

## Mapeamento de QTLs para reação ao oídio e mancha-angular do feijoeiro-comum em diferentes locais<sup>(1)</sup>

Leonardo Cunha Melo<sup>(2)</sup>, João Bosco dos Santos<sup>(3)</sup> e Daniel Furtado Ferreira<sup>(4)</sup>

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram mapear, em diferentes locais, marcadores RAPD ligados a QTLs (Quantitative Trait Loci) de reação do feijoeiro-comum ao oídio e à mancha-angular, avaliar a interação de QTLs por locais e comparar os métodos de mapeamento e regressão múltipla no processo de detecção de QTLs. Foram avaliadas 196 linhagens recombinantes, oriundas do cruzamento entre as cultivares Carioca e Flor de Mayo, em duas épocas de cultivo: época da seca, para mancha-angular, e inverno para oídio, nos anos de 1996, 1997 e 1998, em dois locais de Minas Gerais. Foram conduzidos sete experimentos de avaliação fenotípica utilizando o delineamento experimental em látice quadrado simples. Os resultados mostraram que a interação QTLs por locais foi significativa, mas foram identificados alguns QTLs com maior estabilidade. O método da regressão múltipla detectou maior número de marcadores ligados a QTLs do que o processo de mapeamento por intervalo composto; não houve concordância entre os resultados apresentados pelos dois métodos. Os marcadores que se mostraram mais estáveis e promissores para serem utilizados em programas de seleção assistida foram OPR02-832, OPD08-759 e OPN10-851 para reação a oídio; OPN02-436, e OPN07-1072 para reação à mancha-angular.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, marcadores genéticos, DNA, variação genética, doenças das plantas.

### Mapping QTLs for reaction to powdered mildew and to angular leaf spot in common beans under different environments

Abstract – The objectives of this work were to identify, under different environments, RAPD markers linked to QTLs (Quantitative Trait Loci) that control the reaction to powdered mildew and to angular leaf spot a segregating population of common beans, to evaluate the existence of interactions involving QTLs with planting dates and to compare detection procedure of markers linked to QTLs utilizing the methods of mapping and multiple regression. One hundred and ninety-six recombinant inbred lines derived from the cross of cultivars Carioca x Flor de Mayo under two traditional sowing dates were evaluated for common beans (drought for evaluating the angular leaf spot, and winter for evaluating the powdered mildew) in 1996, 1997 and 1998, in two localities of Minas Gerais State, Brazil. For the phenotypic evaluation of the families, seven field experiments were conducted. The experimental design used was a 14x14 partially balanced square simple lattice. Results indicated that interaction of QTLs by local were significant, and some QTLs with stability were identified. Multiple regression analysis identified a greater number of QTLs-linked markers than the process of composite interval mapping. There was no coincidence between results obtained with the two methods for the majority of the traits studied. Molecular markers which were considered of greater potential use on marker-assisted selection were OPR02-832, OPD08-759 and OPN10-851 for reaction to powdery mildew and OPN02-436, and OPN07-1072 for reaction to leaf blight.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, genetic markers, DNA, genetic variation, plant diseases.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 23 de novembro de 2001.

Extraído da tese de doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Lavras (Ufla), Lavras, MG.

<sup>(2)</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências

Agrárias, Caixa Postal 593, CEP 38400-902 Uberlândia, MG. E-mail: lcmelo@umuarama.ufu.br

<sup>(3)</sup> Ufla, Dep. de Biologia, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: jbsantos@ufla.br

<sup>(4)</sup> Ufla, Dep. de Ciências Exatas. E-mail: danielff@ufla.br

## Introdução

A mancha-angular e o oídio foram consideradas doenças de pouca nocividade, por ocorrerem, mais freqüentemente, no final do ciclo da cultura do feijoeiro-comum, e por acreditar-se que causavam pequenas perdas na produtividade. Entretanto, nos últimos anos, aumentaram sua perniciosidade, e podem acarretar perdas de até 70%, dependendo da suscetibilidade das cultivares, da patogenicidade dos isolados e condições ambientais (Sartorato & Rava, 1994).

No desenvolvimento de cultivares resistentes, pode-se eliminar as dificuldades de inoculação do patógeno e de avaliação fenotípica das plantas por meio da identificação direta de genótipos resistentes. Isso é possível quando se utilizam marcadores moleculares que segregam conjuntamente com os alelos de resistência.

O feijoeiro-comum é uma espécie com um genoma considerado pequeno, estimado em 637 mpb ou 0,66 pg/1C (Arumuganatham & Earle, 1991), o que corresponde a aproximadamente 1.200 cM de distância física por mapeamento (Vallejos et al., 1992). Também foi estimado, via cinética de reassociação do DNA, que 60% do genoma do feijoeiro-comum é composto de seqüências de cópia simples (Talbot et al., 1984). Supõe-se que essas características facilitem a obtenção de marcadores moleculares distribuídos por todos os cromossomos, o que aumentaria a possibilidade de detecção dos QTLs (Quantitative Trait Loci), pois pode-se conseguir mapas genéticos altamente saturados.

Em espécies tolerantes à endogamia severa, pode-se avaliar as famílias obtidas por autofecundações sucessivas (Burr & Burr, 1991). As vantagens são o fato de que as linhas homozigóticas (linhagens recombinantes) podem ser multiplicadas e avaliadas com maior precisão, e a multiplicação de genótipos permite estudos de interação QTLs x ambientes, facilitando inclusive o intercâmbio de material entre pesquisadores (Lanza et al., 2000). Em feijoeiro-comum, existem vários trabalhos (Melo et al., 1997) que relatam a existência de forte interação de genótipos por ambientes para as principais características utilizadas no melhoramento desta espécie.

O mapeamento por meio da análise por intervalo clássico (Lander & Botstein, 1989) é uma das estra-

tégias para detectar poligenes sob delineamentos genéticos envolvendo cruzamentos controlados. No mapeamento por intervalo clássico, outros QTLs ligados ao intervalo em questão interferem no processo de estimação, podendo detectar QTLs não-existentes. Zeng (1993) propôs que se usasse um modelo de regressão múltipla para eliminar esses efeitos, criando assim o método de mapeamento por intervalo composto.

