DISSERTAÇÃO

MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO.

RENATA MORO BARONI

Campinas, SP
2010

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO

RENATA MORO BARONI

Orientadora: Dra. Luciana Benchimol Rubiano

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP
Abril 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

B266m Baroni, Renata Moro
Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro / Renata Moro Baroni. Campinas, 2010. 79 fls.

Orientadora: Luciana Benchimol Rubiano
Dissertação (Mestrado em Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia)– Instituto Agronômico

1. Feijoeiro 2. Antracnose 3. Mapeamento genético – feijoeiro
4. Microssatélites I. Rubiano, Luciana Benchimol II. Título

CDD. 635.65

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro**

Aluna: **Renata Moro Baroni**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **12185/08**

Orientadora: **Dra. Luciana Benchimol Rubiano**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Luciana Benchimol Rubiano - IAC

Dr. José Baldin Pinheiro - ESALQ/USP

Dra. Luciana Aparecida Carlini Garcia - IAC

Campinas, 23 de abril de 2010

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agronômico

Luiz, Silvia e Luiz Rafael,

DEDICO

Aos meus amigos, pelo apoio, compreensão e carinho,

que foram indispensáveis,

OFEREÇO

AGRADECIMENTO

- A pesquisadora e orientadora Dra. Luciana Benchimol Rubiano, pela oportunidade, conhecimentos a mim passados e paciência.

- Aos pesquisadores Dr. Sérgio A. M. Carbonell e Dr. Alisson F. Chioratto, melhoristas do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto Agronômico, pelo auxílio prestado.

- Ao Dr. Antonio Augusto Franco Garcia pela enorme ajuda no entendimento das análises de mapeamento e identificação dos QTLs.

- A Dra. Margarida Fumiko Ito, fitopatologista do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossaniedade do Instituto Agronômico, pela ajuda prestada.

- Agradeço à FAPESP pela concessão de bolsa de estudo.

- As companheiras de laboratório, Juliana M. K. Cardoso, Gliciane M. B. Silva e Paula R. Oblessuc, pela ajuda, paciência e conversas.

- Aos colegas e funcionários da Pós Graduação do Instituto Agronômico.

- A toda minha família, pela compreensão.

- Ao meu namorado e companheiro Julio Cesar Araujo da Silva, pelos finais de semanas sacrificados, palavras de carinho e sabedoria.

SUMÁRIO

SUMÁRIO iii
ÍNDICE DE TABELAS iv
ÍNDICE DE FIGURAS v
ÍNDICE DE ANEXOS viii
RESUMO ix
ABSTRACT xi
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. A cultura do Feijoeiro 4
2.2. Marcadores Moleculares 6
2.2.1. Marcadores Microssatélites (SSRs) 7
2.3. População de Mapeamento 10
2.4. Construção de Mapas Genéticos 12
2.5. Identificação de QTL 16
2.6. Mapeamento com Marcadores Moleculares em Feijão 18
2.7. Antracnose e Fontes de Resistência 19
2.8. Mapa Genético 'IAC-UNA' x 'CAL-143' (UC) 24
3 MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1. População de Mapeamento 'IAC-UNA' x 'CAL-143' (UC) 29
3.2. Extração e Quantificação de DNA 30
3.3. Caracterização dos Microssatélites 30
3.4. Inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus e Avaliação de Patogenicidade 31
3.5. Construção e saturação do Mapa Genético UC 32
3.6. Mapeamento de QTL de Resistência à Antracnose 33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1. Extração e Quantificação de DNA 34
4.2. Caracterização de microssatélites e genotipagem da população de mapeamento 34
4.3. Saturação do Mapa UC 37
4.4. Fenotipagem da população de mapeamento 47
4.5. Loco de resistência à Antracnose 49
5 CONCLUSÕES 63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64
7 ANEXOS 77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Lista dos doze cultivares diferenciadores para a identificação da raça fisiológica para *C. lindemunthianum* com os respectivos valores binários e dois exemplos de isolados (Beraldo, 2007).	20
Tabela 2.	Genes de resistência a antracnose com suas fontes de resistência, com os respectivos *pool* gênico e grupo de ligação no *Core Map* (BIC, 2009; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009).	23
Tabela 3.	Distribuição dos SSRs, mapeados nos 11 grupos de ligação de feijão comum e comparação do mapa genético 'IAC-UNA' / 'CAL 143' (UC). Mapa UC (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) e Mapa UC Saturado.	39
Tabela 4.	Média aritmética da distância entre *loci*, comparando com o Mapa UC (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) e após a saturação, com os 46 marcadores microssatélites.	40
Tabela 5.	Descrição dos QTL para resistência à antracnose, encontrados via análise de Mapeamento por Intervalo Composto (CIM), utilizando o mapa genético UC saturado. Os QTL identificados foram nomeados de ATR1 à ATR23. Foram descritos o intervalo no mapa e a posição do pico dos gráficos de cada QTL (cM), em seus respectivos grupos de ligação. O LODscore de cada pico, efeitos aditivos e efeitos na variância fenotípica (R^2) de cada QTL também foram apresentados. Em negrito, estão os QTL com LODsore maior que 3,0.	59
Tabela 6.	Descrição dos QTL para resistência à antracnose separados por raça (04, 38, 55, 2041) e seus respectivos grupos de ligação (GL). (*) QTL com LODsore maior que 3,0.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas da doença causando pelo fungo *C. lindemuthianum* em feijão. A esquerda sintomas em uma folha e a direita vagem com sintomas. 21

