, R. G.; RANDALL, D.D. Changes in ureide synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. **Journal of Plant Nutrition**, v.13, p. 1539-1553, 1990.
- ROSOLEM, C.A. **Boletim técnico 8; nutrição e adubação do feijoeiro**. Piracicaba-SP, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987. 91p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: laboratory manual. 2ed. NY: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANDBRINK, J.M.; VAN OOIJEN, J.W.; PURIMAHUA, C.C.; VRIELINK, M.; VERKERK, R.; ZABEL, P.; LINDHOUT, P. Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.444-450, 1995.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.231-233, 1975.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P.; BEHRE, T.; LEYNA, H. Sources of *Phaseolus* species resistance and leaf and pod differential reactions to common blight. **HortScience**, v.18, n.6, p.901-903, 1983.
- SEATTLER, A.W. Diseases caused by bacteria. In: HALL, R., ed. **Compendium of bean diseases**, APS Press, 1991, 73p.
- SILVA, L.O.; SINGH, S.P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Inheritance of resistance to bacterial blight in common bean. **Theor Appl Genet.**, v.78, p.619-624, 1989.
- SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. vol. II, 1599P.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. **Plant and Soil**, v.161, p.1-10, 1994.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annu. Rev. Genet.**, v.27, p.205-233, 1993.

- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, v.152, p.131-138, 1993.
- TSAI, S.M.; NODARI, R.O.; GEPTS, P. Análise quantitativa e mapeamento de genes da nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: 9º ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, v. 9, Piracicaba, 1992. **Ampliação da base genética vegetal**. Piracicaba: Departamento de genética - ESALQ/USP, 1992. p.51-67.
- VALARINI, P.J. & MENTEN, J.O.M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopatologica**, v.17, p.227-231, 1991.
- VALLADARES-SANCHEZ, N.E.; COYNE, D.P.; MUMM, R.F. Inheritance and associations of leaf, external, and internal pod reactions to common blight bacterium in *Phaseolus vulgaris* L. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v.108, n.2, p.272-278, 1983.
- VALLADARES-SANCHEZ, N.E.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Differential reaction of pods of *Phaseolus* germplasm to strains of *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from crosses of susceptible germplasm. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.104, n.5, p.648-654, 1979.
- VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, v.131, p.733-740, 1992.
- VANCE, C.P. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease?. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.37, p.399-424, 1983.
- VANCE, C.P.; STADE, S.; MAXWELL, C.A. Alfafa root nodule carbon dioxide fixation. I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. **Plant Physiology**, v. 72, p. 469-473, 1983.
- VICENTE, M.C. & TANKSLEY, S.D. Genome-wide reduction in recombination of backcross progeny derived from male versus female gametes in an interespecific cross of tomato. **Theor. Appl. Genet.**, v. 83, p.173-178, 1991.
- VINCENT, J.M. **Manual of the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 163p. (International biology program, 15).

- WALKER, J.C. Relation of environment to disease development. In: **Plant Pathology**, McGraw - Hill, 1972, 819p.
- WEBSTER, D.M. Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Phaseoli vulgaris* under tropical conditions. **Plant Disease**, v.67, n.4, p.394-396, 1983.
- YOUNG, N.D.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D.; KUMAR, L. Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p.243-249, 1993.
- YU, Z.H.; WANG, J.F.; STALL, R.E.; VALLEJOS, C.E. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. **Genetics**, v.141, p.675-682, 1995.
- ZEBARTH, B.J. & SHEARD, R.W. Response of barley yield and yield components to nitrogen rate under low and high input management systems. **Can. J. Plant Sci.**, v. 71, p.71-80, 1991.

APÊNDICE

Apêndice 1. Composição química da solução nutritiva de Sarruge diluída 3:1.

Soluções estoques (1M)	Tratamentos	
	Sem N (mL/L)	Com N (mL/L)
KH_2PO_4	0,25	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50	0,50
KCl	1,25	1,25
CaCl_2	1,25	1,25
NH_4NO_3	-	2,25
Micronutrientes *	0,25	0,25
Fe EDTA	0,25	0,25

* Solução de micronutrientes (g/L): 2,86g H_3BO_3 , 1,81g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,10g ZnCl_2 , 0,04g CuCl_2 e 0,02g $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Apêndice 2. Composição química do meio de cultura 523 para *X. campestris*.

Reagentes	g/L
Sacarose	10
Caseína hidrolisada enzimaticamente	8
Extrato de levedura	4
K_2HPO_4	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
Ágar	15
pH = 7,0 - 7,1	

Apêndice 3 - Genotipagem das linhagens recombinates F_{8,9} provenientes do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558.

