

REGIÕES GENÔMICAS DO FEIJÃO ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA À MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM

LETÍCIA APARECIDA DE CASTRO LARA¹, IGOR ALMEIDA LIMA²; ROSANA PEREIRA VIANELLO BRONDANI³, ADRIANE WENDLAND FERREIRA⁴, JOÃO BOSCO DOS SANTOS⁵

RESUMO

Em condições de seca, o cultivo do feijoeiro comum sofre severa queda de produtividade, além de se tornar altamente vulnerável ao ataque de doenças, principalmente à murcha-de-curtobacterium. Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar regiões genômicas e mapeamento de marcadores microssatélites (SSR) associados à murcha-de-curtobacterium. Foram obtidas 135 progênies F_{5:7}, a partir do cruzamento entre os genitores Ouro Branco (resistente) e CNFP 10132 (suscetível). As progênies foram inoculadas com o isolado Unb 1252 na concentração de 10⁸ ufc/ml e classificadas em resistentes, intermediárias e suscetíveis. Os dados fenotípicos foram correlacionados com resultados genotípicos dos 10 primers polimórficos por meio da análise por ponto. Apenas o marcador K03289F/R foi significativo. O QTL identificado exibiu efeito genético essencialmente aditivo, explicando 8,3% da resistência.

Palavras-chaves: melhoramento do feijoeiro, QTL, patógeno, marcador SSR

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum destaca-se como uma cultura de grande valor nutricional, e como alimento acessível às populações de baixa renda. Em condições de seca, o cultivo do feijoeiro comum sofre severa queda de produtividade, além de se tornar altamente vulnerável ao ataque de doenças, principalmente à murcha-de-curtobacterium, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* (Hedges) Collins & Jones (Maringoni, 2002).

A bactéria *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* (Cff) infecta a planta por meio de sementes contaminadas, ferimentos e aberturas naturais. A progressão da doença decorre da obstrução dos feixes vasculares devido à colonização da bactéria, impedindo a passagem de água para as demais partes da planta, resultando no sintoma típico de escurecimento dos vasos, murcha e flacidez que se agrava nas horas mais quentes do dia, no qual ocorre maior estresse hídrico (Maringoni, 2002). A murcha na parte aérea é devido à falha no transporte de seiva provocada pela degradação das paredes dos vasos de xilema (Dinesen, 1978). A resistência genética é a melhor forma de controle dessa doença, por evitar o uso de defensivos bem como seu custo.

Estudos genéticos da resistência de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, em vários cruzamentos, têm demonstrado que a herança é de natureza poligênica (Coyne *et al.*, 1965), por isso é interessante a utilização da seleção assistida através de marcadores, com o intuito de identificar QTL's, se possível de grande efeito, responsáveis pela resistência, para auxiliar na seleção.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O cruzamento, condução da população segregante e inoculação das progênies foram realizados na Embrapa Arroz e Feijão em Santo Antônio de Goiás.

Foram utilizados dois genitores de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) o Ouro Branco (resistente) e CNFP 10132 (suscetível). Foi realizado um cruzamento simples em condições controladas obtendo-se a geração F₁ em novembro de 2007. Em dezembro de 2007 foi semeada em telado a geração F₁ e colhida em fevereiro de 2008 a geração F₂. Na época da seca (março) de 2008 foi semeada 1000

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, DBI/UFLA, letis440@yahoo.com.br

² Doutorando em Genética e Melhoramento de plantas, DBI/UFLA, igorlimalmeida@yahoo.com.br

³ Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, rosanavb@cnpaf.embrapa.br

⁴ Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, adrianew@cnpaf.embrapa.br

⁵ Professor Titular, DBI/UFLA, jbsantos@dbi.ufla.br

sementes da geração F₂ em telado e as sementes da geração F₃ foram colhidas em *bulk* em maio de 2008. Essa população foi semeada na época de inverno de 2008 (junho) no campo experimental em parcelas de 10 linhas de 5 metros e colhidas em setembro de 2008, obtendo-se assim a população F₄. As sementes F₄ foram semeadas em Ponta Grossa nas águas de 2008 (outubro) para obter a F₅ em fevereiro de 2009. Essa população foi avançada (SSD) até a geração F₇ durante a safra das águas e da seca no ano de 2009 onde as progênies recombinantes foram estabelecidas em março de 2010 e estas avaliadas para reação à doença em maio de 2010.

Em maio de 2010, 140 progênies F_{5:7} foram plantadas em vasos na casa de vegetação e 135 germinaram. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições (três vasos contendo três plantas) e uma testemunha inoculada com água destilada esterilizada. O método de inoculação utilizado foi a punção entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias das plantas, com agulha entomológica de ponta achatada previamente mergulhada na suspensão bacteriana de 10⁸ ufc/ml, determinada por espectrofotômetro de luz. A suspensão de inóculo do isolado Unb 1252 foi obtida de colônias bacterianas desenvolvidas em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), durante 72 h a 28°C (Wendland et al., 2009). A inoculação foi realizada dez dias após a semeadura e a incidência e severidade da doença foram avaliadas aos 14 dias após a inoculação das plantas. Além da contagem do número de plantas com sintomas, foram registrados os principais sintomas observados em cada planta. Tais sintomas corresponderam a mosaico e flacidez nas folhas, encarquilhamento dos bordos das folhas, murcha, nanismo e/ou morte das plantas, conforme figura 1. A incidência da doença foi avaliada utilizando-se a seguinte escala descritiva:

- 1- Ausência de sintomas;
- 2- Presença de mosaico nas folhas;
- 3- Flacidez nas folhas;
- 4- Encarquilhamento ou queima do bordo das folhas;
- 5- Mosaico ou flacidez acentuada nas folhas, leve nanismo das plantas (redução de menos de 1/3 do tamanho da planta);
- 6- Nanismo leve das plantas (redução menor que 1/3 do tamanho da planta);
- 7- Murcha nas folhas das plantas;
- 8- Murcha severa das plantas acompanhada ou não de nanismo severo (redução de mais de 1/3 no tamanho da planta);
- 9- Morte generalizada das plantas.