Os objetivos desse trabalho foram: mapear, em diferentes épocas de cultivo, marcadores RAPD ligados a QTLs controladores da reação do feijoeiro-comum ao oídio e à mancha-angular em uma população segregante; avaliar a existência de interação entre QTLs e locais, e, comparar os processos de detecção dos marcadores ligados aos QTLs, utilizando o método de mapeamento por intervalo composto e o método de regressão múltipla.

## Material e Métodos

Foram utilizadas 196 famílias oriundas do cruzamento entre os genitores Carioca (conjunto gênico 3) e Flor de Mayo (conjunto gênico 6). A cultivar Carioca apresenta sementes pequenas, de coloração bege com estrias marrons, hábito de crescimento indeterminado do tipo III e faseolina tipo S, e a Flor de Mayo apresenta sementes médias, de coloração bege com estrias rosa, hábito de crescimento indeterminado tipo IV, e faseolina S (Singh, 1988).

A partir da geração F<sub>1</sub> foram obtidas as gerações F<sub>2</sub> até F<sub>5</sub> as quais foram sendo conduzidas pelo método da população. Na geração F<sub>5</sub>, foram coletadas 30 sementes de 196 plantas individuais, tomadas ao acaso, originando as 196 famílias F<sub>5;6</sub>. Estas famílias foram multiplicadas por um ciclo, originando as famílias F<sub>5;7</sub>.

As famílias foram avaliadas em duas épocas tradicionais de cultivo do feijoeiro-comum (seca, visando a avaliação da mancha-angular, e inverno, para avaliação do oídio) nos anos de 1996, 1997 e 1998, na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (Ufla), em Lavras, MG, e na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), em Patos de Minas, MG.

Para a avaliação fenotípica das famílias, foram conduzidos sete experimentos (quatro visando à avaliação da mancha-angular e três, para avaliação do oídio). Foi utilizado o delineamento experimental em látice quadrado (14x14) parcialmente balanceado, com duas repetições. Cada parcela foi constituída por duas linhas de 2 m, com espaçamento de 50 cm entre linhas e 15 sementes por metro.

A reação aos patógenos foi avaliada por meio da nota média atribuída por quatro avaliadores, na época de incidência e severidade máxima das doenças. Para ambas, as notas de severidade variaram de 1 a 9, segundo a escala utilizada por Rezende et al. (1999).

Inicialmente, foram realizadas análises de variância em cada experimento, considerando os efeitos das famílias como sendo aleatório. Posteriormente, foi realizada uma análise conjunta de variância por doença, utilizando as médias ajustadas das análises individuais; o efeito de épocas foi considerado como fixo, conforme apresentado por Vencovsky & Barriga (1992). A partir das esperanças dos quadrados médios, foram estimadas as variâncias genéticas e fenotípicas, e os parâmetros genéticos: herdabilidade no sentido amplo, coeficiente de variação genética e o coeficiente *b* (Vencovsky & Barriga, 1992). Quanto à herdabilidade, foram estimados os limites inferior e superior dos intervalos de confiança, com coeficiente de confiança de 0,95 (Knapp et al., 1985).

A extração e quantificação de DNA e a obtenção dos marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram realizadas conforme os procedimentos descritos por Nienhuis et al. (1995). Foram utilizados 42 primers selecionados previamente pela genotipagem dos pais. As bandas polimórficas foram classificadas como intensa, média ou fraca, com base na resolução e grau de amplificação. Só bandas classificadas como intensas ou médias foram incluídas na análise. Esses primers geraram pelo menos uma banda polimórfica entre as famílias, produzindo 92 produtos de amplificação (bandas) polimórficos. O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) dos 92 marcadores mostrou que 20 deles não apresentaram segregação mendeliana, e portanto foram descartados. Dos 72 marcadores restantes, nove foram descartados, por apresentarem muitas observações perdidas (mais de oito), restando 63 para serem analisados (Tabela 1).

Foi realizada uma análise de regressão múltipla envolvendo os marcadores com segregação mendeliana em cada experimento, e também com as médias de cada local de cultivo, separadamente, além da análise envolvendo as médias dos experimentos, para ambas as doenças.

A análise de regressão linear múltipla foi realizada conforme procedimentos descritos por Edwards et al. (1987), que consideram os marcadores moleculares como variáveis independentes e as características fenotípicas como variáveis dependentes. Os marcadores estatisticamente significativos foram obtidos através de valores do *F* parcial ( $P < 0,05$ ) e a porcentagem de variação explicada por eles foi estimada pelo coeficiente de determinação parcial (Draper & Smith, 1981).

A construção de um mapa genético de ligação foi realizada utilizando-se o programa Mapmaker (Lander et al.,

1987), versão 3.0, com um lod score (log of odds-ratio) de 4,8 e distância máxima de 50 cM, que forneceu um valor de  $\alpha$  de aproximadamente 1%. A função-mapa de Haldane (1919) foi empregada para calcular as distâncias genéticas em centimorgans (cM).

Após a construção do mapa genético, procedeu-se ao mapeamento dos QTLs por meio do programa QTL Cartographer para Windows (versão 1.01). O mapeamento foi feito por experimento, com as médias de cada local, separadamente, além da análise envolvendo as médias dos experimentos.

Utilizou-se o método de mapeamento por intervalo composto (CIM) (Jansen, 1993; Zeng, 1993), que é uma combinação do mapeamento por intervalo e uma regressão linear múltipla, utilizando os marcadores como variáveis regressoras. O processo de Stepwise foi empregado para seleção das variáveis regressoras na regressão múltipla, dentro do mapeamento por intervalo composto, com um valor de lod score de 2,6, para assumir um QTL como participante do controle genético do caráter analisado.

