

СЕЛЕКЦИЯ НА БОБОВИ КУЛТУРИ
LEGUMES BREEDING



ДИРЕКТНА И ИНДИРЕКТНА СЕЛЕКЦИЯ
НА СОРТОВЕ ОБИКНОВЕН ФАСУЛ С УСТОЙЧИВОСТ
КЪМ ИКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ

Димитър Генчев, Иван Киряков, Магдалена Белева
Добруджански земеделски институт – гр. Генерал Тошево

Резюме

Генчев, Д., И. Киряков, М. Белева, 2009. Директна и индиректна селекция на сортове обикновен фасул с устойчивост към икономически важните болести в България.

Селекцията на сортове зрял фасул с подобрена устойчивост на икономически важните болести в България е от първостепенно значение за селекционната стратегия на ДЗИ-Генерал Тошево. Използването на сортове с подобрена устойчивост ще намали използването на пестициди и ще премахне риска от стопански загуби. Постигането на горе посочената цел е възможно най-бързо и икономически изгодно чрез комбинирането на директна (фенотипна) и индиректна (с помощта на ДНК-маркери) селекции. Концепцията за индиректна селекция е атрактивна за селекционерите на културни растения. За сега ДНК-маркерите се създават на определени, сравнително много къси последователности, които при различните сортове вероятно не са на едно и също разстояние от дадения ген. Това води до несигурност в скрининг резултатите. Болшинството ДНК-маркери са на сателитен участък от ДНК. При използването на тези ДНК-маркери в действителност са възможни следните три възможности в резултат на рекомбиниране: 1) Наличие на положителен сигнал и наличие на интересувания ни ген; 2) Наличие на положителен сигнал и липса на интересувания ни ген; и 3) Липса на положителен сигнал и наличие на интересувания ни ген. Най-сигурни са ДНК-маркерите залепящи се за участъци от самия ген. Пирамидалното натрупване на гени (специфичен доминантен, специфичен рецесивен и QTL) за устойчивост в едно растение и създаването на изолинии с даден ген за устойчивост могат да бъдат постигнати чрез селекционната процедура посочена в доклада. Скринингът се извършва с физиологична раса на даден патоген, когато генът за устойчивост е специфичен доминантен и разполагаме с подходяща раса (расата не може или може да преодолява само този ген) за скрининг на този ген. При липса на такава раса скринингът може да бъде извършен с помощта на ДНК-маркер, но получената линия трябва да бъде проверена с подходяща раса. При пирамидалното натрупване на гени е необходима специфична раса, а при изолиниите може да бъде раса, която не може да преодолява дадения ген. Когато генът за устойчивост е рецесивен или е QTL, тогава по-изгодно е скринингът да се извършва

с ДНК-маркер и получените рекомбинантни инбредни линии да бъдат подложени на проверка със съответните раси и щамове на патогените. За прилагане на успешна селекция на сортове обикновен фасул с желани стопански и консумативни качества е необходимо: (1) Информираност за най-новите и перспективни научни постижения на директната и индиректна селекции; (2) Идентифициране, проучване и включване в генофонда на ДЗИ-Г. Тошево на най-подходящите източници на гени за устойчивост; (3) Разработване на ускорена, по-практична и реалистична селекционна процедура включваща както директната (фенотипната), така и индиректната (с използването на ДНК-маркери); (4) Полагане на усилия за по-задълбочено изясняване на същността на механизмите на устойчивост; (5) Провеждане на молекулярни генетични изследвания с цел по-доброто познаване генетиката и физиологията на устойчивостта; и (6) Превръщане на придобитата информация в средства полезни за индиректната селекция. Направен е преглед на физиологическата специализация на икономически важните патогени по обикновения фасул в България (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* и *Bean Common Mosaic Virus*), установените гени за устойчивост и техните източници, и ДНК-маркери (RAPD и SCAR). Описани са методите за скрининг както със самите патогени, така и ДНК-маркери.

Ключови думи: Обикновен фасул – *Phaseolus vulgaris* – Директна селекция – Индиректна селекция – Устойчивост към болести – Маркер-асистираща селекция (МАС).

Abstract

Genchev, D., I. Kiryakov and M. Beleva, 2009. Direct and indirect breeding of common bean varieties with resistance to economically important diseases in Bulgaria.

Breeding of dry bean varieties with improved resistance to economically important diseases in Bulgaria is a primary task of the breeding strategy at Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo. The use of varieties with improved resistance will reduce the use of pesticides and will neutralize the risk of economic losses. The above task will be possible to realize in the fastest and most profitable way through combining direct (phenotypic) and indirect (DNA marker-assisted) breeding. The concept of indirect breeding seems attractive to the breeders of cultivated plants. For the time being DNA markers are developed for specific, comparatively very short sequences, which are probably not located at the same distance from the respective gene in the different cultivars. This makes the screening results uncertain. The majority of the DNA markers are annealing at a satellite DNA segment. Using these DNA-markers, the following three possibilities occur as a result from recombination: 1) a positive signal and presence of the desirable gene; 2) a positive signal and absence of the desirable gene; and 3) no positive signal and presence of the desirable gene. Most reliable are the DNA markers annealing to the segments of the gene itself. The pyramiding of genes for resistance (specific dominant, specific recessive and QTL) in a single plant and developing of isolines with a gene for resistance can be achieved through the breeding procedures presented in this paper. Screening is carried out with the physiological race of a certain pathogen when the gene for resistance is specific dominant; we also must have a suitable race for screening of this gene (the race can/can not overcome this gene only). If there is no such race, the screening may be done with the help of DNA-markers but the produced line has to be checked with a suitable race. In gene pyramiding a specific race is necessary, and with the isolines a race that can not overcome the respective gene is necessary. In case the gene for resistance is recessive or QTL, it is more advantageous to carry out screening with a DNA-marker and the obtained recombinant nbred lines to be checked with the respective races and strains of the pathogens. To carry out breeding for common bean varieties with desirable economic properties, the following is needed: (1) Information about the most recent and promising achievements of direct

and indirect breeding; (2) Identifying, investigating and including the most suitable sources of genes for resistance in the gene pool of DAI – General Toshevo; (3) Developing an accelerated, more practical and realistic breeding procedure which includes both direct (phenotypic) and indirect (DNA marker-assisted) breeding; (4) making efforts to more thoroughly clarify the nature of the resistance mechanisms; (5) conducting molecular investigations with the aim to better understand the genetics and physiology of resistance; (6) Using the information thus obtained in indirect breeding. A review is made of the physiological specialization of the economically important pathogens on common bean in Bulgaria (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Bean Common Mosaic Virus*), the identified genes for resistance and DNA markers (RAPD and SCAR). The method for screening with both the pathogens themselves and the DNA markers are described.

Key words: Common bean - *Phaseolus vulgaris* – Direct breeding – Indirect breeding – Disease resistance – Marker assisted selection (MAS).

ВЪВЕДЕНИЕ

След настъпилите промени в обществения живот на България основното производство на зрял фасул се осъществява на малки площи до 1-2 ha. Тези стопани обикновено са икономически слаби и без необходимите познания за културата. Тези площи са подложени на реален риск за нападение от болести и неприятели, а също така и от абиотичен стрес включващ суша и плодородие на почвата. Стопаните с финансови възможности могат да се борят с тези стресове чрез прилагането на пестициди, торене и напояване. Но в много случаи тези практики не са достатъчно ефективни и оскъпяват продукцията. Основните проблеми при производството на зрял фасул в България са свързани преди всичко с биотичните и абиотични фактори.

Селекцията на сортове зрял фасул с подобрена устойчивост на икономически важните болести в България е от първостепенно значение за селекционната стратегия на ДЗИ-Генерал Тошево. Използването на сортове с подобрена устойчивост ще намали използването на пестициди и ще премахне риска от загуби причинени от болести. Горе посочената цел може най-бързо и икономически изгодно да бъде постигната чрез комбинирането на директна (фенотипна) и индиректната (с помощта на генетични маркери) селекции.

Концепцията за индиректна селекция е атрактивна за селекционерите на културни растения. За успешно прилагане на индиректната селекция е необходимо наличието на много силна корелация между дадени селекционен признак и генетичен маркер, като се има предвид, че директно ще бъде селектиран генетичния маркер. За първи път индиректна селекция при културните растения е приложена от **Sax (1923)** при обикновения фасул (*Phaseolus vulgaris* L.). Той е използвал корелация между масата на отделното семе и оцветяването на семенната обвивка. При кръстосване на сорт с оцветена със сорт с бяла семенна обвивка в F_2 поколение семената на растенията със оцветена семенна обвивка са били с по-висока маса на отделното семе в сравнение със семената с бяла семенна обвивка.

Маркерна селекция е използвана още на ниво полен. **Roemer (1932)** чрез използване на феномена *ксения* (*xenia*) е контролирал наличието на чуждо опрашване при ръжта. При ръжта майчините растения притежаващи рецесивен ген за жълто оцветени зърна, когато се опрашат с полен носител на доминантен ген за зелено оцветени зърна се наблюдават зелено оцветени зърна в класа на майчините растения.

ИКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНИ БОЛЕСТИ

Болестите по културните растения са един от основните фактори, свързани с ниските добиви от зрял фасул. С най-голямо икономическо значение както в световен мащаб, така и за България са *бактерийният пригор*, *ореоловият пригор*, *антракнозата*, *ръждата*, *склеротинията* и *обикновената мозайка*.

Антракноза

Антракнозата в България се проявява сравнително рядко, но в замяна на това е в състояние да провали реколтата. Болестта се причинява от хемибиотрофната гъба *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams-Scrib.

В света са установени повече от 64 физиологични раси на патогена: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 17, 22, 23, 31, 38, 54, 55, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 105, 109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 130, 137, 193, 217, 249, 320, 321, 337, 339, 343, 385, 401, 453, 521, 585, 1545 и 3481 (Генчев, 2007). Първите изследвания върху патогенното разнообразие на *C. lindemuthianum* в България са проведени от Генчев (1987) и са установени две физиологични раси - 81 и 130. По късно Киряков (2000) установява наличието на раса 2, а Киряков и Генчев (2004) установяват пет нови за страната физиологични раси – 3, 6, 23, 73 и

Таблица 1. Гени и източници на гени за устойчивост към *C. Lindemuthianum*.