Figura 2A. Mapa genético UC para feijão comum com os grupos de ligação B1, B2, B3, B4 e B5, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante 'IAC-UNA' x 'CAL 143'. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino ('CAL 143'). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano ('IAC-UNA'). Nível de significância de 5% (OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010). 26

Figura 2B. Mapa genético UC para feijão comum com os grupos de ligação B6, B7, B8a, B8b, B9, B10 e B11, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante 'IAC-UNA' x 'CAL 143'. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino ('CAL 143'). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano ('IAC-UNA'). Nível de significância de 5% (OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010). 27

Figura 3. Quantificação de DNA em gel de agarose 1%. As primeiras 10 amostras correspondem ao marcador Lambda de 25 ng a 250 ng. DNA de amostras de feijão, sendo uma amostra a cada dois poços. O primeiro poço de cada amostra contém a metade da concentração original e o segundo, a concentração original. Os números abaixo correspondem a cada linhagem da população UC. 33

Figura 4. Caracterização dos SSR em gel de agarose 3%, PCR realizada em gradiente nas temperaturas de 56°C à 45 °C. Para cada microssatélites os DNAs amplificados do 'CAL 143', 'IAC-UNA' e F_1 respectivamente foram visualizados. 35

Figura 5. Genotipagem das 380 linhagens da população de mapeamento UC, com o microssatélite ATA3. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata com 8 aplicações. Cada linha contém 48 amostras além do DNA de um genitor por vez. "A" referente ao genitor 'CAL 143' e "B" ao genitor 'IAC-UNA'. 35

Figura 6A. Mapa genético UC com os novos SSRs. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. Os novos microssatélites estão destacados com uma caixa. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino ('CAL 143') estão em vermelho. (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano ('IAC-UNA') estão em azul. Nível de significância conjunto de 5%. Grupos de ligação B1, B2, B3, B4, B5 e B6. 37

Figura 6B. Mapa genético UC com os novos SSRs. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. Os novos microssatélites estão destacados com uma caixa. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’) estão em vermelho. (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’) estão em azul. Nível de significância conjunta de 5%. Grupos de ligação B7, B8a, B8b, B9, B10 e B11. 38

Figura 7A. Comparação do Mapa genético ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ Saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível conjunto de significância de 5%. 43

Figura 7B. Comparação do Mapa genético ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ Saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível conjunto de significância de 5%. 44

Figura 7C. Comparação do Mapa genético ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ Saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível conjunto de significância de 5%. 45

Figura 8. Padronização da escala de notas do CIAT para uniformizar as notas de avaliação da população de mapeamento UC. Círculos mostram as áreas com sintomas de antracnose. 47