Linhagens	Sondas										
	PAL-5	D1308	CHS	D1461	D1492	D1390	PHS	D1861	Bng	Bng	D1831
									204	191	
56	B	B	B	-	J	J	B	B	B	B	J
63	J	B	B	J	B	J	J	J	-	B	B
68	J	J	J	J	J	J	B	B	-	B	-
71	J	J	B	B	B	B	B	B	B	B	J
81	B	J	B	B	B	B	B	B	-	B	B
96	J	B	B	J	J	J	-	-	-	J	J
101	B	B	J	-	B	B	J	J	J	B	B
103	J	J	B	-	J	B	B	-	B	J	J
104	J	J	B	J	J	J	J	-	J	J	-
105	J	B	J	B	B	J	B	J	B	B	B
107	B	J	B	J	J	-	J	-	B	B	J
108	B	B	J	B	J	-	J	J	B	J	-
109	B	B	B	B	B	J	J	J	J	B	B
111	B	B	-	-	B	B	B	-	J	-	J
115	-	B	B	-	J	J	J	J	J	-	J
116	J	B	B	-	B	J	B	-	J	-	J
117	J	J	J	-	J	J	J	-	-	-	B
118	J	J	-	J	J	B	J	B	B	-	J
120	-	B	B	J	B	J	J	J	-	-	B
123	-	J	J	B	-	-	-	B	B	-	J
125	B	B	J	-	J	J	J	J	B	B	B
127	B	B	B	J	J	J	J	J	B	B	J
129	-	B	B	B	J	J	B	B	-	-	-
131	-	B	J	J	J	J	J	J	-	-	J
132	J	B	J	J	B	J	J	B	B	J	B

continuação

133	J	B	J	-	B	J	B	B	B	J	B
136	B	J	B	B	B	B	B	B	B	J	J
137	B	J	J	-	B	B	J	J	-	J	-
138	J	B	J	J	J	J	J	J	-	B	J
139	B	J	J	-	J	B	B	B	B	B	B
141	B	B	B	J	B	B	J	J	B	J	B
142	J	B	J	J	J	B	B	-	-	J	J
144	B	J	B	-	B	B	J	-	-	-	B
146	J	J	J	J	J	J	J	-	-	B	J
148	J	B	B	J	J	B	B	B	-	-	B
149	J	J	J	J	B	B	B	B	B	-	J
154	B	B	J	B	J	B	J	J	J	J	J
155	B	B	B	J	J	B	B	J	B	J	J
159	B	B	J	J	J	B	J	J	J	B	J
160	B	B	B	-	-	B	B	J	B	J	J
161	-	J	J	J	J	B	J	J	B	J	J
167	J	J	B	J	B	B	J	J	B	J	B
169	J	B	J	J	B	J	J	B	J	B	J
170	J	J	B	B	B	B	J	J	B	J	B
171	J	B	J	B	B	J	B	B	B	-	J
172	J	B	B	J	-	B	B	B	B	-	J
176	J	B	B	B	B	J	-	B	B	-	J

Apêndice 4 - *Loci* marcadores utilizados para detecção de QTLs associados a número de nódulos e resistência à *X. c. phaseoli*.

Grupo de ligação	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D14
Marcador	D1662	D1367	D1096	ME	D1080	P2062	Bng 191	D1505	GLUC	D1476	D0252	D1174
	D1862	D1287	D1132	D1325	D1461	D1086	CHI		D1101			
	D1315	D0166	D1020	RBCS	DIAP	D0096	D1390		D1831			
	D1327	CHS	D1377		D1492		PHS		D1338			
	D1032	D1595	SKDH		ACO 2		D1861					
	D1228	D1619	D1151		D1157		Bng 204					
	D1308				D1301		D1107					
	D1291				D1251							
	P2027											
	D1630											
	D1512											

Marcador PAL -5 não foi mapeado

Apêndice 5 - Quadro da análise de variância para área de lesões utilizando um esquema fatorial tendo como efeitos principais: níveis de nitrogênio x blocos x linhagens + parentais.

causas da variação	Grau de liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Níveis de N	1	435128,909	435128,909	7,8462	0,00601
Blocos	3	841379,034	280459,678	5,0572	0,00278
Linhagens	43	20392053,625	474233,805	8,5514	0,00001
Niv.de N x Blo.	3	112496,727	37498,909	0,6762	0,57169
Niv.de N x Lin.	43	5181305,591	120495,479	2,1728	0,00063
Blo. x Lin.	129	7499206,966	58133,387	1,0483	0,39467
Residuo	129	7153964,773	55457,091		
Total	351	41615535,625			

Apêndice 6 - Quadro da análise de variância para nota das lesões utilizando um esquema fatorial tendo como efeitos principais: níveis de nitrogênio x blocos x linhagens + parentais.

causas da variação	Grau de liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Níveis de N	1	38958,107	38958,107	6,0930	0,01426
Blocos	3	267202,869	89067,623	13,9300	0,00001
Linhagens	41	3236148,452	78930,450	12,3446	0,00001
Niv.de N x Blo.	3	15525,012	5175,004	0,8094	0,50618
Niv.de N x Lin.	41	509524,643	12427,430	1,9436	0,00304
Blo. x Lin.	123	701939,381	5706,824	0,8925	0,73551
Resíduo	123	786455,238	6393,945		
Total	335	5555753,702			

