**LOCALIZAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS AO
NÚMERO DE NÓDULOS E À RESISTÊNCIA A *Xanthomonas*
campestris pv. *phaseoli* E *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* EM
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL
Bióloga

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1997

Localização de regiões genômicas associadas ao número de nódulos e à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Raquel Luciana Boscariol. - Piracicaba, 1997. 75 p.

1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro 2. Feijão 3. Fogo selvagem 4. Marcador molecular 5. Mapeamento genético I. Título

CDD 635.652
632.32

**LOCALIZAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS AO NÚMERO DE
NÓDULOS E À RESISTÊNCIA A *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* E
Pseudomonas syringae pv. *tabaci* EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL

Aprovada em: 29.10.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

Prof. Dr. David Henry Moon

Prof^ª Dr^a Siu Mui Tsai

ESALQ/USP

CENA/USP

CENA/USP

Prof^ª Dr^a Siu Mui Tsai

Orientadora

Aos meus pais, pelo apoio em todos os
momentos e pelo esforço desempenhado
em minha educação

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

- À FAPESP pela bolsa concedida e suporte financeiro para desenvolvimento da pesquisa;
- À Prof^ª Dr^a Siu Mui Tsai, pela orientação e confiança na capacidade de trabalho de seus alunos;
- Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela co-orientação e pelo constante incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho;
- Ao Dr. Paul Gepts (Universidade da Califórnia-Davis), pelas sondas e linhagens recombinantes de feijoeiro e ao Dr. Robert Gilbertson (UC-Davis), pela estirpe de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*;
- Ao Dr. Antonio Carlos Maringoni da Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP- Botucatu), pela estirpe de *X. c. pv. phaseoli* var. *fuscans* e ao Dr. Waldemar Atilio Malavolta do Instituto Biológico (Campinas), pelo isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*;
- Aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (CENA-USP) e ao pesquisador David Henry Moon, pelo auxílio na parte experimental;
- Aos colegas de pós-graduação pela amizade, que tornou mais agradável estes anos;
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Crestamento bacteriano comum (CBC).....	3
2.2 Fogo selvagem.....	7
2.3 Fixação biológica do nitrogênio (FBN).....	9
2.4 QTLs de resistência.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Material Vegetal.....	16
3.2 Genotipagem por RFLPs.....	17
3.3 Avaliação de resistência a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	19
3.4 Avaliação de resistência a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	21
3.5 Avaliação do número de nódulos.....	22
3.6 Análises estatísticas.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Genotipagem por RFLPs.....	24
4.2 Detecção de QTLs de resistência a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	28

4.3 Detecção de QTLs para comprimento do segundo internódio.....	38
4.4 Detecção de QTLs de resistência a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	42
4.5 Detecção de QTLs para número de nódulos.....	46
5 DISCUSSÃO.....	50
5.1 Resistência ao crestamento bacteriano comum.....	50
5.2 Ligação do comprimento do primeiro internódio com resistência ao CBC.....	53
5.3 Resistência ao fogo selvagem.....	54
5.4 Número de nódulos.....	55
6 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE.....	70

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Genotipagem das linhagens recombinantes F ₇₋₈ oriundas do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558, com 11 marcadores do tipo RFLP.....	25
2 Reação de linhagens recombinantes e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>P. vulgaris</i> a <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcp) e <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (Xcpf) avaliada por área de lesão.....	30
3 Reação de linhagens recombinantes e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>P. vulgaris</i> a <i>X. campestris</i> pv. <i>Phaseoli</i> (Xcp) e <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (Xcpf) avaliada por nota com base nos sintomas foliares.....	32
4 Áreas de lesões e notas com base nos sintomas causados pelos isolados <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcp) e <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (Xcpf) em <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	33
5 <i>Loci</i> de RFLPs significativamente associados ($p < 0,01$) à área de lesão e nota com base nos sintomas causados pelos isolados <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcp) W18 e <i>X. c.</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (Xcpf) F2495-A.....	35
6 Frequência observada dos genótipos para <i>loci</i> de RFLPs significativos.....	37
7 Comprimento do segundo internódio em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e linhagens parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	40

8	<i>Loci</i> de RFLPs significativamente associados ($p<0,01$) ao comprimento do segundo internócio de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	41
9	Reação das linhagens recombinantes e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> avaliada por área de clorose e área de necrose foliar.....	43
10	<i>Loci</i> de RFLPs significativamente associados com área de clorose causada por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> em <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	44
11	Número de nódulos (NN) em linhagens recombinantes F_{8-9} e linhagens parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	48
12	<i>Loci</i> de RFLPs significativamente associados ($p<0,01$) ao número de nódulos em <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Polimorfismo observado nas linhagens F ₇₋₈ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558), após hibridização do DNA com as sondas D1492 (A) e Bng204 (B). O DNA foi digerido com as enzimas de restrição <i>Hae</i> III (A) e <i>Dra</i> I (B).....	27
2 Distribuição da frequência das áreas de lesões foliares em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> . (A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (W18); (B) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (F2495-A).....	29
3 Distribuição da frequência das notas com base nos sintomas foliares em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>P. vulgaris</i> . (A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (W18); (B) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (F2495-A).....	31
4 Distribuição da frequência do comprimento do segundo internódio em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	39
5 Distribuição fenotípica de área de clorose causada por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	45
6 Distribuição da frequência do número de nódulos em linhagens recombinantes F ₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	47

**LOCALIZAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS AO NÚMERO DE
NÓDULOS E À RESISTÊNCIA A *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* E
Pseudomonas syringae pv. *tabaci* EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Autora: Raquel Luciana Boscariol

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Siu Mui Tsai

RESUMO

Marcadores RFLPs foram utilizados para identificar regiões genômicas (QTLs) do feijoeiro associadas à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf), agentes causais do cretamento bacteriano comum (CBC), e a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) agente causal do fogo selvagem. Estes marcadores RFLPs também foram utilizados para identificar QTLs que controlam o número de nódulos e o comprimento do segundo internódio. Para avaliação destas características, foram usadas 50 linhagens recombinantes F₈₋₉, derivadas do cruzamento BAT-93 (resistente, baixa nodulação) x Jalo EEP558 (suscetível, alta nodulação).

A resistência ao CBC foi avaliada por inoculação simultânea dos dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* em folíolos distintos do primeiro trifoliolo. Área de lesão foliar e nota das lesões foram utilizados na avaliação dos sintomas. No experimento com *P. syringae* pv. *tabaci*, áreas de necrose e de clorose foram medidas após a inoculação dos folíolos primários. Em outro experimento, avaliou-se o número de nódulos formados após inoculação com *Rhizobium tropici*.

Análises de variância foram empregadas para detectar associações entre as características medidas e genótipos das linhagens em 53 *loci* marcadores, distribuídos em 13 grupos de ligação em um mapa de ligação do feijoeiro. No experimento com CBC, associações significativas ($p < 0,01$) foram encontradas entre área de lesão foliar e 13 *loci* marcadores distribuídos em 5 grupos de ligação, e entre nota da lesão e 17 *loci* marcadores, em 6 grupos de ligação. A ausência de interações significativas entre genótipos x isolados indicou que a resistência aos isolados foi controlada pelos mesmos QTLs. Foi também demonstrado que, o isolado W18 de *X. campestris* pv. *phaseoli*, foi mais agressivo em ambas avaliações (área e nota das lesões).

Seis marcadores foram encontrados associados à área de clorose na avaliação da resistência a *P. syringae* pv. *tabaci*. Estes marcadores estão distribuídos em 4 grupos de ligação. Os dados não revelaram associações significativas com área de necrose. Oito marcadores distribuídos em 5 grupos de ligação (D2, D3, D7, D9 e D10), foram associados ao número de nódulos. A maioria dos QTLs associados ao comprimento do segundo internódio (D5, D7, D8 e D9) foram também associados a resistência ao CBC, indicando ligação entre estas características.

Os QTLs localizados nos grupos de ligação D7 e D9 foram associados à resistência ao CBC, ao fogo selvagem e também ao número de nódulos, indicando a possível ocorrência de “clusters” de genes envolvidos no controle destas bacterioses. O QTL no grupo D7 mostrou ainda ter um efeito principal na resistência ao CBC e ao fogo selvagem, pois explicou a maior porcentagem de variação fenotípica, 19% e 14,6% respectivamente, para as duas bacterioses.

**IDENTIFICATION OF GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH NODULE
NUMBER AND RESISTANCE TO *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* AND
Pseudomonas syringae pv. *tabaci* IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Author: Raquel Luciana Boscariol

Adviser: Siu Mui Tsai

SUMMARY

RFLPs markers were used to identify genomic regions (QTLs) of the common bean associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf), causal agents of common bacterial blight (CBB), and to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) causal agent of wildfire. These RFLPs markers were also used to identify QTLs that control nodule number and length of the second internode. For these traits, 50 recombinant inbred F₈₋₉ lines, derived from BAT-93 (resistant, low nodule number) X Jalo EEP558 (susceptible, high nodule number) were used.

The resistance to CBB was evaluated by simultaneous inoculation of the first trifoliolate leaves with two strains of *X. campestris* pv. *phaseoli* in distincts leaflets. Lesion area and lesion score were used in the evaluation of the disease reaction. In the experiment with *P. syringae* pv. *tabaci*, the area of necrosis and chlorosis was measured after inoculation of the first trifoliolate leaves. In another experiment, nodule number was assessed after inoculation with *Rhizobium tropici*.

Analysis of variance was used to detect associations between the measured traits and the genotype of the lines using 53 markers distributed within 13 linkage groups, in the linkage map of the common bean. In the experiment with CBB, significant associations ($p < 0,01$) were found between leaf lesion area and 13 markers distributed among 5 linkage groups, and between the lesion score and 17 markers from 6 linkage groups. The absence of significant interactions between genotype x strain showed that resistance to strains was controlled by the same QTLs. It was also demonstrated that W18 strain of *X. campestris* pv. *phaseoli* was more aggressive in both evaluations (lesion area and lesion score).

Six markers were found associated to area of chlorosis in the evaluation of resistance to *P. syringae* pv. *tabaci*. These markers are distributed within 4 linkage groups. The data did not reveal any significant associations with the area of necrosis. Eight markers, distributed within the 5 linkage groups (D2, D3, D7, D9 and D10) were shown to be associated with nodule number. The majority of the QTLs associated with second internode length (D5, D7, D8 and D9) was also associated with CBC resistance, indicating linkage between these traits.

The QTLs from linkage groups D7 and D9 were associated with CBB resistance, wildfire resistance and nodule number, suggesting the existence of gene clusters involved in the control of these bacteriosis. The QTL in D7 had the main effect on CBB and wildfire resistance, since it explained the largest percentage of the phenotypic variation, 19% and 14,6% respectively, for both diseases.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero (*P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*). É cultivado em mais de 100 países, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Yokoyama et al., 1996). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão, com um consumo médio de 17,5 kg/hab/ano. Contudo, há necessidade de importação do produto devido às perdas pós-colheita e suscetibilidade a doenças e pragas, muito comum nesta cultura. Grãos de feijão constituem uma importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras, sendo que estas possuem efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (Lajolo et al., 1996). Outra importância desta cultura é a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico em associações simbióticas com bactérias do gênero *Rhizobium*. A fixação biológica do nitrogênio reduz a quantidade de adubo aplicado no solo e é determinante no crescimento da planta, afetando a produção de grãos (Tsai et al., 1993).

Dentre as doenças de origem bacteriana que afetam a cultura, o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*, é a mais importante, ocorrendo em várias áreas de produção do mundo (Rava, 1984). Nos últimos anos, uma outra doença, conhecida como fogo selvagem, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, se tornou muito importante nas principais regiões produtoras do Brasil (Rava, 1988). Para ambas doenças, o uso de cultivares resistentes é a forma mais eficaz de controle.

A resistência ao CBC assim como o número de nódulos são características de herança quantitativa de natureza poligênica (Pompeu & Crowder, 1972; Coyne & Schuster, 1974; Nodari et al., 1993b; Pereira et al. 1993). O estudo de características quantitativas de interesse agrônômico pode ser feito através da localização de gene(s)

responsáveis pela característica investigada usando-se marcadores moleculares. Atualmente, existem 5 mapas de ligação do feijoeiro (Vallejos et al., 1992, Nodari et al., 1993a, Adam-Blondon et al., 1994, Jung et al., 1996 e Jung et al., 1997) cobrindo cerca de 1000 cM de um total de 1250 cM estimados para esta espécie. Nodari et al. (1993b) mapearam genes de resistência ao CBC, encontrando 4 *loci* responsáveis por esta característica em uma população F₃ oriunda do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558. Os autores sugerem a necessidade de estudos adicionais para investigar o controle desta característica em outras condições ambientais e outros estádios de desenvolvimento da planta, bem como o estudo de outras características quantitativas que podem estar ligadas à resistência.

Alguns autores já relataram também a existência de “clusters” de genes conferindo resistência a mais de uma doença em diversas culturas. Recentemente, Jung et al. (1996), estudando resistência ao CBC, a “mela” (ou murcha da teia micelial) e a ferrugem do feijoeiro, relataram a possibilidade destes “clusters” ocorrerem também em *P. vulgaris*.

Este trabalho teve como objetivos localizar QTLs (“quantitative trait loci”) que controlam a resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e número de nódulos, em linhagens recombinantes de feijoeiro, utilizando marcadores moleculares do tipo RFLP (“restriction fragment length polymorphism”). O mapeamento possibilitou estimar a contribuição para a variação fenotípica de cada um e verificar a existência de ligação entre eles. Foi também estudado o controle genético de uma característica morfológica contrastante nos parentais (comprimento do segundo internódio), com o objetivo de verificar a ocorrência de ligação desta característica com as outras estudadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Crestamento bacteriano comum (CBC)

Entre as doenças de origem bacteriana que afetam o feijoeiro, o crestamento bacteriano comum é considerada a de maior importância, causando perdas na produção de até 65% (Pompeu & Crowder, 1972). No Brasil, esta bacteriose foi constatada pela primeira vez em 1938, no Estado do Pará. Hoje é encontrada em quase todas as regiões produtoras do país. O patógeno é transmitido pelas sementes, podendo afetar a sua qualidade (Yoshii, 1980). A doença é favorecida por temperatura e umidade altas, intensificando-se na época de chuvas.

O CBC é causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e por sua variante *fuscans* (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*). Quando a doença é causada por esta variante, é denominada também de crestamento bacteriano fosco. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) foi descrita por Robbs (1954), em material vindo do Estado do Rio de Janeiro e a variante *fuscans* (Xcpf) por Nakamura & Kimati (1967) e Paradela Filho et al. (1967), no Estado de São Paulo. Estas bactérias apresentam similaridades morfológicas, fisiológicas e patogênicas. No entanto, a variante *fuscans* difere pela capacidade de produzir melanina em meios de cultura, os quais se colorem de marrom (Maringoni et al., 1994) além de pertencer a um grupo geneticamente distinto (Lazo et al., 1987; Gabriel et al., 1989). Ambas são gram-negativas, aeróbias, móveis e apresentam um flagelo polar. Produzem pigmento carotenóide insolúvel em água (xanthomonadina) e apresentam crescimento mucóide em nutriente-glicose-água. A temperatura ótima de crescimento é entre 28 e 32°C. Este patógeno infecta outras culturas além do feijoeiro comum, como feijão tepari (*Phaseolus acutifolius*), soja

(*Glycine max*), *Vigna angularis*, caupi (*Vigna unguiculata*), feijão mungo (*Vigna mungo*), *Vigna radiata*, *Lupinus polyphylus*, e outras (Saettler, 1991).