Table 1. Genes and sources of genes for resistance to *C. Lindemuthianum*

Ген за устойчивост Resistance gene	Източник на гени за устойчивост Source of genes for resistance	Литературни източници References
Co-1 (A)	Michigan Dark Red Kidney	McRostie (1919)
Co-1 ²	Kaboon	Melotto & Kelly (2000)
Co-1 ³	Perry Marrow	Melotto & Kelly (2000)
Co-1 ⁴	AND 277	Alzate-Marín et al., 2003a
Co-1 ⁵	Widusa	Gonçalves-Vidigal et al., 2003
Co-2 (Are)	Cornell 49242	Mastenbroek, 1960
Co-3 Mexique 1	Mexico 222	Bannerot, 1965
Co-3 ²	Mexico 227	Fouilloux, 1979
Co-4 Mexique 2	TO	Bannerot през 1969 (по Fouilloux, 1976, 1979)
Co-4 ²	G 2333, SEL 1308	Young et al., 1998
Co-4 ³	PI 207262	Alzate-Marín et al., 2007
Co-5 Mexique 3	TU	Bannerot през 1969 (по Fouilloux, 1976, 1979)
	G 2333, SEL 1360	Young et al., 1998
Co-6	AB 136	Kelly & Young, 1996
Co-7	G 2333, SEL 1308	Pastor-Corrales et al., 1994
co-8	AB 136	Alzate-Marín et al., 1997
Co-9	BAT 93	Geffroy et al., 1999
	PI 207262	Alzate-Marín et al., 2003c
Co-10	Ouro Negro	Alzate-Marín et al., 2003b
Co-11	Michelite 62	Gonçalves-Vidigal et al., 2005
Co-12	Jalo Vermelho	Gonçalves-Vidigal et al., 2008
Co-13	Jalo Listras Pretas	Gonçalves-Vidigal et al., 2009

79. Според авторите, раса 6 е характерна за планинските райони и по-конкретно за Западните Родопи и Рила, а раса 81 за равнините райони на страната – Северна България и Добруджа. Проведените през 2006 г. изследвания в Централни и Западни Родопи показват, че популацията на патогена е изградена от най-малко четири раси, като освен установената по-рано раса 6 са идентифицирани и раси 2, 22 и 54 (Kiryakov and Genchev, 2009).

До този момент официално са регистрирани 13 расово-специфични локуса за устойчивост при обикновения фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) към *C. Lindemuthianum* (табл. 1).

Таблица 2. RAPD маркери свързани със специфични гени за устойчивост към *C. Lindemuthianum*.

Table 2. RAPD markers linked to specific genes for resistance to *C. Lindemuthianum*

Локус Locus	RAPD	Литературни източници References
Co-1 (A)	OF10 _{530T} (TRANS)	Kelly and Young (1996)
Co-1 ^b	OA18 _{1500T}	Gonçaves-Vidigal and Kelly (2004)
Co-2 (Are)	OQ41 ₄₄₀ , OH20 ₄₅₀ , B355 ₁₀₀₀	Kelly and Young (1996)
Co-4 (Mexique 2)	OPY20 _{830C} (CISS), OPB03 _{180T}	de Aurra et al. (2000)
Co-4 ²	SAS13, SH18	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
	OPH18 ₁₂₀₀	Alzate-Marin et al. (2001)
Co-4 ³	SBB14, OC8	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
	OY20	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
Co-5	OAB3 ₄₅₀ , SAB3	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
Co-6	OAH1 ₇₈₀ , OAK20 ₈₉₀	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
co-8	OPA220	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
Co-9	SB12	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose
Co-10	F10	http://www.msu.edu/bic/Anthracnose

Таблица 3. SCAR маркери свързани със специфични гени за устойчивост към *C. Lindemuthianum*.

Table 3. SCAR markers linked to specific genes for resistance to *C. Lindemuthianum*

Локус Locus	SCAR	Литературни източници References
Co-1 ²	SE _{ACT} /M _{CCA} (codominant) (AFLP)	Vallejo and Kelly (2002)
Co-2	SCAreoli ₁₀₀₀	Adam-Blondon et al. (1994a); Geffroy et al. (1998)
	SCH20 ₄₅₀ кодминантен; SCF3, доминантен	Adam-Blondon et al. (1994 a,b)
Co-2, Ur-11	SQ4 ₁₄₄₀	Young and Kelly (1996); Awale et al. (2008)
Co-3/Co-9	SW12 _{700CIS}	Miklas et al. (2000c); Singh et al. (2000); Rodríguez-Suárez et al. (2008)
Co-4	SY20 _{830CIS}	Queiroz et al. (2004a); Kelly et al. (2003)
	SC08 _{910CIS}	Melotto et al. (1998); Kelly et al. (2003); Queiroz et al. (2004a)
Co-4 ²	SAS13 _{950CIS}	Young et al. (1998); Kelly et al. (2003)
	SH18 _{1100CIS}	Awale and Kelly (2001); Kelly et al. (2003)
	SBB14 _{1150/1050} (codominant)	Awale and Kelly (2001); Kelly et al. (2003)
	OAL9 ₇₄₀	Young et al. (1998)
Co-5	SAB3 _{400CIS}	Vallejo and Kelly (2001); Campa et al. (2005)
Co-6	SZ20 _{845CIS}	Kelly et al. (2003); Queiroz et al. (2004a)
	SZ04 _{567TRANS}	Kelly et al. (2003); Queiroz et al. (2004a)
Co-9	SB12 _{350CIS}	Mendez de Vigo et al. (2002)
Co-10	SF10 _{1072CIS}	Corrêa et al. (2000); Alzate-Marin et al. (2003 b)

В **табл. 2** са представени **RAPD** маркери свързани със специфичните гени за устойчивост **Co-1, Co-1⁵, Co-2, Co-4 (Mexique 2), Co-4², Co-4³, Co-5, Co-6, co-8, Co-9 и Co-10**.

В **табл. 3** са представени **SCAR** маркери свързани със специфичните гени за устойчивост **Co-1², Co-3/Co-9, Co-2, Co-4 (Mexique 2), Co-4², Co-5, Co-6, Co-9 и Co-10**.

Ръжда

Ръждата по фасула (*Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger) е сериозен проблем в редица райони на света, като пораженията достигат от 18% до 100% (**Stavely and Pastor-Corrales, 1989**). Патогенното разнообразие на гъбата е голямо, като в света са установени повече от 250 физиологични раси (**Stavely and McMillan, 1992**). На база диференциалния ключ от 19 сорта на **Stavely (1983)** досега в България са установени 7 физиологични раси (**Киряков и Генчев, 2003**), които оценени на база диференциалния ключ и модифицираната бинарна система на **Steadman et al. (2002)** са три: 20-0, 20-2 и 20-3. Проведените през периода 2006-2007 г. обследвания в четири пункта на Родопите показват, че популацията на патогена в този район е изградена от най-малко седем физиологични раси, като освен установените по-рано раси 20-0, 20-2 и 20-3 са идентифицирани и четири нови – 20-1, 20-19, 28-1 и 52-3 (**Beleva and Kiryakov, 2009**). Последните изследвания показват, че в този район са разпространени и раси 29-0 и 29-1 (Белева, непубликувани данни).

Таблица 4. Гени и източници на гени за устойчивост към *Uromyces appendiculatus*.
Table 4. Genes and sources of genes for resistance to *Uromyces appendiculatus*

Ген за устойчивост Resistance gene	Източник на гени за устойчивост Source of genes for resistance	Литературни източници References
<i>Ur-1</i>	B1627	Ballantyne, 1978
<i>Ur-2</i>	B 2090	Ballantyne, 1978
<i>Ur-2²</i>	B2055	Ballantyne, 1978
<i>Ur-3</i>	Aurora, Mexico 235, NEP 2	Ballantyne, 1978
<i>Ur-3²</i>	PI 181996	Stavely, 1990
<i>Ur-4</i>	Early Gallatin	Ballantyne, 1978
<i>Ur-5</i>	Mexico 309	Stavely, 1984 a,b
<i>Ur-6</i>	Olathe, Golden Gate Wax	Ballantyne, 1978
<i>Ur-7</i>	GN 1140	Augustine et al., 1972
<i>Ur-8</i>	U.S. #3	Christ and Groth, 1982
<i>Ur-9</i>	Pompador Checa	Finke et al., 1986
<i>Ur-10</i>	Cape, Resisto	Webster and Ainsworth, 1988
<i>Ur-11</i>		Stavely, 1990
<i>Ur-12</i>	Pompador Checa (възрастова устойчивост)	Jung et al., 1998
<i>Ur-13</i>	Kranskop	Liebenberg et al., 2004

До сега официално са регистрирани 12 расово-специфични гени за устойчивост (**табл. 4**) и един ген определящ възрастова устойчивост (**Bassett, 2004**), както и няколко временно именувани гени – *Ur-CNC, Ur-Dorado 53, Ur-Dorado 108, Ur-Ouro Negro, Ur-BAC 6* (**Pastor-Corrales et al., 2008**). Генът *Ur-3* е най-широко използвания при селекцията на устойчивост и се превръща в синоним на устойчивост към ръждата по фасула.

В **табл. 5** са посочени **RAPD** маркери, а в **табл. 6** **SCAR**-маркери свързани

със специфични гени за устойчивост към *Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger.

Таблица 5. RAPD маркери свързани със специфични гени за устойчивост към *Uromyces appendiculatus*.

Table 5. RAPD markers linked to specific genes for resistance to *Uromyces appendiculatus*.

Ген за устойчивост Resistance gene	RAPD	Литературни източници References
<i>Ur-3</i>	OK14 ₆₂₀	Kelly et al., 1996
<i>Ur-3²</i>	OAC20 ₄₉₀ , OAE19 ₈₉₀	Kelly et al., 1996
<i>Ur-4</i>	OA14 ₁₁₀₀	Miklas et al., 1993
<i>Ur-5</i>	OF10 _{970C} , OI19 _{460C}	Haley et al., 1993
<i>Ur-6</i>	OBC06 ₃₀₀ , OAG15 ₃₀₀	Park et al., 2004 b,c

В табл. 6 са представени SCAR маркери свързани със специфичните гени за устойчивост *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-6*, *Ur-7*, *Ur-11*, *Ur-13* и *Ur-Ouro Negro*.