Apêndice 7 - Quadro da análise de variância para número de nódulos sem N. Dados transformados por raiz quadrada

causas da variação	Grau de liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Linhagens	50	1040,0839883	20.8016798	5,1511	0,00001
Blocos	3	92,0797311			
Resíduo	150	605,7429206	4,0382861		
Total	203	1737,9066400			

Apêndice 8 - Quadro da análise de variância para número de nódulos com N. Dados transformados por raiz quadrada

causas da variação	Grau de liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Linhagens	50	1072,3179714	21,4462594	3,9419	0,00001
Blocos	3	39,0051497			
Resíduo	150	816,0953633	5,4406358		
Total	203

Apêndice 9 - Gráfico dos resíduos padronizados segundo o modelo para número de nódulos das linhagens com e sem N.

Apêndice 10 - Gráfico dos resíduos padronizados. Dados transformados por raiz quadrada do número de nódulos das linhagens com e sem N.

Apêndice 11 - Gráfico dos resíduos padronizados do número de nódulos das linhagens sem N

Apêndice 12 - Gráfico dos resíduos padronizados do número de nódulos das linhagens sem N. Dados com transformação por raiz quadrada.

Apêndice 13 - Gráfico dos resíduos padronizados do número de nódulos das linhagens com N.

Apêndice 14 - Gráfico dos resíduos padronizados do número de nódulos das linhagens com N. Dados com transformação por raiz quadrada.

Apêndice 15 - Número de nódulos transformados das linhagens recombinantes F₈₋₉ crescidas em condições de 0 e 5 mM NH₄NO₃.

Número de Nódulos (NN)											
(sem N)						(com N)					
Linhagem	NN		Linhagem	NN		Linhagem	NN		Linhagem	NN	
137	19,80	a	117	13,62	bdefg	Jalo EEP558	16,43	a	116	11,61	abcdef
JaloEEP558	18,64	ab	131	13,56	bdefg	137	16,16	ab	105	11,60	abcdef
sem											
<i>X.c. phaseoli</i>											
172	18,09	abc	BAT-93	13,51	bdefg	Jalo EEP558	15,65	abc	BAT-93	11,55	abcdef
			sem			sem					
			<i>X.c. phaseoli</i>			<i>X. c. phaseoli</i>					
120	17,07	abcd	116	13,47	bdefg	159	15,62	abc	161	11,30	abcdef
109	16,96	abcd	170	13,45	bdefg	149	15,52	abc	125	10,94	abcdef
101	16,78	abcd	63	13,10	bdefg	172	15,50	abc	155	10,92	abcdef
159	16,57	abcd	BAT-93	12,95	bdefg	171	15,42	abcd	68	10,91	abcdef
96	16,57	abcd	146	12,92	bdefg	109	14,25	abcde	129	10,91	abcdef
111	16,50	abcd	108	12,73	cdefg	154	14,05	abcdef	176	10,80	abcdef
JaloEEP558	16,37	abcd	141	12,63	cdefg	144	13,93	abcdef	148	10,61	abcdef
149	16,14	abcdef	123	12,58	cdefg	101	13,90	abcdef	118	10,46	abcdef
71	16,06	abcdef	115	12,52	cdefg	120	13,71	abcdef	103	10,09	abcdef
144	16,03	abcdef	148	12,47	cdefg	132	13,55	abcdef	81	9,96	abcdef
154	15,93	abcdef	169	12,40	cdefg	141	13,50	abcdef	115	9,94	abcdef
118	15,82	abcdef	155	12,37	cdefg	138	13,24	abcdef	123	9,91	abcdef
171	15,66	abcdef	132	12,30	cdefg	71	12,58	abcdef	169	9,91	abcdef
138	15,58	abcdef	125	12,02	defg	131	12,39	abcdef	117	9,55	bcddef
81	15,28	abcdefg	161	11,92	defg	BAT-93 sem	12,23	abcdef	142	9,23	cdef
						<i>X. c. phaseoli.</i>					
176	15,06	abcdefg	103	11,58	defg	127	12,17	abcdef	167	9,03	cdef
56	14,82	abcdefg	136	11,34	defg	56	12,15	abcdef	111	8,75	def
127	14,65	abcdefg	160	11,31	defg	63	12,10	abcdef	107	8,52	ef
105	14,52	abcdefg	142	10,43	efg	96	11,90	abcdef	108	8,28	ef
107	14,48	abcdefg	104	10,36	efg	160	11,85	abcdef	104	8,21	ef
167	14,38	abcdefg	129	10,29	fg	139	11,81	abcdef	170	7,79	ef
139	14,15	abcdefg	133	9,77	g	146	11,80	acbddef	133	7,43	f
68	13,96	bdefg				136	11,67	abcdef			

Teste Tukey 5 %

C.V. = 14,20 % para tratamento sem 5 mM de NH₄NO₃, DMS = 5,79

C.V. = 19,78 % para tratamento com 5 mM de NH₄NO₃, DMS = 6,73

(média de 4 repetições)