Sintomas do CBC manifestam-se em folhas, caules, vagens e sementes (Rava, 1988). As bactérias infectam as folhas através dos estômatos ou ferimentos e então multiplicam-se nos espaços intercelulares, degradando os componentes da parede celular da planta (Yoshii, 1980; Goodwin et al., 1995). Sintomas nas folhas aparecem, inicialmente, como pequenas áreas encharcadas e vão aumentando gradualmente, tornando-se flácidas e necróticas. Frequentemente, as lesões são circundadas por halo clorótico (Saettler, 1991). Em caules, manchas aquosas iniciais tomam a aparência de riscos vermelhos que se estendem ao longo do caule, podendo acumular exsudato bacteriano (Rava, 1988). Em vagens, formam-se manchas aquosas, frequentemente cobertas por incrustações amareladas devido aos exsudatos bacterianos. À medida que as lesões envelhecem, o tecido afetado torna-se seco, deprimido e avermelhado. A bactéria coloniza a planta sistemicamente, penetrando inclusive na semente, onde permanece viável por muitos anos. As sementes podem recobrir-se de pontos amarelados e marrons, ou apresentarem esses pontos restritos à área do hilo (Saettler, 1991). Sementes infectadas constituem a principal forma de disseminação da doença. Estudos epidemiológicos demonstraram que um nível de infecção de 0,5% pode ocasionar séria epidemia (Wallen & Sutton, 1965). Restos culturais, solos infectados e ervas daninhas também servem como fonte de inóculo primário.

Medidas de controle do CBC incluem rotação de culturas, uso de sementes livres do patógeno e eliminação de hospedeiros alternativos. No entanto, estas práticas, muitas vezes, não são observadas em regiões onde prevalece o cultivo de subsistência. A melhor forma de controle é a obtenção de cultivares resistentes, que nos últimos anos se tornou o principal objetivo de estudos visando o melhoramento do feijoeiro (Rava et al., 1996).

Com relação à natureza genética da resistência do feijoeiro a Xcp, diversos trabalhos estabeleceram-na como oligogênica (Coyne et al., 1973; Pompeu & Crowder, 1972; Coyne & Schuster, 1974; Valladares-Sanchez et al., 1979; Webster et al., 1980; Finke et al., 1986; Rava et al., 1987; Arnaud-Santana et al., 1994). Pompeu & Crowder

(1972) mostraram que a resistência a Xcp é condicionada por poucos genes, com dominância parcial, altamente herdável, sendo observada segregação transgressiva em todos os cruzamentos estudados, mostrando que o nível de resistência a esta bactéria pode ser aumentado por cruzamentos entre linhagens resistentes ou entre pais resistentes e suscetíveis. Modelos de ação gênica utilizados por Rava et al. (1987) permitiram que se constataste a existência de efeito gênico aditivo para resistência, concordando com Valladares-Sanchez et al. (1983).

Cultivares de feijoeiro podem apresentar diferentes reações de resistência em folhas e vagens. Um cultivar moderadamente resistente em folha, por exemplo, pode ser suscetível em vagem e vice-versa. Frente a isto, Coyne & Schuster (1974) sugeriram a existência de genes de resistência específicos para certos órgãos do vegetal. Posteriormente, a reação diferencial em folhas e vagens e sua natureza genética foi confirmada por outros autores (Schuster et al., 1983; Valladares-Sanchez et al., 1983; Aggour et al., 1989). A indicação de que um gene de efeito principal (gene que explica a maior porcentagem de variação fenotípica para uma determinada característica) está envolvido no controle de resistência ao CBC em diferentes partes da planta foi feita por Silva et al. (1989), os quais mostraram também que efeitos aditivos foram mais importantes que interações epistáticas e dominantes. Estes autores, porém, não esclarecem se a reação nas diferentes partes da planta deve-se ao efeito pleiotrópico de um mesmo gene ou à ligação entre genes distintos. Posteriormente, Arnaud-Santana et al. (1994) confirmaram a ocorrência de genes de efeitos principais na reação de resistência. Porém, não encontraram associação entre reação de folha e vagem para Xcp. Recentemente, Jung et al. (1996) relataram alta correlação fenotípica entre resistência em folha e vagem. Todos os marcadores significativamente associados com a resistência em vagens estavam também associados com a resistência em folhas. Os autores indicam que na progênie estudada por eles, somente genes de efeitos menores poderiam estar agindo independentemente nas vagens e nas folhas.

Algumas características da planta, como hábito de crescimento (determinado ou indeterminado) e maturidade (precoce ou tardia) foram associados à reação ao CBC

(Valladares-Sanchez et al., 1979; Finke et al., 1986; Zapata et al., 1991). Plantas com hábito determinado são, normalmente, mais suscetíveis à bactéria, ao passo que bons níveis de resistência podem ser encontrados em linhagens com crescimento indeterminado. Plantas com maturidade precoce também são mais suscetíveis à doença.

O ambiente pode influenciar nas reações de um cultivar a Xcp. O efeito do fotoperíodo na resistência a Xcp foi estudado por Webster et al. (1983), Coyne & Schuster (1974) e Goodwin (1992). Plantas tropicais quando cultivadas em regiões temperadas, com diferença no fotoperíodo, foram mais suscetíveis do que as plantas da região e vice-versa. Cultivares mais suscetíveis em fotoperíodo curto (10 horas de luz/14 horas escuro) foram encontrados por Mohamed & Coyne (1995), mostrando que estas podem apresentar menor intensidade da doença em outras condições devido à resposta fisiológica da planta em ambientes diferentes. Goodwin (1992) mostrou também a interferência do CBC na fotossíntese, onde plantas com menos de 20% de área foliar afetada apresentaram uma redução de aproximadamente 50% na taxa fotossintética.

Estudos genéticos de resistência ao CBC geralmente são feitos utilizando isolados de Xcp. Nada se sabe sobre o controle de resistência a Xcpf. Há relatos conflitantes na literatura quanto à agressividade destas bactérias. Alguns estudos mostram que Xcp é mais agressiva que sua variante, ao passo que outros indicam exatamente o contrário, além de existirem trabalhos que apontam para inexistência de diferenças (Rava, 1988). No entanto, segundo Webster¹, citado por Rava & Sartorato (1994), o aspecto mais relevante é que ambos isolados classificam os cultivares de feijoeiro, quanto à resistência, aproximadamente na mesma ordem. Isto sugere que os mesmos genes estão envolvidos na resistência a estes isolados.

¹ WEBSTER, D.M. Evaluation of resistance in beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. Madison, 1978, 117p. Tese (Doutorado) - University of Wisconsin.

Atualmente, marcadores moleculares como isoenzimas, RAPDs, RFLPs e microsátélites vêm sendo empregados em estudos genéticos auxiliando em diferentes etapas do melhoramento. Estas técnicas são utilizadas na construção de mapas de ligação e na localização de QTLs ligados a diversas características quantitativas. Nodari et al. (1993b) estudaram a reação de resistência a Xcp em 70 famílias F₃ do cruzamento BAT-93 e Jalo EEP558 e identificaram 4 regiões genômicas associadas a resistência. As regiões explicaram 75% da variação fenotípica e a ação gênica aditiva foi o principal componente da variação genética. Uma destas regiões (D7) explicou 32% da variação fenotípica para resistência, mostrando ter um efeito principal nesta característica. Neste grupo, também foi localizado um QTL controlando número de nódulos porém, neste trabalho, não foi possível constatar se estes QTLs estavam em ligação ou pleiotropia. Em outro trabalho, Jung et al. (1996) encontraram 11 marcadores associados com a resistência ao CBC, distribuídos em 5 grupos de ligação, explicando 21% da variação fenotípica para esta doença em folhas inoculadas com o isolado EK-11. Estes autores encontraram ainda, uma região onde genes de resistência ao CBC, à “mela” e hábito determinado de crescimento da planta estão ligados. A ligação de genes de resistência a mais de uma doença tem implicações importantes no melhoramento, possibilitando a obtenção de cultivares simultaneamente resistentes a mais de um patógeno.

2.2 Fogo selvagem

O fogo selvagem do feijoeiro, vem se tornando uma doença de grande importância nas regiões produtoras de todo Brasil. Esta doença foi observada, primeiramente, por Ribeiro et al. (1974), que posteriormente identificaram o agente causal como *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) (Ribeiro et al., 1979). Mohan (1982) relatou a presença da doença no Estado do Paraná, em 1976, no cultivar Carioca, e posteriormente em todas as regiões produtoras do Estado, atingindo outros cultivares. O patógeno foi também constatado no Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão (CNPAP), afetando numerosos cultivares e linhagens de feijão, causando morte de

plantas (Rava, 1988). Em inoculações artificiais, a bactéria mostrou-se patogênica também a *Phaseolus lunatus*, *P. acutifolius*, *Vigna unguiculata*, *V. radiata*, *V. mungo*, ervilha (*Pisum sativum*) e soja (*Glycine max*), (Mohan, 1982).

Sintomas de fogo selvagem consistem em lesões foliares necróticas, arredondadas ou irregulares, sempre circundadas por pronunciados halos cloróticos (Rava, 1988; Saettler, 1991). Lesões necróticas podem aumentar, causando crestamento foliar e queda da área necrótica (Rava, 1988). Esses sintomas caracterizam uma reposta de suscetibilidade do hospedeiro e estão associados com a multiplicação e disseminação da bactéria na planta infectada (Lindgren et al., 1986).

Ribeiro et al. (1979) constataram que a bactéria não é transmitida pela semente, e vagens não são atingidas. A importância da doença está relacionada ao fato de que ela pode causar morte de plantas, principalmente na fase inicial do crescimento, período de maior suscetibilidade (Rava, 1988). Pouco se conhece sobre fontes primárias de inóculo ou condições sob as quais o patógeno é disseminado. Desta forma, não há recomendações de medidas de controle (Saettler, 1991). A única substância que contribui parcialmente no controle da doença, possibilitando a recuperação de plantas sobreviventes, é o oxiclureto de cobre (Rava, 1988). Não há relatos sobre outra substância química eficaz no controle do patógeno.

A bactéria causal é classificada como uma pseudomona fluorescente típica, baciliforme, com flagelos lofotríquios, gram-negativa, oxidase negativa e que produz, *in vitro*, uma fitotoxina não-específica denominada “tabtoxina”. No Brasil, a estirpe isolada de soja induz sintomas típicos no feijoeiro, mas é avirulenta em tabaco (Ribeiro et al., 1979).

A tabtoxina é um dipeptídeo que é hidrolisado para sua forma biologicamente ativa, a tabtoxinina- β -lactam, por peptidases presentes em plantas hospedeiras ou outros microrganismos (Levi & Durbin, 1986). Tabtoxinina- β -lactam, por sua vez, inibe a glutamina sintetase na planta hospedeira, enzima responsável pela conversão de glutamato para glutamina, a forma assimilável de nitrogênio (Knight et al., 1986). Em plantas hospedeiras, essa inibição causa acúmulo de amônia, a qual contribui para

formação de halos cloróticos que circundam lesões necróticas no sítio de infecção de Pst em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Durbin, 1982). Contudo, tabtoxinina- β -lactam não é componente essencial para patogenicidade em tabaco e aveia segundo Engst & Shaw (1992), mas pode ter um papel patogênico no feijão, segundo Ribeiro et al. (1979). Salch & Shaw (1988) sugerem que a produção de toxina parece não ser essencial para produção de sintomas, porém, Turner & Taha (1984) relatam o oposto.

Reações de resistência observadas em plantas não-hospedeiras ou em cultivares resistentes estão associadas com rápida necrose no local infectado, conhecida como reação de hipersensibilidade. A reação de hipersensibilidade é uma resposta induzida da planta, sendo considerada um importante componente de resistência pois limita a multiplicação e disseminação do patógeno na planta (Klement, 1982). O tempo para aparecimento desta reação varia de acordo com o patógeno, a planta e condições ambientais (Lindgren et al., 1986).

Alguns cultivares mostraram-se resistentes ao fogo selvagem e ao CBC, como GN Nebraska 1 sel. 27, PI 207.262 e IAPAR BAC-4. Porém, quase nada é conhecido sobre a genética dos mecanismos de patogenicidade de Pst (Salch & Shaw, 1988) e de resistência do feijoeiro. A obtenção de cultivares resistentes ao fogo selvagem e ao CBC tem grande importância agrônômica, pois em ambas o controle químico não é satisfatório.

2.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* são capazes de formar simbioses específicas com leguminosas, induzindo a formação de nódulos nas raízes os quais fixam o nitrogênio atmosférico (Hungria, 1994). Esta simbiose resulta de uma complexa sequência de eventos que requer coordenada expressão gênica dos parceiros simbióticos, iniciando pela troca de sinais moleculares entre eles e resultando na formação do nódulo (Peng & Dickstein, 1994). Os nódulos são formados a partir do encurvamento dos pêlos radiculares, ocorrendo a formação do cordão de infecção, por

onde o rizóbio penetra e se diferencia em bacteróide, capaz de reduzir o N_2 para amônia. Este processo envolve a ação de uma série de enzimas que vão transformar a amônia em compostos, como a glutamina, que serão transportados para o resto da planta (Peng & Dickstein, 1994).

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli* são as espécies capazes de se associar simbioticamente com o feijoeiro. *Rhizobium tropici*, predominante em solos ácidos, compõe cerca de 80% do rizóbio nativo no Brasil (Hungria, 1993). Esta bactéria apresenta-se como a mais promissora para ser usada como inoculante na cultura do feijoeiro, considerando sua alta competitividade para nodulação, entre as linhagens de feijoeiro testadas por Colleta Filho (1993). O feijoeiro apresenta baixa eficiência simbiótica, quando comparado com outras leguminosas produtoras de grãos, sendo que a quantidade de nitrogênio fixado não supre todas as necessidades da planta, principalmente no período de enchimento de grãos, quando os nódulos senescem (Pereira et al., 1984).

A FBN pode ser afetada pela quantidade de N-mineral presente no solo. Alta quantidade de N inibe todas as fases da nodulação, incluindo infecção bacteriana, desenvolvimento do nódulo e atividade da nitrogenase (Streeter, 1988; Coronado et al., 1995). Porém, há relatos que pequenas doses de N são benéficas para a simbiose, estimulando o desenvolvimento inicial das plantas e a fixação de N_2 (Ceccatto, 1994). Testando vários níveis de N, Tsai et al. (1993) verificaram que em baixas doses deste nutriente ocorreu estímulo à formação dos nódulos, maior atividade da nitrogenase e crescimento da planta. Souza (1996) encontrou uma redução no número de nódulos na presença de 5 mM de NH_4NO_3 .

Número de nódulos é um dos parâmetros que pode ser usado na seleção de cultivares, visando o melhoramento do feijoeiro, pois apresenta correlação com a eficiência simbiótica (Pereira et al., 1993) e permite uma rápida discriminação entre as linhagens. Colleta Filho (1993) confirmou que o aumento no número de nódulos pode resultar em linhagens com maior capacidade de fixação de N_2 e sugere também este parâmetro para avaliar eficiência da FBN.

Nodari et al. (1993b) usaram a variável número de nódulos para detectar QTLs envolvidos no controle da nodulação. Estes autores encontraram 4 regiões genômicas associadas a esta característica no mapa de ligação do feijoeiro, demonstrando a sua herança poligênica. Souza (1996) também encontrou várias regiões genômicas associadas ao número de nódulos em linhagens recombinantes de feijoeiro. Anteriormente, Pereira et al. (1993) relataram que o número de nódulos é determinado por um ou poucos genes de grande efeito.

No trabalho de Nodari et al. (1993b), em uma das regiões associadas ao número de nódulos também foi localizado um QTL controlando resistência ao CBC. Isto pode ser uma evidência favorável à idéia de que o *Rhizobium*, antes de obter qualquer benefício da simbiose, pode ter sido parasita ou patógeno potencial, o qual evoluiu para uma relação mutualística com a planta hospedeira (Sprent, 1994; Spaink, 1995). A interação *Rhizobium*-leguminosa apresenta muitos aspectos semelhantes à infecção por fitopatógenos, tanto nas etapas do processo de infecção, como nos compostos envolvidos. Um exemplo disto são os flavonóides que servem como fitoalexinas em reações de defesa das plantas, ou como quimioatraentes para bactérias patogênicas e simbióticas, ou ainda como moléculas sinais para indução de genes essenciais bacterianos, promovendo as interações apropriadas com as plantas hospedeiras (Coronado et al., 1995). Dakora et al. (1993a e 1993b) também sugerem que a primeira resposta da planta à presença do *Rhizobium* pode ser similar à resposta a um patógeno, pois verificaram um aumento na exsudação de fitoalexinas, normalmente elicitadas por patógenos, em resposta à bactéria simbiótica.