Figura 9. Curvas de normalização dos dados fenotípicos de resistência/susceptibilidade à antracnose, das linhagens recombinantes da população segregante ‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’ (UC). Raça 04 ($\lambda = 0$), raça 38 ($\lambda = -1$), raça 55 ($\lambda = - 0,5$) e raça 2041($\lambda = -1$). 48

Figura 10. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 04 no mapa UC. Traço em vermelho LODscore indicativo 3,0; em azul LODscore sugestivo 2,0. 50

Figura 11. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM

para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 38 no mapa UC. 53

Figura 12. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 55 no mapa UC. 54

Figura 13. Grupo de ligação B7 do mapa genético UC, em evidencia (caixa vermelha) os dois blocos de resistência. Lado direito os QTL mapeados, em verde raça 04, preto raça 38 e rosa raça 55. 56

Figura 14. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 55 no mapa UC. 57

Figura 15A. Mapa genético UC saturado, SSRs integrados estão destacados em caixa, mostrando a localização dos vinte e três QTL (ATR1 a ATR23) encontrados para resistência à antracnose. Os QTL em verde são derivados da raça 04. Os QTL em preto são derivados da raça 38. Os QTL em rosa são derivados da raça 38. Os QTL em vermelho referentes a raça 2041. 61

Figura 15B. Mapa genético UC saturado, SSRs integrados estão destacados em caixa, mostrando a localização dos vinte e três QTL (ATR1 a ATR23) encontrados para resistência à antracnose. Os QTL em verde são derivados da raça 04. Os QTL em preto são derivados da raça 38. Os QTL em rosa são derivados da raça 38. Os QTL em vermelho referentes a raça 2041. 62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema de obtenção da população de mapeamento segregante ‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’. 77

Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é de grande importância sócio-econômica. Por isso, busca-se agregar características de resistência às doenças e produtividade. A antracnose é umas das mais importantes doenças do feijoeiro, causando grandes perdas na produção em todo o mundo, principalmente no Brasil, devido a sua ocorrência nas três épocas de cultivo. Neste contexto, o presente projeto teve por objetivo saturar o mapa genético 'IAC-UNA' / 'CAL 143' (UC) e mapear locos de resistência à antracnose. O mapa genético UC foi primeiramente construído final de 2008 com 198 microssatélites ligados usando LOD mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,40. Com esse trabalho, 46 novos microssatélites foram integrados ao mapa UC que agora tem um total de 244 SSR. O comprimento total de mapa passou de 1864,2cM para 2098,4cM distribuídos em onze grupos de ligação. Entretanto, a distância entre os marcadores diminuiu de 9,4cM para 8,6cM. A fenotipagem foi feita usando dados das raças 04, 38, 55 e 2041 do fungo causador da antracnose, *C. lindemuthianum* Sacc & Magnus. A avaliação da severidade foi efetuada entre 7 a 10 dias após a inoculação, pela escala de notas do CIAT (Cali, Colômbia). A análise de mapeamento foi feita pelo método de Mapeamento por Intervalo Composto (CIM). Ao todo, vinte e três locos ligados à resistência à antracnose foram identificados. Para a raça 04, foram localizados sete QTL sendo, um em cada um dos grupos de ligação (GL) B1, B2, B4, dois no B7, um no B8a e um no B9. Quatro QTL foram identificados para a raça 38, distribuídos nos grupos B2, B7 (dois) e B9. Nos GL B1, B2, B3, B5, B6 e B7 (dois) foram identificados sete QTL para a raça 55. Para a raça 2041, cinco QTL foram posicionados nos grupos B1 (dois), B5, B6 e B9. Os resultados obtidos neste trabalho apontam para o controle de vários genes na resistência à antracnose, revelando QTL de menor efeito, porém fortemente envolvidos na expressão do fenótipo de resistência. Estudos de identificação de genes de resistência são muito importantes no melhoramento de plantas, especialmente para o feijão comum, onde a doença contribui para grandes perdas de produtividade. Tendo sido identificação de marcadores microssatélites ligados a locos de resistência à antracnose, essas informações poderão ser usadas no programa

de melhoramento do feijoeiro na seleção de genótipos elites e na introgressão de resistência em cultivares de alta produtividade.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., microssatélites, mapeamento genético, *Colletotrichum lindemuthianum* e QTL.