Para avaliação da severidade da doença utilizou-se o seguinte critério:

R – Resistente: Notas de severidade da doença variando entre 1 e 3

I – Intermediário: Notas de severidade da doença variando entre 4 e 6

S- Suscetível: Notas de severidade da doença variando entre 7 e 9



Figura 1- Sintomas de murcha-de-curtobacterium. A. Murcha; B. Nanismo; C. Morte generalizada; D. Danos causados em vasos condutores de seiva

Extração de DNA e reações em cadeia da polimerase (PCR)

A extração do DNA dos 135 indivíduos F_{5:7} foi realizada no laboratório de genética molecular do departamento de Biologia da UFLA, conforme Teixeira et al. (2005). Foram utilizados 181 marcadores SSR e 44 apresentaram polimorfismo significativo entre os genitores e estão sendo testados nos *bulks* e nos 135 indivíduos F_{5:7}.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

O *bulk* resistente foi constituído da mistura equitativa dos 24 DNA's referentes às plantas resistentes – notas inferiores a três na inoculação. Para o *bulk* suscetível também foram escolhidas as 24 progênies mais suscetíveis à doença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da avaliação dos sintomas, foram obtidos 24 progênies resistentes, 26 intermediários (moderada suscetibilidade) e 85 suscetíveis à murcha-de-curtobacterium. Um exemplo da fenotipagem de algumas progênies é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1-Fenotipagem de *Curtobacterium* de três das 135 progênies inoculadas

Vaso	Identificação	Nº de plantas com sintomas - Incidência ¹						Severidade	
		MO	FLA	QB	EB	MUR	NA	Nota	Reação
549	OB x 10132.197		3					3	R
550			3					3	
551			3					3	
Testemunha									
553	OB x 10132.198		3					3	I
554			3					3	
555			2		2	1		6	
Testemunha									
557	OB x 10132.200					3		8	S
558						3		8	
559						3		8	
Testemunha									

¹**MO:** Mosaico nas folhas; **FLA:** Flacidez nas folhas; **QB:** Queima dos bordos foliares; **EB:** Encarquilhamento dos bordos foliares; **MUR:** Murcha das plantas; **NA:** Nanismos nas plantas

Cada um dos 10 primers polimórficos foi submetido à análise por ponto. Apenas o primer SSR K03289F-R foi significativo, explicando 8,3% da resistência das 135 progênies F_{5:7} do feijoeiro, conforme Tabela 2. Nota-se que a região genômica identificada por esse marcador corresponde a um ou mais QTLs com efeito genético essencialmente aditivo. A pequena parcela da variação fenotípica explicada pelo marcador ocorreu porque somente 10 primers polimórficos foram utilizados.

Tabela 2-Análise de variância do primer K03289F-R

FV	GL	SQ	QM	F	R ²
Genético	2	58,5958	29,2728	5,5669*	8,3
aditivo	1	52,5958	52,5958	10,0022**	
dominante	1	5,9499	5,9499	1,1315	
Erro	132	694,1116	5,2584		
Total	134	752,6573			

*Significativo ao nível de 5%

** Significativo ao nível de 1%

CONCLUSÃO

Até o momento a resistência do feijão à murcha-de-curtobacterium foi pouco explicada apenas pelo primer K03289F-R. Nota-se que o QTL identificado exibiu efeito essencialmente aditivo.

Vale ressaltar que cerca de outros 30 primers polimórficos estão sob análise nesta população. Deste modo, espera-se que maior parcela da variação na reação ao patógeno seja explicada pelos marcadores.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. & YOUNG, J.O. A genetic study of bacterial wilt (*Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*) tolerance in *Phaseolus vulgaris* crosses and the development of tolerance to two bacterial diseases. **American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 87, p. 279-285, jun. 1965.

DINENSEN, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plants. In: Anais, **IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, Angers, pp.929-933. 1978

MARINGONI, A. C. Behaviour of dry bean cultivars to bacterial wilt. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 02, p. 157-162, mar./apr. 2002.

PEREIRA, H.S.; J.B. dos Santos; A. de F.B. Abreu; K.R. Couto. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 707-713, may. 2007.

TEIXEIRA, F.F.; SANTOS, J.B. dos; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B.; GUIMARÃES, C.T.; OLIVEIRA, A.C. de. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.5, p.272-278, apr. 2005.

WENDLAND A.; ALENCAR, N.E.; MELO, L.C.; COSTA, J.G.C.; PELOSO, M.J.D.; PEREIRA, H.S.; FARIA, L.C.; FERREIRA, E.P. de B.; CÔRTEZ, M.V.C.B. Symptom Pattern of Common Bean Genotypes inoculate with different isolates of *Curtobacterium flaccumfaciens* Pv. *Flaccumfaciens*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, USA, mar. 2009.