A semelhança entre a infecção destas bactérias (patogênicas e simbiontes) pode ser também a nível genético (Nodari et al., 1993b). Portanto, a localização de genes que controlam doenças bacterianas e nodulação e sua relação genética tem grandes implicações para o melhoramento do feijoeiro, pois possibilitaria a obtenção de cultivares que apresentam níveis satisfatórios de ambas características.

2.4 QTLs de resistência

Regiões genômicas que exercem efeito significativo em uma característica quantitativa são denominadas QTLs (“Quantitative Trait Loci”; Tanksley, 1993). Essas regiões podem ser identificadas por meio de marcadores fenotípicos como foi mostrado primeiramente por Sax (1923) em feijão e por Thoday (1961) em *Drosophila*. Porém, na prática, o uso desses marcadores fenotípicos é limitado, devido ao número reduzido, efeito deletério e interação epistática muitas vezes presentes nestes marcadores. Marcadores moleculares, como isoenzimas, RAPD (“random amplified polymorphic DNA”), RFLP (“restriction fragment length polymorphism”) e microsátélites, começaram então, a ser utilizados em substituição a marcadores morfológicos na detecção de QTLs. Um crescente número de investigações vêm utilizando estes marcadores para identificar e caracterizar a ação gênica de QTLs associados a várias características agrônômicas.

Atualmente, RFLP (ou polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos com enzimas de restrição) é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de QTLs (Tanksley et al., 1989; Stuber, 1991). As vantagens do RFLP sobre outros tipos de marcadores consiste em abundância de marcadores, co-dominância, ausência de efeito pleiotrópico e alto nível de polimorfismo. Esta técnica consiste na clivagem de moléculas de DNA, com enzimas de restrição, em sítios específicos, e hibridização deste DNA com sondas que identificam regiões genômicas homólogas (Beckmann & Soller, 1983).

Para detecção de um oligogene por meio de um marcador, é necessária a existência de um desequilíbrio de ligação entre alelos do *locus* marcador e o oligogene. Tal desequilíbrio pode ser obtido em populações F_2 , F_3 , retrocruzamentos, linhagens recombinantes e outros (Tanksley, 1993). A identificação de ligação entre *loci* marcadores e oligogenes baseia-se na classificação dos indivíduos de uma progênie segregante com relação ao seu genótipo no *locus* marcador (genotipagem) e associação entre genótipos e variações quantitativas na característica em estudo. Para isso, são utilizadas análises estatísticas para identificar diferenças significativas entre genótipos com relação a característica estudada. As análises mais utilizadas são o teste F e o

mapeamento por intervalos, utilizando-se do método da máxima verossimilhança (Camargo, 1995). Com o uso de marcadores moleculares é possível avaliar os efeitos de *locus* individuais de resistência (Concibido et al., 1994). Entre os primeiros autores que empregaram RFLP na detecção de QTLs de resistência estão Heun (1992) e Landry et al. (1992). Hoje esta técnica é usada na maioria dos trabalhos envolvendo QTLs.

Variação na magnitude dos efeitos dos QTLs foi encontrada por muitos autores. QTLs podem apresentar desde grande contribuição na variação fenotípica, sendo chamados de QTLs de efeito principal, até uma pequena contribuição para uma determinada característica. Neste último caso são chamados de QTLs de efeitos secundários. Por exemplo, Chen et al. (1994) encontraram 2 QTLs de resistência à ferrugem causada por *Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*, sendo que um QTL apresentou um efeito maior na variação fenotípica (57%) e o outro um efeito menor (10%). Bubeck et al. (1993) detectaram um QTL explicando apenas 4% da variação fenotípica, enquanto Ferreira et al. (1995) encontraram um QTL que explicou 90% da variância.

É de conhecimento geral, entre melhoristas, que interações genótipo x ambiente existem para muitas características quantitativas, sugerindo que conclusões gerais em torno da contribuição fenotípica de um QTL, particularmente os de menor efeito, com base em único ambiente e única população, são limitadas e de pouca utilidade no melhoramento (Bubeck et al., 1993). Sendo assim, alguns autores estudaram a expressão de QTLs em vários ambientes. Paterson et al. (1991), por exemplo, identificaram 29 QTLs, em um cruzamento interespecífico de tomate, associados a tamanho do fruto, pH e concentração de sólidos solúveis, em 3 ambientes. Somente 4 QTLs foram encontrados em todos os ambientes, 10 em 2 ambientes e 15 num único ambiente, demonstrando o impacto potencial da interação genótipo x ambiente na identificação de QTLs. Já Camargo et al. (1995), estudando a resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Brassica oleracea* em dois ambientes (casa-de-vegetação e campo), encontraram 4 QTLs controlando a resistência no experimento em casa-de vegetação e 2 QTLs de resistência no experimento em campo. Neste caso, os autores indicaram que a seleção para esta característica pode ser feita em qualquer um dos ambientes.

A magnitude do efeito de um QTL também pode ser influenciada pela constituição (“background”) genética das linhagens parentais. Isso pode ser verificado no estudo de Bubeck et al. (1993) com 3 populações desenvolvidas a partir do cruzamento entre 4 parentais distintos de milho. Os autores encontraram diferentes QTLs de resistência à mancha parda para as 3 populações. Somente uma região no cromossomo 2 foi associada à resistência nas 3 populações.

A análise genética da resistência por meio de marcadores moleculares tem revelado a existência de alelos de suscetibilidade em material resistente e vice-versa. Jung et al. (1996 e 1997), estudando resistência ao CBC em feijoeiro, encontraram alelos de resistência no parental suscetível. Isto foi anteriormente encontrado por Nodari et al. (1993b) no grupo de ligação D3, estudando a mesma doença. Esse fato também foi relatado em outros patossistemas, como na resistência ao míldio em feijão mungo, onde Young et al. (1993) encontraram um QTL cujo alelo de suscetibilidade pertencia à linhagem parental resistente. O efeito deste QTL só foi significativo na fase final da doença, sugerindo que genes de resistência podem atuar em fases distintas do desenvolvimento da doença.

No feijoeiro, são reportados 5 mapas de ligação (Vallejos et al., 1992, Nodari et al., 1993a, Adam-Blondon et al., 1994; Jung et al., 1996 e 1997). Nestes mapas, foram localizados importantes características para o melhoramento do feijoeiro como: tamanho e cor da semente, cor da flor, resistência ao CBC e nodulação, resistência a antracnose, ferrugem e “mela” (ou murcha da teia micélica). No estudo de resistência ao CBC, Nodari et al. (1993b) mapearam 4 QTLs controlando essa característica. Um destes QTLs também foi associado ao número de nódulos fixadores de nitrogênio. Neste caso, a hipótese de pleiotropia ou ligação destes QTLs é levantada, com implicações importantes para o melhoramento. A ocorrência de pleiotropia negativa (uma característica é afetada positivamente e a outra negativamente) impossibilita a obtenção de variedades que combinem importantes características agrônômicas, como resistência a diferentes patógenos pois, quando uma característica se expressa positivamente, a outra é afetada negativamente. Por outro lado, se prevalecer a hipótese de ligação entre genes diferentes

(dois QTLs controlando duas características distintas, localizados em uma mesma região do genoma), por meio de recombinação sexuada, é possível realizar o melhoramento. Esta informação é de suma importância na manipulação de QTLs e busca de características valiosas de germoplasmas selvagens, pois é mais fácil identificar e transferir QTLs únicos do que em pares, trios, etc. (Paterson et al., 1990).

Recentemente, Jung et al. (1996) construíram um mapa de ligação parcial, com marcadores do tipo RAPD e mapearam QTLs de resistência ao CBC, ferrugem e “mela” em feijoeiro comum. Os QTLs detectados para CBC explicaram de 14% a 29% da variação fenotípica, dependendo do órgão da planta e estirpe bacteriana usada. Neste trabalho, também foi relatada possível ligação entre genes envolvidos na resistência ao CBC e “mela”, bem como de “mela” e ferrugem, evidenciando a presença de “clusters” de genes de resistência em *P. vulgaris*. Estudos adicionais são necessários para determinar pleiotropia ou ligação nestas associações. A existência de tais “clusters” já foi descrita em várias culturas como soja, amendoim (Choi et al., 1989), milho (Hulbert & Bennetzen, 1991; McMullen & Simcox, 1995), cevada (Jin et al., 1996), *Arabidopsis* (Reignault et al., 1996) e alface (Kesseli et al., 1993). Análises genéticas têm mostrado que a resistência para muitas doenças é determinada por membros individuais de “clusters” de genes, cada membro conferindo resistência a estirpes ou espécies diferentes do patógeno. Genes conferindo resistência a diferentes patógenos podem estar co-localizados no genoma, confirmando a hipótese de que alguns genes de resistência estão relacionados em função e evolução (Michelmore, 1995).

Até 1992, genes de resistência em plantas não tinham sido clonados e caracterizados (Staskawicz et al., 1995). Nos últimos anos, estes vêm sendo clonados de diversas espécies de plantas, como resultado de combinações entre caracterização de genes e desenvolvimento tecnológico. A clonagem de genes de resistência possibilita a obtenção de uma maior diversidade de linhagens resistentes. O isolamento de múltiplos genes permite novas estratégias para o controle de doenças e estudos mais detalhados dos mecanismos de ação e evolução dos genes de resistência (Michelmore, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Linhagens recombinantes F₇₋₈ de *Phaseolus vulgaris* L., obtidas do cruzamento BAT-93 x Jalo EEP558, foram usadas para genotipagem e posterior avaliação de resistência e número de nódulos. BAT-93 é uma linhagem desenvolvida por S. Temple no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), derivada do duplo cruzamento envolvendo 4 genótipos mesoamericanos (“Veranic 2”, PI 207262, Jamapa e “Great Northern Tara”). Este cultivar é resistente ao CBC (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), ao vírus do mosaico comum (BCMV), à ferrugem (*Uromyces phaseoli*) e antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mas suscetível à mancha angular (*Phaeoisariopsis angularis*). Os cultivares mesoamericanos apresentam semente pequena e hábito de crescimento indeterminado. BAT-93 também desenvolve poucos nódulos após inoculação com *Rhizobium tropici*. Jalo EEP558 tem origem Andina e foi selecionado na Estação Experimental de Patos de Minas (Guazelli, Minas Gerais). Apresenta reações opostas às de BAT-93 com relação aos mesmos patógenos e desenvolve grande número de nódulos quando em simbiose com *Rhizobium*. Estes dois parentais diferem ainda quanto a características morfológicas como cor da flor, tamanho da semente e comprimento dos internódios.

Este cruzamento foi obtido por Nodari et al. (1993a), que trabalharam com uma população F₂ para construção de um mapa de ligação. Posteriormente, a população F₃ foi usada pelos mesmos autores (Nodari et al., 1993b) para mapear QTLs de resistência ao CBC e número de nódulos fixadores de nitrogênio. Sementes das linhagens F₇₋₈ foram cedidas pelo Dr. Paul Gepts, da Universidade da Califórnia (EUA).

Inicialmente, 70 linhagens F₇₋₈ foram utilizadas neste trabalho para extração de DNA e genotipagem. Destas, as que produziram sementes foram avaliadas para resistência, número de nódulos e o para comprimento do segundo internódio.

3.2 Genotipagem por RFLPs

Sondas (marcadores) utilizadas na genotipagem das linhagens foram as mesmas utilizadas por Nodari et al. (1993a). Em complementação a estas, foram usadas duas sondas de outra biblioteca genômica, obtidas do CIAT (Colômbia), e que foram utilizadas por Vallejos et al. (1992) na construção de outro mapa de ligação. Estas sondas foram escolhidas para complementar dados de genotipagem do grupo de ligação D7. Um total de 53 sondas (Apêndice 1) foi utilizado na genotipagem das linhagens. A genotipagem com as sondas D1308, D1461, D1492, D1390, D1861, D1831, CHS (chalcona sintetase), PHS (faseolina), PAL (fenilalanina amônia-liase), Bng191 e Bng204, foram obtidos neste trabalho. Os demais genótipos foram obtidos via internet², pela colaboração do Dr. Paul Gepts.

Para a genotipagem, primeiramente, procedeu-se a extração de DNA das linhagens, a qual foi feita com CTAB (“cetyl trimethyl amonium bromide”) conforme Ferreira & Grattapaglia (1995). A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria em aparelho Gene-Quant (Pharmacia). Para a digestão das amostras, utilizou-se 5µg do DNA, adicionando-se 1U/µg de DNA de enzima de restrição (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HaeIII*, *DraI*), por 12 horas a 37°C. Estas enzimas foram escolhidas pois revelam polimorfismos de comprimento entre as linhagens parentais (Nodari et al., 1993a). Após a digestão, os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose ultra pura a 0,8%, durante 14 horas a 16 V. Os géis foram corados com brometo de etídio para visualização do DNA sob luz ultra violeta e posteriormente fotografados.

² (<http://agronomy.ucdavis.edu/Gepts/Gepts.htm>)

“Southern blotting” ou transferência do DNA para a membrana de náilon (Hybond-N, Amersham), foi feita segundo o método de Sambrook et al. (1989). Após a transferência, o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultra violeta, por 3 minutos. A membrana foi armazenada em temperatura ambiente, em local seco, até a hibridização.

As sondas genômicas utilizadas na hibridização estavam clonadas em plasmídios bacterianos. Assim, houve a necessidade da extração desses plasmídios de células bacterianas de *E. coli* e posterior isolamento do fragmento clonado (inserto). Para tal, seguiu-se o protocolo de Sambrook et al. (1989). Após a extração, o plasmídio foi digerido com 5U da enzima *Pst* I, por 2 horas a 37°C, para remoção do inserto. Após a corrida do plasmídio digerido, em gel de agarose 0,8%, fez-se uma incisão com lâmina de bisturi logo abaixo ao inserto identificado pelo seu peso molecular. Colocou-se um papel de filtro (Whatman DE 81 Cat. no. 3658 915) nesta incisão, com auxílio de pinças, correndo o gel por mais 5 a 10 minutos, de acordo com o tamanho do inserto. A identificação do inserto foi feita pelo seu peso molecular, comparando-o ao marcador λ -*Hind* III. O papel de filtro retirado do gel foi colocado em tubo Eppendorf e eluído em 400 μ l do tampão de eluição (Tris 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 1,5 M) por 1 hora a 37°C. Decorrido esse tempo, centrifugou-se por 3 minutos a 12127 g (12000 rpm). O sobrenadante foi filtrado em um Eppendorf contendo lã de vidro por centrifugação rápida (15 segundos). Adicionou-se ao filtrado 1 ml de etanol absoluto a -20°C e precipitou-se o DNA por uma noite. No dia seguinte, centrifugou-se por 15 minutos, lavando-se 2 vezes com etanol 70% (100 μ l, centrifugando 5 minutos entre uma passagem e outra para que não se perdesse o pélete). Após a centrifugação, secou-se bem o pélete, ressuspensando-o em 6 μ l de água Milli-Q estéril e armazenando-o em congelador até o uso.

Os insertos foram marcados não-radioativamente com d-UTP conjugado à digoxigenina (Dig) pelo método de “random priming” (Feinberg & Vogelstein, 1983). Inicialmente, 100 ng de inserto foram desnaturados a 94°C por 5 minutos. Feito isto, procedeu-se sua marcação com os reagentes do kit de marcação com Dig da Boehringer Mannheim e incubação a 37°C por uma noite.

A pré-hibridização e a hibridização da sonda na membrana foi feita segundo Sambrook et al. (1989), utilizando-se uma solução contendo 5x SSC (de uma solução estoque 20x SSC, contendo cloreto de sódio + citrato de sódio), 50% formamida, 0,5% SDS (“sodium dodecyl sulfate”), 5x de solução de Denhardt, 100 µg/ml de DNA fragmentado de esperma de salmão, numa temperatura de 42°C. As lavagens foram feitas a 65°C com 2x SSC, 0,1% SDS, por 10 minutos; 0,5x SSC, 0,1% SDS, por 15 minutos; 0,1x SSC, 0,1% SDS, por 30 minutos. A detecção da sonda marcada foi feita pela adição de anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina, por 2 horas. O substrato CSPD (“disodium 3-94-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2’-(5’chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan} 4-yl) phenyl phosphate”) foi usado para promover a reação de quimioluminescência e sensibilizar filmes de raios-X (KODAK X-OMAT). A membrana foi exposta ao filme por 8-10 horas. Após a revelação do filme realizou-se a genotipagem das linhagens, comparando-se o padrão de cada linhagem com os padrões parentais.