Таблица 6. SCAR маркери свързани със специфични гени за устойчивост към *Uromyces appendiculatus*.

Table 6. SCAR markers linked to specific genes for resistance to *Uromyces appendiculatus*

SCAR	Локус Locus	Група на скачване Linkage group	Литературни източници References
SK14 ₆₂₀ CIS	<i>Ur-3</i>	B11	Haley et al. (1994);
SA14 _{1079/800} (codominant)	<i>Ur-4</i>	B6	Miklas et al.(1993); Miklas et al.(2002); Meine et al. (2004)
SI19 ₄₆₀ CIS	<i>Ur-5</i>	B4	Haley et al. (1993); Melotto and Kelly, (1998); Miklas et al. (2000c)
SBC6 ₈₀₀ CIS	<i>Ur-6</i>	B11	Miklas (2003)
SBC6 ₃₀₈ CIS	<i>Ur-6</i>		Miklas et al. (2002); Park et al. (2003b, 2004b)
SAD12 ₅₃₇ CIS	<i>Ur-7</i>		Park et al. (2003a, 2004a, 2008)
SAE19 ₈₉₀ TRANS	<i>Ur-11</i>		Johnson et al. (1995); Miklas et al. (2002); Queiroz et al. (2004b)
UR11-GT2 ₄₅₀ CIS	<i>Ur-11</i>		Boone et al. (1999); Miklas et al. (2002)
WR11GT2 ₄₅₀	<i>Ur-11</i>		Miklas (2003)
KB126 _{405/430} (codominant)	<i>Ur-13</i>		B8
SE _{AAC} M _{ACC} 384/405 ?		Liebenberg et al. (2004)	
SE _{ACA} M _{CTT} 320/396 ?		Liebenberg et al. (2004)	
SF10 ₁₀₇₂ CIS	<i>Ur-Ouro Negro</i>	B4	Corrêa et al. (2000); Miklas et al. (2002)
SBA8 ₅₃₀ CIS	<i>Ur-Ouro Negro</i>		Corrêa et al. (2000); Miklas et al. (2002)

Склеротиния (бяло гниене)

В Североизточна България склеротинията (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) е сериозен проблем при редица земеделски култури, включително и обикновения фасул. Съвременната селекционна стратегия в борбата със склеротинията при фасула включва комбинирането на физиологична устойчивост с механизми, предотвратяващи или снижаващи развитието и разпространението на болестта — изправен храст и рехав листна маса (Miklas et al., 2000d). Petzoldt and Dickson (1996) са разработили

метод за тестване физиологичната устойчивост на фасула към *S. sclerotiorum*.

Miklas et al. (2001) съобщават за установени **QTL** в седма скачена група (хромозома) близо до гена за фазеолиновия протеин (*Phs*) и в първа група близо до локуса *fin*. **Park et al. (2001)** са установили седем QTLs в 2, 3, 4, 7 и 8 скачени групи (хромозоми) близо до локус *C*, отговорен за оцветяването на семенната обвивка. **Miklas et al. (2003)** установяват QTLs молекулярни маркери (RAPD: AU05; SCAR: SAU5 и RAPD: S18; SCAR: SS18) в шеста и осма скачени групи (хромозоми).

В **табл. 7** са посочени SCAR маркери свързани с главни QTLs за устойчивост към *Sclerotinia sclerotiorum* (*Lib.*) *de Bary*.

Таблица 7. SCAR маркери свързани с главни QTLs за устойчивост към *Sclerotinia sclerotiorum*.

Table 7. SCAR markers linked to main QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*

SCAR	Локус Locus	Група на скачване Linkage group	Литературни източници References
Phs (Multiple)	Major QTL (G 122 & BAT 93) (Бяло гниене и бактериен пригор)	B7	Nodari et al. (1993); Kami et al. (1995); Miklas et al. (2001)
SAU5 _{1350CIS}	QTL (minor) NY6020-4	B6	Miklas et al. (2003)
SS18 _{1650CIS}	QTL (minor) NY6020-4	B8	Miklas et al. (2003)

Бактериен пригор

Бактерийният пригор (БП), причиняван от семенно-преносимата фитопатогенна бактерия *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Vauterin et al., 1995 (*Xap*) е сериозен проблем при производството на фасул в България (**Kiryakov and Genchev, 1993; Киряков, 1999**). Мерките за борба с болестта включват: използване на здрав посевен материал, спазване на сеитбооборота и използване на устойчиви сортове.

Таблица 8. SCAR маркери свързани с главни QTLs за устойчивост към *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* и *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Table 8. SCAR markers linked to main QTLs for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

SCAR	Локус Locus	Група на скачване Linkage group	Литературни източници References
Бактериен пригор			
SAP6 _{820CIS}	Major QTL (GN#1 sel 27)	B10	Miklas et al. (2000b,c)
BAC6 _{1250CIS}	Major QTL (GN#1 sel 27)		Jung et al. (1999)
SU91 _{700CIS}	Major QTL (XAN 159)	B8	Pedraza et al. (1997)
LG5 syn. BC420 _{900CIS}	Major QTL (XAN 159)	B6	Yu et al. (2000)
R7313 _{700CIS}	Major QTL (OAC 88-1)	B8	Bai et al. (1997); Beattie et al. (1998)
R4865 _{950CIS}	Major QTL (OAC 88-1)		Bai et al. (1997); Beattie et al. (1998)
Ореолов пригор			
SB10 _{525CIS}	<i>Pse</i> – без име	B4	Fourie et al. (2004)

Устойчивостта при фасула към БП има количествен характер и се контролира от малък брой главни гени (**Genchev and Kiryakov, 2001**). Генните ефекти са предимно

адитивни (McElroy, 1985).

В зависимост от щама на патогена и родителските компоненти на изследваната кръстоска QTLs са установени почти във всички скачени групи: 1,2,3,4,5,6,7,9,10 и 11 (Ariyaranthe et al., 1999; Jung et al., 1996; Jung et al., 1997; Tar'an et al., 1998; Tsai et al., 1998; Tar'an et al., 2002).

Ореолов пригор

Ореоловият пригор (ОП), причиняван от семенно-преносимата фитопатогенна бактерия *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkh.) Dows, се нарежда на второ място по разпространение от установените в България бактериини болести по фасула. Резултатите от ДНК анализи на щамове на бактерията дават основание за отнасяне на патогена към патовариететите на *P. savastanoi* – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp) (Gardan et al., 1992). Мерките за борба с бактерията включват: използване на здрав посевен материал, спазване на сеитбооборота и използване на устойчиви сортове (Coyne and Schuster, 1983; Webster et al., 1983).

От установените в света девет раси на ореоловия пригор в България са изолирани пет – раси 1, 2, 6, 7 и 9 (Kiryakov, 2001). Установените гени за устойчивост към ореоловия пригор са посочени в табл. 9.

Таблица 9. Гени и източници на гени за устойчивост към *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Table 9. Genes and sources of genes for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Ген за устойчивост Resistance gene	Източник на ген за устойчивост Sources of gene for resistance	Литературни източници References	Скачена група Linkage group	Литературни източници References
<i>Pse-1</i>	Red Mexican 3	Walker and Patel, 1964	B ₁₀	Freyre et al., 1998; Kelly et al., 2003; Pedrosa et al., 2003
<i>Pse-2</i>	ZAA 12	Taylor et al., 1996		
<i>Pse-3</i>	Tendergreen	Taylor et al., 1996	B ₄	Freyre et al., 1998; Pedrosa et al., 2003
<i>Pse-4</i>	Red Mexican 3 на 14.7 cM от <i>Pse-1</i>	Taylor et al., 1996	B ₁₀	Freyre et al., 1998; Pedrosa et al., 2003
<i>Pse-5</i>	ZAA 12	Taylor et al., 1996		

Обикновена мозайка

Обикновенната мозайка се причинява от две групи щамове мозайчни (BCMV – bean common mosaic virus) и некротични (BCMNV – bean common mosaic necrosis virus), които принадлежат към групата potyvirus. Двата вируса са семенно преносими, пренасаят се от няколко вида листни въшки и са неперсистентни. Генетичната устойчивост към двата потивируса се контролира от серия независими мулти-алелни локуси при обикновения фасул. Доминантният ген / осигуряващ свръхчувствителна устойчивост към пет потивируса (BCMV – Blackeye Cowpea Mosaic Potyvirus; CAMV – Cauliflower Mosaic Virus; SBMV – Southern Bean Mosaic Virus; WMV – Watermelon Mosaic Virus) (Kyle & Provvidenti, 1993) е локализиран във втора скачена група (B2), който в комбинация със рецесивните специфични гени *bc-3*, *bc-1²*, *bc-2²* и неспецифичния ген *bc-u* осигуряват стабилна защита без системна некроза (Drijfhout et al., 1978).

Създадени са SCAR маркери SW13_{690CIS}, ROC11_{420TRANS} и SBD5_{1250CIS} съответно за контрол на специфичните гени *I*, *bc-3* и *bc-1²* (табл. 10).

Таблица 10. SCAR маркери свързани със специфични гени за устойчивост към BCMV и BCMNV.

Table 10. SCAR markers linked to specific genes for resistance to BCMV and BCMNV.

SCAR	Локус <i>Locus</i>	Група на скачване <i>Linkage group</i>	Литературни източници <i>References</i>
Обиквена фасулева мозайка/Bean common mosaic virus			
SW13 _{690CIS}	<i>I, Pse-3</i>	B2	Haley et al. (1994); Melotto et al. (1996); Melotto et al. (1998); Fourie et al. (2004)
ROC11 _{420TRANS}	<i>bc-3</i>	B6	Johnson et al. (1997)
SBD5 _{1250CIS}	<i>Bc-1²</i>	B3	Miklas et al. (2000a)

ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ

Известни са три типа генетични маркери: морфологични (признакови), биохимични (запасни протеини в семена и ензими) и молекулярни (ДНК-маркери). Полиморфизмът на тази база може да бъде използван за установяване на корелации със стопански значими признаци. Един старателен преглед на тези маркери показва, че методите свързани с PCR (polymerase chain reaction) са с най-широко приложение като маркери в селекцията (MAS – marker assisted selection).

