

BROTÉRIA GENÉTICA

REVISTA QUADRIMESTRAL

ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

Subsidiada pelo

Instituto Nacional de Investigação Científica



CONSELHO DE REDACÇÃO:

Prof. Dr. Luís J. Archer (Director)
Cristina Marinho (Secretária)
Prof. Dr. Jorge Antunes-Correia
Prof. Dr. Miguel Pereira Coutinho
Eng.º Tristão Mello-Sampayo
Prof. Dr. Luís Sieuve Monteiro
Prof. Dr. Amândio S. Tavares

ADMINISTRADOR: Januário Geraldes

CONDIÇÕES DE ASSINATURA PARA 1991

Portugal: Esc.: 1000\$00 (oferecida gratuitamente pela Sociedade Portuguesa de Genética aos seus sócios)
Espanha e Países de expressão portuguesa, Dol. \$7.00
Outros Países: Dol. \$15.00
Número avulso: Esc.: 400\$00

REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO:

BROTÉRIA GENÉTICA
Rua Maestro António Taborda, 14
1293 LISBOA CODEX
Telef. 396 16 60

Comp. e Imp. — Gabinete Comercial Gráfico, Lda.
Rua dos Duques de Bragança, 6 — 1200 LISBOA
Depósito Legal n.º 23964/88

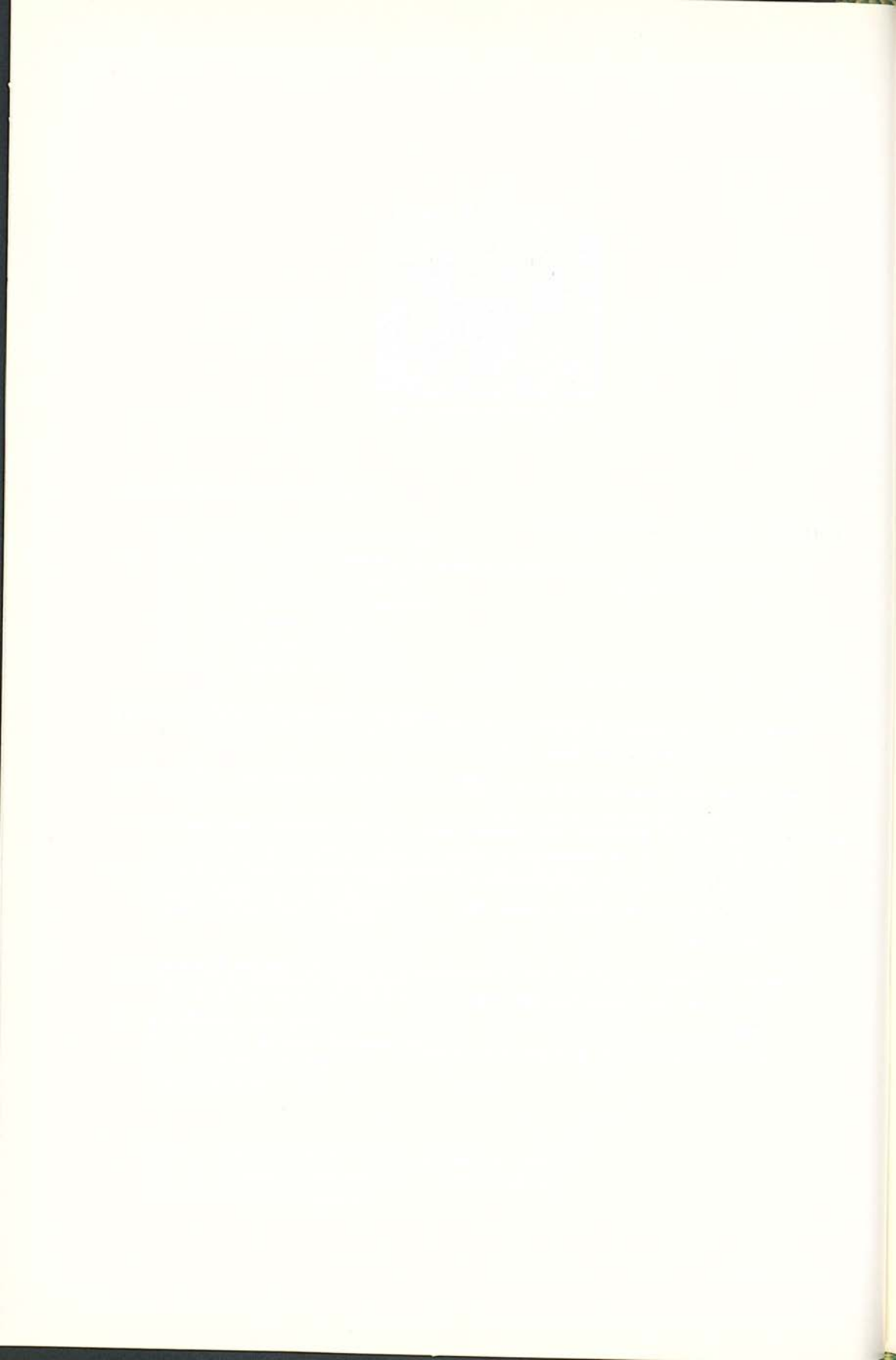
Í N D I C E

ARTIGOS GERAIS E DE REVISÃO

- As novas tendências do melhoramento genético de plantas na década de 90 141
por *Francisco Bagulho*

ARTIGOS DE INVESTIGAÇÃO

- Genes for L-Arabinose utilization in *Bacillus Subtilis* 149
por *Helena Paveia* and *Luís Archer*
- Mapping of *ara* genes in *Bacillus Subtilis* 161
por *Helena Paveia* and *Luís Archer*
- Histological study of the heterozigosity effect of coffee resistance genes SH₁ and SH₄ SH₅ Towards *Hemileia Vastatrix* 169
por *Maria do Céu Silva*, *Luisete Rijo*, *C. J. Rodrigues Jr.* e *Maria Isabel Vasconcelos*
- Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia Vastatrix* Berk et Br. dos Clones-Tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de híbrido de Timor 185
por *A. J. Bettencourt*, *J. Lopes* e *S. Palma*



AS NOVAS TENDÊNCIAS DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS NA DÉCADA DE 90

por

FRANCISCO BAGULHO

Estação Nacional de Melhoramento de Plantas
Apartado 6, 7351 Elvas Codex, Portugal

SUMÁRIO

Complexos e diversificados problemas apresentam-se à agricultura moderna, pelo que a obtenção de variedades melhoradas terá um papel cada vez mais importante.

O melhoramento convencional está a encontrar nas novas tecnologias fortes estímulos em diferentes áreas de actuação.

Factores bióticos e abióticos criam novas situações ao melhoramento de plantas que terá também de atender às situações de poluição do ambiente.

A agricultura sustentável ou alternativa surge como um novo e significativo conceito susceptível de proporcionar elevados benefícios futuros.

Culturas não alimentares trazem muitas hipóteses ao melhoramento genético e favorecem a introdução de tecnologias avançadas.

ABSTRACT

Modern agriculture is facing a significant number of diverse and complex problems to which plant breeding has to be prepared to respond. The conventional methods will be still nuclear for the purpose, in a permanent basis. However, the recent upsurge of the so-called new technologies appear to make them promising tools for the future. The power and the magnitude of their intervention will be as increasingly important as Genetics and Cell and Molecular Biology of Plants mostly develop and turn out to become practicable in important food crops such as cereals and pulse legumes among others.

Biotic and abiotic stresses to crop plants bring different kinds of problems and special attention will be required to those in which environmental pollution is concerned.

Sustainable agriculture appears to be a new and defensible concept worth of being extensively tried in order to obtain better ecological returns of the agricultural systems and lower costs for the products.

Also promising perspectives to plant breeding may be offered by industrially exploited non-alimentary crops. Such plants favour the extensive development of advanced technologies.

INTRODUÇÃO

A actual agricultura produtivista assenta em técnicas culturais que levam ao crescente consumo de 'inputs' de origem industrial (máquinas, adubos, pesticidas), com fortes gastos energéticos, o que se traduz em custos importantes. Tais custos representam significativos encargos de natureza financeira e trazem acrescidos desequilíbrios ecológicos causados pela poluição.

O melhorador de plantas vê-se, assim, confrontado com complexos e diversificados problemas, onde, para além da necessidade de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade, tem de atender-se também à conservação do ambiente, à redução dos consumos energéticos e à diminuição dos custos de produção.

Estes parâmetros constituirão importantes e significativos condicionantes do melhoramento genético do futuro, sendo susceptíveis de assumir influência decisiva nas metodologias e nos objectivos da investigação.

Será sobre as características biológicas da planta que incidirá a pesada responsabilidade de satisfazer grande parte das necessidades dominantes na agricultura das próximas gerações. O impacto das variedades melhoradas manifesta-se cada vez mais decisivo, não só porque constituem o factor de produção mais barato, mas também porque terão um papel com crescente relevância no aumento das produções e na qualidade dos produtos obtidos.

Poderá questionar-se a referência à produtividade como um objectivo essencial no momento em que o problema dos excedentes agrícolas constitui uma forte preocupação dos países industrializados. Porém, é importante recordar que, como sempre tem sucedido, cedo ou tarde estes excedentes vão desaparecer e de novo o aumento dos rendimentos de produtos essenciais voltará a constituir uma meta preferencial (EDWARDS, 1987; EVANS, 1987).

Independentemente das graves carências alimentares hoje existentes em muitas regiões, as projecções apontam para necessidades extremamente avultadas de cereais, hortícolas e frutas nas primeiras décadas do século XXI, quando 8 biliões de pessoas povoarem a Terra (SWAMINTHAN, 1990).

AS NOVAS TECNOLOGIAS

O progresso do melhoramento de plantas está a encontrar na biotecnologia estimulantes possibilidades para a obtenção de variação genética e para a maior precisão e rapidez nos métodos de selecção (MUJEEB-KAZI and SICH, 1989).

Novas combinações de genes podem conseguir-se através de cruzamentos

entre espécies afastadas («wide crosses»), fusão de protoplastos, variação somaclonal e transformação genética, constituindo instrumentos que podem ser de extrema utilidade para o melhorador. No entanto, embora em rápida evolução, não estão ainda disponíveis para todos os tipos de plantas.

Como exemplo das vantagens dos cruzamentos afastados pode salientar-se o sucesso que o triticale está a ter entre nós. Fruto da hibridação entre espécies de géneros diferentes, o trigo e o centeio, a sua expansão tem crescido de forma notória nos últimos anos, devido ao excelente comportamento em solos marginais.

Na realidade, o triticale é a primeira espécie sintetizada artificialmente pelo homem e o rápido sucesso do seu melhoramento tem contribuído para o tornar competitivo com outros cereais há milénios utilizados pelo homem. Em Portugal revela-se como uma cultura extremamente prometedora, rivalizando com os cereais tradicionais nos diversos ambientes (COUTINHO et al., 1990) e despertando muito interesse aos agricultores.

Ainda derivados de cruzamentos envolvendo trigo e centeio, referem-se as promissoras variedades de trigo portadoras da translocação 1B/1R com alto potencial de produção e elevada resistência às ferrugens, podendo salientar-se que algumas cultivares com estas características já se encontram bastante divulgadas no País.

Das contribuições mais importantes que a ciência moderna tem trazido ao melhoramento de plantas, com enormes potencialidades de maior impacto no futuro, salienta-se a alta eficácia das técnicas de selecção (ARNOLD, 1987). Destacamos os resultados das técnicas electroforéticas de análise das subunidades de proteínas, como formas mais aperfeiçoadas de selecção que facilitam grandemente o trabalho dos melhoradores, permitindo identificar subunidades de proteína apenas a partir de uma parte do grão. Toda esta investigação tem ampliado o conhecimento dos factores genéticos que regulam a qualidade e da sua tradução em factores bioquímicos. Ao mesmo tempo, tem contribuído para aprofundar o estudo das proteínas e da sua correlação com o potencial tecnológico dos genótipos.

O estudo da qualidade, através de métodos avançados, assume hoje importância primordial, porque representa a possibilidade de conduzir à valorização varietal pela avaliação rápida e simples. Esta nova metodologia é particularmente benéfica quando se procura a divulgação de materiais com alto interesse tecnológico.

Ao mesmo tempo, em diversos programas procura-se melhorar a qualidade nutritiva de algumas plantas, merecendo realce os esforços que se dedicam aos cereais. Em particular, no caso do milho, os genótipos portadores do gene *Opaco 2* recebem uma atenção especial, por apresentarem valores elevados de fracções proteicas mais ricas em aminoácidos essenciais, que manifestam comprovados ganhos em valor alimentar.

Também o estudo das proteínas da cevada tem conseguido despertar o interesse da ciência moderna, conhecendo-se o mecanismo genético que controla o alto teor em lisina e os genes *lys* têm sido incorporados em variedades com acentuado interesse agrícola. Porém, como em relação ao gene *Opaco 2* do milho, verifica-se que a presença dos genes *lys* está correlacionada com baixo interesse agrônomico, o que traz reflexos negativos à expressão da produtividade, e continua a ser um obstáculo ao progresso do melhoramento da qualidade.

Em termos de futuro, procuram-se especialmente adoptar processos para reduzir o tempo de obtenção de novas variedades, através sobretudo da produção de duplo-haploides. A eliminação de algumas gerações segregantes, com testes incidindo sobre material homozigótico, conduzirá a um tipo de selecção mais rápida e mais eficiente (KNOTT, 1986).

Da mesma forma, torna-se indispensável empregar as novas tecnologias no melhoramento da resistência a doenças e pragas. A identificação e combinação de múltiplos genes de resistência trará grandes vantagens à estabilidade das produções e evitará o recurso à utilização sistemática de pesticidas, sempre dispendiosos e potencialmente responsáveis por situações de poluição ambiental.

RESPONSABILIDADE DO MELHORAMENTO CONVENCIONAL

O avanço da biotecnologia na década de 90 irá seguramente trazer elevadas vantagens para o melhoramento genético. Contudo, não podemos negligenciar as áreas mais convencionais da investigação no melhoramento de plantas, visto que elas representam hoje a principal linha de defesa da produção de alimentos (BORLAUG, 1983). A biotecnologia vai complementar e facilitar os esforços do melhoramento convencional, mas não o pode substituir na avaliação dos génotipos no campo. Uma variedade destinada à agricultura estará sempre dependente da interacção génotipo x ambiente (EDWARDS, 1987), pelo que a experimentação plurilocal e plurianual se revela decisiva para a sua divulgação. De igual modo, os novos métodos não conseguem realizar milagres, embora ofereçam maior precisão. Técnicas como a fusão de protoplastos e a transferência de genes necessitam, porém, dos melhoradores para desenvolver cultivares evoluídas (MAC KEY, 1991).

Normalmente incluído no melhoramento clássico, o aproveitamento da heterosis, que tantos benefícios tem proporcionado às plantas alogâmicas, começa a encontrar soluções para aplicação a espécies autogâmicas. Grandes esforços estão a realizar-se neste campo, embora problemas vários tenham impedido o sucesso comercial desejado para alguns cereais, onde o trigo apresenta limitações ainda não totalmente ultrapassadas. Esta linha de trabalho é pois mais um instrumento que se vislumbra útil para o futuro do melhoramento de diversas plantas.

INFLUÊNCIA DOS FACTORES ABIÓTICOS

Apesar do constante progresso que se tem verificado, novas situações criam contínuos desafios ao melhoramento de plantas. A ideia dominante de que profundas alterações de natureza climática estão a afectar a Terra impõe estudos visando a selecção de combinações genéticas com resistências específicas a 'stresses' abióticos. Nesta conformidade, procuram-se investigar mecanismos que controlem a resistência à secura, ao calor e ao frio, bem como à poluição do ar e aos altos níveis de CO₂, de molde a conseguirem isolar-se génotipos portadores de tais características.

Paralelamente, reconhece-se que outros problemas estão a ser agravados, como, por exemplo, os causadores da crescente fitotoxicidade mineral que se observa em solos salinos e em solos ácidos.

Tais 'stresses' conduzem à necessidade de se realizarem estudos profundos de fisiologia, no sentido do melhor conhecimento do processo. Por outro lado, são definidas novas estratégias de melhoramento, com o recurso a modernas técnicas de 'screening', para identificar os génotipos resistentes. O conhecimento de fontes de resistência permite a adopção de convenientes esquemas de melhoramento, para introduzir os mecanismos controladores da toxicidade em materiais com elevado interesse agronómico.

Parece importante referir o significado que assumem as colecções de germoplasma, onde espécies selvagens ou variedades indígenas podem servir como dadores de genes indispensáveis para ultrapassar alguns obstáculos. Por isso, são de maior oportunidade os esforços que incidem sobre colheita, conservação e caracterização de recursos genéticos, constituídos por variedades antigas das principais plantas cultivadas, bem como espécies afins. Este germoplasma, cada vez mais raro, pode constituir distintas fontes de genes extremamente úteis para transferir genes favoráveis para novas cultivares, dotando-as de resistência aos diversos tipos de 'stress' que contemplam muitas situações agroecológicas.

Também a utilização destes materiais encontrará um precioso auxílio nas novas tecnologias, facilitando os cruzamentos e os vários critérios de selecção e permitindo um maior rigor na localização de genes de resistência e no isolamento de génotipos portadores de caracteres valiosos. E, não podemos esquecer que a aplicação de métodos de cultura *in vitro* é essencial para a conservação de várias espécies.

AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

O termo agricultura sustentável, durável ou alternativa (tradução de «sustainable agriculture») significa um vasto conjunto de opções subordinadas ao objectivo determinante de permitir o uso mais eficiente dos recursos existentes,

para que os ganhos a curto prazo não sejam realizados hipotecando o futuro. Nesta perspectiva, defende-se a necessidade de empregar métodos que contribuam para parar a contínua degradação do ambiente. Consideráveis esforços vão fazer-se para reunir técnicas tradicionais com outras de vanguarda, de molde a permitirem a combinação das forças ecológicas com as económicas (SWAMI-NATHAN, 1990).