Para a utilização das sondas Bng191 e Bng204 foi necessário, primeiramente, descobrir qual enzima de restrição revelava polimorfismo entre as linhagens parentais. Para isto, foram utilizadas as enzimas (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HaeIII*, *DraI*) na digestão do DNA das linhagens parentais. O DNA foi hibridizado com estas duas sondas, como descrito anteriormente.

3.3 Avaliação de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

Das 70 linhagens recombinantes inicialmente utilizadas para genotipagem, somente foi possível obter um número suficiente de sementes de 50 linhagens. Estas linhagens foram avaliadas para resistência a dois isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em casa-de-vegetação. As linhagens parentais foram usadas como controle. Inicialmente, as sementes foram desinfetadas com álcool 70% (3 minutos) e hipoclorito de sódio, solução comercial 10%, (por 2 minutos). Após o plantio, observou-se que 50% das sementes tratadas não germinaram, havendo a necessidade de um novo plantio.

Optou-se por um plantio em placas de Petri contendo uma mistura de areia + vermiculita e incubação a 28°C, até germinação. Estas sementes não foram desinfetadas, pois acredita-se que este procedimento tenha influenciado na germinação. Após a germinação, foram transferidas para vasos em casa-de-vegetação, mantendo-se uma temperatura de 28 a 30°C. Esta diferença no dia do plantio não interferiu na condução do experimento, pois as plantas foram inoculadas e avaliadas de acordo com a data de plantio de cada uma.

O inóculo foi obtido de culturas estoques de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp), isolado W-18/Wisconsin e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* variante *fuscans* (Xcpf), isolado F2495-A/Botucatu, de onde foram retirados 50 µl, transferidos para 100 ml de meio 523 (Apêndice 2) e incubados a 28°C por 48 horas sob agitação contínua (150 rpm). A concentração do inóculo foi estimada através de diluições em série, contando-se o número de colônias formadas nas placas. As concentrações obtidas variaram de 2 a 4×10^8 ufc/ml.

A inoculação foi feita simultaneamente com os dois isolados, em folíolos distintos do primeiro trifolíolo, 15 dias após o plantio. O método usado para inoculação foi baseado em Rava (1984), o qual consistiu em um corte feito com tesoura embebida no inóculo em cada lado da folha.

A unidade experimental consistiu em um vaso contendo duas plantas, disposta em blocos inteiramente casualizados com três repetições. Os vasos utilizados continham uma mistura de solo + “plant max” (1:1), com pH aproximadamente 6,0. Durante a condução do experimento adicionou-se, em cada vaso, um suplemento nutricional de 50 ml de solução de Sarruge (Apêndice 3) contendo 3 mM de NH_4NO_3 .

Os sintomas foram avaliados 9 dias após a inoculação, medindo-se a área da lesão com um medidor de área Li-Cor, e por meio de escala de notas (0 a 6), feita por dois observadores. A escala usada foi de Rava (1984), onde: 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 ultrapassem a nervura lateral; 5=clorose e

murcha até o nível interno dos cortes; e 6=clorose avançando em torno de 1 cm no interior da folha, e murcha da área cortada.

Durante o experimento, foi observado que as linhagens parentais apresentavam diferenças no comprimento dos internódios e que essa diferença estava presente nas linhagens recombinantes. A partir desta observação, decidiu-se avaliar esta característica. Desta forma, mediu-se o comprimento do segundo internódio (distância entre o primeiro e segundo par de trifolíolos) nestas plantas.

3.4 Avaliação de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

As mesmas linhagens de feijoeiro utilizadas no experimento com Xcp e Xcpf foram avaliadas para resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em um outro experimento. A unidade experimental, neste caso, consistiu em um vaso contendo três plantas, distribuídas em 3 blocos inteiramente casualizados. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, a aproximadamente 30°C. As sementes não foram submetidas ao tratamento para desinfecção, procedendo-se como descrito anteriormente no segundo plantio feito no experimento com *Xanthomonas*.

O inóculo foi obtido de uma cultura estoque de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) isolado 986, do Instituto Biológico-Campinas. Foram retirados 50 µl do estoque, transferidos para 100 ml de meio B de King (Apêndice 4) e incubados a 28°C por 36 horas sob agitação contínua (150 rpm). A concentração do inóculo foi avaliada através de diluições em placas, obtendo-se 10⁹ ufc/ml.

A inoculação foi feita no primeiro trifolíolo, 18 dias após o plantio, como descrito anteriormente. Os sintomas foram avaliados 10 dias após a inoculação, medindo-se a área de clorose e a área de necrose com um medidor de área Li-Cor.

3.5 Avaliação do número de nódulos

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação (CENA-USP) entre maio e junho de 1997, com as mesmas linhagens de feijoeiro utilizadas nos ensaios anteriores. Os parentais foram usados como controle. A unidade experimental consistiu em 1 vaso contendo duas plantas, com repetições em 3 blocos inteiramente casualizados.

Como neste experimento foi necessário manter condições assépticas, para não haver contaminação com outras estirpes de rizóbio, foram utilizados vasos de Leonard (CIAT, 1988) modificados, com uma capacidade de 1,5 L e contendo uma mistura de vermiculita + areia na proporção 1:1. Este substrato foi autoclavado por 1 hora à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm. Os vasos foram desinfetados previamente com hipoclorito de sódio 10% (solução comercial) e álcool 70%. As sementes também foram desinfetadas com estas soluções por 2 minutos e em seguida lavadas 7 vezes em água destilada. A solução nutritiva utilizada nestes vasos foi a solução de Sarruge (1975) diluída 3:1, contendo 2mM de NH_4NO_3 (Apêndice 3), a qual foi autoclavada por 30 minutos a 120°C e pressão de 1 atm. A solução foi fornecida semanalmente às plantas.

O inóculo foi preparado com a estirpe UMR1899 de *Rhizobium tropici*, fornecida pela seção de Microbiologia do CENA-USP, com a identificação de CM-01. Inicialmente, a estirpe foi cultivada em placas de Petri contendo meio sólido YM (Vincent, 1970). Colônias isoladas destas placas foram transferidas para o meio YM líquido, mantido em agitador a 28°C, por 48 horas. A concentração do inóculo foi verificada por diluições em placas, obtendo-se a concentração de $2,8 \times 10^9$ ufc/ml.

A inoculação foi feita com 5 ml do inóculo, com o auxílio de uma pipeta estéril, 5 dias após o plantio. Após 30 dias, a parte aérea da planta foi cortada e as raízes colocadas em sacos plásticos, os quais foram armazenados em câmara fria a 10°C até a contagem dos nódulos. A média do número de nódulos foi utilizada na identificação de QTLs associados a esta característica.

3.6 Análises estatísticas

A comparação de médias entre linhagens foi feita empregando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. No primeiro experimento, considerou-se os dois isolados de Xcp, blocos e linhagens como efeitos principais. Nas análises de comprimento do segundo internódio, resistência à Pst e número de nódulos, foram considerados como efeito principal, somente blocos e linhagens. O programa computacional utilizado para esta análise foi o SANEST.

A análise empregada para mapeamento de QTLs de resistência foi a análise de variância onde *locus* marcador, isolados (no caso de Xcp e Xcpf) e blocos foram considerados variáveis independentes e a característica medida (área de lesão, nota, comprimento de internódio, área de clorose ou número de nódulos) como variável dependente. Esta análise foi empregada para detectar diferenças significativas entre genótipos para cada *locus* marcador e a característica medida. Constatando-se diferenças significativas ao nível de $p < 0,01$, interpretou-se que o marcador está ligado a QTLs que controlam a característica estudada (Edwards et al., 1987). O programa utilizado para estas análises foi STATISTICA 4.5.

Para detectar distorções de segregação da proporção esperada, que no caso de linhagens homozigotas é 1:1, foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2) para cada marcador, pois a ocorrência de distorções pode interferir na detecção de um QTL.

Valores de R^2 (coeficiente de regressão linear) foram calculados para verificar a contribuição para a variação fenotípica dos QTLs encontrados (Edwards et al., 1987).

4 RESULTADOS

4.1 Genotipagem por RFLPs

As 11 sondas utilizadas na genotipagem das linhagens e seus respectivos grupos de ligação foram: PAL-5, D1308 no grupo de ligação D1; CHS no grupo D2; D1461, D1492 no grupo D5; D1390, D1861, PHS, Bng191, Bng204 no grupo D7 e D1831 no grupo D9. As sondas D1308, D1390 e PHS revelaram polimorfismo com a enzima *EcoRI*; as sondas CHS e D1461 com a enzima *EcoRV*; as sondas D1492 e D1861 com a enzima *HaeIII*; a sonda D1831 com a enzima *HindIII* e PAL-5 com a enzima *PstI*, confirmando o polimorfismo encontrado por Nodari et al. (1993a), utilizando a combinação de várias enzimas com estas sondas.

As sondas Bng191 e Bng204, pertencentes a outra biblioteca genômica, revelaram polimorfismo com as enzimas *EcoRI*, *EcoRV* e *DraI*. Entre estas enzimas, escolheu-se a que proporcionou um padrão de bandas mais distinto entre os parentais. Assim, para a sonda Bng191 foi escolhida a enzima *EcoRV* e para a sonda Bng204 foi escolhida a enzima *DraI*.

Os genótipos das 70 linhagens F₇₋₈ com as 11 sondas estão relacionados na Tabela 1. Alelos do parental BAT-93 foram identificados com a letra B e alelos do parental Jalo EEP558 pela letra J. O genótipo para as demais sondas utilizadas neste trabalho estão disponíveis na internet (<http://agronomy.ucdavis.edu/Gepts/Gepts.htm>).

O polimorfismo apresentado pelas linhagens e parentais com as sondas D1462 e Bng204, após a autoradiografia, pode ser visto na Figura 1.

Tabela 1- Genotipagem das linhagens recombinantes F₇₋₈ oriundas do cruzamento entre BAT-93 e Jalo EEP558, com 11 marcadores do tipo RFLP.

Sondas	Pal-5	D1308	CHS	D1461	D1492	D1831	Bng 191	D1390	PHS	D1861	Bng 204
Linhagens											
56	B	-	B	-	J	J	B	J	B	B	B
57	B	-	J	J	J	B	-	J	B	B	J
63	J	B	B	J	B	B	B	J	J	J	-
68	J	B	J	J	J	H	B	J	B	B	-
71	J	-	B	B	B	J	B	B	B	B	B
81	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	-
87	-	J	B	-	-	-	-	-	-	-	-
88	B	-	B	B	B	J	B	B	B	B	-
96	J	-	B	J	J	J	J	J	B	-	-
101	B	-	J	-	B	B	B	B	J	J	J
103	J	-	B	-	J	J	J	B	B	-	B
104	J	-	B	J	J	H	B	J	J	-	J
105	J	B	J	B	B	B	B	J	B	J	B
106	J	J	B	J	B	B	B	J	B	J	-
107	B	J	B	J	J	J	B	-	J	-	B
108	B	B	J	B	J	-	J	-	J	J	B
109	B	-	B	B	B	B	B	J	J	J	J
110	J	-	B	J	B	J	J	J	J	J	J
111	B	-	-	-	B	J	-	B	B	-	J
112	B	-	J	B	B	B	-	-	B	-	J
113	-	-	-	-	J	B	-	B	J	B	B
115	-	-	B	-	J	J	-	J	J	J	J
116	J	J	B	-	B	J	-	J	B	-	J
117	J	B	J	-	J	B	-	J	J	-	-
118	J	J	-	J	J	J	-	B	J	B	B
119	J	B	J	-	J	B	-	J	J	-	-
120	-	J	B	J	B	B	-	J	J	J	-
123	-	J	J	B	-	J	-	-	-	B	B
125	B	B	J	-	J	B	B	J	J	J	B
127	B	B	B	J	J	J	B	J	J	J	B
128	-	-	B	J	J	B	-	B	B	B	B
129	-	B	B	B	J	-	-	J	B	B	-
130	-	J	J	-	J	J	-	J	B	B	J
131	-	J	J	J	J	J	-	J	J	J	-
132	J	B	J	J	J	B	B	J	B	B	J
133	J	B	J	-	B	B	J	J	B	B	B
134	B	J	J	B	B	-	B	B	-	J	J
135	J	J	J	J	B	B	J	J	J	J	B
136	B	J	B	B	B	J	J	B	B	B	B
137	B	J	J	-	B	H	J	B	J	J	-

	continuação										
138	J	J	J	J	B	J	B	J	J	J	-
139	B	J	J	-	J	B	B	B	B	B	B
141	B	B	B	J	J	B	J	B	J	J	B
142	J	B	J	J	B	J	J	B	B	-	-
144	B	J	B	-	J	B	-	B	J	-	-
145	J	B	B	J	B	J	-	B	J	-	J
146	J	-	J	J	-	J	B	J	J	-	-
147	J	J	B	B	J	H	B	B	-	-	B
148	J	J	B	J	B	B	-	B	B	B	-
149	J	B	J	J	J	J	-	B	B	B	B
150	B	J	B	B	B	J	-	B	B	B	B
153	J	-	-	J	J	B	B	J	B	-	B
154	B	J	J	B	B	J	J	B	J	J	J
155	B	J	B	J	J	J	J	B	B	J	B
157	J	B	J	B	J	B	-	J	J	J	B
159	B	B	J	J	J	J	B	B	J	J	J
160	B	B	B	-	J	J	J	B	B	J	B
161	-	-	J	J	J	J	J	B	J	J	B
164	J	J	J	-	B	J	J	J	B	B	B
165	B	J	B	B	J	J	J	J	J	J	B
166	B	J	J	J	B	B	J	B	B	B	B
167	J	B	B	J	B	B	J	B	J	J	B
169	J	J	J	J	B	J	B	J	J	B	J
170	J	J	B	B	B	B	J	B	J	J	B
171	J	B	J	B	B	J	-	J	B	B	B
172	J	J	B	J	-	J	-	B	B	B	B
176	J	B	B	B	B	-	-	J	-	B	B
178	J	J	J	-	J	B	-	B	B	B	-
179	-	B	B	J	J	B	-	B	B	B	-
180	J	J	B	B	-	J	-	B	B	B	-

B=BAT-93

J=Jalo EEP558

- = não foi possível genotipar

Pal-5= fenilalanina amônia-liase-5

CHS= chalcona sintetase

PHS= faseolina

A

B

Figura 1 - Polimorfismo observado nas linhagens F_{7-8} e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558), após hibridização do DNA com as sondas D1492 (A) e Bng204 (B). O DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Hae* III (A) e *Dra*I (B).

4.2 Detecção de QTLs de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

O parental resistente BAT-93 e o suscetível Jalo EEP558 apresentaram áreas de lesão foliar de 1,43 e 5,81 cm² para Xcp e 0,55 e 5,26 cm² para Xcpf, respectivamente. Entre as linhagens, a área de lesão variou de 0,81 a 7,23 cm² para Xcp e de 0,43 a 5,98 cm² para Xcpf. Foram observados, em algumas linhagens, índices de lesão inferiores e superiores aos apresentados pelos parentais (Fig.2). Estas diferenças, porém, não foram significativas a 5% no teste de Tukey (Tabela 2).

Segundo o critério de avaliação por nota, os valores encontrados para os parentais BAT-93 e Jalo EEP558 foram 2,33 e 5,83 para Xcp e 1,33 e 4,91 para Xcpf, respectivamente. Entre as linhagens, a variação foi de 1,58 a 5,33 para Xcp e de 1,00 a 4,00 para Xcpf. Valores de notas inferiores ao apresentado pelo parental resistente foram observados entre as linhagens. Valores superiores ao parental suscetível, no entanto, não foram encontrados (Fig.3). O teste de Tukey a 5% não foi significativo para estas linhagens, mostrando a não ocorrência de segregação transgressiva, concordando com o resultado para área de lesão (Tabela 3). A análise de correlação entre os critérios de avaliação (nota e área da lesão) foi significativa ($r=0,85$), indicando que a resistência ao CBC pode ser avaliada por estes dois critérios.