Морфологични маркери

Морфологичните признаци са първите маркери използвани в индиректната селекция. Но, тези признаци не са толкова много, че да задоволят нуждите на селекционера. Морфологичните мутации, които са описани в литературата, не са подходящи, тъй като те са свързани обикновено с нежелани от селекционна гледна точка характеристики. Много рядко се установяват корелации между морфологични признаци и ценни от стопанска гледна точка признаци. Така например, **Jung et al. (1997)** съобщават за корелация между оцветяването на цвета при обикновения фасул (*V/v^{lae}*) и устойчивостта му към бактериения пригор.

Като предимство на морфологичните признаци като генетични маркери за индиректна селекция може да се посочи лесното им оценяване, а като недостатък: 1) ограничения брой локуси и алели; 2) обикновено те са доминантно-рецесивни; 3) могат да бъдат оценени главно при възрастни растения и 4) обикновено са свързани с генетични уродливости.

Биохимични маркери (ензими и запасни белтъци)

Като биохимични маркери са запасните белтъци на семената и изозимите. Сравнително лесното им определяне (електрофореза в агарозен гел) дават основание за възлагане на големи надежди за установяване на силни корелации със значими стопански признаци. Но, за разлика от други култури, при обикновения фасул полиморфизмът на изозимите се ограничава само между двата генни пула (Andean – А и Middle American – М), но не и на генотипно ниво (**Singh et al., 1991a,b**).

Предимствата на изозимите като генетични маркери са: 1) предимно кододоминантни и много алелни; 2) могат да бъдат установени в ранните етапи от

развитието на растенията; 3) относително свободни от вторични ефекти; и 4) лесно се установяват чрез електрофореза. *Като несдатъци могат да бъдат посочени:* 1) ограничен брой локуси и 2) проява на тъканна специфичност в някои случаи (**Weber and Wricke, 1994**).

Запасните белтъци се оказали полезни по отношение класификацията както на културните, така и на дивите генплазми в генните пулове. Запасните белтъци с успех се използват при индиректната селекция за устойчивост към инсекти и повишаване съдържанието на протеин в семената на обикновения фасул. Специфичният белтък, арселин, се оказва много полезен като инсектицид спрямо складовия неприятел *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Прибавяйки в изкуствени семена на чист арселин **Osborn et al. (1988)** установява, че арселинът проявява отлични инсектицидни свойства без негативен ефект върху бозайниците. Поради това, че арселинът се наследява специфично (**Romero-Andreas et al., 1986**) в самостоятелни бендове от другите запасни белтъци, което го прави подходящ за индиректна селекция. В резултат на такава селекция са създадени множество селекционни линии (**Kornegay et al., 1993**). Тези маркери са използвани при гаметна селекция на пет болести (ъгловати листни петна, антракноза, обикновена фасулева мозайка, златиста фасулева мозайка и бактериен пригор) и цикадката *Empoasca kraemeri* Ross & Moore (**Singh et al., 1998**). Освен това, те са използвани за промяна на състава на семенните протеини с цел осигуряване на устойчивост към втория складов неприятел (*Zabrotes subfasciatus*) (**Hartweck et al., 1997**).

ДНК-маркери

На базата на генетичните характеристики ДНК-маркерите се групират в две категории:

Еднолокусни, мултиалелни, кодоминантни маркери. Например, **RFLP** (restriction fragment length polymorphism), (**VNTR** – Variable Number Tandem Repeats; **SSRs** – Short Sequence Repeats; **STRs** – Short Tandem Repeats; **Microsatellites** (2-6 нб); **Minisatellites** (10-60 нб) и **SSRs** – Simple Sequence Repeats). Single-nucleotide polymorphism (**SNP**).

Мултилокусни, едноалелни, доминантни маркери. Например, **AFLP** (amplified fragment length polymorphisms), **RAPD** (random amplified polymorphic DNA), **DAF** (DNA amplification fingerprinting), **DArT** (diversity array technology) и **DNA fingerprint** (**Jeffreys et al., 1985**).

Най-широко приложение при индиректната селекция в настоящия момент намират RAPD и SCAR маркерите.

СКРИНИНГ НА ГЕНИ ЗА УСТОЙЧИВОСТ ЧРЕЗ ДНК-МАРКЕРИ

Екстракция на геномна ДНК (Afanador et al., 1993)

За извличане на геномна ДНК се вземат по 1-2 диска от простите листа от 4 до 7 ден след поникване или от току-що разтворените тройни листа. Веднага се поставят в Епендорфова (Eppendorf tube) епруветка, с обем 1.5 µl или листните дискове се поставят между два пласта филтърна хартия и след това в полиетиленово пликче. След това веднага се поставят в хладилна чанта върху торбички с лед. Растенията могат да бъдат отгледани както в оранжерия, така и на поле. Използвайте най-младите листа. Добри резултати се получават и при използването на 100 µl стрити на ситно лиофилизирани листни тъкани. Пробите могат да бъдат обработени веднага или да бъдат съхранени във фризер за няколко дни, без това да се отрази на количеството и качеството извлечената ДНК.

Екстракцията на ДНК започва със стриване на листната проба с помощта на малък пестик до получаване на каша. Към така получената каша се прибавят 100 µl

горещ (65°C) **екстракционен буфер СТАВ** (за 100 ml **СТАВ** са необходими: 2% СТАВ (2 g), 1.4 M NaCl (8.1 g), 20 mM EDTA (4 ml), 100 mM Tris-HCl (10 ml), 1% β -mercaptoethanol (1 ml) и ddH₂O до 100 ml) се прибавят към всяка епруветка. След това пробата се хомогенизира добре, допълнително се прибавят 300 μ l към всяка проба. След като се смели напълно пробата се поставя в инкубатор при 65°C за 20 min. След инкубирането към всяка проба се прибавят 400 μ l **chloroform-isoamyl alcohol** (24:1; 384 g chloroform + 16 g isoamyl alcohol) като се клати на шейкър за 15 min. Полученият екстракт се центрофугира при 13000 rpm за 5 min, като супернатанта се прехвърля в нова Епендорфова епруветка съдържаща 400 μ l **isopropanol**. Пробите се разбъркват добре и се оставят при стайна температура за 5 min. Центрофугира се при 13000 rpm за 5 min, супернатантът се изхвърля, а епруветките се обръщат за 5 min за сушене на гранулите (pellet). Гранулите се ресуспендират в 100 μ l от TE_{0.1} буфер (Tris-EDTA 0.01 mM pH 8.0, (за 100 ml TE_{0.1} са необходими: 1 ml 1M Tris NCl pH 8.0, 0.2 ml 0.5 M EDTA и се довежда с ddH₂O до 100 ml) и 4 μ l от RNase (10 mg/ml) се прибавят към всяка епруветка. Преди преципитация със студен 100%-ов етанол пробите се оставят при стайна температура за 15 min. Центрофугират се и супернатанта се изхвърля. Гранулите се ресуспендират в 100 μ l TE_{0.1} буфер.

Чрез този протокол за 4 часа един лаборант може да изпълни 50 ДНК екстракции. Използването на СТАВ буфера вместо Tris буфера води до елиминирането на повечето растителни остатъци. Средно от 1500 проби количество ДНК за една проба е 78 ng/ μ l, което се съдържа в 100 μ l TE буфер.

Таблица 10. PCR протоли за SCAR маркерите.

Table 10. PCR protocols for SCAR markers

SCAR	PCR ПРОТОКОЛИ/ PCR PROTOCOLES
СВВ	
SAP6	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 55°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
BC409	34 цикли по 10s при 94°C, 60s при 70°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SU91	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 58°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
BC420/LG5	35 цикли по 30s при 94°C, 30s при 50°C, и 60s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
R7313	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 60°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
R4865	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 60°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SB10	94°C 5 min за 1 цикъл, 30 цикли по 10s при 94°C, 40s при 65°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
ВCMV	
SW13	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 67°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
ROC11	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 55°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SBD5	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 65°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
Ръжда/ Rust	
SAD12	Температура на анелиране от 71°C
SAE19	94°C 5 min за 1 цикъл, 35 цикли по 15s при 94°C, 60s при 58°C, и 90s при 72°C, и накрая един цикъл от 7 min при 72°C
UR11-GT2	60°C анелиране = кодоминантен; 65°C анелиране = доминантен
KB126	1 цикъл за 5 min при 94°C; 35 цикли по 1 min при 94°C, 1 min при 45°C, и 1 min при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SF10	1 цикъл за 3 min при 94°C; 35 цикли по 15s при 94°C, 60s при 65°C, и 90s при 72°C, и накрая един цикъл от 7 min при 72°C
SBA8	1 цикъл за 3 min при 94°C; 35 цикли по 15s при 94°C, 60s при 65°C, и 90s при 72°C, и накрая един цикъл от 7 min при 72°C

Таблица 10 (продължение)
Table 10 (continuation)

Бяло гниене (склеротиния) / White mold (sclerotinia)	
Phs	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 50°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SAU5	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 60°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SS18	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 63°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
Антракноза/ Anthracnose	
SQ4	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 59°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SCAreoli	58°C температура на анелиране и насичане с <i>Dral</i>
SY20	35 цикли за 30s при 94°C, 60s при 65°C, и 90s при 72°C
SC08	35 цикли за 30s при 94°C, 60s при 65°C, и 90s при 72°C
SAS13	34 цикли по 10s при 94°C, 144s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SH18	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 62°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SBB14	34 цикли по 10s при 94°C, 40s при 67°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SAB3	1 цикъл за 3 min при 94°C; 30 цикли по 10s при 94°C, 30s при 65°C, и 120s при 72°C, и накрая един цикъл от 5 min при 72°C
SZ20	35 цикли за 30s при 94°C, 60s при 60°C, и 90s при 72°C
SZ04	45 цикли за 30s при 94°C, 120s при 45°C, и 90s при 72°C
SB12	1 цикъл за 2 min при 94°C; 35 цикли по 60s при 94°C, 60s при 68°C, и 60s при 72°C, и накрая един цикъл от 7 min при 72°C
SF10	1 цикъл за 3 min при 94°C; 35 цикли по 15s при 94°C, 60s при 65°C, и 90s при 72°C, и накрая един цикъл от 7 min при 72°C

(www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR_Markers_2009.pdf).