O elevado consumo de energia fóssil, fornecido principalmente através de produtos químicos, como fertilizantes e pesticidas, vai por certo ser reduzido. Não só porque os preços dos produtos agrícolas vão baixar, como também porque a constante degradação do ambiente está a impor medidas especiais para salvaguardar a qualidade de vida. Nestas condições, as características das plantas assumem um papel fundamental, dada a enorme diversidade de aplicações e a sua flexibilidade para sofrer variação genética e se adaptarem a diversos ambientes. Novas culturas e melhores variedades vão proporcionar ao homem alternativas mais favoráveis e contribuir para que a agricultura esteja menos sujeita a 'inputs' externos.

A contribuição da ciência moderna para dar corpo a este novo conceito pode ser vasta a diversificada. Desde a obtenção de variedades melhoradas pela resistência aos parasitas, passando pela utilização de cultivares com maior capacidade de absorção de elementos minerais, sem esquecer a introdução de espécies fixadoras do azoto atmosférico, muitas são as potencialidades de aperfeiçoamento dentro do mundo vegetal. Também o uso de formas biológicas de fixação do azoto em gramíneas cria fortes expectativas de reduzir o consumo de fertilizantes industriais. Bactérias do solo prometem favorecer associações com gramíneas, com efeitos benéficos para o seu desenvolvimento, constituindo promissoras e aliciantes linhas de investigação (GALLI, et al. 1988; GIANNONE et al. 1988; KNOTT, 1986; NUTI et al. 1988).

CULTURAS NÃO ALIMENTARES

O actual problema dos excedentes vai contribuir para diversificar os sistemas agrícolas e levará à ocupação de terras com culturas não alimentares. Matérias primas para novas indústrias transformadoras ou para a produção de energias renováveis, são alternativas que começam a ser encaradas com boas hipóteses.

Interessantes oportunidades para o fabrico de novos materiais e a extracção de produtos químicos a partir das plantas, como, por exemplo, fibras artificiais, polímeros, colas, gelatinas, cosméticos e outros, surgem como realidades muito próximas (ZANDERIGHI, 1988). Processos biotecnológicos estão a ser adoptados para descobrir melhores formas de utilização de produtos derivados dos

vegetais, aproveitando assim a tremenda variação natural. Através de processos avançados, torna-se ainda possível a produção de microorganismos e plantas que podem ser geneticamente modificados para permitir a sua adaptação a fins industriais, o que obriga a inovar certos sectores da química, e conduziu à já denominada química verde (ZANDERIGHI, 1988).

Uma das maiores expectativas criou-se à volta do emprego das plantas na obtenção de combustíveis líquidos, actuando como fontes de energia renovável. O sucesso do gasóleo verde no Brasil, conseguido a partir da cana de açúcar, nunca foi generalizado, porém surgem informações animadoras dos Estados Unidos que apontam as boas possibilidades de transformação da biomassa em combustíveis. Híbridos de árvores perenes, de crescimento rápido, requerendo poucos 'inputs', estão a ser desenvolvidos, prevendo-se que com o sucesso da aplicação da moderna biologia a cultura possa ser estendida e, ao mesmo tempo, o preço da sua conversão em etanol venha a tornar-se competitivo (ABELSON, 1991).

A produção de fibras vegetais é outro caminho que se pode abrir. Novas culturas estão em vias de apresentar perspectivas favoráveis e a sua expansão irá conduzir à selecção de variedades capazes de satisfazerem índices de qualidade determinados por exigentes padrões industriais. Naturalmente que também neste domínio são de admitir inovações para facilitar e acelerar o melhoramento de espécies em que a investigação, mesmo agronómica, tem estado esquecida.

IMPACTO DO MELHORAMENTO LOCAL

Verifica-se que o actual melhoramento de plantas se encaminha no sentido de se transformar numa indústria muito agressiva, caracterizando-se por forte competitividade aos mais diversos níveis de intervenção. As respostas rápidas às mudanças constantes dos mercados e às suas exigências prometem trazer substanciais vantagens aos melhoradores, em que a definição de objectivos particulares pode assumir carácter prioritário.

Uma das consequências desta mentalidade traduz-se na crescente importância dos programas de melhoramento local, subordinados a fins específicos. Os conceitos de ampla adaptação tendem a ser subvalorizados por outros de adaptação mais restrita, de certo modo relacionados com os requisitos da indústria transformadora e com as características agroecológicas de cada região.

O melhoramento local torna-se não só indispensável para aspectos relativos à qualidade, como contempla a introdução de resistência aos parasitas prevalentes, como ainda serve para atender exigências de natureza abiótica causadas por situações ambientais de carácter limitado.

As transformações que se podem prever para a agricultura dos anos 90 desenham, assim, um relevo significativo para o melhoramento genético local, em que a selecção terá de satisfazer objectivos específicos, e onde as vantagens de aplicação das altas tecnologias tendem a projectar-se como importantes dinamizadores de progresso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, P., 1991. Improved yields of biomass. *Science*, vol. 252. No 5012:1469.
- ARNOLD, M. H., 1987. El papel de la ciencia y la tecnologia en la produccion de maiz y trigo. *CIMMYT. El desarrollo futuro del maiz y trigo en el Tercer Mundo*. Mexico D. F.: 65.76.
- BORLAUG, N. E., 1985. Contribution of conventional plant breeding to food production. *Science*, vol. 219: 689-695.
- COUTINHO, J., MAÇAS, B., BAGULHO, F. e COCÓ, J., 1990. Estudo comparativo do comportamento do triticales e do trigo em 6 anos de ensaios. V Reunião Portuguesa sobre Triticales (a publicar).
- EDWARDS, I. B., 1987. New horizons in wheat breeding. *Proc. New Horizons in wheat breeding*. Un. Minnesota, St. Paul Mn. Oct. 19: 30-34.
- EVANS, L. T., 1987. Oportunidades de aumentar el potencial de rendimiento del trigo. *CIMMYT. El desarrollo futuro del maiz y trigo en el Tercer Mundo*. México D. F.: 86-101.
- GALLI, E., BARBIERI, P., and ZANETTI, G., 1988. Recent developments and perspectives of Azospirillum-graminae association. *The future of cereals for human feeding and development of biotechnological research*. Foggia (Italy): 335-342.
- GIANNONE, V., NUZZIELO, M., TESTA, R. and WITTMER, G., 1988. Use of Azospirillum brasilense to improve the energetic inputs in durum wheat (*Triticum durum*) crop. *The future of cereals for human feeding and development of biotechnological research*. Foggia (Italy): 361-369.
- KNOTT, D. R., 1986. Novel approaches to wheat breeding. *Genetic improvement in yield of wheat CSSA spec. publ.* No 13: 25-40.
- MAC KEY, J., 1981. Cereal production. *Cereals, a renewable resource, Theory and practice*. *Proc. Int. Symp.* Copenhagen: 5-23.
- MAC KEY, J., 1991. Is plant breeding at the end, or can another breakthrough be expected? *Pl. Mut. Breed. for Crop Imp. vol. Proc. Symp.* Vienna, 18-22 June: 466-467.
- MUJEEB-KAZI, A., and SICH, L. A., 1989. Review of advances in plant biotechnology, 1985-88. *2nd Int. Symp. on Gen. Manip. in Crops*. Mexico D. F. and Manila: CIMMYT and IRRI. pp. 328
- NUTI, M. P., SQUARTINI, A. and PASTI, M. B., 1988. Funtional interaction between Azospirillum sp. and gramineous plants. *The future of cereals for human feeding and development of biotechnological research*. Foggia (Italy): 330-334.
- SWAMINATHAN, M. S., 1990. Changing nature of food security challenge: implications for agricultural research policy. *Sir John Crawford Memorial Lecture*, Washington D. C.
- ZANDERIGHI, L., 1988. The non-alimentary use of agricultural products. *The future of cereals for human feeding and development of biotechnological research*. Foggia (Italy): 489-512.

GENES FOR L-ARABINOSE UTILIZATION IN *BACILLUS SUBTILIS*

HELENA PAVEIA * and LUÍS ARCHER †

Laboratório de Genética Molecular, Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14,
2781 Oeiras Codex, Portugal

ABSTRACT

The biochemical characterization of a collection of *Bacillus subtilis* mutants, unable to use L-arabinose as sole carbon source, was performed by determining the activities of L-arabinose degradation enzymes and/or the intermediate products accumulated. This characterization enabled the identification of four *ara* genes: the three structural genes, *araA*, *araB* and *araD*, coding, respectively, for L-arabinose isomerase, L-ribulokinase and L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase, and a regulatory gene, *araC*.

RESUMO

A caracterização bioquímica de uma colecção de mutantes de *Bacillus subtilis*, incapazes de utilizar a L-arabinose como única fonte de carbono, foi efectuada por determinação da actividade das enzimas de degradação daquela pentose e/ou por identificação dos produtos intermédios acumulados. Essa caracterização permitiu a identificação de quatro genes *ara*: os três genes estruturais, *araA*, *araB* e *araD*, que codificam, respectivamente, a isomerase da L-arabinose, a L-ribulocinase e a epimerase-4 do fosfato-5 da L-ribulose, e um gene regulador, *araC*.

INTRODUCTION

The pathway of L-arabinose in *Bacillus subtilis* (Fig. 1) was described (Lepe-
sant & Dedonder, 1967). Ara⁻strains deficient in either one of three enzymes

* Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Ed. C2, 1700 Lisboa, Portugal.

† Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2825 Monte da Caparica, Portugal.



Fig. 1 — The L-arabinose Pathway in *B. subtilis*. PPP: Pentose Phosphate Pathway

involved in the sugar utilization were characterized as well as constitutive mutants for all three enzymes (Lepesant & Dedonder, 1967 a.).

Some years ago we isolated ten Ara⁻mutants. The corresponding *ara* mutations were made isogenic by congression and then mapped by PBS1 transduction. These *ara* mutations were located in three different regions, far apart, on the *B. subtilis* chromosome (Paveia & Archer, 1980). Subsequently, another ten Ara⁻mutants were isolated, which carry *ara* mutations mapping within two of the regions defined before. The biochemical and genetic analysis, by PBS1 transduction, of this set of twenty Ara⁻strains showed that the three structural genes for L-arabinose utilization map together, while a regulatory *ara* gene lies in another site (H. Paveia, PhD Thesis, University of Lisbon, Portugal, 1987). Mutants with a constitutive phenotype, whose *ara* mutations are in the same region as the regulatory *ara* gene, were also isolated (Sá-Nogueira *et al.*, 1988). Recently, two recombinant plasmids from a *B. subtilis* library were found which complement the *ara* mutations of some of our Ara⁻mutants and those of *Escherichia coli* equivalent strains (Sá-Nogueira & Lencastre, 1989).

In the present paper we report the identification of the four *ara* genes, using a set of simple methods that allow a preliminary screening of Ara⁻mutants. The results were further confirmed by determinations of enzyme activity and/or of intermediate products accumulated.

MATERIALS

Strains. *B. subtilis* strains are listed in Table 1.

Media. The mineral medium used was 'C (Pascal *et al.*, 1971) either liquid or solidified with 1.5% agar. Carbon sources were added to a final concentration of 0.1%, unless otherwise stated, and nutritional requirements to a final concentration of 20µg/ml.

METHODS

With the minor modifications indicated below, the methods used were previously described: growth experiments and determination of the amount of ketosugar accumulated in the cultures (Englesberg, 1961; Englesberg *et al.*, 1962); sensitivity to L-arabinose (Englesberg *et al.*, 1962), and to ribitol in the presence of L-arabinose (Katz, 1970); preparation of cell-free extracts by sonic disruption (Neuhard *et al.*, 1978); induction of strains non sensitive and sensitive to L-arabinose (Englesberg, 1961; Englesberg *et al.*, 1962); isolation of L-ribulose from induced cells (Englesberg, 1961) using 0.4M borate buffer at pH8.0 as suspension medium; isolation of L-ribulose-5-phosphate (Englesberg *et al.*, 1962)

TABLE 1
B. SUBTILIS STRAINS

Strain	Genotype	Origin
BR151	<i>metB10 lys5 trpC2</i>	F. E. Young
IGCg701	<i>metB10 lys5 ara1</i>	H. Paveia
IGCg702	<i>metB10 lys5 ara2</i>	»
IGCg703	<i>metB10 lys5 ara3</i>	»
IGCg704	<i>metB10 lys5 ara4</i>	»
IGCg705	<i>metB10 lys5 ara5</i>	»
IGCg707	<i>metB10 lys5 ara7</i>	»
IGCg708	<i>metB10 lys5 ara8</i>	»
IGCg711	<i>metB10 lys5 ara11</i>	»
IGCg712	<i>metB10 lys5 ara12</i>	»
IGCg713	<i>metB10 lys5 ara13</i>	»
IGCg714	<i>metB10 lys5 ara14</i>	»
IGCg715	<i>metB10 lys5 ara15</i>	»
IGCg716	<i>metB10 lys5 ara16</i>	»
IGCg717	<i>metB10 lys5 ara17</i>	»
IGCg720	<i>metB10 lys5 ara20</i>	»
IGCg722	<i>metB10 lys5 ara22</i>	»
IGCg724	<i>metB10 lys5 ara24</i>	»
IGCg726	<i>metB10 lys5 ara26</i>	»
IGCg727	<i>metB10 lys5 ara27</i>	»
IGCg730	<i>metB10 lys5 ara30</i>	»

from extracts of induced cells resuspended in 0.5% the initial volume in Tris/HCl-EDTA buffer (Neuhard *et al.*, 1978); pentose analysis by the Orcinol Test (Ashwell, 1952) and the Cystein-Carbazole Test (Dische & Borenfreund, 1951); separation of arabinose from ribulose by ascendant paper chromatography (Cohen, 1953) and development of chromatographs (Englesberg, 1960) using a 0.5% alkaline solution of triphenyletrazolium in methanol (Sigma) as indicator spray; dephosphorylation of sugarphosphates (Anderson & Wood, 1962) using 6 units of acid phosphatase (Sigma) for 3 μ M of sugarphosphate; determination of L-arabinose isomerase activity (Schleif & Wensink, 1981), L-ribulokinase activity (Mortlock & Wood, 1966) and protein content (Lowry *et al.*, 1951) in cell-free extracts.

RESULTS

The Ara⁻ phenotype is operationally defined here as inability to grow on C minimal medium supplemented with 0.1% L-arabinose, the sugar concentration used for the isolation of Ara⁻ mutants (Paveia & Archer, 1980). Most of our

Ara⁻ strains kept such growth inability at high sugar concentrations. However, strains IGCg702, 705, 711, 713, 715, 720, 722, 726 and 730 reached a degree of development similar to the Ara⁺ control (BR151) when the concentration of sugar was 2%, and showed different degrees of development when it was 0.5 or 1%. We will refer to them as conditional Ara⁻ or cryptic Ara⁺ strains.

Preliminary classification of some Ara⁻ mutants was successfully obtained by using the criteria indicated on Table 2. Data are presented in Fig. 2 and Table 3.

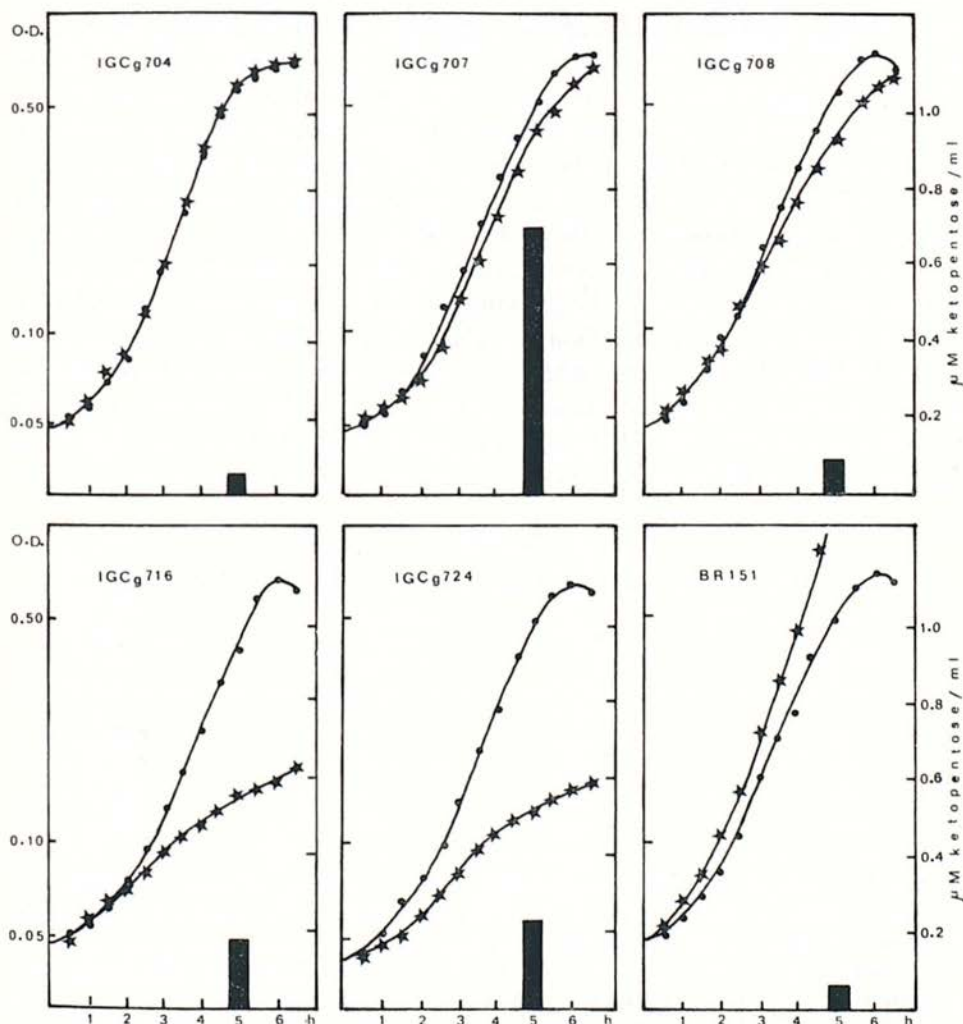


Fig. 2—Growth of Ara⁻ mutants (IGCg704, 707, 708, 716 and 724) and of the Ara⁺ control (BR151) in C medium with 0.1% casein hydrolysate in the presence (★) and absence (●) of 0.2% L-arabinose. ■—amount of ketopentose accumulated in the cultures after 5 hours incubation

IGCg708, 717 and 727 are slightly inhibited by L-arabinose and sensitive to ribitol in the presence of L-arabinose; a mutation in the *araA* gene was therefore assigned to them. IGCg703, 707, 712 and 714 are also moderately inhibited by L-arabinose but are resistant to ribitol and accumulate large amounts of ketosugar; these results are suggestive of a defective *araB* gene. IGCg701 and 704 are resistant both to L-arabinose and to ribitol and do not accumulate ketosugar; they were presumed to carry an altered *araC* gene. Finally, IGCg724 is severely inhibited by L-arabinose, suggesting a mutation in *araD* gene. When streaked on L-arabinose/casein hydrolysate plates the growth of this strain is inhibited and resistant colonies appear, which still exhibit Ara⁻ phenotype because they possess a second mutation in one of the other *ara* genes (data not shown). The same happens when the medium contains 0.1 % of either maltose, glucitol, fructose or trehalose substituting for casein hydrolysate. Nevertheless, only slight inhibition was observed when the additional carbon source was glucose or glycerol, a fact possibly related to catabolite repression by these two sugars, as suggested earlier (Lepesant & Dedonder, 1967).