O efeito principal de isolados foi significativo nas análises de variância (Apêndices 5 e 6), indicando uma maior agressividade do isolado Xcp (W18) nos dois critérios de avaliação (Tabela 4).

Figura 2- Distribuição da freqüência das áreas de lesões foliares em linhagens recombinantes $F_{8,9}$ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris*. (A) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (W18); (B) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (F2495-A).

Tabela 2- Reação de linhagens recombinantes e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *P. vulgaris* a *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf) avaliada por área de lesão.

Linhagens	Xcp		Linhagens	Xcpf	
115	7,23	a	159	5,98	a
112	6,82	ab	109	5,42	ab
Jalo EEP558	5,81	abc	115	5,30	abc
164	5,45	abcd	Jalo EEP558	5,26	abcd
159	4,74	abcde	127	5,06	abcde
134	4,62	abcdef	146	4,89	abcdef
138	4,22	abcdefg	112	4,30	abcdefg
133	4,16	abcdefgh	167	3,56	abcdefgh
123	4,03	bcdefghi	145	3,46	abcdefgh
88	3,92	bcdefghij	164	2,78	bcdefgh
145	3,76	bcdefghij	123	2,72	bcdefgh
160	3,51	cdefghij	138	2,57	bcdefgh
109	3,28	cdefghij	131	2,38	bcdefgh
169	3,23	cdefghij	169	2,32	bcdefgh
146	3,16	cdefghij	134	2,27	bcdefgh
141	3,10	cdefghij	144	2,15	cdefgh
105	3,01	cdefghij	88	2,13	defgh
167	2,89	cdefghij	133	2,03	efgh
63	2,78	cdefghij	107	2,02	efgh
127	2,71	cdefghij	141	2,02	efgh
176	2,65	cdefghij	87	1,96	efgh
154	2,51	defghij	153	1,78	fgh
56	2,50	defghij	160	1,72	fgh
132	2,41	defghij	176	1,62	gh
103	2,33	defghij	171	1,52	gh
153	2,24	efghij	154	1,50	gh
104	2,00	efghij	120	1,44	gh
107	1,91	efghij	56	1,41	gh
166	1,87	efghij	166	1,40	gh
165	1,86	efghij	103	1,40	gh
57	1,81	efghij	63	1,39	gh
131	1,73	efghij	118	1,34	gh
144	1,71	efghij	104	1,27	gh
118	1,70	efghij	147	1,25	gh
106	1,64	efghij	170	1,22	gh
130	1,62	efghij	132	1,16	gh
81	1,60	efghij	105	1,12	h
120	1,48	fghij	165	1,09	h
147	1,43	ghij	81	0,99	h
117	1,43	ghij	117	0,89	h
BAT-93	1,40	ghij	57	0,82	h
155	1,33	ghij	129	0,80	h
129	1,29	ghij	113	0,79	h
113	1,15	ghij	128	0,74	h
87	1,15	ghij	172	0,73	h
171	1,01	hij	106	0,72	h
128	0,98	ij	142	0,70	h
142	0,94	ij	155	0,67	h
170	0,88	ij	130	0,57	h
172	0,86	ij	136	0,56	h
148	0,81	j	BAT-93	0,55	h
136	0,81	j	148	0,43	h

Teste de Tukey 5% C.V.=41,24 (média de 3 repetições)

DMS=1,52 para comparação de médias de Xcp e Xcpf entre linhagens

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

Figura 3- Distribuição da frequência das notas com base nos sintomas foliares em linhagens recombinantes $F_{8,9}$ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *P. vulgaris*. (A) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (W18); (B) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (F2495-A).

Tabela 3- Reação de linhagens recombinantes e linhagens parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *P. vulgaris* a *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf) avaliada por nota com base nos sintomas foliares .

Linhagens	Xcp		Linhagens	Xcpf	
Jalo EEP558	5,83	a	Jalo EEP558	4,91	a
112	5,33	ab	112	4,00	ab
115	4,75	abc	115	3,91	abc
134	4,33	bcd	127	3,75	bcd
159	4,25	bcde	164	3,58	bcde
138	4,16	cdef	145	3,50	bcde
164	4,16	cdef	159	3,33	bcdef
145	4,16	cdef	146	3,25	bcdefg
88	4,08	cdefg	138	3,08	bcdefgh
123	4,00	cdefgh	167	2,91	bcdefghi
127	3,83	cdefghi	88	2,83	cdefghi
103	3,75	cdefghi	154	2,83	cdefghi
141	3,75	cdefghi	87	2,83	cdefghi
133	3,66	cdefghi	109	2,75	defghi
165	3,50	defghij	134	2,75	defghi
167	3,50	defghij	169	2,66	defghijk
169	3,50	defghij	123	2,66	defghijk
154	3,50	defghij	141	2,50	efghijkl
146	3,25	defghijk	133	2,33	fghijklm
118	3,16	efghijkl	153	2,25	fghijklmn
105	3,16	efghijkl	107	2,25	fghijklmn
87	3,16	efghijkl	165	2,25	fghijklmn
104	3,16	efghijkl	118	2,16	ghijklmno
153	3,08	fghijkl	131	2,16	ghijklmno
160	3,00	ghijklm	103	2,08	hijklmnop
176	3,00	ghijklm	105	2,08	hijklmnop
109	3,00	ghijklm	166	2,00	hijklmnop
63	2,91	hijklm	160	2,00	hijklmnop
131	2,83	ijklmn	144	2,00	hijklmnop
166	2,75	ijklmno	176	2,00	hijklmnop
56	2,50	jklmnop	104	2,00	hijklmnop
144	2,50	jklmnop	129	1,91	ijklmnop
106	2,50	jklmnop	56	1,83	ijklmnop
107	2,50	jklmnop	63	1,83	ijklmnop
129	2,50	jklmnop	120	1,66	jklmnop
147	2,41	jklmnop	128	1,66	jklmnop
130	2,33	klmnop	147	1,58	klmnop
128	2,33	klmnop	132	1,58	klmnop
BAT-93	2,33	klmnop	117	1,58	klmnop
120	2,33	klmnop	81	1,50	lmnop
81	2,25	klmnop	106	1,50	lmnop
142	2,25	klmnop	171	1,41	lmnop
132	2,16	klmnop	113	1,41	lmnop
117	2,08	lmnop	170	1,41	lmnop
57	2,08	lmnop	155	1,33	mnop
171	2,08	lmnop	57	1,33	mnop
172	1,91	mnop	BAT-93	1,33	mnop
136	1,75	nop	142	1,33	mnop
148	1,75	nop	130	1,16	nop
170	1,66	nop	136	1,16	nop
155	1,66	op	148	1,08	op
113	1,58	p	172	1,00	p

Teste Tukey 5% C.V.=13,07 (médias de 3 repetições)

DMS=0,55 para comparação de médias de Xcp e Xcpf entre as linhagens

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

Tabela 4- Áreas de lesões e notas com base nos sintomas foliares causados pelos isolados *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf) em *Phaseolus vulgaris* L.

Isolado	Área de lesão	Nota dos sintomas
Xcp	2,56 a	3,04 a
Xcpf	2,00 b	2,23 b

DMS=0,21, para área de lesão

DMS=0,07, para nota dos sintomas

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

A partir dos dados obtidos com os 11 marcadores utilizados na genotipagem das linhagens recombinantes e parentais e pela complementação destes, com os genótipos publicados na internet, totalizando 53 marcadores (Apêndice 1), foram aplicadas as análises estatísticas para detecção de QTLs de resistência.

Foram detectadas correlações significativas ($p < 0,01$) para área de lesão foliar, independente dos isolados, para 12 marcadores distribuídos em 5 regiões genômicas (Tabela 5): 3 marcadores no grupo de ligação D1 (D1862, D1315 e D1308); 3 no grupo de ligação D2 (CHS, D1595 e D1619); 4 no grupo de ligação D7 (CHI, PHS, D1861 e Bng204); 1 no grupo de ligação D8 (D1505); 1 no grupo de ligação D9 (D1831). Assumindo que em cada uma das regiões genômicas exista um único QTL e que seus efeitos sejam aditivos, a contribuição destes para a resistência, estimada pelo coeficiente de regressão linear (R^2), foi de 11,4%, 9,2%, 19,2%, 14% e 7,6% respectivamente, explicando 61,4% da variação fenotípica para área de lesão.

Na avaliação por nota, foram detectadas correlações significativas ($p < 0,01$) independente dos isolados, para 17 marcadores distribuídos em 6 regiões genômicas (Tabela 5): 4 marcadores no grupo de ligação D1 (D1862, D1315, D1032 e D1308); 3 no grupo de ligação D2 (D0166, CHS e D1619); 3 no grupo de ligação D5 (D1157, D1301 e D1251); 4 no grupo de ligação D7 (CHI, PHS, D1861 e Bng204); 1 no grupo de ligação D8 (D1505); 2 no grupo de ligação D9 (D1831 e D1338b). A contribuição dos QTLs para resistência em cada uma das regiões genômicas, estimada pelo coeficiente de regressão linear (R^2), foi de 20%, 22%, 20%, 28%, 24% e 20% respectivamente. Por este critério, foi encontrado um QTL a mais, no grupo de ligação D5, em relação aos QTLs encontrados pela medida da área de lesão. Este grupo também foi encontrado por Nodari et al. (1993b) usando esta mesma forma de avaliação. A localização dos QTLs encontrados neste trabalho encontra-se no Apêndice 7. Estes QTLs foram localizados no mapa de ligação do feijoeiro, feito por Gepts et al. (1993).

Não houve interações significativas entre genótipos *versus* isolados, mostrando que a resistência aos dois isolados foi controlada pelos mesmos QTLs.

Tabela 5- *Loci* de RFLPs significativamente associados ($p < 0,01$) à área da lesão e nota com base nos sintomas causados pelos isolados *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) W18 e *X. c. phaseoli* var. *fuscans* (Xcpf) F2495-A.

Grupo de ligação	Locus de RFLP	Área de lesão (cm ²)						Nota (0 a 6)					
		Xcp		Xcpf		R ² ^c	P	Xcp		Xcpf		R ² ^d	P
		BB ^a	JJ ^b	BB	JJ			BB ^a	JJ ^b	BB	JJ		
D1	D1862	3,18	2,22	2,32	1,91	0,08	0,004	3,21	2,83	2,44	2,08	0,16	0,009
	D1315	3,02	2,28	2,41	1,89	0,08	0,007	3,20	2,87	2,46	2,10	0,17	0,009
	D1032	2,20	3,02	1,74	2,11	0,06	0,029ns	2,80	3,24	2,11	2,33	0,17	0,010
	D1308	3,04	1,84	2,30	1,59	0,11	<0,001	3,23	2,65	2,40	1,92	0,20	<0,001
D2	D0166	2,36	2,62	1,96	2,10	0,04	0,180ns	2,83	3,19	2,08	2,37	0,18	0,005
	CHS	2,16	3,00	1,79	2,20	0,08	0,002	2,82	3,19	2,07	2,35	0,17	0,005
	D1595	2,68	2,29	2,33	1,53	0,07	0,004	3,07	2,83	2,29	2,05	0,16	0,045ns
	D1619	2,93	1,96	2,24	1,66	0,09	<0,001	3,25	2,60	2,40	1,92	0,22	<0,001
D5	D1157	2,84	2,31	2,25	1,80	0,05	0,022ns	3,26	2,75	2,43	2,00	0,20	<0,001
	D1301	2,82	2,21	2,14	1,85	0,05	0,025ns	3,22	2,75	2,36	2,04	0,19	<0,001
	D1251	2,85	2,22	2,13	1,89	0,05	0,032ns	3,24	2,73	2,38	2,03	0,19	<0,001
D7	CHI	1,99	2,72	1,26	2,46	0,19	<0,001	2,69	3,36	1,89	2,57	0,25	<0,001
	PHS	2,31	2,67	1,33	2,57	0,11	<0,001	2,76	3,13	1,88	2,48	0,20	<0,001
	D1861	2,19	2,95	1,34	2,52	0,13	<0,001	2,70	3,19	1,87	2,39	0,23	<0,001
	Bng204	2,26	3,64	1,68	2,86	0,18	<0,001	2,84	3,72	2,05	2,75	0,28	<0,001
D8	D1505	3,09	1,92	2,44	1,49	0,14	<0,001	3,25	2,73	2,50	2,75	0,24	<0,001
D9	D1831	2,30	2,79	1,71	2,25	0,08	0,007	2,70	3,21	1,94	2,42	0,20	<0,001
	D1338	2,28	2,72	1,84	2,27	0,05	0,043ns	2,77	3,18	2,01	2,39	0,19	0,002

a=área de lesão média e média de notas das linhagens homozigotas para alelos de BAT-93

b= área de lesão média e média de notas das linhagens homozigotas para alelos de Jalo EEP558

c=proporção da variação fenotípica em área de lesão explicada pelo *locus* marcador

d= proporção da variação fenotípica em nota explicada pelo *locus* marcador

p=nível de significância do teste F

CHS=chalcona sintetase; CHI=chalcona isomerase; PHS=faseolina

ns=não significativo

Nos grupos de ligação D7, D9 e para os marcadores D0166 e CHS (D2), alelos de BAT-93 conferiram resistência, ao passo que nos grupos de ligação D1, D8 e D2 para os marcadores D1595 e D1619, foram alelos do parental Jalo EEP558 que contribuíram para resistência. Os marcadores D1862 (D1), D1315 (D1) e Bng204 (D7) apresentaram distorção mendeliana da segregação esperada (1:1) nestas linhagens (Tabela 6).

A comparação dos resultados obtidos pelos dois critérios de avaliação deste experimento mostra que nos mesmos grupos de ligação foram encontrados QTLs de resistência, com exceção do grupo D5.

Tabela 6- Frequência observada dos genótipos para *loci* de RFLPs significativos.

Grupo de ligação	Locus de RFLP	Genótipo		χ^2 (1:1)
		nº BB ^a	nº JJ ^a	
D1	D1862	11	29	8,10**
	D1315	13	28	5,48*
	D1032	27	15	3,42
	D1308	27	19	1,39
D2	D1367	22	21	0,02
	D1287	26	18	1,45
	D0166	22	23	0,02
	CHS	31	18	3,44
	D1595	27	19	1,39
	D1619	26	21	0,53
D3	D1096	23	23	0
	D1377	19	24	0,58
D5	Aco-2	19	21	0,10
	D1157	21	21	0
	D1301	22	25	0,19
	D1251	22	24	0,08
D6	D2062	17	27	2,26
	D1086	23	23	0
D7	CHI	20	16	0,44
	PHS	22	23	0,02
	D1861	19	19	0
	Bng204	24	11	4,82*
D8	D1505	24	22	0,08
D9	D1101	24	22	0,08
	D1831	20	25	0,55
	D1338	23	19	0,38
D10	D1476	29	17	3,13

a= B e J correspondem a alelos de BAT-93 e Jalo EEP558, respectivamente.

* e ** representam distorções significativas da segregação esperada aos níveis de $p=0,05$ e $p=0,01$, respectivamente

Aco-2= aconitase-2; CHS= chalcona sintetase; CHI= chalcona isomerase; PHS= faseolina

4.3 Detecção de QTLs para comprimento do segundo internódio

Os valores médios encontrados para comprimento do segundo internódio nos parentais foram 3,08 cm para BAT-93 e 5,50 cm para Jalo EEP558. As linhagens variaram de 0,5 a 16 cm, mostrando valores inferiores e superiores aos apresentados pelos parentais (Fig. 4). Os valores de internódio de algumas linhagens diferiram estatisticamente dos parentais, indicando a ocorrência de segregação transgressiva para maior comprimento. Isto pode ser observado nas linhagens 87 e 138, as quais apresentaram comprimento de internódio maior que o parental Jalo EEP558 (suscetível à Xcp e Xcpf) (Tabela 7).

Foram encontrados 11 marcadores significativos ($p < 0,01$), distribuídos em 5 grupos de ligação (Tabela 8) associados a esta característica: 1 no grupo de ligação D3 (D1096); 4 no grupo de ligação D5 (Aco-2, D1157, D1301 e D1251); 4 no grupo de ligação D7 (CHI, PHS, D1861 e Bng204); 1 no grupo de ligação D8 (D1505) e um no grupo D9 (D1831), explicando 59,4% da variação fenotípica nesta característica. Destes marcadores, somente Bng204 no grupo de ligação D7 apresentou distorção mendeliana, o que pode ser verificado pelo cálculo de qui-quadrado (Tabela 6).