PCR анализ чрез SCAR маркер за доказване на специфичен ген

При анализа се използва кит за PCR (PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads, GE Healthcare), като се следват инструкциите на фирмата производител. Всяка реакция съдържа puReTaq полимераза (2-3 единици) и четирите дезоксинуклеотид трифосфата (0.2 mM от всеки). Общият обем на PCR реакцията е 25 µl, от които 2 µl ДНК (20 ng), по 1 µl от всеки праймер (15 pmol) и 21 µl стерилна д.Н₂О.

Условията на амплификация са според протоколите посочени в **табл. 10**. Продуктите от PCR анализа се визуализират на 1% агарозен гел.

PCR анализ чрез RAPD маркер за доказване на специфичен ген

При анализа се използва кит за RAPD (Ready-To-Go™ RAPD Analysis beads, GE Healthcare), като се следват инструкциите на фирмата производител. Всяка реакция съдържа AmpliTaq™ полимераза (2-3 единици) и четирите дезоксинуклеотид трифосфата (0.4 mM от всеки). Общият обем на PCR реакцията е 25 µl, от които 2 µl ДНК (20 ng), 2.5 µl от праймера (25 pmol) и 20.5 µl стерилна д.Н₂О. Условията на амплификация са следните: един цикъл на 95°C за 5 мин., 45 цикъла от 95°C за 1 мин., 36°C за 1 мин., 72°C за 2 мин. и един цикъл на 72°C за 10 мин. Продуктите от RAPD анализа се визуализират на 1.5% агарозен гел.

СКРИНИНГ НА ГЕНИ ЗА УСТОЙЧИВОСТ ЧРЕЗ ПАТОГЕН

Антракноза

Причинител. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams-Scrib.

Гъбни изолати. В изследванията се използват едноспорови изолати от

разпространените в страната раси на патогена. Тъй като расовото разнообразие в България не осигурява достатъчна представителност на патотипове за идентифициране на някои расово-специфични гени със селекционен интерес у нас, то във фитопатологичната колекция на Института се интродуцират необходимите раси.

Подготовка на инокулум. Изолатите се култивират върху среда на Mathur (dextrose, 8 g/l; MgSO₄ 7 H₂O, 2.5 g/l; KH₂PO₄, 2.7 g/l; peptone, 2.4 g/l; yeast agar, 2.0 g/l; agar 16 g/l) при 18±1°C на тъмно за 10 дни. Споровата маса се смива със стерилна дестилирана вода, и след прецеждане през двоен тензук, суспензията е доведена до концентрация 10⁶ спори/ml.

Инокулиране и отчитане на реакцията на устойчивост. Десет дневни растения от посочените в табл. 11 потомства на дадена кръстоска и техните родители се пулверизират със спорова суспензия от съответните раси, поотделно. След инокулиране, растенията се поставят във влажна камера за 72 h при 20±2°C, като след снемане на камерата температурата се поддържа в същите граници (Генчев, 1983). Болестната реакция върху хипокутила и несъщинските листа се отчита 7-10 дни след инокулиране по 9 бална скала – 1, напълно устойчиви; 9, високо чувствителни (Генчев и Киряков, 1994; Генчев и Киряков, 2005). Като устойчив фенотип се приема този с бални оценки 1 - 3 (липса на симптоми до много малки неспорообразуващи петна).

Ръжда

Причинител. *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger.

Физиологични раси. В изследванията се използват едносорови изолати от раси даващи възможност за in vivo тестване на расово-специфичните гени, представляващи интерес за селекцията на устойчивост към ръждата по фасула.

Инокулум. За приготвянето на инокулума се използват току-що събрани уредоспори. Събирането на големи количества уредоспори се осъществява чрез стръскване на споровата маса върху стерилно фолио. При дългосрочно съхраняване, споровата маса се поставя в малки шишенца с винтови капачки или ампули, съдържащи 1g силикагел. Събраната спорова маса се съхранява в хладилник при 4°C. За оценка на селекционните материали се използват прясно събрани уредоспори 10-12 дни след инокулация на растенията.

Инокулумът се приготвя с концентрация 15-20 хиляди уредоспори в ml. За целта се прибавят 0.03 g уредоспори към 50 ml 0.01% Tween-20 в 250 ml ерленмайерова колба. Сместа се разбърква до хомогенизиране с подходяща бъркалка.

Тестово растение. Натрупването на инокулум при полски условия се осъществява с помощта на чувствителен сорт (намножител). С оглед установяване вирулентния потенциал на патогенната популация се използват тестови растения от сортовете включени в диференциращия ключ на ръждата. Проучваните материали, намножителя и тестовите растения се засяват в редове от 1m. При оранжерийни условия, проучваните материали се засяват в пласмасови саксии с диаметър 10 cm и се отглеждат при температура 20-25°C.

Инокулиране. Инокулирането се извършва 16-18 дни след сеитба, когато листата са достигнали 35-65% от пълните си размери (Stavely, 1983; 1984a,b). Инокулирането се извършва чрез нанасяне на спорова суспензия с четка за рисуване или чрез пулверизиране. При изпитване на повече от един изолат, с цел да бъде нанесена споровата суспензия в точно определена част от дадения лист, на дюзата се поставя плексигласова тръбичка с диаметър 12 mm и дължина 5 cm (Stavely, 1983). При масово инокулиране листата са пулверизират от двете страни. (Stavely, 1983; 1984a,b).

Инкубиране. На полето се изнесят растения в саксии заразени с определени раси, от които заразата се разпространява по околните растения. В оранжерия след

инокулиране растенията се поставят във влажна камера за 16 h при 20-25°C, след което на плота до отчитането. Реакцията на устойчивост се отчита след 15 дни (Stavely, 1983;1984a,b).

Склеротиния

Инокулум. За инокулум се използват 3 дневни култури от изолат на патогена върху PDA хранителна среда.

Инокулация. Четири седмици след сеитба, растенията се инокулират (фиг. 1) по метода на Petzoldt and Dickson (1996).

Главното стъбло на 10 растения от образец се отрязват на разстояние 30 mm от листния възел на последния развит троен лист. Върху отреза се поставя едностранно затворена пластмасова сламка (6 x 25 mm) с която предварително е взет агаров диск от 3 дневна култура на използвания фасулев изолат върху хранителната среда PDA (Potato Dextrose Agar). След инокулиране растенията се пренасят в оранжерия при 20-25°C. Резултатите се отчитат 14 и 21 дни след инокулиране по 9 бална скала Petzoldt and Dickson (1996).



Фиг.1 Растение инокулирано по метода на straw-теста. Мокрото гниене е развито до 1/2 от второто междувъзлие. Figure 1. A bean plant inoculated by the straw-method. White mold occurs on half the stem from the second internode.

Бактерийен и ореолов пригори

Скринингът на устойчивост към БП и ОП се прави по Киряков, И. (1999). Поради различен генен контрол на устойчивостта на листата и бобовете изкуствена инокулация (фиг. 2) се извършва както на листата (във фаза цъфтеж (R6) по метода на многобройните игли (Andrus, 1948)), така и на бобовете (във фаза наливане на бобовете (R8) с помощта на 1 ml спринцовка (Valladares-Sánchez et al., 1983)). За инокулум се използват 48 h бактеријни култури върху YDC (Yeast extract-dextrose-CaCO₂). Реакцията на листата и бобовете се отчита 14 дни след инокулиране на съответните растителни органи по 9 бална скала (Genchev and Kiryakov, 2005).



а



б

Фиг. 2 Бактерийна инокулация на лист (а) и боб (б)
Figure 2. Bacterial inoculation of leaf (a) and pod (b)

Обикновена фасулева мозайка

- При работа с вирусите трябва да се спазват следните правила:
- За сеитба се използват свободни от вирусни частици семена.

➤ Ръцете и инвертара за работа между работата с два различни щамове се дезинфекцират, както и след приключване на работа.

➤ Осигуряване на липса на преносители в орънжерията, чрез прибавяне на системни инсектициди към съдовете на растенията всяка седмица.

Инокулум. Изпитването за устойчивост се прави с щам 'NL 3', който на практика покрива вирулентността на всички щамове от BCMV. Инокулумът се приготвя от прясно откъснати листа от инфектирано растение от 2 до 6 седмици след инокулацията му. Листата се стриват в хаванче с карборунд в 0.01 M фосфатен буфер с pH = 7 (1:1 w/v) до напълно хомогенна маса. Последната се прецежда през тензух. Сокът се разрежда 1:10 с цел да се достигне концентрация на вирусните частици 10^{-3} до 10^{-4} , което е допустимо гранично разреждане на този вирус.



Фиг. 3 Механично инокулиране с BCMV и BCMNV.

Figure 3. Manual inoculation with BCMV and BCMNV

Дълготрайно съхранение на щамове става в семената. Обикновено 20-80% от семената на болното растение източник на зараза са носители на вируса. Реизолацията на вируса от него става много бързо, когато е необходимо (Drijfhout et al., 1978).

Инокулиране. Върху листа, на които ще се извърши инокулирането се насипва карборунд (прекаран през сито 500 mesh) и след това се натърква леко с памучния край на пласмасово шише пълно с инокулум (фиг. 3). Добри резултати се получават, когато се инокулират простите листа развити до S до s от пълните им размери, промити с чешмяна вода и поставени при 23 до 26°C (Drijfhout et al., 1978).

Растителен материал. Тестовите растения се отглеждат по едно в пласмасови саксии с диаметър от 8 до 12 cm. През зимните месеци се осигурява допълнително осветление от 400 W с разчет по 100 W/m² (Drijfhout et al., 1978).

Инкубиране. След инокулацията листата се промиват с чешмяна вода и се поставят при 23-26°C и допълнително осветление през зимните месеци от 400 W или по 100 W/m² (Drijfhout et al., 1978).

Отчитане реакцията на устойчивост. Реакцията на устойчивост се отчита една, две, три и четири седмици след инокулацията. От всяко растение се взема по един троен лист (най-горен) и се проверява за наличието на вирус в него върху растения от чувствителните сортове 'Dubbele Witte' или 'Sutter Pink' (Drijfhout et al., 1978). Отчитането при полски условия се прави във фаза цъфтеж (R6). Отчита се типът и степента на нападение:

- 1 – Устойчива реакция. Симптоми липсват.
- 3 – Устойчив тип на реакция. Растението реагира с локална некроза.
- 5 – Толерантна реакция. Системните симптоми могат да бъдат слаби и атипични.

➤ 7 – Чувствителна реакция. Умерени до силни симптоми на системна мозайка, уродливост, вджуджаване.