The remaining strains, however, could not be unambiguously assigned by the criteria proposed in Table 2. The growth of IGCg716 is inhibited by L-arabinose. Notwithstanding, in liquid medium containing casein hydrolysate its development is not inhibited if the sugar is added to exponentially growing cultures with an O.D. equal to 0.1 or higher (data not shown), a behaviour different from that of IGCg724. Unlike this strain and the other Ara⁻ mutants, the growth of IGCg716 is also inhibited in D-xylose (1 %)/casein hydrolysate plates.

TABLE 2
PRELIMINARY CRITERIA FOR CLASSIFICATION OF ARA⁻MUTANTS

L-arabinose resistance ^a	Ribitol resistance ^b	Accumulation of ketosugar ^c	Gene presumably affected ^d
+	-	-	<i>araA</i>
+	+	+	<i>araB</i>
+	+	-	<i>araC</i>
-	nd	-	<i>araD</i>

- growth poorly or not inhibited (+=resistance) vs. severely inhibited (-=sensitivity) both in solid and liquid C medium containing, respectively, 1 % and 0.1 % casein hydrolysate, 0.1 % and 0.2 % L-arabinose.
- resistance (+) vs. sensitivity (-), as described in a., in solid C medium with 1 % casein hydrolysate, 1 % ribitol and 0.1 % L-arabinose; nd = not defined by this test.
- cultures growing in liquid C medium with 0.1 % casein hydrolysate and 0.2 % L-arabinose showing highly positive (+) vs. weak or no (-) Cystein-Carbazole reaction.
- as in *E. coli* (Englesberg, 1961; Englesberg *et al.*, 1962) the genes that code for L-arabinose isomerase, L-ribulokinase and L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase are named, respectively, *araA*, *araB* and *araD*; the regulatory gene is named *araC*.

As for the conditional Ara⁻ mutants, they are not inhibited by L-arabinose; in fact, some of them show an even heavier growth when the sugar is present (Table 3). Definite sensitivity to ribitol in the presence of L-arabinose was only observed when the concentration of the sugar was 2%.

Identification of the ketosugar accumulated by an *araB* mutant. The ketosugar accumulated by IGCg707 was isolated as a thick yellowish syrup. The

TABLE 5

EFFECT OF L-ARABINOSE ON THE GROWTH OF ARA⁻MUTANTS, AMOUNT OF KETOPENTOSE ACCUMULATED IN THE CULTURES AND RIBITOL RESISTANCE

Strains ^a	Inhibition Index ^{b,d}	μ M ketopentose per ml of culture ^{c,d}	Growth with ribitol an L-arabinose ^e
IGCg716	+22.0	0.17	nd
IGCg724	+29.8	0.21	nd
IGCg705	+ 1.7	0.28	+
IGCg707	+ 7.5	0.70	+
IGCg712	+ 6.2	0.58	+
IGCg714	+ 6.5	0.52	+
IGCg708	+ 7.2	0.08	-
IGCg717	+ 5.9	0.06	-
IGCg727	+ 6.2	0.07	-
IGCg701	- 0.5	0.07	+
IGCg702	- 0.5	0.05	+/-
IGCg704	+ 0.7	0.10	+
IGCg705	- 0.1	0.05	+/-
IGCg711	- 2.0	0.05	+/-
IGCg713	- 0.9	0.05	+/-
IGCg715	- 0.7	0.06	+/-
IGCg720	+ 0.1	0.05	+/-
IGCg722	- 1.2	0.04	+/-
IGCg726	- 0.8	0.04	+/-
IGCg750	+ 0.3	0.07	+/-
BR151	-35.2	0.04	-

- strains are grouped according to the similarity of inhibition indexes and to the amount of ketopentose accumulated.
- Inhibition Index = $OD \times 100$ in 0.1% casein hydrolysate medium minus $OD \times 100$ in 0.2% L-arabinose, 0.1% casein hydrolysate medium.
- after 5 hours incubation of cultures.
- average of several independent experiments.
- normal (+), poor (+/-) and no (-) growth after 24 hours incubation in 1% ribitol, 0.1% L-arabinose, 1% casein hydrolysate plates; nd = not defined by this test.

absorption spectrum of the substance in the Cystein-Carbazole Test (data not shown) showed a peak at 540nm and the time required for full colour development was 15 min., a characteristic of ribulose; in this test arabinose is much less reactive (Cohen, 1953). As judged by the Cystein-Carbazole reaction, 86% of the L-arabinose employed was converted to ribulose.

The absorption spectrum in the Orcinol Test (data not shown) showed two peaks, the smaller at 540 nm and the larger at 670 nm; the ratio $O.D._{540}/O.D._{670} = 0.62$ indicates contamination by L-arabinose. By ascendant chromatography two spots appeared, the first with $R_f = 0.18$ and the second with $R_f = 0.33$ corresponding respectively to arabinose and ribulose (Cohen, 1953). Ribulose extracted from spots with $R_f = 0.33$ had an $O.D._{540}/O.D._{670} = 0.79$, a normal value for ribulose (Anderson & Wood, 1962; Simpson *et al.*, 1958).

Identification of the ketosugraphosphate accumulated by an *araD* mutant. Cell-free extracts of IGCg724 contained a substance with a positive reaction in the Cystein-Carbazole Test that required, approximately, 7 hours for full colour development as pentosephosphates do. The absorption spectrum of this substance in the Orcinol reaction, before and after dephosphorylation (data not shown), corresponded to the profile indicative of ribulose-5-phosphate (Simpson *et al.*, 1958): one peak ($O.D._{540}$) and two peaks ($O.D._{540}$ and $O.D._{670}$), respectively. The product of dephosphorylation had a positive reaction in the Cystein-Carbazole test requiring only 15 min for colour development as characteristic of ribulose.

L-arabinose isomerase and L-ribulokinase activities of *Ara*⁻ mutants. The results shown in Table 4 are in agreement with the patterns of growth and with the results of accumulated intermediate products described above.

Altogether the evidence indicates that: i) mutants with isomerase but no kinase activity (IGCg703, 707, 712, 714) are resistant to L-arabinose and to ribitol and accumulate L-ribulose; ii) those with kinase but no isomerase activity (IGCg708, 717, 727) are L-arabinose resistant, ribitol sensitive and do not accumulate ketosugar (we must emphasize that on the assay for estimation of ribulokinase activity we used ribulose produced with strain IGCg707 and that no kinase activity was detected in strain IGC708 when D-ribulose was used instead); iii) the ones with poor or no activity of both enzymes (IGCg701, 704) are L-arabinose and ribitol resistant and no ketosugar is accumulated; iv) finally, IGCg724, which is L-arabinose sensitive and accumulates L-ribulose-5-phosphate, has both isomerase and kinase activity and, therefore, is concluded to lack epimerase activity.

In the cryptic *Ara*⁺ mutants isomerase and kinase increases with the concentration of L-arabinose used for induction, and presumably, the same happens with epimerase activity. This could explain why these mutants grow on minimal medium with L-arabinose as sole source of carbon only at high concentrations of the sugar. The level of activity of both enzymes in IGCg716 is similar to that obtained for IGCg724.

TABLE 4

L-ARABINOSE ISOMERASE AND L-RIBULOKINASE ACTIVITIES OF ARA-MUTANTS

Strains ^a	μ M L-ribulose h ⁻¹ mg prot ⁻¹ produced by cells induced ^b with L-arabinose at:		μ M 1-ribulose-5-P h ⁻¹ mg prot ⁻¹ produced by cells induced ^b with L-arabinose at:	
	0.4 %	2 %	0.4 %	2 %
IGCg716 ^c	20.4	nd	10.9	nd
IGCg724 ^c	10.3	nd	7.2	nd
IGCg703	0.6	0.5	< 0.05	< 0.05
IGCg707	148.0	110.0	< 0.05	< 0.05
IGCg712	65.0	61.0	< 0.05	< 0.05
IGCg714	89.0	36.8	< 0.05	< 0.05
IGCg708	< 0.05	< 0.05	27.0	24.0
IGCg717	< 0.05	< 0.05	11.4	10.3
IGCg727	< 0.05	< 0.05	12.0	9.0
IGCg701	1.5	2.4	0.9	1.8
IGCg702	14.7	40.9	7.3	11.4
IGCg704	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
IGCg705	5.1	15.6	5.5	8.5
IGCg711	7.7	16.3	2.5	6.0
IGCg713	2.3	12.3	1.2	7.2
IGCg715	5.6	46.6	6.4	11.3
IGCg720	5.8	39.0	6.0	14.7
IGCg722	7.4	34.3	5.5	10.2
IGCg726	9.1	23.5	4.2	9.2
IGCg730	13.2	46.2	7.4	11.0
BR151	51.0	58.0	10.0	14.3

a. see Table 3.

b. grown for 16h in liquid C medium containing 1 % casein hidrolysate and L-arabinose at the concentrations indicated.

c. sensitive stains were grown without sugar for the same period and further incubated for another 3h with L-arabinose.

nd. not determined.

DISCUSSION

The described results allow the following conclusions: i) Strains IGCg708, 717 and 727 have a mutation in the *araA* gene, which codes for L-arabinose isomerase. ii) Strains IGCg703, 707, 712 and 714 carry a mutation in the *araB* gene, which codes for L-ribulokinase. iii) Strain IGCg724 has a mutation in the

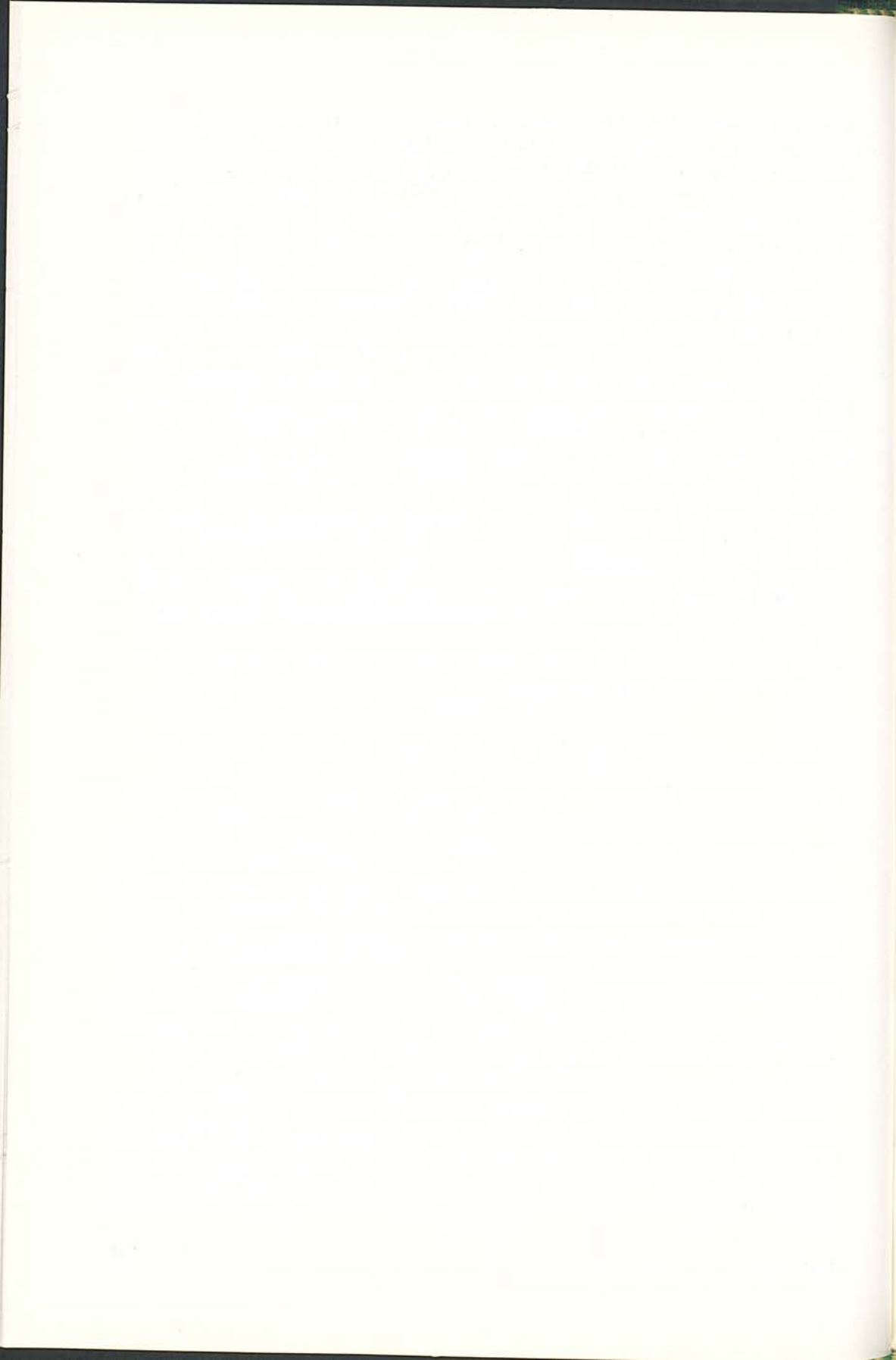
araD gene that codes for L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase. These conclusions are confirmed by the pattern of complementation of cloned *B. subtilis ara* genes with *E. coli* Ara⁻ strains (Sá-Nogueira & Lencastre, 1989). The three structural genes map together (H. Paveia, PhD Thesis, University of Lisbon, Portugal, 1987) in the order *araA*, *araB*, *araD* (Sá-Nogueira & Lencastre, 1989), and are believed to be organized in an operon. iv) Strains IGCg701 and 704 carry a pleiotropic mutation in the regulatory gene *araC*; mutations conferring a constitutive phenotype for L-arabinose utilization map in the same chromosome region where *araC* was found to be located (Sá-Nogueira *et al.*, 1988); this probably means that they are mutations of this gene.

The remaining ten Ara⁻ strains are not yet fully characterized. The conditional Ara⁻ mutants have functional *araA* and *araB* genes and must also have a functional *araD* gene; other studies are necessary in order to decide whether they are transport mutants, regulatory ones (note that their mutations have a similar location to those used to define *araC*), or else. The mutation carried by IGCg716 maps in a third region of the *B. subtilis* chromosome; it confers a pleiotropic phenotype - sensitivity both to L-arabinose and to D-xylose — that is suggestive of a defect in a gene coding for one of the enzymes of the Pentose Phosphate Pathway. Nevertheless, the data obtained so far are insufficient to identify the exact gene altered in this strain.

REFERENCES

- ANDERSON, R. & WOOD, W. (1962). Pathway of L-xylose and L-xylose degradation in *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 296-303.
- ASHWELL, G. (1957). Colorimetric analysis of sugars. In *Methods in Enzymology* vol. III, p. 73. Edited by Colowick & Kaplan. New York: Academic Press.
- COHEN, S. (1953). Studies on D-ribulose and its enzymatic conversion to D-arabinose. *Journal of Biological Chemistry* **201**, 71-83.
- DISCH, Z. & BORENFREUND, E. (1951). A new spectrophotometric method for the detection of ketosugars and trioses. *Journal of Biological Chemistry* **192**, 583-587.
- ENGLESBERG, E. (1960). Inhibition of the growth of *Salmonella typhosa* by L-rhamnose. *Journal of Bacteriology* **79**, 58-64.
- ENGLESBERG, E. (1961). Enzymatic characterization of seventeen L-arabinose negative mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **81**, 996-1006.
- ENGLESBERG, E., ANDERSON, R., WEINBERG, R., LEE, N., HOFFEE, P., HUTTENHAER, G. & BOYER, H. (1962). L-arabinose sensitive, L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **84**, 137-146.
- KATZ, L. (1970). Selection of *AraB* and *AraC* mutants of *Escheria coli*. *Journal of Bacteriology* **102**, 593-595.
- LEPESANT, J.-A. & DEDONDER, R. (1967). Métabolisme du L-arabinose chez *Bacillus subtilis* Marburg Ind⁻168. *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences de Paris, Série D*, **264**, 2683-2686.

- LEPESANT, J.-A. & DEDONDER, R. (1967 a.). Isolement de mutants du système du L-arabinose chez *Bacillus subtilis* Marburg Ind-168. *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences de Paris, Série D*, **264**, 2832-2835.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N. FARR, A. & RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- MORTLOCK, R. & WOOD, W. (1966). D-ribulokinase. In *Methods in Enzymology* vol. IX, p. 466. Edited by A. Wood. New York and London: Academic Press.
- NEUHARD, J. PRICE, A., SCHACK, L. & THOMASSEN, F. (1978). Two thymidilate synthetases in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences Usa* **75**, 1194-1198.
- PASCAL, M., KUNST, F., LEPESANT, J.-A. & DEDONDER, R. (1971). Characterization of two sucrose activities in *Bacillus subtilis* Marburg. *Biochimie* **53**, 1059-1066.
- PAVEIA, H. & ARCHER, L. J. (1980). Location of genes for L-arabinose utilization in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Brotéria-Genética Lisboa I (LXXVI)*, 169-176.
- SÁ-NOGUEIRA, I., PAVEIA, H. & LENCASTRE, H. (1988). Isolation of constitutive mutants for L-arabinose utilization in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **170**, 2855-2857.
- SÁ-NOGUEIRA, I. & LENCASTRE, H. (1989). Cloning and characterization of *araA*, *araB* and *araD*, the structural genes for L-Arabinose utilization in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **171**, 4088-4091.
- SIMPSON, F., WOLIN, M. & WOOD, W. (1958). Degradation of L-arabinose by *Aerobacter aerogenes*, I. A pathway involving phosphorylated intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **230**, 457-472.
- SCHLEIF, R. & WENSINK, P. (1981). *Practical methods in molecular biology*. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.