## Resultados e Discussão

### Avaliação fenotípica

A maioria das famílias analisadas foi suscetível ao oídio. Foram identificadas 17 famílias que tinham alta resistência (nota menor que 3), indicando existir variabilidade. Sobre o controle genético da reação ao oídio, Rezende et al. (1999) e Rezende (2000) indicam a existência de alguns genes de efeito maior, que conferem resistência vertical, e outros, de efeito menor, que conferem resistência parcial ou quantitativa. O genitor Carioca possui alelos de resistência vertical. Supõe-se que o Flor de Mayo possui alelos de resistência parcial, visto que, em alguns ensaios experimentais esse genitor apresentou moderada suscetibilidade ao patógeno. Os altos valores das estimativas do coeficiente *b* e da herdabilidade encontrados neste trabalho sugerem que o controle genético da reação ao oídio se deva a poucos genes (Tabela 2). Essas estimativas indicam haver variabilidade genética entre as famílias suficiente para se obter sucesso com a seleção de plantas ou famílias resistentes.

A população analisada é mais suscetível à mancha-angular do que ao oídio, visto que as médias das notas para reação à mancha-angular foram superiores às notas de reação a oídio (Tabela 2). Quanto à

**Tabela 1.** Tamanho do marcador (pares de bases), número de famílias genotipadas (NFG), número observado de famílias com a presença do marcador (NOFM) e sem a presença (NOFSM), número esperado de famílias com a presença do marcador (NEFM) e sem a presença (NEFSM), e valor do teste de qui-quadrado ( $\chi_c^2$ ) relativos aos marcadores analisados. Lavras, 2000.

Marcador <sup>(1)</sup>	Tamanho	NFG	NOFM	NOFSM	NEFM	NEFSM	$\chi_c^{2(2)}$
OPAA-09	1.059	188	114	74	100	88	4,29
OPB-07 <sup>1</sup>	676	196	128	68	104	92	11,8
OPB-07 <sup>2</sup>	631	196	111	85	104	92	1,00
OPB-18	1.412	189	122	67	100	89	10,3
OPD-08	759	194	83	111	103	91	8,28
OPE-15 <sup>1</sup>	851	196	88	108	104	92	5,24
OPE-15 <sup>2</sup>	427	196	123	73	104	92	7,40
OPE-20 <sup>1</sup>	1.585	196	101	95	104	92	0,18
OPE-20 <sup>2</sup>	891	196	108	88	104	92	0,33
OPF-10	1.000	196	125	71	104	92	9,03
OPG-04	1.259	196	128	68	104	92	11,8
OPG-16 <sup>1</sup>	851	193	125	68	102	91	11,0
OPG-16 <sup>2</sup>	676	191	117	74	101	90	5,38
OPG-16 <sup>3</sup>	602	192	95	97	102	90	1,02
OPG-19	851	189	91	98	100	89	1,72
OPH-02	1.094	196	111	85	104	92	1,00
OPH-03 <sup>1</sup>	1.318	196	115	81	104	92	2,48
OPH-03 <sup>2</sup>	1.258	196	85	111	104	92	7,40
OPH-03 <sup>3</sup>	1.112	196	81	115	104	92	10,8
OPH-03 <sup>4</sup>	759	196	128	68	104	92	11,8
OPH-03 <sup>5</sup>	562	196	127	69	104	92	10,8
OPI-03	955	196	126	70	104	92	9,91
OPI-06	480	194	82	112	103	91	9,13
OPI-07	631	195	126	69	103	92	10,8
OPJ-04	2.344	195	93	102	103	92	2,06
OPM-06 <sup>1</sup>	1.096	194	111	83	103	91	1,32
OPM-06 <sup>2</sup>	871	194	112	82	103	91	1,68
OPM-06 <sup>3</sup>	575	194	91	103	103	91	2,98
OPN-02 <sup>1</sup>	1.445	195	125	70	103	92	9,96
OPN-02 <sup>2</sup>	436	195	91	104	103	92	2,96
OPN-07 <sup>1</sup>	1.698	196	83	113	104	92	9,03
OPN-07 <sup>2</sup>	1.445	196	120	76	104	92	5,24
OPN-07 <sup>3</sup>	1.072	196	115	81	104	92	2,48
OPN-07 <sup>4</sup>	741	196	80	116	104	92	11,8
OPN-07 <sup>5</sup>	661	196	109	87	104	92	0,51
OPN-10	851	192	96	96	102	90	0,75
OPO-04	1.905	192	115	77	102	90	3,53
OPO-06	1.778	195	87	108	103	92	5,27
OPO-10 <sup>1</sup>	2.951	193	96	97	102	91	0,75
OPO-10 <sup>2</sup>	1.479	195	117	78	103	92	4,03
OPO-10 <sup>3</sup>	525	196	117	79	104	92	3,46
OPO-12	1.412	195	80	115	103	92	10,9
OPO-13 <sup>1</sup>	1.698	196	96	100	104	92	1,31
OPO-13 <sup>2</sup>	1.318	196	118	78	104	92	4,02
OPO-19 <sup>1</sup>	1.636	195	97	98	103	92	0,74
OPO-19 <sup>2</sup>	1.412	196	108	88	104	92	0,33
OPO-20 <sup>2</sup>	1.698	190	91	99	101	89	2,11

*Continua...*

**Tabela 1.** Continuação.

Marcador <sup>(1)</sup>	Tamanho	NFG	NOFM	NOFSM	NEFM	NEFSM	$\chi^2_{e(2)}$
OPO-20 <sup>3</sup>	1.585	189	96	93	100	89	0,34
OPO-20 <sup>4</sup>	933	190	97	93	101	89	0,34
OPO-20 <sup>5</sup>	741	190	99	91	101	89	0,08
OPR-02 <sup>1</sup>	1.230	192	118	74	102	90	5,35
OPR-02 <sup>2</sup>	832	192	79	113	102	90	11,1
OPR-12 <sup>1</sup>	3.200	193	100	93	102	91	0,08
OPR-12 <sup>2</sup>	1.072	194	121	73	103	91	6,71
OPR-12 <sup>3</sup>	1.000	193	80	113	102	91	10,1
OPR-12 <sup>4</sup>	794	193	116	77	102	91	4,08
OPS-10 <sup>1</sup>	794	196	90	106	104	92	4,02
OPS-10 <sup>2</sup>	562	196	117	79	104	92	3,46
OPS-13 <sup>1</sup>	1.950	195	104	91	103	92	0,02
OPS-13 <sup>2</sup>	1.122	195	91	104	103	92	2,96
OPS-16	640	193	86	107	102	91	5,32
OPS-19	1.122	194	101	93	103	91	0,08
OPW-11	676	191	86	105	101	90	4,73

<sup>(1)</sup>Refere-se ao tamanho do fragmento de DNA utilizado como marcador: quanto menor o expoente, maior o tamanho; a ausência de expoente significa que este primer forneceu apenas um marcador. <sup>(2)</sup>Valor do  $\chi^2 = 11,96$  ( $\alpha = 5\%$ , com correção de Bonferroni).