- 9 – Чувствителна реакция. Растението реагира със системна некроза.

Растението загива.

Степента на нападение се отразява чрез процента нападнати растения в посева.

СЕЛЕКЦИОНЕН ПОДХОД

Пирамидалното натрупване на гени (специфичен доминантен, специфичен рецесивен и QTL) за устойчивост в едно растение и създаването на изолинии с даден ген за устойчивост могат да бъдат постигнати чрез селекционната процедура посочена

в табл. 11. При осъществяване на три поколения в година (едно поколение при полски и две при оранжерийни условия) рекомбинантна инбредна линия с желаните стопански качества може да се постигне за 30 месеца в девет стъпки.

Table 11. Селекционна процедура
Table 11. Breeding procedure

Стъпка Step	Кръстоска Cross	Месеци и място на изпълнение Months and location	Скрининг (специфична раса/щам, ДНК-маркер) Screening (specific race/strain, DNA-marker)		
			Брой оценени растения Number of surviving plants	Одобрени растения Selected plants	Бракувани растения Discarded plants
1 st	A [†] x B [‡]	V–VIII, поле	N x n _g	RR и rr	
2 th	A x BC ₁ F ₁	IX–XII, оранжерия	N x n _g	Rr	rr
3 th	A x BC ₂ F ₁	I–IV, оранжерия	N x n _g	Rr	rr
4 th	A x BC ₃ F ₁	V–VIII, поле	N x n _g	Rr	rr
5 th	A x BC ₄ F ₁	IX–XII, оранжерия	N x n _g	Rr	rr
6 th	A x BC ₅ F ₁	I–IV, оранжерия	N x n _g	Rr	rr
7 th	BC ₆ F ₁	V–VIII, поле	N x n _g	Rr	rr
8 th	BC ₆ F ₂	IX–XII, оранжерия	N x n _g	Rr	
9 th	BC ₆ F ₃ (RILs)	I–IV, поле	N x n _p x n _g	RR	Rr и rr

n_g – брой гени; † - рекурентен родител; ‡ - донор на специфичния ген за устойчивост;
N – брой на растенията подложени на скрининг в зависимост от броя на специфичните гени и поколението.

*n_g – number of genes; † - recurrent parent; ‡ - donor of the specific gene for resistance;
N – number of plants subjected to screening according to the number of specific genes in the progeny.

При първата стъпка се извършва кръстосването на рекурентния родител (A) и донора (B) на гена за устойчивост. Като за целта N растения от донора се проверяват дали са носители на дадения ген и растенията, които са показали, че са носители на дадения ген се използват в хибридизация. Когато рекурентния родител е носител на дадени гени, то и от него N растения се подлагат на проверка за съответните гени.

От втора до шеста стъпки проверка за наличието на съответните гени се подлагат по N растения, както от рекурентния родител, така и от F₁ на съответния беккрос и за хибридизация се използват растенията носители на съответните гени.

Седма стъпка (BC₆F₁). Отглеждането при самоопрашване на растенията от BC₆F₁ е желателно да бъде при полски условия, за да може да се получат възможно по-голям брой семена, което ще даде възможност за по-голям шанс за попадане на желанния генотип. Тук трябва да се подберат растенията носители на желаните гени. Получените семена от всяко растение се прибират отделно.

Осма стъпка (BC₆F₂). Семената от всяко BC₆F₁ растение се засяват в отделен ред. На скрининг се подлагат всички растения. Семената от растенията притежаващи всички желани от нас гени се прибират отделно.

Девета стъпка (BC₆F₃). Семената от всяко BC₆F₂ растение се засяват в отделен ред. На скрининг се подлагат по N растения. Тези линии, които притежават всички желани от нас гени и не показват разпадане са желаните от нас RILs.

Когато генът за устойчивост е специфичен доминантен и разполагаме с подходящата раса (расата не може да преодолява или да може да преодолява само този ген, първият вариант е по-подходящ) за скрининг на този ген. При липса на такава раса скринингът може да бъде извършен с помощта на ДНК-маркер, но получената линия трябва да бъде проверена с подходяща раса или набор от раси. При пирамидалното натрупване на гени е необходима специфична раса, а при изолиниите може да бъде раса, която не може да преодолява дадения ген. Когато генът за устойчивост е рецесивен или е QTL по-изгодно е скринингът да се извършва с ДНК-маркер и получените рекомбинантни инбредни линии да бъдат подложени на проверка със съответните раси и щамове на патогените. В тези случаи скринингът може да се извърши с подходяща раса или подходящ щам, но процесът е много по-скъп и по-продължителен. При случая с рецесивните гени генотип в хомозиготно състояние на даден рецесивен ген може да се отсее в F_2 покоение. При селекция на QTLs, селекцията се прави едновременно в няколко пункта или различни години на едно и също поколение с различни метеорологични условия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За успешното продължаване селекцията на сортове обикновен фасул със желаните стопански и консумативни качества е необходимо:

- Информираност за най-новите и перспективни научни постижения;
- Идентифициране, проучване и включване в генофонда на ДЗИ-Г. Тошево;
- Разработване на ускорена, по-практична и реалистична селекционна процедура включваща както директната (фенотипната), така и индиректната (с използването на ДНК-маркери);
- Полагане на усилия за по-задълбочено изясняване на същността на механизмите на устойчивост;
- Провеждане на молекулярни генетични изследвания с цел по-доброто познаване генетиката и физиологията на устойчивостта;
- Превръщане на придобитата информация в средства полезни за индиректната селекция.

За сега ДНК-маркерите се създават на определени сравнително много къси последователности, които при различните сортове вероятно не са на едно и също разстояние от дадения ген. Това води до много несигурни скрининг резултати. Болшинството ДНК-маркери се свързват със сателитен участък от ДНК на дадения ген. При използване на тези ДНК-маркери в действителност са възможни следните три възможности: 1) Наличие на положителен сигнал с наличие на интересувания ни ген; 2) Наличие на положителен сигнал и липса на интересувания ни ген; и 3) Липса на положителен сигнал и наличие на интересувания ни ген. Най-сигурни са ДНК-маркерите свързващи се с участъци от самия ген.

ЛИТЕРАТУРА

- Генчев, Д., 1983. Методика за изкуствена инокулация на фасула с причинителя на антракнозата и отчитане на реакцията на устойчивост. Растениевъдни науки 20(1):139-148.
- Генчев, Д., 1987. Проучвания върху антракнозата по фасула в България във връзка със селекцията на устойчиви сортове. Автореферат на Дисертация за получаване на научната степен "Кандидат на селскостопанските науки", 25 стр.
- Генчев, Д. и Киряков, И., 1994. Обикновен зрял фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) - Селекционните признаци и тяхната оценка. ПъблишСайСет - ООД, София, 60 pp.
- Генчев, Д., 2007. Селекционно-генетични изследвания при зрелия фасул (*Phaseolus vulgaris* L.). Автореферат за присъждане на научната степен дсн, 74 стр.
- Генчев, Д., и И. Киряков, 2005. Цветни скали на идентификационните признаци при обикновения фасул (*Phaseolus vulgaris* L.)/Color Scales for Identification Characters of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) CD ISBN 954-9780-07-4.
- Киряков, И., 1999. Проучвания върху бактериозите по зрелия фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) в България и средствата за борба с тях. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен "Доктор". ИПС "Добруджа" Ген.Тошево, 157 стр.
- Киряков, И., 2000. Расово разнообразие на *Colletotrichum lindemuthianum* в България. Растениевъдни науки, 37:248-251.
- Киряков, И., Генчев, Д. 2003. Раси на ръждата по фасула в Североизточна България през 2002 година. Научни съобщения на СУБ кл. Добрич, т. 5(1)72-76.
- Киряков, И. и Генчев Д., 2004. Нови раси на антракнозата по фасула в България. Field Crop Studies (Bg) 1(2):336-341.
- Adam-Blondon, A.F., M.Sevignac, H.Bannerot, and M.Dron, 1994a. SCAR, RAPD and RFLP marker linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. Theor. Appl. Genet. 88:865-870.
- Adam-Blondon, A.F., M. Sevignac, M. Dron, and H. Bannerot, 1994b. A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. Genome 37:915-924.
- Afanador, L.K., S.D. Haley and J.D. Kelly. 1993. Adoption of "mini-prep" DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.36:10-11.
- Alzate-Marin, A.L., G.S. Baia, T.J. de Paula, Jr., G.A. de Carvalho, E.G. de Barros and M.A. Moreira. 1997. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. Plant Dis. 81: 996-998.
- Alzate-Marin, A.L., H. Menarim, G. S. Baia, T.J. Paula Jr, and K. A. de Souza, 2001. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. J. Phytopathology 149:259-264.
- Alzate-Marin, A.L., K.M. Arruda, E.G. De Barros, and M.A. Moreira. 2003a. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop. 46:173-174.
- Alzate-Marin, A.L., M.R. Costa, K.M. Arruda, E.G. De Barros, and M.A. Moreira. 2003b. Characterization of the anthracnose resistance genes present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. Euphytica 133:165-169.
- Alzate-Marin, A.L., M.G. De Moraes Silva, E.J. De Oliveira, M.A. Moreira, and E.G. De Barros. 2003c. Identification of the second anthracnose resistant gene present in the common bean cultivar PI 207262. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop/ 46:177-178.
- Alzate-Marin, A.L., K.A. de Souza, M.G.M. Silva, E.J. Oliveira, M.A. Moreira and E.G. Barros. 2007. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4³* and *Co-9* in common bean cultivar Tlalnepantla 64 (PI 207262). Euphytica 154: 1-8.