MAPPING OF *ara* GENES IN *BACILLUS SUBTILIS*

HELENA PAVEIA * and LUÍS ARCHER †

Laboratório de Genética Molecular, Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14,
2781 Oeiras Codex, Portugal

ABSTRACT

Twenty *ara* mutations that confer an Ara⁻ phenotype in *Bacillus subtilis* were mapped by PBS1 transduction. Eleven of these mutations, including two identified as belonging to the regulatory *araC* gene, are located between *cysA* and *smo*. A group of eight mutations in the structural genes, three in *araA*, four in *araB* and one in *araD*, lie between *phoP* and *leuA*; the twentieth *ara* mutation maps near the *thyA* gene.

RESUMO

Vinte mutações que conferem fenótipo Ara⁻ a *Bacillus subtilis* foram localizadas por transdução com o fago PBS1. Onze destas mutações, incluindo duas que afectam o gene regulador *araC*, situam-se entre o gene *cysA* e a marca *smo*. Um grupo de oito mutações nos genes estruturais, três em *araA*, quatro em *araB* e uma em *araD*, localiza-se entre os genes *phoP* e *leuA*; a vigésima mutação *ara* encontra-se próximo do gene *thyA*.

INTRODUCTION

The isolation of ten *Bacillus subtilis* Ara⁻ mutants, unable to grow on minimal medium supplemented with 0.1 % L-arabinose, and the mapping of the corresponding *ara* mutations were reported earlier (Paveia & Archer, 1980).

* Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Ed. C2, 1700 Lisboa, Portugal.

† Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2825 Monte da Caparica, Portugal.

Five of these mutations were found to be localized between *cysA* and *hisA*, four in the region *aroG-leuA* and one cotransduced with *gltA* and presumably, *thyA*.

Subsequently, another set of ten *Ara*⁻ mutants were isolated, whose *ara* mutations are located either in the first or in the second regions mentioned above. This note relates the mapping of such mutations by PBS1 transduction and complements previously published data (Paveia & Archer, 1980).

The biochemical characterization of the *Ara*⁻ mutants, reported elsewhere (Paveia & Archer, accompanying paper), allowed the identification of the affected gene in nine out of the twenty strains studied. Therefore, the location of the four *ara* genes identified so far — the structural genes, *araA*, *araB* and *araD* and a regulatory gene, *araC* — was determined.

MATERIALS

Strains. The *B. subtilis* strains used are listed in Table 1. Phage PBS1 was a gift from C. Anagnostopoulos.

TABLE 1

Bacillus subtilis strains

BD111	<i>thr cysB3 smo trpC2</i>	C. Anagnostopoulos
QB936	<i>leuA8 aro G932 aldA1 trpC2</i>	R. A. Dedonder
QB943	<i>pyrD1 ilvA1 thyA1 thyB1 trpC2</i>	»
IGCg301	<i>hisA1 cysB3 smo trpC2</i>	H. Paveia
IGCg302	<i>aroG932 argA11 ald1 trpC2</i>	»
IGCg303	<i>leuA8 argA11 ald1 phoP8 trpC2</i>	»
IGCg701	<i>metB10 lys3 araC1</i>	»
IGCg702	<i>metB10 lys3 ara2</i>	»
IGCg703	<i>metB10 lys3 araB3</i>	»
IGCg704	<i>metB10 lys3 araC4</i>	»
IGCg705	<i>metB10 lys3 ara5</i>	»
IGCg707	<i>metB10 lys3 araB7</i>	»
IGCg708	<i>metB10 lys3 araA8</i>	»
IGCg711	<i>metB10 lys3 ara11</i>	»
IGCg712	<i>metB10 lys3 araB12</i>	»
IGCg713	<i>metB10 lys3 ara13</i>	»
IGCg714	<i>metB10 lys3 araB14</i>	»
IGCg715	<i>metB10 lys3 ara15</i>	»
IGCg716	<i>metB10 lys3 ara16</i>	»
IGCg717	<i>metB10 lys3 araA17</i>	»
IGCg720	<i>metB10 lys3 ara20</i>	»
IGCg722	<i>metB10 lys3 ara22</i>	»
IGCg724	<i>metB10 lys3 araD24</i>	»
IGCg726	<i>metB10 lys3 ara26</i>	»
IGCg727	<i>metB10 lys3 araA27</i>	»
IGCg730	<i>metB10 lys3 ara30</i>	»

Media. The media were: SPI (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961) with 0.1% glucose for the selection of recombinants; C (Pascal *et al.*, 1971) with 0.1% L-arabinose to screen the Ara⁺ and Ara⁻ colonies; LP (Yamane & Maruo, 1987; —, 1978a.) for growth of Pho⁺ and Pho⁻ colonies; and Brain Heart Infusion (Difco) added with 0.5% Yeast Extract (Difco) for the development of cultures for transduction. The nutritional requirements were added to the minimal media to a final concentration of 20 µg/ml except thymine and uracil (50 µg/ml).

METHODS

The methods used in this study were described: transduction analysis with phage PBS1 (Paveia & Archer, 1980), identification of Pho⁺ and Pho⁻ colonies with p-nitrophenylphosphate (Le Hégarat & Anagnostopoulos, 1969) and of ThyA⁺ ThyB⁻, ThyA⁻ ThyB⁺ colonies in medium containing trimethoprim (Neuhard *et al.*, 1978). Smo⁺ and Smo⁻ colonies were distinguished in SPI with glucose supplemented with 50 µg/ml of glutamate.

RESULTS AND DISCUSSION

Using Ara⁻ strains as donors, and IGCg301 or QB936 as recipients, we found that six *ara* mutations (*araC1*, *ara13*, 20, 22, 26 and 30) cotransduced with *cysA* and *hisA* in the same way as *araC4* and four other *ara* mutations already mapped (*ara2*, 5, 11 and 15); the remaining four (*araA17*, *araA27*, *araB12* and *araD24*) cotransferred with *aroG* and *leuA* and, therefore, they are in the same region of another four mutations previously studied (*araA8*, *araB3*, *araB7* and *araB14*).

Three- and four-factor transduction crosses using as donors Ara⁻ strains, which carry *ara* mutations located in the first region, and as recipients, BD111 and IGCg301, revealed the order: *thr cysB ara smo hisA* (Table 2). Similar experiments involving as donors Ara⁻ strains that carry *ara* mutations in the second region and as recipients strains IGCg302 and IGCg303 showed the order: *aroG argA phoP ara leuA* (Table 3).

The distances expressed in the maps of Fig. 1 were determined by two-factor crosses. As the percent of recombination between the *ara* mutations and the other markers were similar (data not shown), we used the mean values for the construction of these maps.

IGCg716 carries the only *ara* mutation that maps in a third region, near the terminus of the *B. subtilis* chromosome. As stated before (Paveia & Archer, 1980), we obtained Thy⁺ Ara⁻ cotransductants when using IGCg716 as donor

TABLE 2

THREE- AND FOUR-FACTOR TRANSDUCTION CROSSES INVOLVING *araC4*, *hisA1*,
thr5, *smo* AND *cysB5*

Relevant genotype of:		Recombinants				
Recipient	Donor	Selection	Classes	N.		
<i>thr5 cysB5 smo</i>	<i>araC4</i>	Thr ⁺	Thr ⁺ Cys ⁺ Ara ⁺	21		
			Thr ⁺ Cys ⁺ Ara ⁻	19		
			Thr ⁺ Cys ⁻ Ara ⁺	60		
			Thr ⁺ Cys ⁻ Ara ⁻	0		
		Cys ⁺ Smo ⁺	Cys ⁺ Smo ⁺ Thr ⁺ Ara ⁺	0		
			Cys ⁺ Smo ⁺ Thr ⁺ Ara ⁻	5		
			Cys ⁺ Smo ⁺ Thr ⁻ Ara ⁺	1		
			Cys ⁺ Smo ⁺ Thr ⁻ Ara ⁻	94		
		Cys ⁺ Smo ⁻	Cys ⁺ Smo ⁻ Thr ⁺ Ara ⁺	39		
			Cys ⁺ Smo ⁻ Thr ⁺ Ara ⁻	37		
			Cys ⁺ Smo ⁻ Thr ⁻ Ara ⁺	1		
			Cys ⁺ Smo ⁻ Thr ⁻ Ara ⁻	25		
		<i>hisA1 cysB5</i>	<i>araC4</i>	His ⁺	His ⁺ Cys ⁺ Ara ⁺	0
					His ⁺ Cys ⁺ Ara ⁻	26
					His ⁺ Cys ⁻ Ara ⁺	20
					His ⁺ Cys ⁻ Ara ⁻	54
Cys ⁺	Cys ⁺ His ⁺ Ara ⁺			0		
	Cys ⁺ His ⁺ Ara ⁻			15		
	Cys ⁺ His ⁻ Ara ⁺			56		
	Cys ⁺ His ⁻ Ara ⁻			29		

Strains BD111 and IGCg301 were used as recipients and IGCg704 as donor. The order implied by these results is: *thr5* — *cysB5* — *araC4* — *smo* — *hisA1*. Similar results were obtained when the donor strain carried either *araC1* or *ara 2, 5, 11, 13, 15 20, 22, 26, and 30*.

and QB943 as recipient. On the basis of our finding that the mutation of IGCg716, *ara16*, did not cotransfer with *ilvA*, which lies near the *thyB* gene, we assumed that the high frequency of Ara⁻ colonies among Thy⁺ transductants was due to its cotransduction with the *thyA* gene. We confirmed this assumption by first separating ThyA⁺ ThyB⁻ from ThyA⁻ ThyB⁺ colonies and then screening for the Ara⁻ phenotype. The percent of recombination between *ara16* and *thyA* was found to be 17. Mutation *ara16* cotransduces with the *gltA* maker too, the percent of recombination between them being 92 (Paveia & Archer, 1980). The order of *ara16*, *gltA* and *thyA* was not determined.

TABLE 5

THREE- AND FOUR-FACTOR CROSSES INVOLVING *araB7*, *aroG932*, *argA11*, *phoP8* AND *leuA8*

Relevant genotype of:		Recombinants				
Recipient	Donor	Selection	Classes	N.		
<i>aroG932 argA11</i>	<i>araB7</i>	Aro ⁺	Aro ⁺ Arg ⁺ Ara ⁺	28		
			Aro ⁺ Arg ⁺ Ara ⁻	37		
			Aro ⁺ Arg ⁻ Ara ⁺	135		
			Aro ⁺ Arg ⁻ Ara ⁻	0		
		Arg ⁺	Arg ⁺ Aro ⁺ Ara ⁺	64		
			Arg ⁺ Aro ⁺ Ara ⁻	79		
			Arg ⁺ Aro ⁻ Ara ⁺	17		
			Arg ⁺ Aro ⁻ Ara ⁻	40		
		<i>leuA8 argA11 phoP8</i>	<i>araB7</i>	Leu ⁺	Leu ⁺ Arg ⁺ Ara ⁺	3
					Leu ⁺ Arg ⁺ Ara ⁻	64
					Leu ⁺ Arg ⁻ Ara ⁺	94
					Leu ⁺ Arg ⁻ Ara ⁻	39
Arg ⁺	Arg ⁺ Leu ⁺ Pho ⁺ Ara ⁺			z		
	Arg ⁺ Leu ⁺ Pho ⁺ Ara ⁻			38		
	Arg ⁺ Leu ⁺ Pho ⁻ Ara ⁺			2		
	Arg ⁺ Leu ⁺ Pho ⁻ Ara ⁻			0		
	Arg ⁺ Leu ⁻ Pho ⁺ Ara ⁺			20		
	Arg ⁺ Leu ⁻ Pho ⁺ Ara ⁻			40		
	Arg ⁺ Leu ⁻ Pho ⁻ Ara ⁺			32		
	Arg ⁺ Leu ⁻ Pho ⁻ Ara ⁻			0		

IGCg302 and IGCg303 were used as recipients and IGCg707 as donor. The order *aroG932* — *argA11* — *phoP8* — *araB7* — *leuA8* was inferred from these results. Similar results were obtained when the donor strain carried other mutations either in *araB* gene or in the *araA* and *araD* genes.

Attempts were also made to use the Ara⁻ mutants as recipients but the results (data not shown) were not in good agreement with the ones obtained in the reciprocal crosses. The lack of agreement derived from an excess of wild type phenotypes over deficient phenotypes for the unselected markers when the primary selection was for Ara⁺ colonies. This may be due to a slow growth of Ara⁺ transductants carrying deficiencies which would not enable them to reach visible colony size. Nevertheless we think that the twenty *ara* mutations studied may be helpful on mapping experiments provided that Ara⁺ is not used for primary selection.

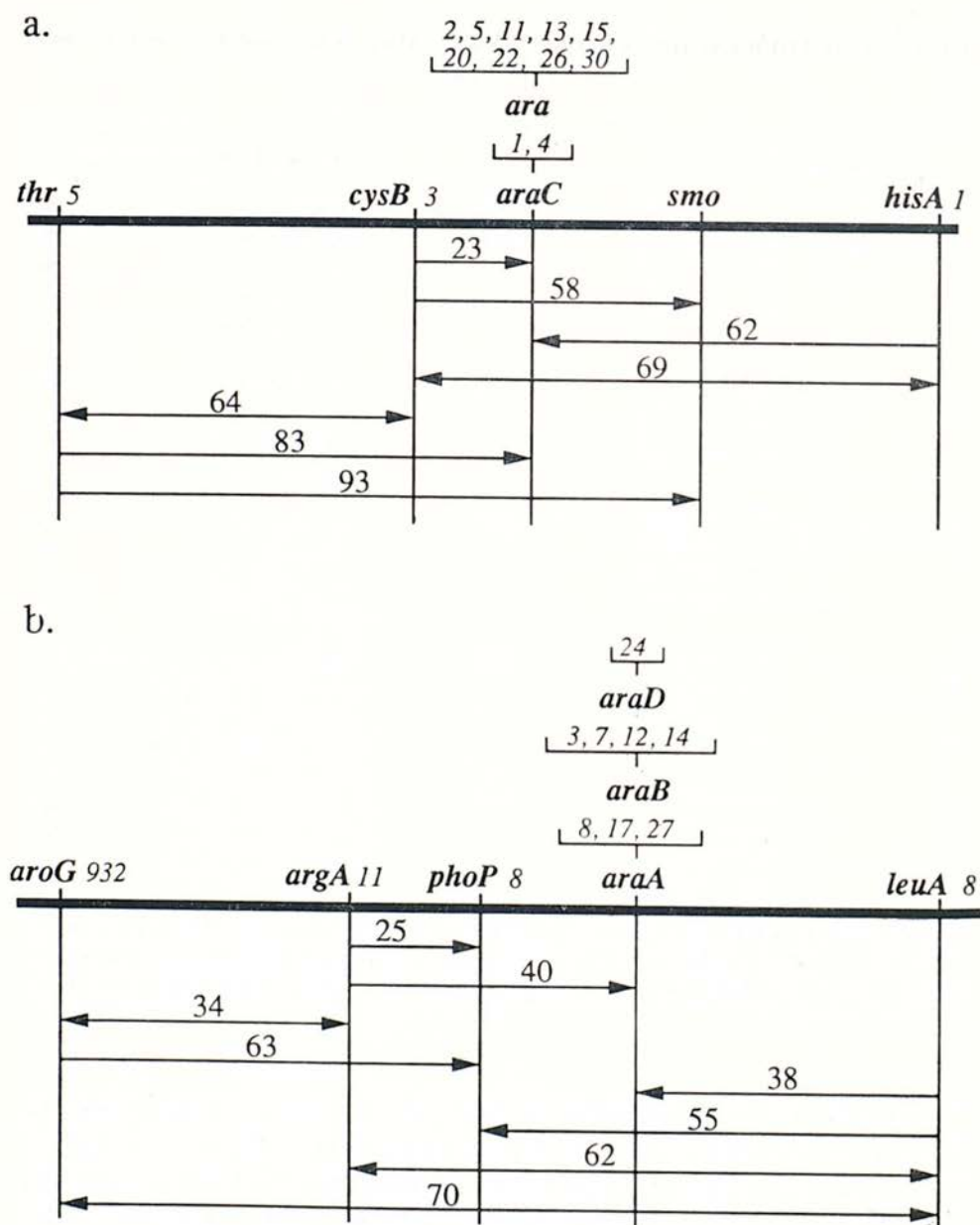


Fig. 1—Location of the regulatory gene *araC*, and other *ara* mutations (a.), and of the structural genes *araA*, *araB* and *araD* (b.) in the *B. subtilis* chromosome. Distances are expressed as percent of recombination (100-percent of cotransduction). The arrows point the unselected makers.

REFERENCES

- ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPIZIZEN, J. (1951). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **81**: 741-746.
- LE HÉGARAT, J. C. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1969). Localisation chromosomique d'un gène gouvernant la synthèse d'une phosphatase alcaline chez *Bacillus subtilis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **269** (D): 2048-2050.
- NEUHARD, J. PRICE, A., SCHACK, L. & THOMASSEN, F. (1978). Two thymidilate synthetases in *Bacillus subtilis*. *Proceedures of the National Academy of Sciences USA* **75**: 1194-1198.
- PASCAL, M., KUNST, F., LEPESANT, J.-A. & DEDONDER, R. (1971). Characterization of two sucrose activities in *Bacillus subtilis* Marburg. *Biochimie* **53**: 1059-1066.
- PAVEIA, H. & ARCHER, L. (1980). Location of genes for L-arabinose utilization in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Brotéria-Genética Lisboa* **I** (LXXVI): 169-176.
- PAVEIA, H. & ARCHER, L. (1991). Genes for L-arabinose utilization in *Bacillus subtilis*. (accompanying paper).
- YAMANE, K. & MARUO, B. (1978). Purification and characterization of extracellular soluble and membrane-bound insoluble alkaline phosphatases possessing phosphodiesterase activities in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **134**: 100-107.
- YAMANE, K. & MARUO, B. (1978 a.). Alkaline phosphatase possessing alkaline phosphodiesterases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **134**: 108-114.