**Tabela 2.** Resumo das análises conjunta de variância e estimativas do coeficiente de variação genética (CVg), relação entre coeficiente de variação genética e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS), para reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e à mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*). Lavras e Patos de Minas, 1996 a 1998.

Fontes de variação	Graus de liberdade	QM	
		Oídio	Mancha angular
Locais (L)	1	311,98**	85,22**
Famílias (F)	195	7,24**	2,20**
L x F	195	2,90**	0,70**
Erro médio	507	0,36	0,54
Média		4,70	5,43
CVe (%)		12,76	13,53
CVg (%)		22,78	9,69
b		1,78	0,72
$h_a^2$ (%)		95,03 (59,94) <sup>(1)</sup>	75,45 (68,18) <sup>(1)</sup>
LI ( $h_a^2$ )		93,68	68,79
LS ( $h_a^2$ )		96,04	80,46

<sup>(1)</sup>Estimativa da herdabilidade considerando os fatores do modelo como aleatórios. \*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

mancha-angular, o controle genético é exercido por alguns genes de efeito maior que conferem resistência vertical (Ferreira et al., 1999), e outros genes de efeito menor que conferem uma resistência do tipo parcial ou quantitativa (Sartorato & Rava, 1994). Com

relação aos genitores deste estudo, não existe referência da presença de gene que confira resistência vertical, uma vez que a pequena tolerância observada nesse estudo se deve basicamente ao acúmulo de alguns alelos de resistência de pequeno efeito, que conferem resistência parcial. Na média, nenhuma família se mostrou resistente; no entanto, houve, em alguns experimentos específicos, famílias com moderado nível de resistência (notas de 2,5 a 3).

Provavelmente, o número de genes que controlam a reação da planta à mancha-angular é superior ao número de genes que controlam a reação ao oídio, pois as estimativas do coeficiente b e da herdabilidade para mancha-angular foram inferiores às obtidas em relação ao oídio (Tabela 2).

Dada a reduzida variabilidade genética entre as famílias para reação à mancha-angular, a fim de aumentar as chances de sucesso com a seleção de plantas ou famílias resistentes na população segregante, recomenda-se realizar seleção assistida por marcadores, visando complementar a informação fenotípica gerada pelas avaliações no campo. Lande & Thompson (1990) comentam que quanto menor a herdabilidade do caráter a ser selecionado, maior será a eficiência da seleção assistida por marcadores em relação à seleção somente com avaliação fenotípica, o que, mais uma vez, reforça os benefícios de se mapear

QTLs de reação à mancha-angular, e, em seguida, utilizá-los em programa de seleção assistida por marcadores. Além disso, o grande número de patótipos do agente causal da mancha angular propicia uma instabilidade da resistência vertical, aumentando assim a importância da resistência parcial e, conseqüentemente, aumentando a importância do mapeamento de QTLs para reação à mancha-angular no feijoeiro-comum.

A análise conjunta de reação a ambas doenças em locais de cultivo mostrou existir interação significativa entre famílias x locais (Tabela 2). A correlação entre as médias das famílias nos dois locais foi de 43,80% para oídio e 37,98% para mancha-angular, o que indica que a maior parte da interação dessas características é do tipo complexa (Ramalho et al., 1993). Assim, com essa baixa correlação, aumentam as chances de o material superior em um ambiente não o ser em outro.

Para confirmar o efeito da interação famílias versus locais, foi calculada a herdabilidade considerando os fatores do modelo como aleatórios (Vencovsky & Barriga, 1992). Dessa forma, obteve-se a estimativa da herdabilidade, livre dos efeitos da interação. Com relação à reação ao oídio, a herdabilidade estimada foi de 59,94%, e quanto à reação à mancha-angular, foi de 68,18%, o que confirma o efeito da interação nestas doenças. A ocorrência da interação pode ser devida principalmente às diferenças na quantidade e na qualidade (diferentes patótipos) dos isolados presentes nos dois locais, visto que a avaliação foi realizada com incidência natural do patógeno.

### **Análise de regressão linear múltipla para reação à mancha-angular**

No primeiro experimento (Lavras - F<sub>8</sub> - seca - 1997) a análise identificou três marcadores ligados a QTLs (Tabela 3). O marcador OPE-20<sup>2</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (5,62%) desse caráter nesse experimento. Os marcadores em conjunto conseguiram explicar 14,41% desta variação. No segundo experimento também foram identificados três marcadores ligados a QTLs, e nenhum explicou mais de 3,5% da variação genética. No terceiro, foram quatro marcadores ligados a QTLs. O marcador OPR-12<sup>1</sup> foi o que explicou a maior parte da variação

genética (7,11%), mas em conjunto, todos os marcadores explicaram 16,04% da variação genética desse caráter. Nenhum dos marcadores identificados em um experimento se repetiu em outro, o que indica forte interação QTLs por ambientes (locais), como foi verificado nos resultados anteriores (Tabela 2). Com relação a esse caráter, uma das causas da interação QTLs x locais pode ser a ocorrência de patótipos diferentes ou mesmo às diferenças nas condições ambientais de desenvolvimento das doenças manifestadas nos diferentes locais.