- Andrus, C.F., 1948.** A method of testing beans for resistance to bacterial blight. *Phytopathology* 38:757-759.
- Ariyaratne, H., D.P. Coyne, G. Jung, P.W. Skroch, A.K. Vidaver, J.R. Steadman, P.N. Miklas, and M.J. Bassett, 1999.** Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124:654-662.
- Augustin, E., Coyne, D.P., and Schuster, M.L. 1972.** Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli typica* Brazilian rust race B11 and of plant habit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96:526-529.
- Awale, H.E., S.M. Ismail, V.A. Vallejo and J.D. Kelly. 2008.** SQ4 SCAR marker linked to the Co-2 gene on B11 appears to be linked to the *Ur-11*. *Annu. Rpt. Improv. Coop.* 51:174-175.
- Awale, H.E. and J.D. Kelly. 2001.** Development of SCAR markers linked to *Co-4²* gene in common bean. *Annu. Rpt. Improv. Coop.* 44:119-120.
- Bai, Y., T.E. Michaels and K.P. Pauls. 1997.** Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Genome* 40:544-551.
- Beattie, A. T.E. Michaels and K.P. Paul. 1998.** An efficient reliable method to screen for common bacterial blight (CBB) resistance in *Phaseolus vulgaris* L. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.* 41:53-54.
- Ballantyne, B. 1978.** The genetic basis of resistance to rust caused by *Uromyces appendicularis* in bean (*Phaseolus vulgaris*). Ph.D. thesis University of Sidney, Australia, 262 pp.
- Bannerot, H. 1965.** Resultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'antracnose. *Annales de l'Amélioration des plantes, Versailles*, 15:210-222.
- Bassett, M.J. 2004.** List of Genes - *Phaseolus vulgaris* L. *BIC* 32: 1-24.
- Beleva M., and I. Kiryakov, 2009.** Virulence diversity of *Uromyces appendiculatus* in Rhodopi Mountains, Bulgaria. *Ann. Report of the Bean Improvement Cooperative* 52: 74-7
- Boone, W.E., J.R. Stavely and N.F. Weeden. 1999.** Development of a sequence-tagged site (STS) marker for *Ur-11*, a gene conferring resistance to the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.*, 42:33-34.
- Campa, A., C. Rodriguez-Suarez, A. Paceda, R. Giraldez, and J.J. Ferreira, 2005.** The bean anthracnose gene *Co-5*, is located in linkage group B7. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.*, 48:68-69.
- Christ, B.J., and J.V. Groth, 1982.** Inheritance of resistance in three cultivars of beans to the bean rust pathogen and interaction of virulence and resistance genes. *Phytopathology* 72:771-773.
- Corrka, R.X., M.R. Costa, P.I. Good-God, V.A. Ragagnin, F.G. Faleiro, M.A. Moreira and E.G. de Barros. 2000.** Sequence characterized in linkage group B7. *Crop Sci.* 40:804-807.
- Coyne, D.P., and M.L. Schuster, 1983.** Genetics of breeding for resistance to bacterial pathogens in vegetable crops. *Phytopathology*, 75: 1032-1039
- de Aurra, M.C., A.L. Alzate-Marin, J.M. Chagas, M.A. Moreira, and E.G. de Barros, 2000.** Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology* 90:758-761.
- Drijfhout, E., M.J. Silbernagel, D.W. Burke, 1978.** Differentiation of strains of bean common mosaic virus. *Neth. Pl. Path.* 84:13-26.
- Finke, M.L., D.P. Coyne and J.R. Steadman, 1986.** The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica* 35: 969-982.

- Fouilloux, G. 1976.** Bean anthracnose: New genes for resistance. Annu. Rep. Bean Improv. Coop 19:36-37.
- Fouilloux, G. 1979.** New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: Diseases of Tropical Food Crops. (Eds.) Maraite, H., Meyer, J.A., p. 221-235. Universite Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgium.
- Fourie, D., P.N. Miklas and H.M. Ariyaratne, 2004.** Genes conditioning halo blight resistance to races 1,7, and 9 occur in a tight cluster. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.
- Freyre, R., P.W. Skroch, V. Geffroy, A.-F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W.C. Jonson, V. Llaca, R.O. Nodari, P.A. Pereira, S.-M. Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C.E. Vallejos, and P. Gepts. 1998.** Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map alignment of RFLP maps. Theor. Appl. Genet. 97:847-856.
- Geffroy, V., F. Creusot, J. Falquet, M. Seignac, A. F. Adam-Blondon, H. Bannerot, P. Gepts and M. Dron. 1998.** A family of LRR sequences at the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet. 96: 494-502.
- Geffroy, V., S. Delphine, J.C.F. De Oliveira, M. Seignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, and T.C.H.Goulden, 1999.** Problem in plant selection. p. 132-133. In: R.C. Burnett(ed.). Proc. &th Int.Genet. cong. (Edinburgh). Cambridge universiti press.
- Genchev, D., and I.Kiryakov, 2001.** Genetic control of the reaction to common bacterial blight *Xanthomonas campestris* pv.*phaseoli* (Smith) Dye) in two dry beans lines, *Phaseolus vulgaris* L.. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 7; 15-21
- Genchev, D., and I.Kiryakov, 2005.** Color scales for indentification characters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). http://www.css.msu.edu/bic/PDF/Color_Scales.pdf
- Goncalves-Vidigal, M.C., V. Vallejo, and J.D. Kelly, 2003.** Characterization on the anthracnose resistance in the differential cultivar Widusa. Ann. Rept. Bean Improv. Coop., 46:175-176.
- Goncalves-Vidigal, M.C., and J.D. Kelly, 2004.** RAPD marker linked to *Co-1^s* anthracnose resistance gene in Widusa. Annu. Rep. Bean Improv. Coop., 47:135-136.
- Goncalves-Vidigal, M.C., C.R. Silva, P.S. Vidigal Fiho, and J.P. Poletine, 2005.** Characterization of the anthracnose resistance gene in common bean cultivar Michelite. Annu. Rep. Bean Improv. Coop., 48:78-79.
- Gonzalves-Vidigal, M.C., G.F. Lacanallo and P.S. Vidigal Filho. 2008.** A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean(*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'Jalo Vermelho'. Plant Breeding 127 (6) 592-596.
- Gonzalves-Vidigal, M.C., P.S. Vidigal Filho, A.F. Medeiros and M.A. Pastor-Corrales. 2009.** Common bean landrace Jalo Listras pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. Crop Sci. 49: 133-138.
- Haley, S.D., P.N. Miklas, J.R. Stavely, J. Byrum, and J.D. Kelly, 1993.** Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theor. Appl. Genet., 86:505-512.
- Haley, S.D., L. Afanador and J.D. Kelly. 1994.** Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. Theor. Appl. Genet. 88:337-342.
- Hartweck, L.M., C. Cardona and T.C. Osborne. 1997.** Bruchid resistance of common bean lines having an altered seed protein composition. Theor. Appl. Genet. 95:1018-1023.
- Jeffreys, A., J.V. Wilson and S.L. Thein. 1985.** Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314:67-72.
- Johnson, E., P.N. Miklas, J.R. Stavely and J.C. Martinez-Cruzado. 1995.** Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. Theor. Appl. Genet. 90:659-664.
- Johnson, W.C., P. Guzman, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire, S. Temple, R.L. Gilbertson**

- and P. Gpets. 1997. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. *Crop Sci.* 37:248-254.
- Jung, G., D.P.Coyne, P.W. Skroch, J. Nienhuis, E. Arnaud-Santana, J. Bokosi, H.M. Ariyaratne, J.R. Steadman, J.S. Beaver, and S.M. Kaeppler, 1996. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(5):794-803.
- Jung, G., P.W. Skroch, D.P. Coyne, J. Nienhuis, E. Arnaud-Santana, H.M. Ariyaratne, S.M. Kaeppler and M.J. Bassett. 1997. Molecular-markers-based genetic analysis of tepary beanderived common bacterial blight resistance in different developmental stage of common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:329-337.
- Jung, G., D.P. Coyne, J.M.Bokosi, J.R. Steadman, and J. Nienhuis, 1998. Mapping genes for specific and adult plant resistance to rust and abaxial leaf pupescence and their genetic relationship using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123:859-863.
- Jung, G., P.W. Skroch, J. Nienhuis, D.P. Coyne, E. Arnaud-Santana, H.M. Ariyaratne and J.M. Marita. 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. *Crop Sci.* 39:1448-1455.
- Kami, J., V.B. Velasquez, D.G. Debouck and P. Gepts. 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:1101-1104.
- Kelly, J.D., and R.A. Young, 1996. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 39:20-24.
- Kelly, J.D., J.R. Stavely, and P.N. Miklas, 1996. Proposed symbols for rust resistance genes. *Ann. Rept. Bean Improv. Coop.*, 39:25-31.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas, and D.P. Coyne. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular importance in bean and cowpea. *Field Crop Res.*, 82:135-154.
- Kiryakov, I., and D.Genchev, 1993. Common blight of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in North-Eastern Bulgaria. *Ann. Rep. of Bean Improvement Cooperative*, 36; 152-153.
- Kiryakov, I., 2001. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola* races in Northeastern Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 7;315-320
- Kiryakov, I., and D. Genchev, 2009. Races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Rhodoppi Mountains, Bulgaria and landraces resistance. *Ann. Report of the Bean Improvement Cooperative* 52: 34-35
- Kornegay, J., C. Cardona and C.E. Posso. 1993. Inheritance of resistance to Mexican bean weevil in common bean, determined by bioassay and biochemical tests. *Crop Sci.* 33:589-594.
- Kyle, M.M. and R. Provvidenti, 1993. Inheritance of resistance to potyviruses in *Phaseolus vulgaris* L. II. Linkage relations and utility of a dominant gene for lethal systemic necrosis to soybean mosaic virus. *Theor. Appl. Genet.* 86: 189-196.
- Liebenberg, M.M., C.M.S. Mienie, and Z.A. Pretorius, 2004. Evidence for Middle-American origin of rust resistance in the differential cultivar Redlands Pioneer. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.*, 47:257-258.
- Mastenbroek, C., 1960. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. *Euphytica* 9(2)177-184.
- McElroy, J. B., 1985. Breeding dry beans, *Phaseolus vulgaris* L., for common bacterial blight resistance derived from *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Ph.D. dissertation. Cornell University, Ithaca, NY, USA. 45 p.
- McRostie, G.P. 1919. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. *Phytopathology* 9:141-148.
- Meine, C.M.S., R. Naidoo and M.M. Liebenberg. 2004. Conversion of the RAPD marker for *Ur-4* to co-dominant SCAR marker SA14_{1079/800}. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.*