HISTOLOGICAL STUDY OF THE HETEROZIGOSITY EFFECT OF COFFEE RESISTANCE GENES SH₁ AND SH₄SH₅ TOWARDS *HEMILEIA VASTATRIX*

MARIA DO CÉU SILVA, LUISETE RIJO, C. J. RODRIGUES JR,
MARIA ISABEL VASCONCELOS

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
Quinta do Marquês, 2780 Oeiras — Portugal

ABSTRACT

The effect of heterozygosity of the resistance genes SH₁ and SH₄SH₅ in plants of *Coffea arabica* when inoculated with the same avirulent culture of *Hemileia vastatrix* was histologically studied. In the coffee tree 128/2 (SH₁SH₁) the fungus ceased its growth mainly on the first stages of infection giving rise to a reaction of complete resistance (*flt*). However, in coffee 128/2 (SH₁ sh₁) and in coffee H 168/8 ((849/1 × 128/2) — SH₇ × SH₁), both with SH₁ heterozygous, besides the aborted infections (many of them corresponding to *flt*), others evolved and produced chloroses which sporulated giving rise to an incomplete type of resistance. Of the plants bearing genes SH₄SH₅ only H 454/43 ((849/1 × 110/5) — SH₇ × SH₄SH₅), where genes SH₄ and SH₅ are both in the heterozygous condition, presented a mixture of resistance (*flt*) and susceptibility reactions. Callose and lignin were compounds detected in the reactions of resistance.

RESUMO

Estudou-se histologicamente o efeito da heterozigocidade dos genes de resistência SH₁ e SH₄SH₅ de plantas de *Coffea arabica*, quando inoculadas com a mesma cultura avirulenta de *Hemileia vastatrix*. No cafeeiro 128/2 (SH₁SH₁) o fungo cessou o seu crescimento predominantemente nas primeiras fases da infecção originando uma reacção de resistência completa (*flt*). Porém, em 128/1 (SH₁sh₁) e em H 168/8 ((849/1 × 128/2) — SH₇ × SH₁), ambos com SH₁ heterozigóticos, a par de infecções abortadas (muitas das quais corresponderam a *flt*) outras evoluíram originando cloroses que em geral esporularam, ou seja, observou-se resistência incompleta. Das plantas portadoras dos genes SH₄SH₅ somente em H 454/43 ((849/1 ×

This research is part of the senior author's M Sc dissertation (Instituto Superior de Agronomia — Universidade Técnica de Lisboa).

$\times 110/5$) — $SH_7 \times SH_4SH_5$), onde para além do gene SH_4 também SH_5 se apresenta em heterozigotia, se observou uma mistura de reacções de resistência (*flr*) e de susceptibilidade. A calose e a lenhina foram os compostos detectados nas reacções de resistência.

INTRODUCTION

The host-pathogen interaction produces generally a response that is the result of the interaction between the genotypes of the host and of the pathogen and is also dependent upon the existing environment before and after the infection (ROWELL, 1984). The gene-for-gene relationship of FLOR (1955), according to which for each gene conditioning the resistance in the host there is a gene conditioning the virulence in the pathogen, applies among others to the *Coffea spp* — *Hemileia vastatrix* Berk and Br. interactions (NORONHA-WAGNER and BETTENCOURT, 1967). This relationship is very often simplified and applied only to the homozygous genotypes of the host and the pathogen, by assuming in general that the resistance genes are dominant and the virulence genes are recessive (ROELFS, 1988). This supposition is generally accepted in the coffee-rust interaction but ESKES (1983) admits the possibility that the genes for resistance and the genes for avirulence may not be completely dominant. The importance of the heterozygosity of the host is stressed by DICK and SAMBORSKI (1968), ROELFS and McVEY (1979), ROELFS (1988) and ISLAM *et al.* (1989) who indicate that plants heterozygous for a given resistance gene are sometimes less resistant than the plants which are homozygous for the same gene and that the genetic background might have a significant effect on the response of the infection type.

In the present work it was histologically studied the response to the same avirulent culture of *H. vastatrix* of two groups of plants of *Coffea arabica* L. bearing respectively the genes for resistance SH_1 and SH_4SH_5 . The objective of the study was to know what was the influence of the heterozygosity of the referred genes on the expression of resistance. Simultaneously it was studied the case of a coffee plant in which those genes were in the recessive stage, being the plant susceptible for that reason. The histologic studies considered both the development of the fungus and the eventual modifications observed on the host.

MATERIAL AND METHODS

Coffee plants and coffee rust

The coffee plants used (Table I) were maintained in the greenhouse conditions. The rust uredospores used belonged to culture 1427 of *H. vastatrix* from Kenya, considered as physiologic race II and bearing as such the virulence gene v_5 .

TABLE I

PHYSIOLOGIC GROUPS, ORIGIN AND GENES FOR RESISTANCE (HOMO OR HETEROZYGOUS) OF THE DIFFERENT PLANTS UNDER STUDY

Plants	Physiologic groups	Origin	Genes for resistance (Homo ou heterozygous)
849/1 — Matari	β	Ethiopia	SH ₇
128/2 — Dilla & Alghe	α	»	SH ₁ (homoz.)
128/1 » »	α	»	SH ₁ (heroz.)
H 168/8 = (849/1 × 128/2)	α	—	SH ₇ × SH ₁
110/5 — S4 Agaro	J	Ethiopia	SH ₄ SH ₅ (homoz.)
H 454/43 = (849/1 × 110/5)	J	—	SH ₇ × SH ₄ SH ₅
H 310/2 = (19/1 — Caturra × 110/5)	J	—	SH ₅ × SH ₄ SH ₅

Inoculation and incubation

Young and adult leaves were inoculated according to the technique described by D'OLIVEIRA (1954-57) and D'OLIVEIRA and RODRIGUES (1961) by using 0.25 mg uredospores per leaf.

Fungus growth and host colonization

Cross sections of infected leaf fragments were made with a freezing microtome, stained and mounted with cotton blue in lactophenol, following the technique described by RIJO and RODRIGUES (1978).

The fungus growth was evaluated in the cross sections of the leaves of each coffee plant under study. For this purpose a micrometric eye-piece was used to measure in each infection the length of all the hyphae which constituted the mycelial mass. Simultaneously, the number of haustoria present was counted. In order to obtain the mean value of these parameters, 50 infections per plant were considered as a minimum in each day of observation. These evaluations were made from the third day after inoculation onwards, which is the time where differences in mycelial growth start to be observed between the compatible and the incompatible coffee-rust combinations (RIJO and RODRIGUES, 1978). These measurements were made up to the ninth day after inoculation because in the coffee plants which behaved as susceptible (genes for resistance in the recessive stage) the mycelial development became difficult to single out the infections.

When the symptoms corresponded to resistance reactions (particularly flecks with tumefactions-*flt*) the following phases of the infection process in which the

fungus ceased growth were analysed: Appressorium (phase 1), penetration hypha (phase 2), anchor (phase 3) and post-anchor (phase 4). For statistical purposes 100 infections were observed in each host.

Cytological tests:

Aniline blue fluorescence test

Cross sections of the infected fragments were placed in phosphate buffer (K_2HPO_4) 0.07 M, pH 8.9, during 10 minutes, and then removed to a 0.01 % solution of aniline blue on the same buffer for about 10-15 minutes after which they were mounted in the same solution (RIJO and VASCONCELOS, 1984). Callose deposits were identified by their yellow brilliant fluorescence (ESCRICH and CURRIER, 1964).

Autofluorescence

Cross sections of fresh tissue fragments were mounted in water or phosphate buffer (K_2HPO_4) 0.07 M, pH 8.9, and observed under the fluorescence microscopy. Lignin-like compounds were detected by its autofluorescence.

Phloroglucinol-HCl test

This test for lignin was applied to cross sections of fresh coffee leaves as previously described in the coffee-rust interaction (TIBURZY *et al.*, 1983; RIJO and VASCONCELOS 1984; MARTINS *et al.*, 1985), following the technique of SHERWOOD and VANCE (1976).

All the microscopic observations were made with a microscope Leitz Dialux 20 equipped with a mercury bulb HB0 50 W, ultra-violet light (excitation filter B1 340-380; barrier filter LP 430) and blue light (excitation filter BP 450-490; barrier filter LP 515).

Statistical analysis

It was accomplished with variance analysis and when the colonization of the fungus was studied in the first phases of infection, the comparison of the means was made by using TUKEY's test. When the stages where the fungus ceased growth were evaluated the analysis of variance was done with coded data and SCHEFFÉ's test was used for comparison of the means.

RESULTS

Host reactions and their microscopic observation

The reactions of the different coffee plants used to the culture 1427 of *H. vastatrix* were the following:

- 849/1 (SH_7)— abundant sporulation (reaction 4) about 30 days after the inoculation — (Fig. 1a).
- 128/2 (SH_1SH_1)— chlorotic flecks with tumefactions (*flt*) (Fig. 2a).
- 128/1 (SH_1sh_1)— *flt* and scattered chloroses, in general with late and scarce sporulation (about 45 days after inoculation) — (Fig. 3a).
- H 168/8 (849/1 \times 128/2 — ($SH_7 \times SH_1$))— *flt* and scattered or large coalescent sporulating chloroses (Fig. 4a).
- 110/5 ($SH_4SH_4SH_5SH_5$)— *flt* — (Fig. 5a).
- H 310/2 (19/1 * \times 110/5 — ($SH_5 \times SH_4SH_5$))— *flt* — (Fig. 6a).
- H 454/43 (849/1 \times 110/5 — ($SH_5 \times SH_4SH_5$))— *flt*. It must be noted that in each inoculation, in a minimum of 4 pairs of leaves per plant, at least one leaf or one pair of leaves showed scattered chloroses in small number which originated weak sporulation 1.5—2 months after the inoculation (Fig. 7a). The produced uredospores after being collected and inoculated on the differentials proved to belong to the same original culture used.

In the different inoculations made, the *flt* were observed 11-13 days after the inoculation.

In 849/1 (SH_7) the majority of the infections showed mycelium well developed, without apparent inhibition of growth or sporulation. In 128/1 (SH_1sh_1), H 168/8 ($SH_7 \times SH_1$) and H 454/43 ($SH_7 \times SH_4SH_5$) the chlorotic areas with sporulation showed mycelium well developed with various haustoria in the mesophyll cells. Sporogenic hyphae and uredosporic sori were also observed (Figs. 3b and 7b).

The *flt* corresponded always to cells of the spongy tissue with bigger size (having thicker cell walls) around the infections where the fungus ceased its growth on the different phases (Fig. 2b). Even in the cases where the mycelium grew out a little farther, a reduced number of haustoria was observed. Altered cells with thick walls and granular cytoplasm were also observed around the aborted hypha but without the formation of tumefaction (Figs. 3c, 6b, 7c).

Process of the fungus colonization

The mean value of mycelial growth and the number of haustoria per infection did not differ significantly on the 3rd day after inoculation in the group of

* When inoculated with the culture 1427 produced a reaction type 4.

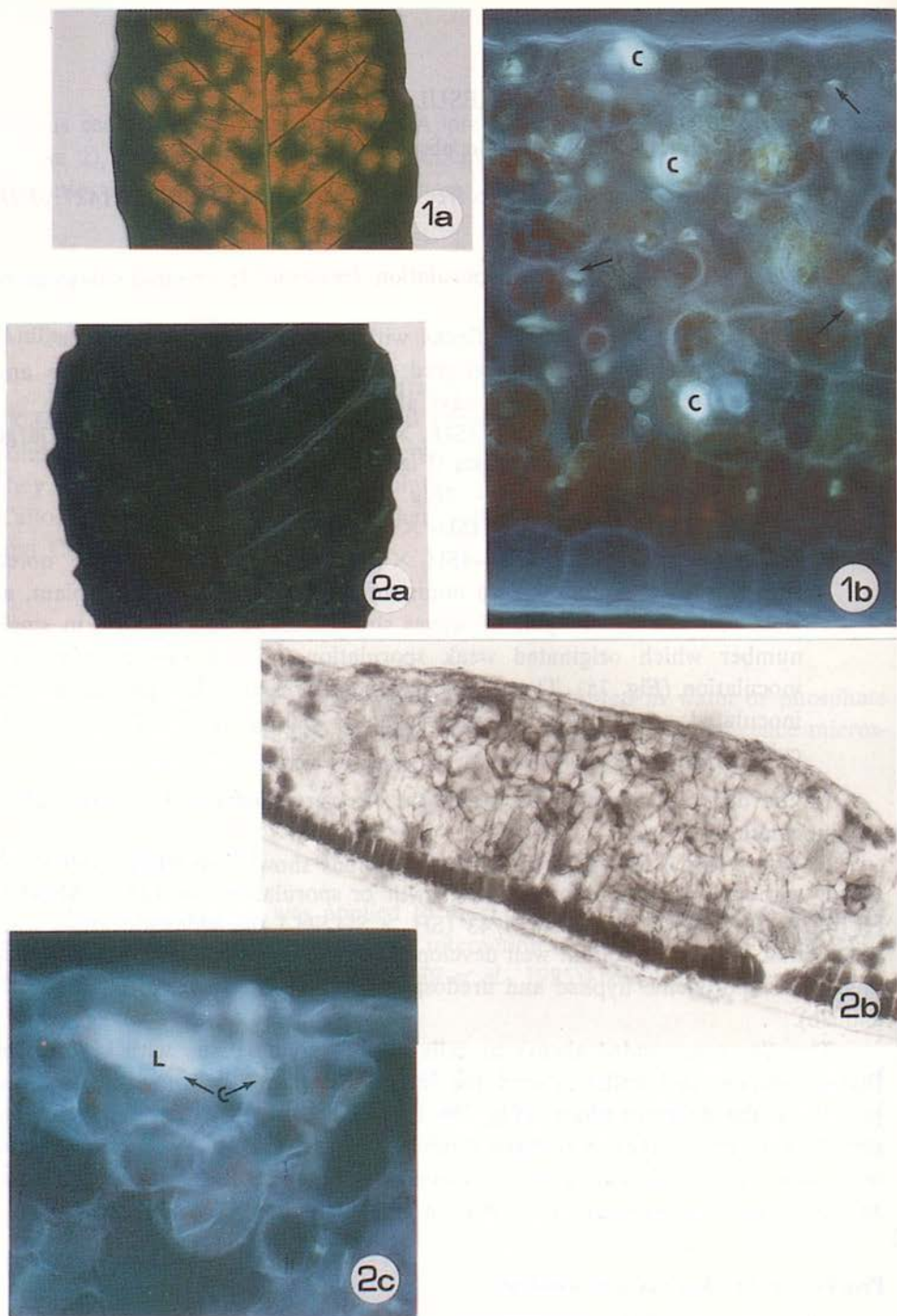


Fig. 1 — 849/1 (SH_7): a) Abundant sporulation — Reaction 4; b) Callose (C) only around some haustoria and haustorial mother cells (arrows) in one chlorotic zone — UV light (x400).
 Fig. 2 — 128/2 (SH_1SH_1): a) Reaction *flt*; b) Senescent mycelium in the mesophyll between cells of the tumefaction (x150); c) Lignified cells (L) around aborted hypha showing disseminated callose (C) — UV light (x400).

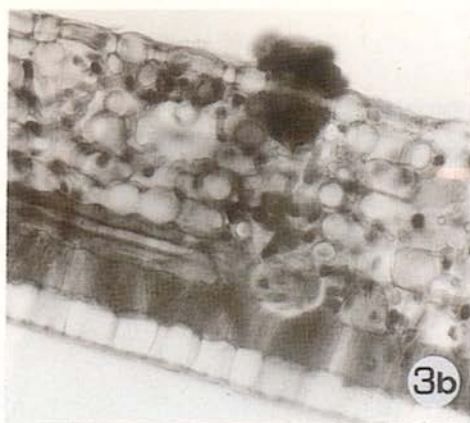


Fig. 3 — 128/1 (SH_1sh_1): a) *flt* and dispersed chloroses with scarce sporulation; b) Mycelium distributed in the mesophyll and a uredosporic sorus (x250); c) Senescent mycelium in post-anchor stage with altered cells around it (x400).

Fig. 4 — H 168/8 ((849/1 × 128/2) — $SH_7 \times SH_1$ — *flt* and chloroses with abundant sporulation.

Fig. 5 — 110/5 ($SH_4SH_4SH_5SH_5$): a) Reaction *flt*; b) Lignified cells (L) around the aborted hypha with callose dots (C) — UV light (x400).

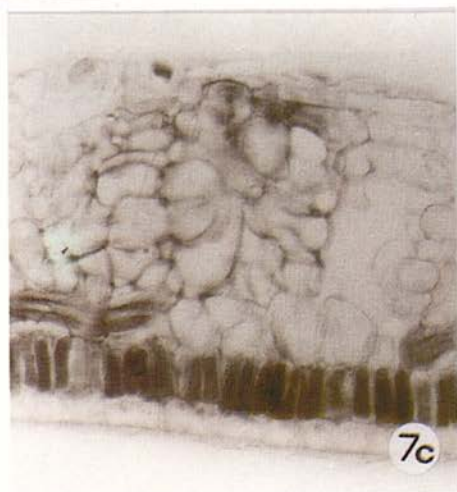
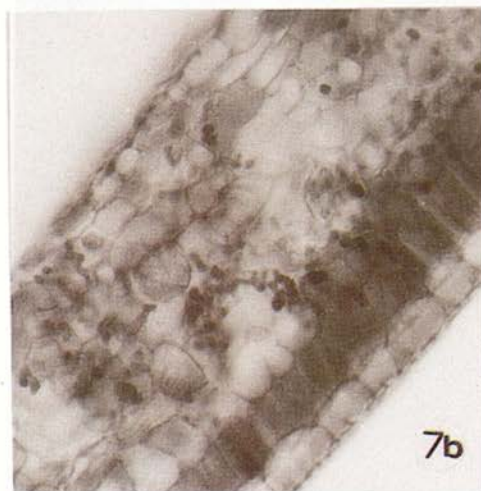


Fig. 6 — H 310/2 ((19/1 × 110/5) — SH₅ × SH₄SH₅): a) Reaction *flt*; b) Senescent mycelium in a post-anchor stage; cells with thickened wall (x400).