A análise de regressão conjunta identificou cinco marcadores ligados a QTLs que controlam a reação do feijoeiro-comum à mancha-angular, e todos explicando menos de 5% da variação genética entre famílias. Os cinco marcadores em conjunto explicaram 16,57% dessa variação. O marcador OPH-03<sup>4</sup> não foi identificado nos experimentos que avaliaram essa característica, mas o foi na análise conjunta. Provavelmente, trata-se de um QTL estável, mas de pequeno efeito, o que fez com que ele fosse identificado somente na análise com as médias gerais, na qual teve seu efeito final amplificado. A interação observada de famílias com locais, e também a pequena variabilidade deste caráter, explicam o pequeno número de marcadores estáveis e de grande efeito, identificados neste trabalho (Tabela 2). O grande número de QTLs com efeito positivo, ou seja, de aumentar a severidade da doença, talvez se deva ao baixo nível de resistência das famílias. Entretanto, alguns QTLs reduziram a severidade da doença, entre eles o OPN-02<sup>2</sup>, e podem contribuir para a obtenção de cultivares de feijoeiro-comum mais resistentes à mancha-angular.

### **Análise de regressão linear múltipla para reação ao oídio**

No primeiro experimento (Lavras - F<sub>7</sub> - inverno - 1996) foram identificados nove marcadores ligados a QTLs (Tabela 4). O marcador OPR-02<sup>2</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (27,41%) nesse experimento. Os marcadores em conjunto conseguiram explicar 63,86% dessa variação. Comprova-se, assim, o potencial que os marcadores moleculares têm para se tornarem um instrumento importante no processo de seleção dentro de um pro-

grama de melhoramento. Somente um marcador explicou quase um terço de toda a variação genética, e todos os marcadores, praticamente dois terços dessa variação. As estimativas do parâmetro b e da herdabilidade para reação ao oídio foram elevadas em todos os experimentos e também na análise conjunta (Tabela 2), o que contribuiu para a identificação de marcadores que explicam grande parte da variação genética.

No segundo experimento, identificaram-se apenas dois marcadores ligados a QTLs, explicando no máximo 5% da variação genética. No terceiro experimento, foram três marcadores ligados, todos, no sentido de reduzir a ocorrência de oídio, sendo que nenhum marcador explicou mais do que 4,5% da variação genética. Apenas um dos marcadores (OPD-08) foi detectado em todos os três experimentos. A identificação de vários QTLs específicos indica a ocorrência de forte interação QTLs por ambientes (locais), como verificado nos resultados anteriores (Ta-

bela 2). A cultivar Carioca, que se tem mostrado resistente ao oídio na maioria dos locais em que é cultivada, foi suscetível ao patógeno em Patos de Minas, o que sugere a ocorrência de diferentes patótipos nesses locais, contribuindo para o aumento da interação QTLs x ambientes, e portanto, devem existir QTLs de resistência específica à raças que ocorrem em apenas um local.

A análise de regressão conjunta identificou oito marcadores ligados a QTLs. O marcador OPR-02<sup>2</sup> explicou 13,42% da variação genética. Os oito marcadores explicaram 38,56% desta variação. Mesmo o marcador OPR-02<sup>2</sup>, identificado somente no primeiro experimento, manteve-se significativo na análise conjunta, o que é importante para seleção em vários ambientes.

A interação de famílias com locais e, também, a restrita variabilidade com relação a esse caráter explicam o pequeno número de marcadores estáveis (Tabela 2). O QTL ligado ao marcador OPR-02<sup>2</sup>, ape-

**Tabela 3.** Resumos das análises de regressões para reação à mancha-angular utilizando o processo Stepwise para seleção dos marcadores. Lavras e Patos de Minas, 1997/1998.

Marcadores	Estimativas dos parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro-padrão	Teste t
Lavras, F <sub>8</sub> , seca, 1997				
Intercepto	4,76		0,17	28,64*
OPE-20 <sup>2(1)</sup> (891 pb)	0,76	0,0562	0,17	4,53*
OPO-13 <sup>2</sup> (1.318 pb)	0,38	0,0334	0,16	2,39*
OPN-02 <sup>2</sup> (436 pb)	-0,54	0,0545	0,16	-3,45*
Patos de Minas, F <sub>8</sub> , seca, 1997				
Intercepto	5,71		0,12	47,14*
OPF-10 (1.000 pb)	-0,25	0,0271	0,11	-2,22*
OPR-02 <sup>1</sup> (1.230 pb)	0,22	0,0256	0,11	2,02*
OPO-20 <sup>3</sup> (1.585 pb)	0,28	0,0342	0,11	2,62*
Lavras, F <sub>10</sub> , seca, 1998				
Intercepto	4,99		0,13	37,74*
OPN-07 <sup>5</sup> (661 pb)	0,31	0,0270	0,11	2,71*
OPR-12 <sup>1</sup> (3.200 pb)	0,46	0,0711	0,11	4,19*
OPR-12 <sup>3</sup> (1.000 pb)	-0,41	0,0306	0,13	-3,11*
OPS-13 <sup>1</sup> (1.950 pb)	0,31	0,0317	0,13	2,34*
Média geral				
Intercepto	4,86		0,16	31,29*
OPE-20 <sup>2</sup> (8.991 pb)	0,46	0,0475	0,11	4,17*
OPO-13 <sup>2</sup> (1.318 pb)	0,22	0,0333	0,11	2,05*
OPN-02 <sup>2</sup> (436 pb)	-0,24	0,0253	0,11	-2,29*
OPH-03 <sup>4</sup> (759 pb)	0,26	0,0301	0,12	2,28*
OPR-12 <sup>1</sup> (3.200 pb)	0,32	0,0295	0,11	3,01*

<sup>(1)</sup>Tamanho do fragmento de DNA utilizado como marcador (banda): quanto menor o expoente, maior o tamanho; a ausência de expoente significa que este primer forneceu apenas um marcador. \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

sar do grande efeito, sofre grande influência da interação com locais; é este o comportamento da maioria dos QTLs identificados, fato, este, que leva à redução da variação genética explicada quando se avalia o comportamento na média dos experimentos. No entanto, o marcador OPD-08 foi o único que se manifestou em todos os experimentos e também na análise conjunta; isto indica maior estabilidade, apesar de ser um pequeno efeito (em média 6,5%). O grande número de QTLs com efeito positivo, provavelmente, é devido ao baixo nível de resistência demonstrado pelas famílias. Mesmo não sendo tão eficiente, pode-se selecionar para a ausência do marcador.