- 47:261-262.
- Meine, C.M.S., M.M. Liebenberg, Z.A. Pretorius and P.N. Miklas. 2005.** SCAR markers linked to the *Phaseolus vulgaris* rust resistance gene *Ur-13*. Theor. Appl. Genet. 111:972-979.
- Melotto, M., L. Afanador and J.D. Kelly. 1996.** Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. Genome 39:1216-1219.
- Melotto, M. and J.D. Kelly. 1998.** SCAR markers linked to major disease resistance genes in common bean. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 41:64-65.
- Melotto, M., and J.D. Kelly. 2000.** An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. Euphytica 116:143-149.
- Mendez de Vigo, B., C. Rodriguez, A. Paneda, R. Giraldez and J.J. Ferreira. 2002.** Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. Annu. Rpt. Improv. Coop. 45:116-117.
- Miklas, P. 2003.** DNA SCAR markers linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*). <http://www.usda.prosser.wsu.edu/miklas/Scartable3.pdf>.
- Miklas, P.N., J.R. Stavely, and J.D. Kelly, 1993.** Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. Theor. Appl. Genet., 85:745-749.
- Miklas, P.N., R. Larsen, K. Victry, R. Delorme, C. Marma, R.H. Riley & D. Kelly. 2000a.** Marker-assisted selection for the *bc-1²* gene for resistance to BCMV and BCMNV in common bean. Euphytica 116:211-219.
- Miklas, P.N., J.R. Smith, R. Riley, K.F. Grafton, S.P. Singh, G. Jung and D.P. Coyne. 2000b.** Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop., 43:39-40.
- Miklas, P.N., V. Stone, M.J. Daly, J.R. Stavely, J.R. Steadman, M.J. Bassett, R. Delorme and J.S. Beaver. 2000c.** Bacterial, fungal and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/XAN 176). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125:476-481.
- Miklas, P., R. Delorme, W. Johnson, and P. Gepts, 2000d.** Field and straw test reaction to white mold in a RIL population (A55/G122). Ann. Rep. of Bean Improvement Cooperative, 43:76-77.
- Miklas, P.N., W.C. Johnson, R. Delorme, R.H. Riley and P. Gepts. 2001.** Inheritance and QTL analysis of physiological resistance to white mold in common bean G122. Crop Sci. 41:309-315.
- Miklas, P.N., M.A. Pastor-Corrales, G. Jung, D.P. Coyne, J.D. Kelly, P.E. McClean, and P. Gepts. 2002.** Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop., 45:125-129.
- Miklas, P.N., R. Delorme, and R.H. Riley, 2003.** Identification of QTL conditioning resistance to white mold in a snap bean population. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 128:564-570.
- Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzman, R.L. Gilbertson and P. Gepts. 1993.** Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. Genetics 134:341-350.
- Osborn, T.C., D.C. Alexander, S.S.M. Sun, C. Cardona and F.A. Bliss. 1988.** Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science 240:207-210.
- Park, S.O., D.P. Coyne, J.R. Steadman, and P.W. Skroch, 2001.** Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. Crop Sci., 41:1253-1262.
- Park, S.O., D.P. Coyne, J.R. Steadman and P.W. Skroch. 2003a.** Mapping of the *Ur-7* gene for specific resistance to rust in common bean. Crop Sci. 43:1470-1476.
- Park, S.O., K.M. Crosby, D.P. Coyne and J.R. Steadman. 2003b.** Development of a SCAR marker linked to the *Ur-6* gene for specific rust resistance in common bean. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 46:189-190.
- Park, S.O., D.P. Coyne and J.R. Steadman. 2004a.** Development of a SCAR marker linked to the *Ur-7* gene in common bean. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop., 47:269-270.
- Park, S.O., D.P. Coyne, J.R. Steadman, K.M. Crosby and M.A. Brick. 2004b.** RAPD and

- SCAR markers linked to the *Ur-6* Andean gene controlling specific rust resistance in common bean. *Crop Sci.* 44:1799-1807.
- Park, S.O., D.P. Coyne, and J.D. Steadman, 2004c.** Survey of RAPD and SCAR markers linked to the *Ur-6* gene in Middle American and Andean beans. *Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.*, 47:117-118.
- Park, S.O., J.D. Steadman, D.P. Coyne and K.M. Crosby, 2008.** Development of a coupling phase SCAR marker linked to the *Ur-7* rust resistance gene and its occurrence in diverse common bean lines. *Crop Sci.* 48:357-363.
- Pastor-Corrales, M.A., O.A. Erazo, E.I. Estrada, and S.P. Singh, 1994.** Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease* 78:959-962.
- Pastor-Corrales, M.A., P.A. Arraes Pereira, Lewers, K., R. Vianello Brondani, G. Cortopassi Buso, M.A. Ferreira, and W. Santos Martins, 2008.** Identification of SSR markers linked to rust resistance in Andean common bean PI 260418. *BIC* 51:46-47.
- Pedraza, F., G. Gallego, S. Beebe, and J. Tohme, 1997.** Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis comun (CBB). P. 130-134. En Singh, S.P., y O. Voysest (eds.). Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para America Latina. 559 pp., CIAT, Cali, Colombia.
- Pedrosa, A., C.E. Vallejos, A. Bachmair, and D. Schweizer, 2003.** Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor. Appl. Genet.* 106:205-212.
- Petzoldt, R., and M. Dickson, 1996.** Straw test for resistance to white mold in beans. *Ann. Rep. of Bean Improvement Cooperativ*, 39:142-143.
- Queiroz, V.T., C.S. Souza, M.R. Costa, D.A. Sanglad, K.M.A. Arruda, T.L.P.O. Souza, V.A. Ragagnin, E.G. Barros and M.A. Moreira, 2004a.** Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 47:249-250.
- Queiroz, V.T., C.S. Souza, M.R. Costa, D.A. Sanglad, V.A. Ragagnin, E.G. Barros and M.A. Moreira, 2004b.** SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 47:271-272.
- Rodríguez-Suárez, C., J.J. Ferreira, A. Campa, A. Paceda and R. Giraldes, 2008.** Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. *Theor. Appl. Genet.* 116:807-814.
- Roemer, T. 1932.** über die Reichweite des Pollens bei Roggen. *Z. Roy. Hort. Soc.* 40:450-472.
- Romero-Andreas, J., B.S. Yandell and F.A. Bliss, 1986.** Bean arcelin. 1. Inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effect on seed composition. *Theor. Appl. Genet.* 72:123-128.
- Sax, K., 1923.** The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-560.
- Singh, S.P., J.A. Guitiérrez, A. Molina, C. Urrea and P. Gepts, 1991a.** Genetic diversity in cultivated common bean. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci.* 31:23-29.
- Singh, S.P., R. Nodari and P. Gepts, 1991b.** Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Sci.* 31:19-23.
- Singh, S.P., C. Cardona, F.J. Morales, M.A. Pastor-Corales, and O. Voysest, 1998.** Gamete selection for upright Carioca bean with resistance to five diseases and a leafhopper. *Crop Sci.*, 38:666-672.
- Singh, S.P., F.J. Morales, P.N. Miklas and H. Ter6n, 2000.** Selection for bean golden mosaic resistance in intra- and inter-racial bean populations. *Crop Sci.* 40:1565-1572.
- Staveland, J.R. 1983.** A rapid technique for inoculation of *Phaseolus vulgaris* with multiple

- pathotypes. *Phytopathology* 73(5): 676-679.
- Stavely, J.R. 1984a.** Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* line resistance to most races of the pathogen. *Phytopathology* 74(3): 339-344.
- Stavely, J.R. 1984b.** Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. *Plant Diseases* 68(2): 95-99.
- Stavely, J.R. 1990.** Genetics of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. *Phytopathology* 80:1056 (abstract).
- Stavely, J.R., and R.T. McMillan, Jr., 1992.** BARC-rust resistant bush market green bean germplasm lines. *HortScience* 27:1052-1054.
- Stavely, J.R., and M.A. Pastor-Corrales, 1989.** Rust, p. 159-194. In: H.F. Schwartz and M.A. Pastor-Corrales (Eds), *Bean Production Problems in the Tropics*. Ctr. Intl. Agr. Trop. Cali, Colombia.
- Steadman, J.R., M.A. Pastor-Corrales, and J.S. Beaver, 2002.** An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common blight international workshop, March 4-8, 2002, Pietermaritzburg, Sout Africa. Bean rust races in North Dakota. *Ann. Report of the Bean Improvement Cooperative*, 45:120-124.
- Tar'an, B., T.E. Michaels, and K.P. Pauls, 1998.** Stability of the association of molecular markers with common bacterial blight resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding*, 117:553-558.
- Tar'an, B., T.E. Michaels, and K.P. Pauls, 2002.** Genetic mapping of agronomic traits in common bean. *Crop Sci.*, 42:544-556.
- Taylor, J.D., D.M. Teverson, and J.H.C. Davis, 1996.** Sources of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* races in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Pathology* 45:479-485.
- Tsai, S.M., R.O. Nodari, D.H. Moon, L.E.A. Camargo, R. Vencovsky, and P. Gepts, 1998.** QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 204:135-145.
- Valladares-Sanches N.E., D.P. Coyne, and R.F. Munn, 1983.** Inheritance and associations of leaf, external, and internal pod reactions to common blight bacterium in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108: 272-278
- Vallejo, V. and J.D. Kelly. 2001.** Development of a SCAR marker linked to *Co-5* gene in common bean. *Annu. Rpt. Improv. Coop.* 44: 121-122.
- Vallejo, V. and J.D. Kelly. 2002.** The use of AFLP analysis to tag the *Co-1²* gene conditioning resistance to bean anthracnose. *Plant Animal Genome Conference 2002*, San Diego, CA.
- Walker, J.C., and P.N. Patel, 1964.** Inheritance of resistance to halo blight of bean. *Phytopathology* 54:952-954.
- Weber, W.E. and G. Wricke. 1994.** *Advances in Plant Breeding*. Supplement 16 to "Plant Breeding", 105 pp.
- Webster, D.M., J.D. Atkin, and J.E. Cross, 1983.** Bacterial blight of snap beans and their control. *Plant Disease*, 67: 935-940
- Webster, D.M., and P.M. Ainsworth, 1988.** Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap beans to *Uromyces appendiculatus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113:938-940.
- Young, R.A. and J.D. Kelly. 1996.** RAPD marker flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:37-41.
- Young, R.A., M. Melotto, R.O. Nodary, and J.D. Kelly. 1998.** Marker assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G 2333. *Theor. Appl. Genet.* 96:87-94.
- Yu, K., S.J. Park and V. Poysa. 2000.** Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficiency and economics. *Plant Breed.* 119:411-416.