Fig. 7 — H 454/43 ((849/1 × 110/5) — SH₇ × SH₄SH₅): a) *flt* and dispersed chloroses with scarce sporulation; b) High density of mycelium in a chlorotic zone (x250); c) Senescent mycelium in the first layers of spongy parenchyma and between cells with thickened walls (x250).

plants bearing the gene for resistance SH_1 (in the homozygous or heterozygous condition) and in 849/1 (SH_7) (Tables 2 and 3). At the 3rd day, some aborted infections started to be noticed showing mycelium meager and plasmolysed sometimes swelled, including the coffee plant 849/1 that behaved as susceptible (resistance genes at the recessive stage). Similar observations are reported by MARTINS *et al.* (1985) who point out values of 50-75% of aborted penetrations on the first phases of the infection process in susceptible coffee plants. In the present study, however, in 849/1 the number of aborted infections was always much less than the infections which apparently evolved without any growth inhibition.

When on the 6th and 9th days after the inoculation the process of colonization (expressed in mycelial growth and number of haustoria per infection) was compared in 128/2 (SH_1SH_1) and 128/1 (SH_1sh_1) no significant differences were found. It must be noted, however, that while in 128/2 the total number of infections was aborted, in 128/1 some infections presented normal morphology and evolved giving rise to chloroses with a very late sporulation. Thus, in the presence of the resistance gene SH_1 considered as dominant but in the heterozygous condition in 128/1 (NORONHA-WAGNER and BETTENCOURT, 1967), the culture 1427 (with the gene of virulence v_5) induced incomplete resistance.

In the hybrid H 168/8 ((849/1 × 128/2) - SH_7 × SH_1) the process of fungus colonization in the 6th and 9th days after the inoculation was more like of the susceptible parent 849/1, what is in agreement with the symptoms that presented (intermediate reaction that, with the time, and at least on some inoculated leaves, was close to the susceptible reaction). On the other hand, H 168/8

TABLE 2
MEAN MYCELIAL LENGHT/INFECTION (RUST CULTURE 1427) IN THE COFFEE PLANTS 128/2 (SH_1SH_1), 128/1 (SH_1sh_1), H 168/8 (SH_7 × SH_1) and 849/1 (SH_7), 3,6 and 9 DAYS AFTER INOCULATION

Days after Inoculation	Mean mycelial length (μ m)/infection in the coffee plants			
	128/2	128/1	H 168/8	849/1
3	31.20a A (12-65; \pm 16.52)	31.56a (12-81; \pm 19.17)	33.06a (12-84; \pm 16.07)	36.12a (12-84; \pm 21.03)
6	31.23a (12-72; \pm 15.28)	50.64a (12-141; \pm 34.30)	100.32b (12-255; \pm 79.24)	133.92b (15-384; \pm 99.23)
9	31.56a (12-72; \pm 16.11)	53.16a (12-198; \pm 42.13)	142.80b (15-423; \pm 124.40)	233.76c (21-618; \pm 211.22)

A (Range; \pm standard deviation of means)

Values in the same row followed by different letters differed significantly according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

TABLE 3

MEAN NUMBER OF HAUSTORIA/INFECTION (CULTURE 1427) IN THE COFFEE PLANTS 128/2 (SH₁SH₁), 128/1 (SH₁sh₁), H 168/8 (SH₇ × SH₁) AND 849/1 (SH₇), 3, 6 and 9 days after inoculation

Days after inoculation	Mean number of haustoria/infection in the plants			
	128/2	128/1	H 168/8	849/1
3	0.12a A (0.3; ± 0.60)	0.32a (0.3; ± 0.90)	0.36a (0.3; ± 0.86)	0.80a (0.3; ± 1.23)
6	0.36a (0.3; ± 1.00)	1.24ab (0.4; ± 1.51)	1.96b (0.5; ± 1.62)	2.20b (0.5; ± 1.68)
9	0.36a (0.3; ± 1.00)	1.40ab (0.4; ± 1.47)	2.28bc (0.7; ± 1.96)	3.04c (0.8; ± 2.26)

A (Range; ± standard deviation of means)

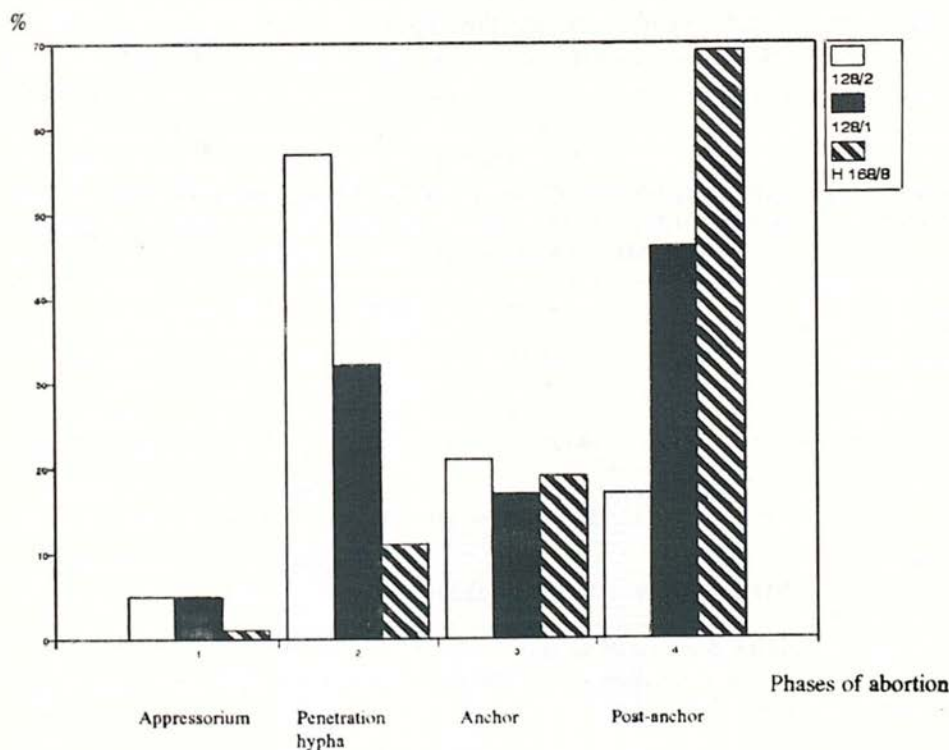
Values in the same row followed by different letters differed significantly according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

(SH₇ × SH₁) and 128/1 (SH₁sh₁) differentiated from each other on the 6th and 9th days after the inoculation regarding the mycelial length that was always higher on the hybrid. It is admitted that this difference might be determined by the genetic constitution of 849/1 (SH₇), since in both cases the resistance gene SH₁ is in the heterozygous condition.

When the coffee plants bearing gene SH₁ showed symptoms the phases in which the fungus ceased growth were evaluated on the areas of the leaf with *flt*. Those observations did not include 849/1 (SH₇) because on this plant most of the infections presented a well developed mycelium. Thus, when the phases of fungus abortion were compared (Fig. 8), it was observed that the phase of penetration hypha (phase 2) was that which occurred with higher frequency (57%) in 128/2 (SH₁SH₁), whereas in 128/1 (SH₁sh₁) and in H 168/8 (SH₇ × SH₁) that occurred at the phase of post-anchor (phase 4) with frequencies of 46% and 69% respectively. The comparison of the means showed that in H 168/8 the fungus totally aborted in more advanced phases of the infection process, in opposition to 128/2 and that 128/1 was in an intermediate position; those plants were differentiated among themselves.

When the first phases of infection were evaluated in the coffee plants possessing the resistance genes SH₄SH₅ (in the homo or heterozygous condition) and were compared with 849/1 (SH₇) it was observed that the mean values of the mycelium length and of the number of haustoria per infection (Tables 3 and 4) were again not significantly different at the 3rd day after the inoculation, when aborted infections start to be observed. On the 6th and 9th days after ino-

Fig. 8 - Percentage of infections which aborted at different phases (1-appressorium; 2-penetration hypha; 3-anchor; 4-post-anchor) in the hosts 128/2 (SH_1SH_1), 128/1 (SH_1sh_1), H 168/8 [(849/1 \times 128/2) - $SH_7 \times SH_1$].



128/2: Mode = 2 (penetration hypha); $\bar{x}_{w1} = 2.50$ a

128/1: Mode = 4 (post-anchor) ; $\bar{x}_{w2} = 3.04$ b

H 168/8: Mode = 4 (post-anchor) ; $\bar{x}_{w3} = 3.56$ c

Note: Values followed by different letters differed significantly according to Scheffe's test at $P \leq 0.001$.

ulation, the two parameters under study were also not different in 110/5 ($SH_4SH_4SH_5SH_5$), H 310/2 ($SH_5 \times SH_4SH_5$) and H 454/43 ($SH_7 \times SH_4SH_5$). However, any of these plants was differentiated from 849/1 (SH_7) that presented infections with mycelial length significantly higher. This fact is in agreement with the susceptible behaviour of 849/1 towards culture 1427.

Besides 849/1 (SH₇), of the remaining plants bearing genes SH₄SH₅, only H 454/43 (SH₇ × SH₄SH₅) produced uredospores where in some leaves it was observed an intermediate reaction (*flt* and scattered chloroses that in general originated a late and weak sporulation). To evaluate the process of fungus colonization in the leaf fragments before the appearance of the symptoms, most of the observed infections presented mycelium with limited growth and senescent aspect. Thus, the values relative to the fungus colonization process in H 454/43

TABLE 4
MEAN MYCELIAL LENGHT/INFECTION (RUST CULTURE 1427) IN THE COFFEE PLANTS 110/5 (SH₄SH₄SH₅SH₅), H 310/2 (SH₅ × SH₄SH₅), H 454/43 (SH₇ × SH₄SH₅) and 849/1 (SH₇), 3, 6 and 9 days after inoculation

Days after inoculation	Mean micelial length (μm)/infection in the coffee plants			
	110/5	H 310/2	H 454/43	849/1
3	24.72a A (9-84; ± 18.66)	40.44a (9-156; ± 33.64)	24.72a (9-51; ± 16.02)	36.12a (12-84; ± 21.03)
6	51.24a (12-315; ± 59.71)	46.32a (12-174; ± 40.34)	41.04a (12-105; ± 23.46)	133.92b (15-384; ± 99.23)
9	54.48a (12-321; ± 61.93)	70.68a (12-264; ± 55.39)	42.00a (15-108; ± 24.50)	233.76b (21-618; ± 211.22)

A (Range; ± standard deviation of means)

Values in the same row followed by different letters differed significantly according to Tukey's test at P ≤ 0.05.

TABLE 5
MEAN NUMBER OF HAUSTORIA/INFECTION (CULTURE 1427) IN THE COFFEE PLANTS 110/5 (SH₄SH₄SH₅SH₅), H 310/2 (SH₅ × SH₄SH₅), H 454/43 (SH₇ × SH₄SH₅) and 849/1 (SH₇), 3, 6 and 9 days after inoculation

Days after inoculation	Mean number of haustoria/infection in the plants			
	110/5	H 310/2	H 454/43	849/1
3	0.20a A (0-3; ± 0.71)	0.56a (0-3; ± 1.04)	0.24a (0-2; ± 0.66)	0.80a (0-3; ± 1.23)
6	1.12a (0-4; ± 1.39)	0.96a (0-4; ± 1.37)	0.64a (0-3; ± 1.08)	2.20b (0-5; ± 1.68)
9	1.24a (0-5; ± 1.54)	1.88ab (0-4; ± 1.56)	0.96a (0-4; ± 1.49)	3.04b (0-8; ± 2.26)

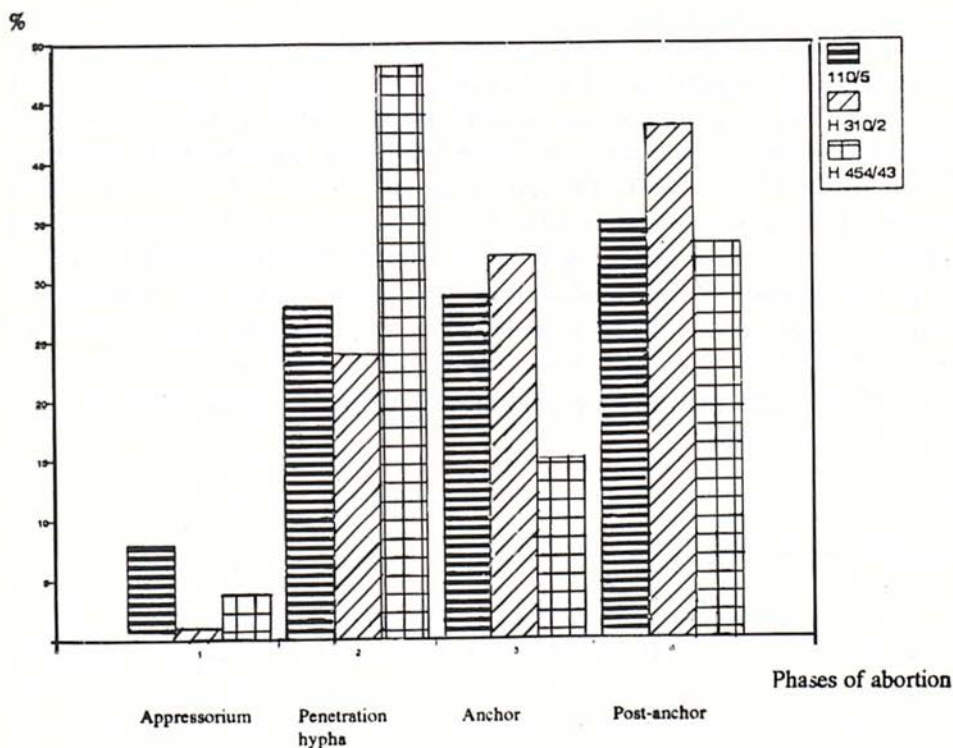
A (Range; ± standard deviation of means)

Values in the same row followed by different letters differed significantly according to Tukey's test at P ≤ 0.05.

(Tables 3 and 4) correspond only to part of the truth. In fact, the infections that evolved and originated chloroses and late sporulation are not represented there.

When coffee plants 110/5 ($SH_4SH_4SH_5SH_5$), H 310/2 ($SH_5 \times SH_4SH_5$) and H 454/43 ($SH_7 \times SH_4SH_5$) showed symptoms the phases where the fungus ceased growth were evaluated in the leaf areas which produced *flt* (Fig. 9). It was

Fig. 9 - Percentage of infections which aborted at different phases (1-appressorium; 2-penetration hypha; 3-anchor; 4-post-anchor) in the hosts 110/5 ($SH_4SH_4SH_5SH_5$), H310/2 [$(19 \times 110/5) - SH_5 \times SH_4SH_5$] and R 454/43 [$(849/1 \times 110/5) - SH_7 \times SH_4SH_5$].



110/5: Mode = 4 (post-anchor) ; $\bar{y}_{w1} = 2.91$ ab

H 310/2: Mode = 4 (post-anchor) ; $\bar{y}_{w2} = 3.17$ b

H 454/43: Mode = 2 (penetration hypha) ; $\bar{y}_{w3} = 2.77$ a

Note: Values followed by different letters differed significantly according to Scheffe's test at $P \leq 0.001$.

observed that the abortions on the post-anchor phase were the most frequent both in 110/5 (35 %) and H 310/2 (43 %), whereas in H 454/43 the abortions occurred with higher frequency at the phase of penetration hypha (48 %) immediately followed by the phase of post-anchor (35 %). The comparison of the means showed that 110/5 did not separate significantly either from H 310/2 or from H 454/43, but these latter separated between each other.

With a basis on the FLOR's gene-for-gene theory, the resistance of 110/5 (SH_4SH_5) to culture 1427 (v_3) is conferred by gene SH_4 . In the hybrids H 310/2 ((19/1 \times 110/5) - $SH_5 \times SH_4SH_5$) and H 454/43 ((849/1 \times 110/5 - $SH_7 \times SH_4SH_5$) in spite of gene SH_4 being present in both of them in the heterozygous condition only H 454/43 showed incomplete resistance. In inoculations carried out at the CIFC on these hybrids with other avirulent cultures of *H. vastatrix*, similar results have been obtained which have been suggested to be due to the larger spectrum of susceptibility of 849/1 (SH_7) when compared with 19/1 (SH_5). However, in relation to culture 1427, both 19/1 and 849/1 presented the same type of reaction 4. Thus, the difference that is left to be considered between H 310/2 and H 454/43 is the fact that in the latter both genes SH_4 and SH_5 are in the heterozygous condition. It has been observed at the CIFC in coffee-rust compatible combinations that a resistance gene in the heterozygous condition might confer higher susceptibility than in the homozygous condition. Thus, although it is not known how to explain the type of reaction observed in H 454/43 it is admitted that the gene SH_5 in the heterozygous condition might have some influence.

Responses to the presence of the fungus

The cytological tests indicated the following in the aborted infections, mainly *flt*, of plants with genes SH_1 and SH_4SH_5 in the homo or heterozygous condition: the presence of callose was detected in the contact zones of the host cells with the hyphae and around the haustoria; the presence of lignin was found mainly on the thickened walls of the hypertrophied cells of the tumefaction area. However, even when a visible tumefaction was not formed it was detected callose as well and the presence of lignin in the walls and cytoplasmic contents of the cells around the aborted mycelium (Figs. 2c and 5b). When the fungus ceased growth in the appressorium phase or in incipient phases of the infection process, the formation of lignin was restricted in general to the cells of the stomatal area (cell walls and sometimes cytoplasmic content as well). The presence of callose and lignin as a resistance response in incompatible coffee-rust associations is also referred by TYBURZY *et al.* (1983), RIJO and VASCONCELOS (1984) and MARTINS *et al.* (1985).