No caso de QTLs que são responsáveis por reação a patógenos, tanto os de efeitos gerais quanto os específicos por ambientes, são úteis em um programa de melhoramento, uma vez que a ocorrência de diferentes patótipos nos vários ambientes é a principal causa da interação genótipos x ambientes, e por isso, muitas vezes se justifica a realização de seleção especificamente em um determinado local. Assim, pode-se utilizar as informações dos QTLs ligados a alelos de resistência que se expressam apenas em um local, visando ao desenvolvimento de cultivares com vista à recomendação específica para uma região.

**Tabela 4.** Resumos das análises de regressões múltiplas quanto à reação ao oídio, utilizando o processo Stepwise para seleção dos marcadores. Lavras e Patos de Minas, 1996/1997.

Marcadores	Estimativas dos parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro-padrão	Teste t
Lavras, F <sub>7</sub> , inverno, 1996				
Intercepto	5,53		0,40	13,74*
OPR-02 <sup>1(1)</sup> (1.230 pb)	-1,13	0,1132	0,24	-4,65*
OPD-08 (759 pb)	-1,02	0,0638	0,23	-4,41*
OPR-02 <sup>2</sup> (832 pb)	1,86	0,2741	0,28	6,66*
OPS-10 <sup>2</sup> (562 pb)	-1,05	0,0325	0,27	-3,95*
OPO-19 <sup>2</sup> (1.412 pb)	-0,78	0,0214	0,26	-3,02*
OPH-03 <sup>2</sup> (1.258 pb)	-1,07	0,0338	0,24	-4,54*
OPH-03 <sup>5</sup> (562 pb)	0,56	0,0128	0,25	2,23*
OPS-16 (640 pb)	0,72	0,0288	0,23	3,12*
OPG-16 <sup>1</sup> (851 pb)	0,85	0,0582	0,26	3,24*
Lavras, F <sub>9</sub> , inverno, 1997				
Intercepto	4,33		0,17	25,36*
OPM-06 <sup>1</sup> (1.096 pb)	-0,42	0,0311	0,19	-2,23*
OPD-08 (759 pb)	-0,58	0,0502	0,19	-3,13*
Patos de Minas, F <sub>9</sub> , inverno, 1997				
Intercepto	6,46		0,30	21,64*
OPN-10 (851 pb)	-0,70	0,0322	0,23	-2,98*
OPD-08 (759 pb)	-0,74	0,0416	0,24	-3,09*
OPH-03 <sup>4</sup> (759 pb)	-0,54	0,0284	0,25	-2,15*
Média geral				
Intercepto	4,65		0,24	19,60*
OPN-10 (851 pb)	-0,40	0,0345	0,16	-2,55*
OPD-08 (759 pb)	-0,69	0,0768	0,16	-4,44*
OPR-02 <sup>2</sup> (832 pb)	0,53	0,1342	0,18	2,91*
OPS-10 <sup>2</sup> (562 pb)	-0,86	0,0302	0,22	-3,93*
OPS-19 (1.122 pb)	0,34	0,0215	0,15	2,23*
OPO-10 <sup>1</sup> (2.951 pb)	0,44	0,0189	0,21	2,08*
OPH-03 <sup>1</sup> (1.318 pb)	0,41	0,0410	0,15	2,68*
OPS-16 (640 pb)	0,42	0,0285	0,16	2,69*

<sup>(1)</sup>Tamanho do fragmento de DNA utilizado como marcador: quanto menor o expoente, maior o tamanho; a ausência de expoente significa que este primer forneceu apenas um marcador. \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.



### Mapa de ligação dos marcadores RAPD

Foram encontrados sete grupos de ligação no genoma do feijoeiro-comum com os marcadores utilizados neste mapeamento (Tabela 5). Como essa espécie tem o número básico de cromossomo igual a 11, esperavam-se, no mínimo, 11 grupos de ligação. No entanto, como o número de marcadores utilizados foi relativamente pequeno, a baixa saturação de marcadores no mapa é a explicação mais provável para este pequeno número de grupos de ligação.

Em média, os marcadores foram mapeados com um intervalo de 20,15 cM. Stuber et al. (1992) relataram que a máxima vantagem da análise por intervalo sobre a análise por ponto ocorre quando marcadores ligados estão razoavelmente separados (mais de 15 e menos de 35 cM de distância). Nestas condições, provavelmente existirão algumas permutas entre os marcadores e o QTL, que podem ser compensadas pela análise por intervalo.

Conseguiu-se mapear uma região que corresponde a 785,7 cM. Como o tamanho do genoma do feijoeiro-comum é estimado em torno de 1.200 cM (Vallejos et al., 1992), calcula-se que este trabalho conseguiu mapear em torno de 66% desse genoma, mas com baixa saturação de marcadores. Pode-se considerar essa cobertura como satisfatória, visto que, em outros trabalhos (Nodari et al., 1993; Vallejos, 1994) que utilizaram mapas mais saturados, conseguiram 82% de cobertura.