QTLs encontrados em 4 grupos de ligação (D5, D7, D8 e D9) também foram significativos na avaliação da resistência por nota e área de lesão. Nos grupos de ligação D5 e D8, alelos do parental Jalo EEP558 contribuíram para menor comprimento do segundo internódio, sendo que nos outros grupos a contribuição foi de alelos do parental BAT-93 (resistente). Estes dois grupos de ligação, também apresentaram uma contribuição de alelos do parental suscetível (Jalo EEP558) na resistência ao CBC, indicando a ligação entre estas.

Figura 4- Distribuição da frequência do comprimento do segundo internódio em linhagens recombinantes $F_{8,9}$ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris* L.

Tabela 7- Comprimento do segundo internódio em linhagens recombinantes F₈₋₉ e linhagens parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris* L.

Linhagem	Comprimento do internódio (cm)		Linhagem	Comprimento do internódio (cm)	
87	16,00	a	118	3,00	fghijklmn
138	10,41	b	154	3,00	fghijklmn
134	8,58	bc	146	2,91	fghijklmn
115	7,00	cd	130	2,90	fghijklmn
169	6,58	cde	176	2,83	ghijklmn
145	6,50	cde	133	2,83	ghijklmn
112	6,00	cdef	117	2,83	ghijklmn
131	5,50	cdefg	164	2,66	ghijklmn
Jalo EEP558	5,50	cdefg	136	2,66	ghijklmn
123	5,41	defg	105	2,66	ghijklmn
170	5,16	defgh	81	2,66	ghijklmn
165	5,00	defghi	172	2,50	ghijklmn
127	5,00	defghi	148	2,50	ghijklmn
56	4,66	defghij	113	2,25	hijklmn
88	4,33	defghijk	120	2,18	hijklmn
167	4,16	defghijkl	142	2,16	hijklmn
13	4,16	defghijkl	159	2,08	hijklmn
107	4,00	defghijklm	160	1,93	ijklmn
109	3,50	efghijklmn	166	1,80	ijklmn
144	3,25	fghijklmn	63	1,75	ijklmn
106	3,25	fghijklmn	128	1,66	ijklmn
153	3,25	fghijklmn	132	1,41	klmn
141	3,25	fghijklmn	57	1,16	lmn
147	3,16	fghijklmn	171	1,08	lmn
BAT-93	3,08	fghijklmn	129	1,00	mn
104	3,08	fghijklmn	155	0,50	n

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05) (média de 3 repetições)

DMS=3,13

C.V.=24,65

Tabela 8- *Loci* de RFLPs significativamente associados ($p < 0,01$) ao comprimento do segundo internódio de *Phaseolus vulgaris* L.

Grupo de ligação	<i>Locus</i> de RFLP	R^2 ^a	BB ^b	JJ ^c	P
D3	D1096	0,087	2,93	4,52	<0,001
D5	Aco-2	0,089	4,55	2,87	0,002
	D1157	0,100	4,55	2,83	<0,001
	D1301	0,083	4,55	3,01	<0,001
	D1251	0,186	4,93	2,58	<0,001
D7	CHI	0,129	3,01	5,04	<0,001
	PHS	0,134	2,64	4,09	<0,001
	D1861	0,067	2,86	4,02	0,007
	Bng204	0,135	3,11	4,59	<0,001
D8	D1505	0,106	4,52	2,79	<0,001
D9	D1831	0,080	2,86	4,48	<0,001

a=proporção da variação fenotípica em comprimento do 2º internódio explicada pelo *locus* marcador

b=média do comprimento do 2º internódio das linhagens homozigotas para alelos de BAT-93

c=média do comprimento do 2º internódio das linhagens homozigotas para alelos de Jalo EEP558

p=nível de significância do teste F

Aco-2=Aconitase-2; CHI=chalcona isomerase; PHS=faseolina

4.4 Detecção de QTLs de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Os parentais BAT-93 e Jalo EEP558 apresentaram áreas de necrose de 1,55 e 0,61 cm², respectivamente. Entre as linhagens, a variação foi de 0,35 a 2,13 cm². Para clorose, a variação foi de 0,17 a 2,20 cm² entre as linhagens e os parentais apresentaram 0,26 e 2,11 cm² respectivamente para BAT-93 e Jalo EEP558. Embora tenham sido encontrados valores inferiores e superiores aos apresentados pelos parentais em área de clorose, não houve segregação transgressiva, pois o teste de Tukey não foi significativo para estas linhagens (Tabela 9). Este teste também não foi significativo na comparação de médias entre os parentais para área de necrose. Por este motivo, esta avaliação não foi considerada nas análises subseqüentes.

Nas análises de variância para detectar ligação entre os marcadores moleculares e a característica estudada, foram detectadas correlações significativas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) entre 6 marcadores e área de clorose, distribuídos em 4 grupos de ligação: D6 (D2062, D1086); D7 (PHS, D1861); D9 (D1101); D10 (D1476) (Tabela 10). Os efeitos dos QTLs encontrados foram estimados pelo coeficiente de regressão linear (R^2). A contribuição dos QTLs encontrados para área de clorose foi de 44,4%. Não houve distorção mendeliana para nenhum dos marcadores significativos na análise desta característica (Tabela 6).

O parental BAT-93 (resistente a Xcp) mostrou uma resposta mais rápida a Pst, formando lesões necróticas características de uma reação de hipersensibilidade e posteriormente uma pequena área clorótica. Já o parental Jalo EEP558 (suscetível a Xcp) apresentou uma maior área de clorose circundando a pequena área de necrose, o que se constitui em sintoma característico de plantas suscetíveis ao fogo selvagem. Esta diferença de área de clorose entre os parentais é mostrada na Figura 5.

Nas regiões D7 e D9 também foram localizados QTLs de resistência a Xcp e Xcpf mostrando que os mesmos QTLs estão envolvidos no controle destas doenças.

Tabela 9- Reação de linhagens recombinantes e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris* a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* avaliada por área de clorose e área de necrose foliar.

Área de clorose			Área de necrose		
Linhagem			Linhagem		
115	2,20	a	169	2,13	a
131	2,16	ab	106	1,86	ab
Jalo EEP558	2,11	ab	134	1,76	ab
105	1,88	abc	109	1,70	ab
141	1,87	abc	133	1,68	ab
159	1,86	abc	56	1,67	ab
154	1,86	abc	171	1,63	ab
165	1,84	abc	128	1,61	ab
160	1,82	abc	132	1,58	ab
123	1,82	abc	BAT-93	1,55	ab
145	1,80	abc	57	1,54	ab
117	1,65	abc	112	1,53	ab
120	1,64	abc	105	1,50	ab
146	1,62	abc	141	1,46	ab
130	1,55	abc	167	1,39	ab
113	1,48	abc	138	1,37	ab
147	1,47	abc	148	1,24	ab
127	1,44	abc	176	1,19	ab
103	1,43	abc	170	1,19	ab
171	1,43	abc	155	1,17	ab
148	1,42	abc	166	1,17	ab
104	1,41	abc	144	1,16	ab
132	1,31	abc	130	1,15	ab
118	1,30	abc	146	1,12	ab
106	1,26	abc	81	1,12	ab
129	1,24	abc	88	1,09	ab
172	1,21	abc	172	1,09	ab
166	1,19	abc	63	1,09	ab
133	1,19	abc	127	1,07	ab
81	1,17	abc	159	1,03	ab
164	1,15	abc	103	1,02	ab
112	1,14	abc	118	0,99	ab
63	1,09	abc	87	0,99	ab
167	1,02	abc	104	0,97	ab
144	1,01	abc	153	0,97	ab
134	0,97	abc	117	0,96	ab
138	0,93	abc	145	0,92	ab
56	0,86	abc	107	0,92	ab
136	0,84	abc	147	0,91	ab
170	0,80	abc	142	0,89	ab
88	0,79	abc	136	0,89	ab
107	0,77	abc	160	0,80	ab
153	0,70	abc	129	0,78	ab
57	0,59	abc	120	0,76	ab
169	0,58	abc	113	0,70	ab
142	0,53	abc	123	0,62	ab
128	0,48	abc	164	0,61	ab
176	0,38	bc	Jalo EEP558	0,61	ab
BAT-93	0,26	c	165	0,59	ab
87	0,24	c	131	0,57	ab
155	0,18	c	115	0,51	ab
109	0,17	c	154	0,35	b

DMS= 1,81

C.V.= 44,42 (média de 3 repetições)

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

DMS= 1,80

C.V.= 42,18

(média de 3 repetições)

Tabela 10- *Loci* de RFLPs significativamente associados com área de clorose causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em *Phaseolus vulgaris* L.

Grupo de ligação	Locus de RFLP	R ² ^a	BB ^b	JJ ^c	P
D6	D2062**	0,092	1,05	1,37	0,008
	D1086**	0,046	0,98	1,46	<0,001
D7	PHS**	0,146	1,08	1,38	0,009
	D1861*	0,117	1,12	1,39	0,016
D9	D1101**	0,126	1,04	1,44	<0,001
D10	D1476**	0,080	1,12	1,44	0,008

a=proporção da variação fenotípica em área de clorose explicada pelo *locus* marcador

b=média da área de clorose das linhagens homozigotas para alelos de BAT-93

c=média da área de clorose das linhagens homozigotas para alelos de Jalo EEP558

p=nível de significância do teste F

* e **=associações significativas a $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente

PHS=faseolina

Figura 5- Distribuição fenotípica de área de clorose causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, em linhagens recombinantes $F_{8,9}$ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris* L.

4.5 Detecção de QTLs para número de nódulos

A média do número de nódulos (NN) das linhagens variou de 20,0 a 117,6. Os parentais BAT-93 e Jalo EEP558 apresentaram médias de 38,3 e 147,3 nódulos/planta, respectivamente. A distribuição fenotípica dos dados, mostra uma maior frequência de linhagens apresentando menor NN (Figura 6). Algumas linhagens apresentaram NN menor que o parental BAT-93, porém nenhuma linhagem apresentou valor maior que o encontrado para Jalo EEP558. Estes valores inferiores não foram significativos estatisticamente ao teste de Tukey (5%) (Tabela 11).

Através da análise de variância ($p < 0,01$), considerando como variável independente o estado alélico de cada *locus* marcador e como variável dependente o número de nódulos, foram encontradas 8 associações significativas, distribuídas em 5 regiões genômicas (Tabela 12): 3 marcadores no grupo de ligação D2 (D1367, D1287 e D0166); 1 no grupo D3 (D1377); 1 no grupo D7 (CHI); 2 no grupo D9 (D1831 e D1338) e 1 no grupo D10 (D1476). Nenhum dos marcadores apresentou distorção na segregação mendeliana esperada (1:1), quando aplicado o teste de qui-quadrado (Tabela 6). A contribuição destes QTLs para a característica, estimada pelo coeficiente de regressão linear (R^2), foi 16,7%, 8,3%, 9,4%, 16,6% e 8,6%, explicando 59,8% da variação fenotípica.

Em geral, alelos de Jalo EEP558 (parental com alta nodulação) conferiram maior NN, somente no grupo de ligação D10, alelos de BAT-93 foram responsáveis pelo maior NN (Tabela 12). Com exceção do grupo D3 e de dois marcadores do grupo D2, nos demais grupos, foram encontrados QTLs associados à resistência a Xcp, Xcpf e Pst para os mesmos marcadores encontrados nesta análise. As regiões D7 e D9, significativas para as duas bacterioses estudadas e para o comprimento do segundo internódio aparecem também envolvidas no controle do NN. A localização dos QTLs para NN, assim como para as demais características estudadas, no mapa do feijoeiro, encontram-se no Apêndice 7.

Figura 6- Distribuição da frequência do número de nódulos em linhagens recombinantes $F_{8,9}$ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) de *Phaseolus vulgaris* L.

Tabela 11- Número de nódulos (NN) em linhagens recombinantes F₈₋₉ e parentais (BAT-93 e Jalo EEP-558) de *Phaseolus vulgaris* L.

Linhagem	NN		Linhagem	NN	
Jalo EEP558	147,3	a	130	56,0	Bcdefgh
164	117,6	ab	169	55,3	Bcdefgh
87	106,6	abc	155	52,0	Bcdefgh
145	102,0	abcd	160	50,3	Bcdefgh
107	101,6	abcd	176	50,0	bcdefgh
165	100,6	abcde	120	49,3	bcdefgh
138	99,3	abcde	144	49,0	bcdefgh
159	92,6	abcdef	56	48,6	bcdefgh
112	92,3	abcdef	123	48,0	cdefgh
134	90,6	abcdefg	166	47,3	cdefgh
88	90,3	abcdefg	141	45,3	cdefgh
172	89,3	abcdefgh	146	44,6	cdefgh
131	78,6	abcdefgh	81	42,3	cdefgh
171	78,3	abcdefgh	153	42,0	cdefgh
63	73,3	bcdefgh	115	40,6	cdefgh
148	73,3	bcdefgh	BAT-93	38,3	cdefgh
142	71,3	bcdefgh	133	38,0	cdefgh
132	69,6	bcdefgh	167	36,6	defgh
147	67,0	bcdefgh	170	34,3	defgh
118	66,6	bcdefgh	105	32,0	efgh
136	65,3	bcdefgh	104	29,6	fgh
109	65,3	bcdefgh	106	29,3	fgh
113	63,3	bcdefgh	57	23,6	fgh
154	63,3	bcdefgh	128	23,3	fgh
127	60,0	bcdefgh	103	21,6	gh
129	56,3	bcdefgh	117	20,0	h

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p=0,05) (média de 3 repetições)

DMS=69,53

C.V.=33,32%

Tabela 12- *Loci* de RFLPs significativamente associados ($p < 0,01$) ao número de nódulos em *Phaseolus vulgaris* L.

Grupo de ligação	<i>Locus</i> de RFLP	R^{2a}	nº de nódulos BB ^b	nº de nódulos JJ ^c	P
D2	D1367	0,106	53,7	70,6	0,001
	D1287	0,135	51,4	72,0	<0,001
	D0166	0,167	49,1	72,3	<0,001
D3	D1377	0,083	52,6	68,0	0,004
D7	CHI	0,094	51,0	67,0	0,004
D9	D1831	0,166	47,5	71,2	<0,001
	D1338	0,088	52,5	68,1	0,004
D10	D1476	0,086	66,3	51,8	0,007

a=proporção da variação fenotípica em número de nódulos explicada pelo *locus* marcador

b=média do número de nódulos das linhagens homozigotas para alelos de BAT-93

c=média do número de nódulos das linhagens homozigotas para alelos de Jalo EEP-558

p=nível de significância do teste F

CHI=chalcona isomerase

5 DISCUSSÃO

5.1 Resistência ao cretamento bacteriano comum

Com base nos resultados de nota e área de lesão foliar para os isolados Xcp e Xcpf, verificou-se uma maior agressividade do isolado Xcp (W18), o qual apresentou médias de lesões foliares maiores que as apresentadas por Xcpf. A maior agressividade deste isolado foi confirmada na análise estatística, onde o efeito principal de isolados foi significativo. Maior agressividade de isolados de Xcp também foi encontrada por Webster³, citado por Rava & Sartorato (1994).

Segregação transgressiva para suscetibilidade ou para resistência não foi observada entre as linhagens, em nenhum dos critérios de avaliação, concordando com os resultados de Nodari et al. (1993b) que também não encontraram segregação transgressiva na população F₃ do mesmo cruzamento (BAT-93 x Jalo EEP558). No entanto, a ocorrência de segregação transgressiva para resistência e suscetibilidade ao CBC já foi encontrada por alguns autores Coyne & Schuster (1974), Valladares-Sanchez et al. (1979) e Silva et al. (1989). Embora segregação transgressiva não tenha sido observada, alguns marcadores apresentaram alelos do parental suscetível conferindo resistência, o que é uma das causas deste tipo de segregação. Entre os QTLs encontrados para nota e área de lesão, marcadores do grupo de ligação D1, D8 e dois marcadores no grupo D2, apresentaram alelos do parental suscetível (Jalo EEP558) conferindo resistência. Provavelmente, o pequeno tamanho da população usada neste trabalho não

³ WEBSTER, D.M. Evaluation of resistance in beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. Madison, 1978, 117p. Tese (Doutorado) - University of Wisconsin.

tenha possibilitado a detecção de segregantes transgressivos. Nodari et al. (1993b) e Jung et al. (1996) também encontraram este resultado para dois marcadores na resistência ao CBC.