In the chlorotic areas of plants 128/1 and H 168/8 (both with SH₁ heterozygous) and H 454/43 (with SH₄ and SH₅ heterozygous) as well as on the susceptible reaction of 849/1 (with the referred genes in the recessive stage) (Fig. 1b) it was observed callose as well but only around some haustoria. It has been noted by RIJO (personal communication) that callose formation in the susceptible coffee plants takes place only on the oldest haustoria and this may be the fundamental difference in relation to the resistant varieties.

DISCUSSION

The mixture of resistant and susceptible types of reaction on the same leaf as it was observed in 128/1 and H 168/8 (both with heterozygous SH₁) and in H 454/43 (with heterozygous SH₄ and SH₅) is also referred by ESKES (1983) in derivatives of *C. canephora* with intermediate level of resistance. ESKES, among others, defends that this reaction may not be the result of a variation of the fungus, but that is rather a response of incomplete resistance that can be influenced by light intensity and the leaf age. On the other hand, HEATH (1982) based in histological and fine structure studies of some host-rust interactions makes the generalization that both the fungus growth and the host responses might differ in different infections of the same tissue. The referred author admits that that variation may not only reflect merely differences in the individual capacity of the fungus to grow but also that it is much more common on the resistant than in the susceptible hosts. In the present work it was also observed a high variability both in the colonization of the fungus and in the responses that this induced in different infections of each plant under study. The expressions of resistance (complete and incomplete) found were considered as being mainly due the homo or heterozygous condition of the present resistance genes. It is admissible, however, that other genes might have some influence on the types of answers obtained.

REFERENCES

- DYCK, P. L. and SAMBORSKI, D. J. 1968. Genetics of resistance to leaf rust in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakof and Centenario. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 10: 7-17.
- D'OLIVEIRA, B. 1954-57. As ferrugens do cafeeiro. *Revista do café Português*. 1(4): 5-13, 2(5): 5-12, 2(6): 5-15, 2(7): 9-17, 2(8): 5-22, 4(16): 5-15.
- D'OLIVEIRA, B. and RODRIGUES, C. J. Jr. 1961. O problema das ferrugens do cafeeiro. *Revista do café Português* 8(29): 5-50.
- ESKES, A. B. 1983. *Incomplete Resistance to Coffee Leaf Rust Hemileia vastatrix*. Doctoral thesis. Wageningen, the Netherlands. 140. p.

- ESCHRICH, W. and CURRIER, H. B. 1964. Identification of callose by its diachrome and flurochrome reactions. *Stain Technology* **39**: 303-304.
- FLOR, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax-rust, its genetics and other implications *Phytopathology* **45**: 680-685.
- HEATH, M. C. 1982. Host defense mechanisms against infection by rust fungi. In: *The Rust Fungi*. Edited by K. Y. Scott & A. K. Chakravorty, Academic Press, London, New York pp. 223-245.
- ISLAM, M. R. SHEPHERD, K. W. and MAYO, G. M. E. 1989. Effect of genotype and temperature on the expression of L genes in flax conferring resistance to rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**: 141-150.
- MARTINS, E. M. F., TIBURZY, R. and MORAES, W. B. C. 1985. Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira* **10**: 627-636.
- NORONHA-WAGNER, M. and BETTENCOURT, A. J. 1967. Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* **45**: 2021-2031.
- RIJO, L. and RODRIGUES, C. J. Jr. 1978. Processo de infecção de *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. *Garcia de Orta (Série Estudos Agronômicos)* **5**: 23-24.
- RIJO, L. and VASCONCELOS, M. I. 1984. Formação de calose e de lenhina em combinações incompatíveis *Coffea* sp.-*H. vastatrix*. In: *Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro*, Oeiras, 17-20 Out. 1983. *Comunicações*. pp. 267-281.
- ROELFS, A. P. 1988. Genetic control of phenotypes in wheat stem rust. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 351-367.
- ROELFS, A. P. and McVEY, D. V. 1979. Low infection types produced by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and wheat lines with designated genes for resistance. *Phytopathology* **69**: 722-730.
- ROWELL, J. B. 1984. Controlled infection by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* under artificial conditions. In: *The Cereal Rusts*, Volume 1. Ed. W. R. Bushnell, A. P. Roelfs, Orlando, Fla: Academic Press, London and New York. pp. 291-332.
- SHERWOOD, R. T. and VANCE, C. P. 1976. Histochemistry of papillae formed in reed canary grass leaves in response to noninfecting pathogenic fungi. *Phytopathology* **66**: 503-510.
- TIBURZY, R., MARTINS, E. M. F. and MORAES, W. B. C. 1983. Visualization of *Hemileia vastatrix* structures in coffee leaves by fluorescence microscopy. *Fitopatologia Brasileira* **8**: 461-466.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the invaluable help of Dr. João Tiago Mexia and Eng. Maria José Silva in the statistical interpretation of the data.

FACTORES GENÉTICOS QUE CONDICIONAM A RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS DE *HEMILEIA VASTATRIX* BERK ET BR. DOS CLONES-TIPO DOS GRUPOS 1, 2 E 3 DE DERIVADOS DE HÍBRIDO DE TIMOR

A. J. BETTENCOURT, J. LOPES e S. PALMA
 Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
 Quinta do Marquês, 2780 Oeiras — Portugal

SUMÁRIO

Progénies autofecundadas dos clones-tipo H. 420/10, H. 420/2 e H. 419/20 dos grupos fisiológicos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor e populações resultantes de cruzamentos entre estes clones e os cafeeiros 849/1 (Matari) e 3205/5, 8 (Catuaí Amarelo) foram inoculadas, nas estufas do CIFC, com as culturas-tipo de 20 raças de *Hemileia vastatrix*.

A análise mendeliana das populações dos diversos tipos de segregantes observados nos cafeeiros estudados, deu a indicação da existência de três novos factores dominantes S_H7 , S_H8 e S_H9 , condicionando, simples ou associados entre si e com S_H5 e S_H6 , a resistência desses clones-tipo.

A aplicação da teoria gene para gene de Flor às interacções dos cafeeiros H. 420/10 ($S_H5,6,7,9$), H. 420/2 ($S_H5,8$) e H. 419/20 ($S_H5,6,9$) com as 20 raças de *H. vastatrix* permitiu inferir o genótipo das novas raças XXIX, XXX e XXXI, respectivamente, $v_{5^16^7^8^9}$, v_{5^78} , $v_{2^5^6^9}$.

Palavras-chave: Híbrido de Timor, ferrugem do cafeeiro, *Hemileia vastatrix*, genes de resistência.

ABSTRACT

Selfed progenies of the coffee type-clones H. 420/10, H. 420/2 e H. 419/20 of the physiologic groups 1, 2 and 3, derived from Híbrido de Timor (HDT), and the populations resulting from crosses between these clones and the coffee plants 849/1 (Matari) and 3205/5, 8 (Catuaí Amarelo) were inoculated with the type-cultures of 20 races of *Hemileia vastatrix*.

The mendelian analysis of the various types of segregants observed gave the indication that three new dominant factors S_H7 , S_H8 and S_H9 exist, conditioning by themselves or associated with each other or with S_H5 and S_H6 , the resistance of those type-clones.

The application of Flor's gene-for-gene theory to the interactions of coffees H. 420/10 ($S_H5,6,7,9$), H. 420/2 ($S_H5,8$) and H. 419/20 ($S_H5,6,9$) with the 20 races of *H. vastatrix* allowed to infer the genotypes of the new races XXIX, XXX and XXXI, respectively $v_5v_6v_7v_8v_9$, v_5v_8 and $v_2v_5v_6v_9$.

Key words: Híbrido de Timor, coffee rust, *Hemileia vastatrix*, resistance genes.

INTRODUÇÃO

É já significativa a informação de que se dispõe sobre a hereditariedade da resistência vertical dos cafeeiros da espécie *Coffea arabica* L. e de segregantes tetraplóides *C. arabica* × *Coffea* spp. às diferentes raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Os primeiros dados foram obtidos por Mayne (1936) estudando na Índia as interações de selecções de *C. arabica* (Coorg e DK¹/6) e de híbridos tetraplóides *C. arabica* × *C. liberica* (S. 288 e S. 353) com as raças de *H. vastatrix* ali prevalentes. Admitiu então aquele investigador a existência de dois factores genéticos responsáveis pela resistência dessas selecções a três raças do fungo.

Os trabalhos realizados no CIFIC a partir de 1956 incidiram numa primeira fase na análise mendeliana das interações de selecções de *C. arabica*, Bourbon, Geisha, DK¹/6 e S. 4 Agaro e da selecção *C. arabica* × *C. liberica* S. 288, respectivamente dos grupos fisiológicos E, C, D, J e G, com 14 raças de *H. vastatrix*. Foi possível identificar cinco factores dominantes S_H1 , S_H2 , S_H3 , S_H4 e S_H5 condicionando, simples ou associados, a resistência dos clones-tipo desses grupos. Os genes S_H2 e S_H3 correspondem aos dois factores previstos por Mayne. Como factor S_H3 apenas se encontra nos cafeeiros das selecções indianas de origem interspecífica *C. arabica* × *C. liberica*, é muito provável que provenha do progenitor desta última espécie (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971).

A análise passou depois a ser feita sobre as interações de cafeeiros Híbrido de Timor (população segregante do híbrido natural *C. arabica* × *C. canephora*) e seus derivados, com as raças de *H. vastatrix*. Através do estudo do clone-tipo 1343/269 do grupo R, um outro factor genético dominante S_H6 foi identificado, condicionando a resistência deste cafeeiro a 19 raças do fungo, factor esse originário, certamente, do progenitor *C. canephora* do Híbrido de Timor (Bettencourt *et al.*, 1980).

Entretanto verificou-se que alguns cafeeiros das populações H. 419 e H. 420 resultantes de retrocruzamentos para Mundo Novo do híbrido HW 26 (19/1 Caturra Vermelho × 832/1 Híbrido de Timor), inicialmente classificados no grupo A eram susceptíveis a algumas culturas de *H. vastatrix* originárias da Índia e de Timor (Quadro I). Três dessas culturas 1302, 1321 e 1326 obtidas de amostras colhidas, respectivamente, em híbrido Robusta × Arabica, em derivado de Híbrido de Timor e em Híbrido Ramerá (*C. arabica* × *C. canephora*), ao

QUADRO 1

EPECTROS DE REACÇÃO E GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE CLONES-TIPO DE 11 GRUPOS FISIOLÓGICOS, INCLUINDO 1, 2, 3 e A, EM RELAÇÃO A 20 RAÇAS DE H. VASTATRIX

Raças fisiológicas de H. vastatrix		Clones-tipo, grupos fisiológicos, genótipos de resistência conhecidos e espectros de reacção *										
		Genótipos de virulência inferiores										
		849/1 Maiari •• 63/1 Bourbon β	87/1 Geisha C	32/1-DK 1/6 D	33/1-S.288-23 G	110/5-S ₁ Agaro J	1343/269-HDT R	H. 440/7** 4	H. 420/10** 1	H. 420/2 2	H. 419/20** 3	832/1-HDT A
		S _{II} 5	S _{II} 1,5	S _{II} 2,5	S _{II} 3,5	S _{II} 4,5	S _{II} 6	S _{II} 5,6	S _{II} ?	S _{II} ?	S _{II} ?	S _{II} ?
I	V _{2,5}	S	—	S	—	—	—	—	—	—	—	—
II	V ₅	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III	V _{1,5}	S	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	V _{3,5}	S	—	—	MS	—	—	—	—	—	—	—
VIII	V _{2,3,5}	S	—	S	S	—	—	—	—	—	—	—
X	V _{1,4,5}	S	S	—	—	S	—	—	—	—	—	—
XII	V _{1,2,3,5}	S	S	S	S	—	—	—	—	—	—	—
XIV	V _{2,3,4,5}	S	—	S	S	S	—	—	—	—	—	—
XV	V _{4,5}	S	—	—	—	S	—	—	—	—	—	—
XVI	V _{1,2,3,4,5}	S	S	S	S	S	—	—	—	—	—	—
XVII	V _{1,2,5}	S	S	S	—	—	—	—	—	—	—	—
XXII	V _{5,6}	S	—	—	—	—	S	—	—	—	—	—
XXIII	V _{1,2,4,5}	S	S	S	—	S	—	—	—	—	—	—
XXIV	V _{2,4,5}	S	—	S	—	S	—	—	—	—	—	—
XXV	V _{2,5,6}	S	—	S	—	—	S	—	—	—	—	—
XXVI	V _{4,5,6}	S	—	—	—	S	S	—	—	—	—	—
XXVIII	V _{2,4,5,6}	S	—	S	—	S	S	—	—	—	—	—
XXIX	V ₅ ?	S	—	—	—	—	S	S	S	S	—	—
XXX	V _{5,6} ?	S	—	—	—	—	—	—	S	—	—	—
XXXI	V _{2,5,6} ?	S	—	S	—	—	S	—	—	S	—	—

* Traços correspondem a reacções de resistência; S = Susceptibilidade; MS = Moderada susceptibilidade.

** H. 419 = 1535/33 Mundo Novo × HW 26/13
 H. 420 = 1535/33 Mundo Novo × HW 26/14
 H. 440 = 19/1 Caturra Vermelho × 1343/269 HDT
 HW 26 = 19/1 Caturra Vermelho × 832/1 HDT

*** Só é possível distinguir os cafeeiros do grupo β dos do grupo E e os do R dos do 4, recorrendo para os primeiros às raças IV, XI, XIX, XX, XXI, XXVII e XXXII e para os segundos às raças XXVII e XXXII, nenhuma delas utilizada neste estudo (Betten-court, 1981).

atacarem plantas de H. 419 e H. 420 definiram por um lado três novos grupos fisiológicos 1, 2 e 3 e, por outro, três novas raças XXIX, XXX e XXXI (Betten-court, 1981).

O presente trabalho foi realizado com o objectivo de caracterizar geneticamente a resistência expressa pelos cafeeiros destes três novos grupos fisiológicos em relação às raças de *H. vastatrix*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo da base genética da resistência à *H. vastatrix* dos cafeeiros dos grupos 1, 2 e 3 incidiu sobre os seus clones-tipo H. 420/10, H. 420/2 e H. 419/20 (Quadro I).

Foi feita a análise dos espectros de resistência das progénies dos três clones-tipo obtidas por autofecundação e de populações resultantes de cruzamentos entre estes clones e os cafeeiros Matari (grupo β) e Catuaí Amarelo 3205/5, 8 (grupo E), inoculadas com as culturas-tipo de 20 raças de *H. vastatrix* (Quadros II e III).

QUADRO II

ANÁLISE DAS PROGÊNIES AUTOFECONDADAS DOS CLONES-TIPO H. 420/10 (GRUPO 1), H. 420/2 (GRUPO 2) e H. 419/20 (GRUPO 3), INOCULADAS COM 20 RAÇAS DE *H. VASTATRIX*

Clones autof.	N.º de plantas estudadas	Proporções esperadas	grupo 1		grupo 2		grupo 3		grupo R ou 4		grupo E ou β		Valores de χ^2
			Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	
H. 420/10	122	48:12:3:1	83	91,5			27	22,9	10	5,7	2	3,8	5,620 (P > 0,10)
H. 420/2	170	3:1			125	127,5					45	42,5	0,196 (P > 0,50)
H. 419/20	177	12:3:1					144	132,8	25	33,2	8	11,1	3,836 (P > 0,10)

- * H. 420 = 1535/33 (E) \times HW 26/13 (A)
 H. 419 = 1535/33 (E) \times HW 26/14 (A)
 H. 440 = 19/1 (E) \times 1343/269 (R)
 HW26 = 19/1 (E) \times 832/1 (A)
 19 = Caturra Vermelho
 1535 = Mundo Novo
 832, 1343 = Híbrido de Timor

QUADRO III

ANÁLISE DAS F₁ DE CRUZAMENTOS ENTRE OS CAFEEIROS 849/1 (β) E 3205/5, 8 (E) E OS CLONES-TIPO H. 420/10 (1), H. 420/2 (2) E H. 419/20 (3), INOCULADOS COM 20 RAÇAS DE *H. VASTATRIX*

F _i	N.º de plantas estudadas	Proporções esperadas	grupo 1		grupo 2		grupo 3		grupo R ou 4		grupo E ou β		Valores de χ ²
			Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	
H. 600 *	112	4:2:1:1	54	56			23	28	14	14	21	14	4,464 (P > 0,20)
H. 608	57	4:2:1:1	30	28,5			16	14,3	5	7,1	6	7,1	1,097 (P > 0,70)
H. 597	38	1:1			17	19					21	19	0,421 (P > 0,50)
H. 595	54	2:1:1					32	27	10	13,5	12	13,5	2,00 (P > 0,30)

* H. 600 = 3205/5 (E) × H. 420/10 (1)
 H. 608 = 849/1 (β) × H. 420/10 (1)
 H. 597 = 3205/8 (E) × H. 420/2 (2)
 H. 595 = 3205/8 (E) × H. 419/20 (3)

H. 420 = 1535/33 (E) × HW 26/15 (A)
 H. 419 = 1535/33 (E) × HW 26/14 (A)
 H. 440 = 19/1 (E) × 1343/269 (R)
 HW 26 = 19/1 (E) × 832/1 (A)
 19 = Caturra Vermelho
 849 = Matari
 1535 = Mundo Novo
 3205 = Catuaí Amarelo
 832, 1343 = Híbrido de Timor

Na inoculação dos cafeeiros e na leitura das diferentes interações seguiram-se o método e a escala de tipos de reacção adoptada pelo CIFIC (D'Oliveira, 1955).

Para se definirem com maior garantia os tipos de reacção procurou-se uniformizar o mais possível as condições que influenciam o desenvolvimento das plantas e da ferrugem e fazer repetidas inoculações para as diferentes combinações cafeeiro-raça do fungo.

OBSERVAÇÕES E DISCUSSÃO

Análise das progénies autofecundadas dos clones-tipo H. 420/10 (grupo 1), H. 420/2 (grupo 2) e H. 419/20 (grupo 3), inoculadas com 20 raças de H. vastatrix.