### Mapeamento por intervalo composto (CIM) relativo à reação à mancha-angular

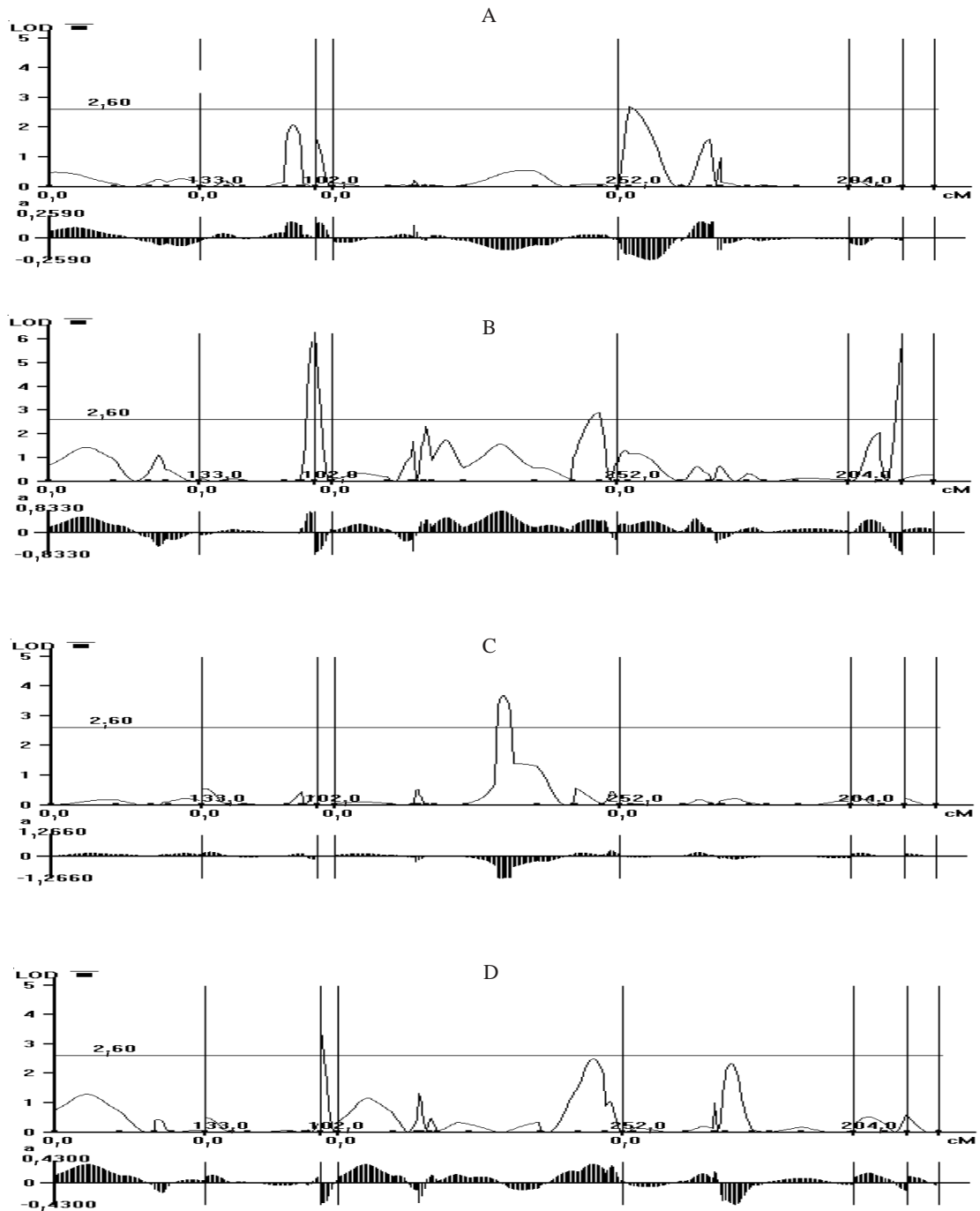
Foram utilizados somente os marcadores mapeados pelo programa Mapmaker, pois esse processo de mapeamento só considera os marcadores alocados em algum grupo de ligação. Dos 63 marcadores obtidos (Tabela 1), somente 39 foram utilizados (Tabela 5).

O mapeamento da mancha-angular somente identificou um QTL, e em somente um experimento (época da seca em Lavras, 1998) (Figura 1a). Esse QTL está no grupo de ligação 5, a 11 cM do início do grupo (lod 2,70). Comparando-o com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 5), conclui-se que esse QTL está localizado entre os marcadores OPN-07<sup>5</sup> e OPN-07<sup>3</sup>, a uma distância de 11 cM do primeiro, e a 0,8 cM do segundo. Na análise de regressão, apenas o marcador OPN-07<sup>5</sup> estava ligado a um QTL.

**Tabela 5.** Mapa de ligação do feijoeiro-comum utilizando marcadores RAPD e linhagens recombinantes oriundas do cruzamento Flor de Mayo x Carioca. Lavras, 2000.

Marcadores RAPD (tamanho)	Distâncias (cM)
Grupo de ligação 1	
OPF-10 (1.000 pb)	0,0
OPM-06 <sup>1(1)</sup> (1.096 pb)	58,1
OPH-03 <sup>3</sup> (1.112 pb)	89,8
OPI-03 (955 pb)	104,1
OPE-20 <sup>2</sup> (891 pb)	133,2
Grupo de ligação 2	
OPI-06 (480 pb)	0,0
OPR-12 <sup>4</sup> (794 pb)	24,9
OPO-10 <sup>1</sup> (2.951 pb)	38,2
OPO-20 <sup>5</sup> (741 pb)	76,1
OPO-20 <sup>3</sup> (1.585 pb)	88,3
OPO-20 <sup>2</sup> (1.698 pb)	92,5
OPO-20 <sup>4</sup> (933 pb)	102,9
Grupo de ligação 3	
OPN-10 (851 pb)	0,0
OPM-06 <sup>3</sup> (575 pb)	16,0
Grupo de ligação 4	
OPG-16 <sup>2</sup> (676 pb)	0,0
OPO-04 (1.905 pb)	49,5
OPE-15 <sup>1</sup> (851 pb)	70,3
OPO-13 <sup>1</sup> (1.698 pb)	75,0
OPG-16 <sup>3</sup> (602 pb)	81,4
OPS-13 <sup>2</sup> (1.122 pb)	88,6
OPN-02 <sup>2</sup> (436 pb)	116,0
OPO-10 <sup>3</sup> (525 pb)	179,1
OPG-19 (851 pb)	213,1
OPN-07 <sup>1</sup> (1.698 pb)	236,0
OP0-12 (1.412 pb)	252,0
Grupo de ligação 5	
OPN-07 <sup>5</sup> (661 pb)	0,0
OPN-07 <sup>3</sup> (1.072 pb)	11,8
OPG-16 <sup>1</sup> (851 pb)	56,1
OPS-13 <sup>1</sup> (1.950 pb)	81,0
OPS-10 <sup>2</sup> (562 pb)	92,5
OPR-02 <sup>2</sup> (832 pb)	115,5
OPR-12 <sup>3</sup> (1.000 pb)	131,8
OPO-19 <sup>2</sup> (1.412 pb)	159,3
OPAA-09 (1.059 pb)	204,3
Grupo de ligação 6	
OPR-02 <sup>1</sup> (1.230 pb)	0,0
OPB-18 (1.412 pb)	29,7
OPS-16 (640 pb)	48,3
Grupo de ligação 7	
OPH-03 <sup>4</sup> (759 pb)	0,0
OPR-12 <sup>1</sup> (3.200 pb)	29,0