Alguns marcadores significativamente associados a nota não foram significativos para área de lesão e vice-versa. No entanto, a correlação significativa entre esses critérios de avaliação indicou que ambos podem ser utilizados na detecção de QTLs de resistência ao CBC. Correlação significativa entre diferentes formas de avaliação também foi encontrada por Camargo et al. (1995) estudando QTLs de resistência em *Brassica oleracea* e por Ferreira et al. (1995) em *Brassica napus*.

Na avaliação por área de lesão foram encontrados 5 QTLs controlando resistência aos dois isolados, alguns dos quais também foram detectadas por Nodari et al. (1993b) (grupos D2, D7 e D9), além do grupo D5 encontrado na avaliação por nota. QTLs dos grupos D1 e D8 não foram detectados por estes autores. Isto pode ter ocorrido devido a variação ambiental, que pode ter interferido na detecção de QTLs, em regiões que anteriormente não foram significativas. A influência do ambiente na detecção de QTLs já foi relatada por vários autores (Webster et al., 1983; Paterson et al., 1991; Bubeck et al., 1993; Newcombe et al., 1996).

A porcentagem de variação fenotípica da resistência, explicada por nota, considerando todos os QTLs encontrados, foi muito alta, tendo em vista o tamanho da população estudada. Isto pode ser atribuído a ocorrência de epistase entre os QTLs. No entanto, epistasia não foi testada nestas linhagens, pois seria necessário um número maior de indivíduos. Outra hipótese que justificaria uma variação tão alta, seria a detecção de falsos QTLs, decorrentes de erro tipo I nas análises de variância. O nível de significância considerado neste trabalho ($p < 0,01$), no entanto, foi escolhido para amenizar erros deste tipo. Optando-se por níveis de significância mais altos (por exemplo, $p < 0,001$) aumenta a probabilidade de se cometer erro tipo II, ou seja, não detectar QTLs significativos.

A interação genótipo x isolado não foi significativa, indicando que os mesmos QTLs controlam a resistência para Xcp e Xcpf.

O QTL encontrado no grupo de ligação D7 também foi detectado por Nodari et al. (1993b) e Souza (1996). Este QTL explicou a maior porcentagem de variação fenotípica para a resistência ao CBC nos 3 trabalhos, podendo ser considerado de efeito principal. Entre os marcadores significativos neste grupo, estão a faseolina (PHS) e a chalcona isomerase (CHI). Esta última, assim como a chalcona sintetase (CHS), pertencente ao grupo D2 e também ligada a QTLs de resistência, são enzimas envolvidas na via metabólica dos fenilpropanóides, compostos envolvidos na resposta de defesa das plantas, catalizando a síntese de precursores de fitoalexinas. Estes compostos estão envolvidos em vários processos fisiológicos, incluindo proteção a raios UV-B e infecção microbiana (Akada & Dube, 1995). Ainda, estas enzimas são ativadas rapidamente em interações incompatíveis, e podem ou não ser ativadas na reação de compatibilidade (Jakobek et al., 1993; Willis et al., 1991). Embora Souza (1996) e Nodari et al. (1993b) também tenham encontrado o *locus* marcador da faseolina associado a resistência, nenhuma atribuição relacionada a defesa é conhecida para esta proteína, que é uma das principais proteínas de reserva na semente. No entanto, os outros marcadores CHI e CHS também encontrados por estes autores, são sondas oriundas de regiões transcritas associadas à defesa da planta.

Distorções na segregação da proporção mendeliana esperada foram encontradas para os marcadores D1862 (D1), D1315 (D1) e Bng204 (D7). Estes dois marcadores do grupo de ligação D1 também apresentaram distorção na avaliação de Nodari et al. (1993b). Estas distorções podem interferir na detecção de um QTL e na estimativa da contribuição deste para a característica estudada. Um dos fatores para essa distorção deve-se ao pequeno número de indivíduos genotipados neste trabalho. No entanto, semelhante resultado, com marcadores RFLPs e RAPDs, foi encontrado por Nodari et al. (1993b), Vallejos et al. (1992), Adam-Blondon et al. (1994) e Jung et al. (1996), mesmo utilizando populações maiores. Distorções na segregação são comumente encontradas em trabalhos envolvendo populações segregantes ou linhagens recombinantes e podem ser causadas por fatores genéticos ou resultantes de uma amostra pequena de indivíduos (Nodari et al., 1993a; Ferreira & Gratapaglia, 1995). Tais distorções são comumente

encontradas em várias outras culturas (Sandbrink et al., 1995; Heun et al., 1992; Landry et al., 1992; Camargo et al., 1995; Young et al., 1993; Paterson et al., 1990; Yu et al., 1995).

5.2 Ligação do comprimento do segundo internódio com resistência ao CBC

Os QTLs associados ao comprimento do segundo internódio coincidiram com os QTLs controlando resistência ao CBC (grupos de ligação D5, D7, D8 e D9), com exceção do QTL no grupo D3. Alelos de BAT-93 foram associados a menor comprimento do segundo internódio, enquanto que alelos de Jalo EEP558 foram associados a maior comprimento deste. Nos grupos de ligação D5 e D8, alelos de Jalo EEP558 (suscetível) conferiram resistência ao CBC e também foram responsáveis por um menor comprimento do segundo internódio, ao contrário do ocorrido nas outras regiões. Estes resultados evidenciam a ligação desta característica à resistência ao CBC para os isolados Xcp e Xcpf. No grupo de ligação D7, o comprimento do segundo internódio também foi ligado a resistência a Pst, na região dos marcadores PHS e D1861.

Em feijoeiro, outros trabalhos já descreveram ligação de resistência ao CBC e características morfológicas. Gepts et al. (1993) encontraram, no grupo de ligação D7, um QTL controlando peso de semente e resistência ao CBC. Jung et al. (1996), encontraram uma região genômica onde resistência ao CBC foi ligada ao hábito de crescimento determinado da planta e à cor da flor (Jung et al., 1997). Ligação de características morfológicas e resistência à doença já foi relatada em outros patossistemas, como por exemplo em *Brassica oleracea* onde QTLs de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foi ligado ao comprimento do pecíolo (Camargo et al., 1995).

A importância da ligação de uma característica morfológica à resistência relaciona-se ao fato de que plantas resistentes podem ser selecionadas baseadas na simples observação desta característica.

5.3 Resistência ao fogo selvagem

A variação dos valores encontrados nas linhagens e parentais para as duas características analisadas (área de clorose e área de necrose) não foram tão altos quanto os valores observados para Xcp e Xcpf. A reação de necrose, embora mais rápida em BAT-93, não foi significativa nas análises de variância quando comparada ao outro parental. Para detectar diferenças nesta análise, teria sido necessário avaliar o tempo de aparecimento da necrose. Como isto não foi avaliado, não foi possível detectar diferenças significativas somente considerando área foliar necrosada. No entanto, constatou-se diferenças significativas na área de clorose entre os parentais e linhagens. O parental suscetível a Xcp e Xcpf (Jalo EEP558) mostrou uma área de lesão clorótica maior do que a apresentada pelo parental resistente (BAT-93). Este fato pode estar relacionado a uma maior quantidade de bactéria sobrevivente na folha, o que já foi relatado por Ribeiro et al. (1979), e também a uma maior produção de toxina por estas bactérias. A produção de tabtoxina pelo patógeno, em sua forma biologicamente ativa (tabtoxinina β -lactam), inibe a ação da glutamina sintetase. Esta inibição causa acúmulo de amônia, formando halos cloróticos. Por outro lado, no parental resistente, a rápida necrose impede a proliferação das bactérias, assemelhando-se a uma reação de hipersensibilidade. Lindgren et al. (1992) relataram que todos os patovares de *P. syringae* induzem reação de hipersensibilidade em plantas não-hospedeiras. Sugerem ainda que a habilidade para induzir reação de hipersensibilidade e causar doença estão ligadas.

Foram encontrados 4 QTLs controlando a reação de clorose. Entre estes, os QTLs localizados nos grupos de ligação D7 e D9 também controlaram resistência a Xcp, Xcpf e o comprimento do segundo internódio. Nestes grupos de ligação, alelos do parental BAT-93 conferiram resistência a Xcp, Xcpf e Pst. No grupo de ligação D7, os mesmos marcadores foram significativos nas análises estatísticas, explicando a maior porcentagem de variação fenotípica na resistência ao CBC e ao fogo selvagem. Os genes envolvidos na resistência a estas doenças podem estar ligados ou serem resultado do efeito pleiotrópico de um mesmo gene. Estudos adicionais são necessários para esclarecer

estas hipóteses. Estes resultados demonstram a possível existência de “clusters” de genes localizados numa mesma região do genoma. Em feijoeiro, Jung et al. (1996) relataram ligação entre genes envolvidos na resistência ao CBC e a “mela” (ou murcha da teia micélica) em alguns locais do genoma. A existência desses “clusters” que controlam resistência a mais de um patógeno, já foi relatada em outros patossistemas (Choi et al., 1989; Hulbert & Bennetzen, 1991; Kesseli et al., 1993; Macmullen & Simcox, 1995; Jin et al., 1996; Reignault et al., 1996).

A contribuição deste trabalho na constatação de que um ou mais genes podem controlar a resistência a várias doenças é de fundamental importância para o melhoramento genético do feijoeiro. No caso do CBC e do fogo selvagem isto é de maior interesse, pois em ambas doenças o controle químico é ineficaz. Se considerarmos BAT-93 resistente a mais de uma doença, ele se constitui num cultivar de grande interesse para estudos genéticos de resistência do feijoeiro. Este estudo deve também ser estendido a outros patógenos e cultivares.

5.4 Número de nódulos

A média do número de nódulos (NN) apresentada pelas linhagens e parentais (BAT-93 e Jalo EEP558) foi baixa, comparando-se aos trabalhos de Nodari et al. (1993b) e Souza (1996), os quais trabalharam com a mesma população. Esse número mais baixo pode ser explicado pela diferença nas condições ambientais e época de condução dos experimentos. O experimento desenvolvido neste trabalho foi conduzido numa época mais fria, onde fatores como luminosidade, fotoperíodo, além da temperatura, podem ter interferido no desenvolvimento da planta e nas necessidades nutricionais da mesma.

Apesar de algumas linhagens apresentarem NN menor do que o parental com baixa nodulação (BAT-93) e alelos deste parental terem contribuído para alta nodulação no marcador D1476 (grupo D10), não foi observada segregação transgressiva. Estes dados concordam com os de Souza (1996), mas não com os dados de Nodari et al.

(1993b) que detectaram segregação transgressiva para maior e menor número de nódulos na população F_3 oriunda do mesmo cruzamento. No entanto, como mencionado anteriormente, o tamanho da população usada neste estudo (50 linhagens), as condições ambientais, entre outros fatores, podem ter interferido na detecção deste tipo de segregação. O efeito ambiental na detecção de QTLs para número de nódulos foi anteriormente relatada por Souza (1996) em condições de presença e ausência de nitrogênio.

Entre os 5 QTLs associados ao número de nódulos, dois (grupos D3 e D7) foram anteriormente associados à nodulação nos trabalhos de Nodari et al. (1993b) e Souza (1996) em diferentes níveis de nitrogênio. Os QTLs dos grupos D7 e D9 também estão associados à resistência a Xcp, Xcpf, Pst e ao comprimento do segundo internódio. Nestas regiões, pelo menos um dos marcadores encontrados foram comuns a todas as características. Isto enfatiza a idéia de que “clusters” de genes possam ocorrer nestas regiões genômicas. Estes “clusters” de genes poderiam controlar as interações planta-bactéria, independentemente se esta é patogênica ou simbiote. As respostas das plantas nas interações com microrganismos patogênicos assemelham-se muito com as interações simbióticas (Vance, 1983). Sabe-se que compostos flavonóides estão envolvidos em ambas, podendo ter tanto um efeito ativador quanto deletério para o *Rhizobium* e *Xanthomonas* (Nodari et al., 1993b).

O marcador CHI (D7), associado a todas as características, corresponde a enzima chalcona isomerase que, por sua vez, está envolvida na via biossintética dos fenilpropanóides e é uma das enzimas precursoras na síntese dos flavonóides (Mehdy & Lamb, 1987). Este marcador também foi significativo nos trabalhos de Nodari et al. (1993b) e Souza (1996) sendo que neste último, foi também associado à resistência ao CBC.

Os grupos de ligação D7 e D9 constituem-se em regiões de grande importância para futuros estudos de melhoramento, pois os marcadores presentes nestas regiões podem ser testados em outros cruzamentos e outras doenças, visando localizar genes de

resistência, além de possibilitar um estudo mais detalhado para esclarecer se estes genes estão ligados ou se o mesmo gene com efeito pleiotrópico.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados pode-se concluir:

1- O isolado de *X. campestris* pv. *phaseoli* (W18) é mais agressivo que *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (F2495-A);

2- Existem 5 QTLs controlando resistência a Xcp e Xcpf na avaliação por área de lesão e 6 QTLs na avaliação por nota e os mesmos QTLs controlam resistência a estas bactérias. Correlação significativa entre os critérios de avaliação, indica que ambos podem ser utilizados na detecção de QTLs de resistência ao cretamento bacteriano comum;

3- QTLs encontrados para comprimento do segundo internódio localizam-se nas mesmas regiões genômicas encontradas para resistência ao CBC, indicando que estas características estão ligadas;

4- A resistência a Pst foi estabelecida como oligogênica, sendo encontrados 4 QTLs envolvidos no controle da doença pela avaliação da área de clorose foliar;

5- O QTL localizado no grupo de ligação D7 possui um efeito principal na resistência ao CBC e ao fogo selvagem, pois explicou a maior variação fenotípica destas duas características;

6- Existem 5 QTLs controlando o número de nódulos em feijoeiro, sendo que três destes também estão associados a resistência a Xcp e Xcpf.

7- QTLs nos grupos de ligação D7 e D9 estão associados a resistência a Xcp, Xcpf, área de clorose causada por Pst e número de nódulos, indicando ligação entre estas características e sugerindo a ocorrência de “clusters” de genes numa mesma região do genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.-F.; SEVIGNAC, M.; DRON, M.; BANNEROT, H. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. **Genome**, v. 37, p.915-924, 1994.
- AGGOUR, A.R.; COYNE, D.P.; VIDAVER, A.K. Comparison of leaf and pod disease reactions of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated by different methods with strains of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) dye. **Euphytica**, v. 43, p.143-152, 1989.
- AKADA, S.; DUBE, S.K. Organization of soybean chalcone synthase gene clusters and characterization of a new member of the family. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.189-199, 1995.
- ARNAUD-SANTANA, E.; COYNE, D.P.; ESKRIDGE, K.M.; VIDAVER, A.K. Inheritance; low correlations of leaf, pod, and seed reactions to common beans, and implications for selection. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 119, n. 1, p. 116-121, 1994.
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.**, v.67, p.35-43, 1983.
- BUBECK, D.M.; GOODMAN, M.M.; BEAVIS, W.D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, v. 33, p.838-847, 1993.
- CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência oligogênica. In: 12^o 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 the field and greenhouse. **Phytopathology**, v.85, p.1296-1300, 1995.
- CECCATTO, V.M. Nodulinas e atividade enzimática em feijoeiro de origem mesoamericana e andina. Piracicaba. 1994. 61p. Dissertação (M.S.) - 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.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Manual de métodos de avaliação, seleção e manejo agrônômico: Simbiose leguminosa-rizóbio. Cali, Colômbia, 1988, 178p.
- CHOI, S.H.; GREEN, S.K.; LEE, D.R. Linkage relationship between two genes conferring resistance to peanut stripe to virus and soybean mosaic virus. **Euphytica**, v.44, p.163-169, 1989.
- COLLETA FILHO, H.D. Avaliação da fixação biológica do N₂ em genótipos de feijoeiro. Piracicaba, 1993. 72p. Dissertação (M.S.) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; BOUTIN, S.R.; HAUTEA, R.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Science**, v.34, p.240-246, 1994.
- CORONADO, C.; ZUANAZZI, A.S.; SALLAUD, C.; QUIRION, J.C.; ESNAULT, R.; HUSSON, H.P.; KONDOROSI, A.; RATET, P. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 533-542, 1995.
- 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.

- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L.; HILL, K. Genetic control of reaction to common blight bacterium in bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by age and bacterial multiplication. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.98, p.94-99, 1973.
- DAKORA, F.D.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiol.** v. 101, p. 819-824, 1993a.
- DAKORA, F.D.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 6, p. 665-668, 1993b.
- DURBIN, R. D. Toxins and Pathogenesis. In: Mount, M.S. & Lacy, G. H. **Phytopathogenic Prokaryotes**. v. 1, Academic Press, New York, p. 423-441, 1982.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.
- ENGST, K.; SHAW, P. D. Identification of a *lysA*-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain PTBR2.024. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, n. 4, p.322-329, 1992.
- FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Bioche.**, v. 132, p. 6-13, 1983.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995, 220p. (Documento 20).
- FERREIRA, M.E.; RIMMER, S.R.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. **Phytopathology**, v. 85, p.213-217, 1995.
- FINKE, M.L.; COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, v. 35, p. 969-982, 1986.

- GABRIEL, D.W.; KINGLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p.14-22, 1989.
- GEPTS, P.; NODARI, R.; TSAI, S.M.; KOINANGE, R.M.K.; LLACA, V.; GILBERTSON, R.; GUZMÁN, P. Linkage mapping in common bean. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.**, v.36, p.24-38, 1993.
- GOODWIN, P. H. Effect of common bacterial blight on leaf photosynthesis of bean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14, p.203-206, 1992.
- GOODWIN, P. H.; SOPHER, C. R.; MICHAELS, T. E. Multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and intercellular enzyme activities in resistant and susceptible beans. **Journal of Phytopathology**, v.143, p.11-15, 1995.
- HEUN, M. Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. **Genome**, v.35, p.1019-1025, 1992.
- HULBERT, S.H.; BENNETZEN, J.L. Recombination at the Rpl locus of maize. **Mol. Gen. Genetics**, v. 226, p. 337-382, 1991.
- 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. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.18, p. 339-364, 1994.
- 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.
- JIN, Y.; CUI, G.H.; STEFFENSON, B.J.; FRANCKOWIAK, J.D. New leaf rust resistance genes in barley and their allelic and linkage relationships with other *Rph* genes. **Phytopathology**, v.86, n.8, p.887-890, 1996.

- JUNG, G.; COYNE, D.P.; SKROCH, P.W.; NIENHIUS, J.; ARNAUD-SANTANA, E.; BOKOSI, J.; ARIYARATHNE, H.M.; STEADMAN, J.R.; BEAVER, J.S.; KAEPLER, S.M. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.121, n.5, p.794-803, 1996.
- JUNG, G.; SKROCH, P.W.; COYNE, D.P.; NIENHUIS, J.; ARNAUD-SANTANA, E.; ARIYARATHNE, H.M.; KAEPLER, S.M.; BASSET, M.J. Molecular-marker-based genetic analysis of tepary bean-derived common bacterial blight resistance in different developmental stages of common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.122, n.3, p.329-337, 1997.
- KESSELI, R.; WITSENBOER, H.; STAGHELLINI, M.; VANDERMARK, G.; MICHELMORE, R. Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radicis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p.722-728, 1993.
- KLEMENT, Z. Hypersensitivity In: M.S. Mount & G.H. Lacy, *Phytopathogenic procaryotes* v. 2, Academic Press, Inc., New York, 1982.
- KNIGHT, T. J.; DURBIN, R. D.; LANGSTON-UNKEFER, P. J. Effects of tabtoxinine- β -lactam on nitrogen metabolism in *Avena sativa* L. roots. **Plant Physiology**, v. 82, p. 1045-1050, 1986.
- LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. coord. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, POTAFOS, 1996, 786p.
- LANDRY, B.S.; HUBERT, N.; CRETE, R.; CHIANG, M.S.; LINCOLN, S.E.; ETOH, T. A genetic map 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.
- LAZO, G.R.; ROFLEY, R.; GABRIEL, D.W. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.214-221, 1987.

- LEVI, C.; DURBIN, R. D. The isolation and properties of a tabtoxin-hydrolysing aminopeptidase from the periplasm of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Physiology Plant Pathology**, v. 28, p. 345-352, 1986.
- LINDGREN, P. L.; PEET, R. C.; PANOPOULOS, N. J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 2, p. 512-522, 1986.
- MARINGONI, A. C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.164-167, 1994.
- MACMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n.6, p.811-815, 1995.
- 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.
- MICHELMORE, R.W. Isolation of disease resistance genes from crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p.145-152, 1995.
- 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.
- MOHAN, S. K. Ocorrência de fogo selvagem causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* nos feijoeiros do Paraná. In: **Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 1, Goiânia, EMBRAPA-CNPAF, 1982. p.296-297.
- NAKAMURA, K.; KIMATI, H. Crestamento fosco no Estado de São Paulo. **R. Soc. Bras. Fitopatol.**, v. 1, p. 40-48, 1967.
- NEWCOMBE, G., BRADSHAW, H.D., Jr., CHASTAGNER, G.A., STETTLER, R.F. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f. sp. *deltoideae* in a hybrid poplar pedigree. **Phytopathology**, v.86, p.87-94, 1996.

- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 513-520, 1993a.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Toward and integrated linkage map of common bean III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, v. 134, p. 341-350, 1993b.
- PARADELA FILHO, O.; CARVALHO, A. M. B. ; POMPEU, A. S. Ocorrência de *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* nos feijoeiros de São Paulo. **Bragantia**, v. 26, p.I-IV, 1967.
- PATERSON, A.H.; DAMON, S.; HEWIT, J.D.; ZAMIR, D.; RABINOWITCH, H.D.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; TANKSLEY, S.D. Mendelian factors underling quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, v. 127, p.181-197, 1991.
- PATERSON, A.H.; VERNA, J.W. de; LANINI, B.; TANKSLEY, S.D. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. **Genetics**, v. 124, p.735-742, 1990.
- PENG, T.; DICKSTEIN, R. Regulation of plant nodule-specific genes expressed in alfalfa nodules at an early stage of development. **Plant Science.**, v. 101, p. 65-73, 1994.
- PEREIRA, P.A.A.; ARAÚJO, 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.
- POMPEU, A. S.; CROWDER, L. V. Inheritance of resistance of *Phaseolus vulgaris* L. (dry beans) to *Xanthomonas phaseoli* Dows. (common blight). **Ciência e Cultura**, v. 24, n.11, p.1055-1063, 1972.

- RAVA, C. A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p. 445-448, 1984.
- RAVA, C. A. Crestamento bacteriano comum. In: ZIMMERMANN, M.J. de O., ROCHA, M., YAMADA, T. (Ed.) **Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. Piracicaba, São Paulo, 1988, 589p.
- RAVA, C. A., COSTA, J. G. C., SARTORATO, A., ZIMMERMANN, M. J. de O. Obtenção de linhagens de feijoeiro resistentes ao crestamento bacteriano comum originadas do cruzamento entre *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius*. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n.1, p.33-36, 1996.
- 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, 300 p. (EMBRAPA-CNPAF-Documento 50).
- 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. X, n.4, p. 709-727, 1987.
- REIGNAULT, P.; FROST, L.N.; RICHARDSON, H.; DANIELS, M.J.; JONES, J.D.G.; PARKER, J.E. Four *Arabidopsis* *RPP* loci controlling resistance to the *Noco2* isolate of *Peronospora parasitica* map to regions known to contain other *RPP* recognition specificities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.9, n.6, p.464-473, 1996.
- RIBEIRO, R. de L.D.; ROOBS, C. F.; KIMURA, O.; SUDO, S. Estudo sobre o agente de crestamento-com-halo ocorrendo em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. no Estado de São Paulo. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro**, v. 4, p. 7-13, 1974.
- RIBEIRO, R. de L. D., HAGEDORN, D. J., DURBIN, R. D., UCHYTIL, F. Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brazil. **Phytopathology**, v.69, p.208-212, 1979.
- ROOBS, C. F. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. **Agronomia**, v.12, p.231-233, 1954.

- SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria In: HALL, R., (Ed.) **Compendium of bean diseases**. The American Phytopathological Society (APS) PRESS, 1991. p.29-32.
- SALCH, Y. P.; SHAW, P. D. Isolation and characterization of pathogenicity genes of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 6, p. 2584-2591, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2^a edição. CSHL, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989.
- SANDBRINK, J.M.; OIJEN, J.W. van; 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.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v.8, p.552-560, 1923.
- 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.
- SILVA, L.O.; SINGH, S.P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Inheritance to bacterial blight in common bean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 78, p.619-624, 1989.
- SOUZA, A.A. de. Mapeamento de regiões genômicas associadas à nodulação e resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* sob dois níveis de adubação nitrogenada. Piracicaba, 1996. 79p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SPAINK, H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of symbiogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p. 345-368, 1995.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. **Plant and Soil**, v.161, p. 1-10, 1994.

- STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p.661-667, 1995.
- STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **Rev. Plant Sci.**, v. 7, p. 1-23, 1988.
- STUBER, C.W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. **Plant Breeding Rev.**, v.9, p.37-61, 1991.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Ann. Rev. Genet.**, v.27, p.205-233, 1993.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **BioTechnol.**, v.7, p.257-264, 1989.
- THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, v.191, p.368-370, 1961.
- 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.
- TURNER, J. G.; TAHA, R. R. Contribution of tabtoxin to the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Physiol. Plant. Pathol.**, v. 25, p. 55-69, 1984.
- 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 leaves and pods of *Phaseolus* germplasms to strains of *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from crosses of susceptible germplasms. **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 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.
- VINCENT, J.M. **Manual of practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 163p. (Internacional biology program, 15)

- WALLEN, V. R.; SUTTON, D.M. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* Starr & Burkh. on field beans in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.43, p.437-446, 1965.
- WEBSTER, D.M.; TEMPLE, S.R.; GALVEZ, G. Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* under tropical conditions. **Plant Disease**, v.67, n.4, p.394-396, 1983.
- WEBSTER, D.M.; TEMPLE, S.R.; SCHWARTZ, H.F. Selection for resistance to *Xanthomonas phaseoli* in dry beans. **Crop Science**, v.20, p.519-522, 1980.
- WILLIS, D.K.; RICH, J.J.; HRABAK, E.M. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, n.2, p.132-137, 1991.
- YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. coord. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, POTAFOS, 1996, 786p.
- YOSHII, K. Common and fuscous blights. In: Schwartz, H.F. & Galvez, G.E. **Bean production problems**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia, S.A., 1980.
- 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.
- ZAPATA, M.; WILKINSON, R.; FREYTAG, G.F.; VÉLEZ, H.; ORTIZ, F.H.; LÓPEZ-ROSA, J.H. Incorporating resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* into bean using the latent period as a resistance marker. **J. Agric. Univ. P. R.**, v. 75, n. 4, p. 345-352, 1991.

APÊNDICE

Apêndice 1- *Loci* marcadores utilizados para detecção de QTLs associados ao número de nódulos, ao comprimento do 2º internódio, à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Grupo de ligação	Marcador										
D1	D1662	D1862	D1315	D1327	D1032	D1228	D1308	D1291	D2027	D1630	D1512
D2	D1367	D1287	D0166	CHS	D1595	D1619					
D3	D1096	D1132	D1020	D1377	SKDH	D1151					
D4	ME	D1325	RBCS								
D5	D1080	D1461	DIAP	D1492	ACO2	D1157	D1301	D1251			
D6	D2062	D1086	D0096								
D7	Bng191	CHI	D1390	PHS	D1861	Bng204	D1107				
D8	D1505										
D9	GLUC	D1101	D1831	D1338							
D10	D1476										
D11	D0252										
D14	D1174										

PAL-5 - fenilalanina amônia liase-5 (marcador não mapeado)

CHS- chalcona sintetase

SKDH- shikimato dehidrogenase

ME- enzima málica

RBCS- ribulose bifosfato carboxilase

DIAP- diaforase

Aco 2- aconitase 2

CHI- chalcona isomerase

PHS- faseolina

GLUC- glucanase

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

Reagentes	g/l
Sacarose	10
Caseína	8
extrato de levedura	4
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
pH= 7,0	

Apêndice 3- Composição química da solução nutritiva de Sarruge diluída 4:1 e 3:1.

Soluções estoques (1M)	dil. (4:1) ml/l	dil. (3:1) ml/l
KH ₂ PO ₄	0,20	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,40	0,5
KCl	1,00	1,25
CaCl ₂	1,00	1,25
NH ₄ NO ₃	1,50	0,90
	(para 3mM)	(para 2 mM)
FeEDTA	0,20	0,25
Micronutrientes*	0,20	0,25

* Solução de micronutrientes (g/l): 2,86g H₃BO₃, 1,81g MnCl₂, 0,10g ZnCl₂, 0,04g CuCl₂, e 0,02g H₂MoO₄.H₂O.

Apêndice 4- Composição química do meio B de King para *Pseudomonas*.

Reagentes	Concentração
peptona	10g
K ₂ HPO ₄	0,75g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75g
glicerol	7,5ml
pH=7,0 - 7,2; volume total= 1000ml	

Apêndice 5- Quadro da análise da variância para área de lesão.

Causas da variação	Graus de Liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
isolado	1	247416,01	247416,01	27,79	0,00002
bloco	2	40961,64	20480,82	2,30	0,10334
linhagem	51	5992164,82	117493,43	13,20	0,00001
isoladoxbloco	2	4305,95	2152,97	0,24	0,78864
isoladoxlinhag	51	886524,65	17382,84	1,95	0,00238
blocoxlinhag.	102	902343,03	8846,50	0,99	0,51265
resíduo	102	908099,38	8902,93		
Total	311	8981815,49			

C.V.= 41,25%

Apêndice 6- Quadro da análise de variância para nota.

Causas da variação	Graus de Liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
isolado	1	502806,49	502806,49	422,36	0,00001
bloco	2	28092,95	14046,47	11,80	0,00010
linhagem	51	2463275,24	48299,51	40,57	0,00001
isol.x bloco	2	5240,38	2620,19	2,20	0,11384
isol. x linhag	51	105839,34	2075,28	1,74	0,00899
bloco x linhag	102	427740,38	4193,53	3,52	0,10010
resíduo	102	121426,28	1190,45		
Total	311	3654421,07			

C.V.= 13,07%

Apêndice 7 - Mapa de ligação de *Phaseolus vulgaris* L. proveniente de uma população F_2 do cruzamento entre BAT-93 x Jalo EEP558 (Gepts et al. 1993) e localização de QTLs associados à resistência a *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, *P. s. tabaci*, ao número de nódulos e ao comprimento do segundo internódio em linhagens recombinantes F_{8-9} .

Apêndice 8- Quadro da análise de variância para comprimento do 2º internódio.

Causas da variação	Graus de Liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
bloco	2	23384,93	11692,47	1,34	0,26485
linhagem	51	10278154,33	201532,44	23,14	0,00001
resíduo	102	888481,73	8710,60		
Total	155	11190020,99			

C.V.= 24,66%

Apêndice 9- Quadro da análise de variância para área de clorose causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Causas da variação	Graus de Liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
bloco	2	18120,78	9060,39	3,0971	0,04802
linhagem	51	441807,41	8662,89	2,9612	0,00002
resíduo	102	298398,55	2925,47		
Total	155	758326,74			

C.V.= 44,42%

Apêndice 10- Quadro da análise de variância para número de nódulos.

Causas da variação	Graus de Liberdade	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
bloco	2	2747,78	1373,89	3,2057	0,04332
linhagem	51	116506,76	2284,44	5,3303	0,00001
resíduo	102	43714,88	428,57		
Total	155	162969,43			

C.V.= 33,32%