Nas plantas da progénie autofecundada do clone H. 420/10 verificou-se uma segregação para os espectros de reacção que caracterizam os grupos 1, 3,

QUADRO IV

GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A *H. VASTATRIX* DOS CLONES-TIPO H. 420/10, H. 420/2 E H. 419/20 E GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DAS RAÇAS XXIX, XXX E XXXI INFERIDOS DE ACORDO COM A TEORIA DE FLOR, QUE COMPLETAM O QUADRO I

Raças fisiológicas de <i>H. vastatrix</i>	Genótipos de virulência inferidos	Clones-tipo, grupos fisiológicos, genótipos de resistência e espectros de reacção *			
		H. 420/10 **	H. 420/2	H. 419/20 **	832/1-HDT
		1	2	3	A
		S _H 5,6,7,9	S _H 5,8	S _H 5,6,9	S _H 5,6,7,8,9 + ?
XXIX	V _{5,6,7,8,9}	S	S	S	—
XXX	V _{5,8}	—	S	—	—
XXXI ***	V _{2,5,6,9}	—	—	S	—

* Traços correspondem a reacções de resistência S = Susceptibilidade

** H. 419 = 1535/33 Mundo Novo × HW 26/13

H. 420 = 1535/33 Mundo Novo × HW 26/14

HW 26 = 19/1 Caturra Vermelho × 832/1 HDT

*** A raça XXXI «quebra» também a resistência dos cafeeiros do grupo D com genótipo S_H2-S_H5 (Quadro I)

R ou 4 e E ou β (Quadro II). A proporção obtida entre plantas com resistência (grupos 1, 3 e R ou 4) e as susceptíveis (grupo E ou β) próxima de 63:1 indica que a expressão de resistência do clone H. 420/10 é condicionada por três factores simples e dominantes em condição heterozigótica.

Um deles é o factor S_H6 (grupo R), outro um novo factor dominante que simples ou associado condiciona o espectro de reacção do grupo 1, e ainda um outro novo factor dominante existente nas plantas do grupo 3. Os dois novos factores foram designados respectivamente por S_H7 e S_H9.

A proporção de segregação para os três factores a esperar neste caso seria 27:9:9:9:3:3:3:1. Porém como as plantas com genótipos onde há S_H7 ou S_H9 não se podem distinguir umas das outras com as raças existentes no CIFC, sendo todas incluídas respectivamente nos grupos 1 e 3, a proporção de plantas observadas dos grupos 1, 3 e R ou 4 e E ou β foi analisada e verificada em relação à proporção 48:12:3:1 de plantas esperadas (Quadro II).

A análise da progénie do clone H. 420/2 permitiu identificar plantas dos grupos 2 e E ou β numa proporção que aponta para a existência de mais um

novo factor dominante e simples, condicionando o espectro de reacção do clone que se designou por S_{H8} (Quadro II).

Finalmente pela análise da progénie do clone H. 419/20 definiu-se uma proporção entre os tipos segregantes dos grupos 3, R ou 4 e E ou β que indica serem dois os factores dominantes e simples a constituir a base genética da expressão de resistência do clone (Quadro II). Um deles é o factor S_{H6} e o outro o factor S_{H9} que, simples ou associado com S_{H6} , condiciona o espectro de resistência do grupo 3. Por não ser possível distinguir estes dois genótipos as plantas observadas dos grupos 3, R ou 4 e E ou β foram analisadas para a proporção 12:3:1 (Quadro II).

Análise das F_1 de cruzamentos entre os clones-tipo H. 420/10 (grupo 1), H. 420/2 (grupo 2) e H. 419/20 (grupo 3) e os cafeeiros 849/1 (grupo β) e 3205/5, 8 (grupo E), inoculadas com 20 raças de H. vastatrix.

A análise das F_1 dos cruzamentos entre H. 420/10, H. 420/2 e H. 419/20 com cafeeiros Matari e Catuaí (H. 600, H. 608, H. 597 e H. 595) veio confirmar os dados obtidos com o estudo das progénies desses clones (Quadro III).

Detectou-se nas populações H. 600 e H. 608 (H. 420/10 \times plantas E ou β) uma proporção de segregantes para os grupos 1, 3, R ou 4 e E ou β que é indicação da existência no clone H. 420/10 dos três factores dominantes S_{H6} , S_{H7} e S_{H9} . Pela impossibilidade já referida de distinguir uns dos outros alguns genótipos com S_{H7} ou S_{H9} , a segregação das plantas observadas foi analisada para a proporção 4:2:1:1. Na população H. 597 (H. 420/2 \times planta E) a proporção de segregantes para os grupos 2 e E ou β aponta para a existência no clone H. 420/2 do factor que foi designado por S_{H8} . A proporção de segregantes para os grupos 3, R ou 4 e E ou β encontrada na população H. 595 (H. 419/20 \times planta E) é também a confirmação da base genética do clone H. 419/20 detectada pela análise da sua progénie ou sejam dois factores S_{H6} e S_{H9} . Por não ser possível distinguir os genótipos S_{H6} e S_{H6} - S_{H9} a segregação de plantas foi analisada para a proporção 2:1:1 dos grupos 3, R e E ou β .

Nas análises não se levou em consideração o eventual efeito do factor S_{H5} existente na maioria dos cafeeiros estudados (Quadro I). De facto como todas as raças utilizadas possuem o factor de virulência v_5 que «quebra» a resistência condicionada por S_{H5} , a caracterização qualitativa das plantas para os diferentes grupos dependerá basicamente da acção dos outros factores de resistência S_{H6} a S_{H9} .

De assinalar ainda que a discrepância encontrada por vezes entre o número de cafeeiros dos grupos E ou β observados e os esperados, maior o dos primeiros, talvez se justifique pelo facto de algumas dessas plantas poderem não ser híbridas por resultarem de sementes formadas a partir de gomos florais do progenitor feminino susceptível já autofecundados antes da operação de emasculação.

Vários são os factores que eventualmente terão afectado as análises das proporções de segregantes verificadas nas populações inoculadas com as raças de *H. vastatrix*. Em primeiro lugar o número de plantas analisadas não é grande e além disso há a possibilidade de ocorrência de irregularidades na meiose devido ao facto dos cafeeiros derivarem de híbrido interespecífico. Acresce que o fenótipo da interacção esteve muito dependente das condições do ambiente e das condições vegetativas das plantas e do fungo e que interacções génicas também podem ter-se verificado não obstante os clones H. 419/20, H. 420/2 e H. 420/10 haverem sido seleccionados para clones-tipo do respectivo grupo por serem os que apresentavam reacções mais definidas de resistência ou susceptibilidade às raças XXIX, XXX e XXXI.

CONCLUSÃO

As análises das segregações observadas nas progénies dos clones-tipo H. 420/10 (grupo 1), H. 420/2 (grupo 2) e H. 419/20 (grupo 3) e nos cruzamentos destes clones com cafeeiros dos grupos β e E, apontam para a existência de três novos factores simples e dominantes S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} .

Assim as plantas com o espectro de resistência do grupo 1 às 20 raças poderão ter como genótipo além do determinado para o clone-tipo H. 420/10, S_{H5}^* — $S_{H6}S_{H6}$ $S_{H7}S_{H7}$ $S_{H9}S_{H9}$, qualquer uma das nove seguintes associações dos factores S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} , com ou sem S_{H5} , cada um deles em condição homozigótica ou hererozigótica: S_{H7} , $S_{H6}S_{H7}$, $S_{H6}S_{H8}$, $S_{H7}S_{H8}$, $S_{H7}S_{H9}$, $S_{H8}S_{H9}$, $S_{H6}S_{H7}S_{H8}$, $S_{H6}S_{H7}S_{H9}$, $S_{H6}S_{H8}S_{H9}$, $S_{H7}S_{H8}S_{H9}$ e $S_{H6}S_{H7}S_{H8}S_{H9}$.

A distinção dos cafeeiros com estes genótipos de resistência só se poderá fazer pela análise das descendências e dos cruzamentos com plantas susceptíveis de cada cafeeiro do grupo 1 ou caso se detectem culturas de *H. vastatrix* com novas combinações dos genes v_6 a v_9 que permitam caracterizar esses genótipos. O estudo realizado por Várzea *et al.* (1988) já permitiu a caracterização de plantas que têm o seu genótipo $S_{H5}S_{H7}$ ou $S_{H5}S_{H7}S_{H9}$, utilizando três culturas de *H. vastatrix* que, embora não ataquem o clone-tipo H. 420/10, são capazes de «quebrar» a resistência de outras plantas incluídas no grupo 1. O genótipo de virulência destas culturas inclui ou o factor v_7 ou a associação v_7v_9 .

Os cafeeiros com o espectro de resistência do grupo 2 terão como genótipo a combinação dos factores S_{H5} e S_{H8} , como o clone-tipo H. 420/2, ou então apenas S_{H8} , ambos os factores em condição homozigótica ou heterozigótica.

As plantas do grupo 3 serão portadoras do factor S_{H9} ou da associação $S_{H6}S_{H9}$, com ou sem S_{H5} . O clone-tipo H. 419/20 tem o genótipo $S_{H5}S_{H6}S_{H9}$.

Assinale-se que os factores de resistência S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} provêm do cafeeiro 832/1 Híbrido de Timor e foram introduzidos nas combinações HW26, H. 419 e H. 420 resultantes de cruzamentos envolvendo essa planta e cafeeiros

* — significa condição não determinada para o alelo.

portadores apenas de S_{H5} , 19/1 (Caturra vermelho) e 1535/33 (Mundo Novo). Deduz-se portanto que o cafeeiro 832/1 é portador dos cinco factores S_{H5} a S_{H9} em condição homozigótica ou heterozigótica e de um ou mais novos factores não caracterizados que lhe conferem resistência às raças XXIX, XXX e XXXI (Grupo A — Quadro I).

A aplicação da teoria gene para gene de Flor (1971) às interações observadas entre os cafeeiros portadores dos factores S_{H5} a S_{H9} e as 20 raças de *H. vastatrix* (Quadro IV) permite inferir o genótipo das raças XXIX, XXX e XXXI, respectivamente, $v_5-v_6-v_7-v_8-v_9$, v_5-v_8 e $v_2-v_5-v_6-v_9$. Prevê-se a existência de numerosas raças ainda não detectadas, tendo como genótipo todas as combinações possíveis entre os factores de virulência v_1 a v_9 . As três raças que foram definidas por Várzea et al. (1989) terão como genótipos v_5-v_7 ou $v_5-v_7-v_9$, $v_2-v_5-v_7$ ou $v_2-v_5-v_7-v_9$ e $v_2-v_4-v_5-v_7$ ou $v_2-v_4-v_5-v_7-v_9$.

Os factores de resistência S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} em diferentes combinações acompanhados ou não de factor ou factores condicionando a resistência do grupo A, têm vindo a ser encontrados em algumas populações derivadas de Híbrido de Timor em fase avançada de selecção para as características agronómicas, como sejam as designadas por Catimor, Sarchimor e Cavimor (Bettencourt, 1984). Os estudos descritos neste trabalho devem ser prosseguidos com outros cafeeiros Híbrido de Timor e seus derivados, designadamente os do grupo A, utilizando inóculo de *H. vastatrix* o mais diversificado possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Carlos Rodrigues Jr., Director do CIFIC, pelo apoio que dispensou à realização destes trabalhos.

Aos Doutores Alcides de Carvalho e Luís Carlos Fazuoli do Departamento de Genética do Instituto Agronómico de Campinas pela leitura crítica do texto.

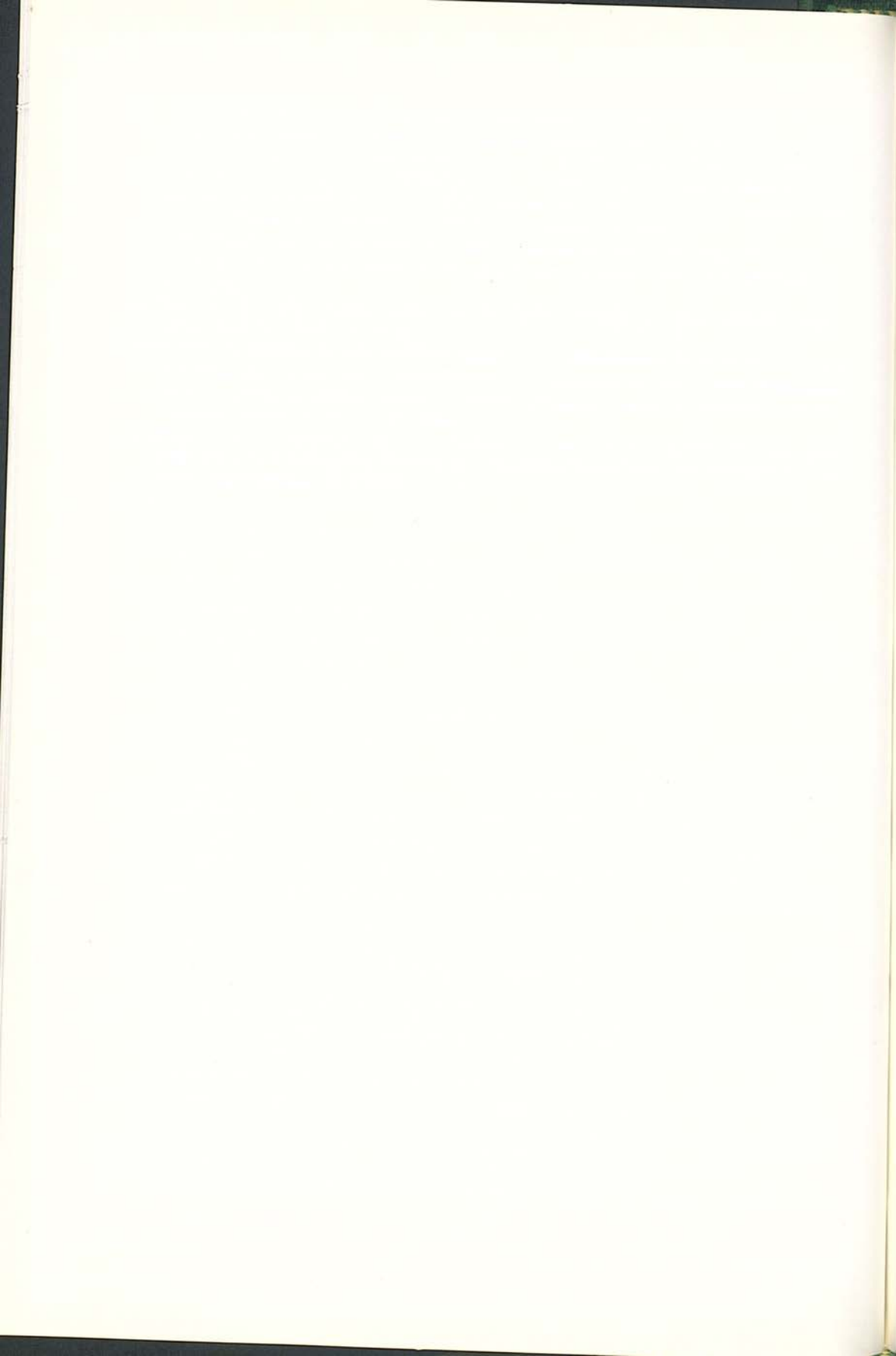
À Eng.^a Agron. Maria José Silva do Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícolas (ICT) pela elaboração de análise estatística dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

- BETTENCOURT, A. J. and NORONHA-WAGNER, M. 1971. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* B. & Br. *Agronomia Lusitana* 31: 285-92.
- BETTENCOURT, A. J., NORONHA-WAGNER, M. and LOPES, J. 1980. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Brotéria Genética* I (LXXXVI): 53-58.
- BETTENCOURT, A. J. 1981. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro* (CIFIC, IITC) Lisboa 93 pp.

- BETTENCOURT, A. J. 1984. Características agronómicas de seleções derivadas de cruzamentos entre Híbrido de Timor e as variedades Caturra, Villa Sarchi e Catuaí. *Comunicações. Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro* p. 353-373. Oeiras, 17-20 Out. 1985.
- BETTENCOURT, A. J. and RODRIGUES, C. J., Jr. 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: *Coffee*, Vol. 4, *Agronomy*. Edited by R. J. Clarke & R. Macrae. Elsevier Applied Science, p. 199-235.
- D'OLIVEIRA, B. 1955. As ferrugens do cafeeiro. *Revista do Café Português*, 2(7): 9-17.
- FLOR, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. of Phytopath.* 9: 275-296.
- MAYNE, W. W. 1936. Annual Report of the Coffee Scientific Officer, 1935-36. *Mysore Coffee Exp. Stn. Bull.* 14, 21 pp.
- NORONHA-WAGNER, M. and BETTENCOURT, A. J. 1967. Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 45: 2021-31.
- VÁRZEA, V. M. P., RODRIGUES, C. J., PASSO, J. E. and PALMA, S. 1989. New rust genotypes and a new genotype in Catimor 45. *Association Scientifique Internationale du Café (ASIC) 13^e Colloque*. p. 735-748.







SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

FICHA DA ACTIVIDADE DOS SÓCIOS

N.B. — Dactilografar ou preencher com maiúsculas

Nome:

Direcção: Instituição (Dep. Fac. Univ. Escl.)

..... Código Postal

Residência

..... Código Postal

Actividades: Ensino — Secundário

Universitário

- Investigação — 1. Citogenética
- 2. Genética Molecular e Microbiana
- 3. Genética e Melhoramento de Plantas
- 4. Genética e Melhoramento Animal
- 5. Genética Humana
- 6. Genética das Populações e Evolutiva
- 7. Genética da Diferenciação e Desenvolvimento

Linhas de Investigação em que trabalha (não exceder três linhas)

Assinatura Data

Enviar esta ficha preenchida para:

Dr.^a Maria José Marinho

Instituto Gulbenkian de Ciência

Apartado 14

2781 Oeiras Codex

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY





SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

INFORMA QUE:

1. A revista Brotéria-Genética é distribuída gratuitamente aos sócios da S. P. G.
2. A quota actual de sócio da S. P. G. é de mil e quinhentos escudos anuais.
3. Se pretender tornar-se sócio da S.P.G., deve enviar, devidamente preenchida, a «Proposta para Sócio» que abaixo se inclui, para:

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

Instituto Gulbenkian de Ciências

Apart. 14 — 2781 OEIRAS Codex

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

PROPOSTA PARA SÓCIO

Nome _____

Profissão _____

Morada (para o envio de correspondência e cobrança de quotas) _____

Data ____/____/____

Assinatura _____