(1) Tamanho do fragmento de DNA utilizado como marcador: quanto menor o expoente, maior o tamanho; a ausência de expoente significa que este primer forneceu apenas um marcador.



**Figura 1.** Mapeamento e efeito aditivo de QTLs: A) reação à mancha-angular em feijoeiro-comum na época da seca, Lavras, 1998; B) reação ao oídio na época de inverno, Lavras, 1996; C) reação ao oídio na época de inverno, Patos de Minas, 1997; D) reação ao oídio utilizando a média dos experimentos. Lavras e Patos de Minas, MG, 1996/1997.

### Mapeamento por intervalo composto (CIM) para reação ao oídio

No primeiro experimento (Figura 1b) (inverno em Lavras), identificaram-se quatro QTLs. O primeiro QTL está situado entre OPO-20<sup>2</sup> e OPO-20<sup>4</sup>, a 6,5 cM do primeiro, e a 3,9 cM do segundo; o segundo QTL, entre OPN-10 e OPM-06<sup>3</sup>, a 3 cM do primeiro, e a 13 cM do segundo; o terceiro QTL, entre OPG-19<sup>1</sup> e OPN-07<sup>1</sup>, a 20,9 cM do primeiro, e a 2 cM do segundo; e o quarto QTL, entre OPB-18 e OPS-16, a 16,3 cM do primeiro, e a 2,3 cM do segundo. Na análise de regressão, somente os marcadores OPS-16 e OPN-10 estavam ligados a QTLs.

No segundo experimento, não foi identificado QTL. No terceiro (inverno em Patos de Minas), foi detectado um QTL (Figura 1c) no grupo de ligação 4. Este QTL está entre OPN-02<sup>2</sup> e OPO-10<sup>3</sup>, a uma distância de 33 cM do primeiro, e a 30,1 cM do segundo. Este QTL está distante dos dois marcadores, e não deve ter efeito final pronunciado, dada a grande frequência de recombinação. Na análise de regressão, estes marcadores não foram identificados como ligados a QTLs.

O mapeamento realizado com as médias (Figura 1d) identificou, novamente, o segundo QTL do primeiro experimento (localizado a 3 cM do início do grupo 3), e quase detectou (lod 2,5) o terceiro QTL, também do experimento 1 (localizado a 234 cM do início do grupo 4).

QTLs que são responsáveis por reação a patógenos, tanto os de efeitos amplos quanto os específicos por ambientes são úteis em um programa de melhoramento, uma vez que a ocorrência de patótipos diferentes nos diversos ambientes é a principal causa da interação genótipos x ambientes e pode desenvolver cultivares resistentes especificamente aos patótipos presentes em cada local.

### Conclusões

1. As interações de QTLs por locais são bastante expressivas, mas é possível identificar QTLs de reação ao oídio e à mancha-angular com estabilidade em diferentes locais.

2. Não há concordância entre os resultados de mapeamento e interação apresentados pelos dois

métodos (CIM e regressão múltipla), principalmente para reação à mancha angular.

3. Os marcadores mais estáveis e promissores para utilização na seleção assistida são OPR02-832, OPD08-759 e OPN10-851 para oídio, e OPN02-436 e OPN07-1072 para a mancha-angular.

### Referências

- ARUMUGANATHAM, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, New Brunswick, v. 9, p. 208-218, 1991.
- BURR, B.; BURR, F. A. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 7, p. 55-60, 1991.
- DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1981. 709 p.
- EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize: numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Bethesda, v. 116, p. 113-125, 1987.
- FERREIRA, C. F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G. A.; NIETSCHKE, S.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identificação de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro comum. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 247-252, 1999.
- HALDANE, J. B. S. The recombination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linkage factors. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 8, p. 299-309, 1919.
- JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 135, p. 205-211, 1993.
- KANAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 1, p. 192-194, 1985.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. **Genetics**, Bethesda, v. 124, n. 3, p. 743-756, 1990.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps. **Genetics**, Bethesda, v. 121, p. 185-199, 1989.

- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.
- MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. Choice of parents to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars tolerant to low temperatures at the adult stage. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 2, p. 283-292, 1997.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.
- NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean, 2. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 513-520, 1993.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Goiânia, UFG, 1993. 271 p.
- REZENDE, V. F. **Caracteres agronômicos e marcadores RAPD associados ao gene de reação ao agente causal do oídio no feijoeiro**. 2000. 60 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- REZENDE, V. F.; RAMALHO, M. A. P.; CORTE, H. R. Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 233-236, 1999.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 300 p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 50).
- STUBER, C. W.; LINCOLN, S. E.; WOLFF, D. W.; HELENTAJARIS, T.; LANDER, E. S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Bethesda, v. 132, p. 823-839, 1992.
- TALBOT, D. R.; ADANG, M. J.; SLIGHTON, J. L.; HALL, T. C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 198, p. 42-49, 1984.
- VALLEJOS, C. E. *Phaseolus vulgaris*: the common bean. In: PHILLIPS, R. L.; VASIL, I. K. (Ed.). **DNA-based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 261-270.
- VALLEJOS, C. E.; SAKIYAMA, N. S.; CHASE, C. D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 733-740, 1992.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica aplicada no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.
- ZENG, Z. B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 10972-10976, 1993.