Mapping of anthracnose resistance genes in common beans

ABSTRACT

Common bean has a great socio-economic interest. Therefore, researchers try to aggregate disease resistance traits and productivity. Anthracnose is one of the most important common beans diseases, causing great losses in production worldwide, especially in Brazil, where it can be harvested on three seasons. The aim of this research was to saturate the 'IAC-UNA' x 'CAL 143' (UC) genetic map, and map anthracnose resistance *loci*. The UC genetic map have been developed in 2008 based on 198 microsatellites, using a minimum LODscore of 3.0 and maximum recombination fraction of 0.40. In this research 46 new microsatellites were integrated on the saturated UC map, with now based on a total of 244 SSR. The total map length increased from 1864.2 cM to 2098.4 cM, distributed in eleven linkage groups. However, the distance between markers decreased from 9.4 cM to 8.6 cM. The resistance phenotypes were evaluated with the following *C. lindemuthianum* race isolates: 04, 38, 55 and 2041. The severity scores were evaluated between 7 to 10 days after inoculation, through a note scale from CIAT (Cali, Colômbia). Mapping analysis was performed by the Composite Interval Mapping (CIM) method. Twenty three QTL for anthracnose resistance were found. For race 04, seven QTL were found, one in B1, B2 and B4 linkage group (LG), two QTL on B7, and one QTL on B8a and B9. For race 38, four QTL were identified on B2, B7 (two) and one on B9. For race 55, other seven QTL were mapped on B1, B2, B3, B5, B6 and B7 (two). For race 2041, five QTL were positioned on B1 (two), B5, B6 and B9. The results suggest that anthracnose resistance genetic control may be regulated by various genes, revealing small effect QTL, deeply involved in the phenotypic response. Gene resistance identification studies are very important in plant breeding, especially for common beans, where disease contributes for great losses in productivity and grain quality. Therefore, once anthracnose resistance *loci* are mapped, common bean breeding programs may use this information to screen their elite genotypes and introgress new sources of resistance into high yield cultivars.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., microsatellites, genetic mapping, *Colletotrichum lindemuthianum* and QTL.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma leguminosa pertencente à subfamília Papilionoideae, que inclui a maioria das leguminosas de importância econômica, inclusive o gênero *Phaseolus*. É uma excelente fonte protéica, contém grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e isoflavonas (ANDERSON et al., 1999; VIEIRA et al., 1998), além de ser uma importante fonte de ferro, fósforo, magnésio e manganês e em menor escala de zinco, e cálcio (BROUGHTON et al., 2003). Dentre as 50 espécies descritas para *Phaseolus*, cinco estão incluídas na alimentação humana. A espécie *P. vulgaris* (feijão comum) é a de maior produção, correspondendo a 75% do consumo no mundo (BROUGHTON et al., 2003).

O Brasil destaca-se como maior consumidor e produtor mundial de feijão, com um consumo 'per capita' superior a 17 kg/ano e produção de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas na safra de 2009/10 (CONAB, 2010). Toda a produção nacional é utilizada no abastecimento do mercado interno, sendo ainda necessária à importação do produto.

A produtividade nacional de feijão ainda é inferior ao seu potencial, apresentando produtividade média equivalente a 898 kg/ha em 2009/10 (CONAB, 2010). A produtividade é influenciada por vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas de redução da produção. Dentre as doenças do feijoeiro, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus é uma das mais importantes, devido a sua ocorrência nas três épocas de cultivo, causando, assim, uma redução na produção e na qualidade do grão produzido (CHIORATO et al., 2006).

Desta forma, buscam-se ferramentas para agilizar a transferência de genes de resistência à esta doença, e também a outras para cultivares de feijão, objetivando assegurar o desempenho e estabilidade em campo das cultivares e garantindo a aceitação pelos produtores (XU & CROUCH, 2008). Nesse contexto, o melhoramento genético de plantas tem sido de grande importância e o uso de marcadores moleculares vem sendo cada vez mais intenso, uma vez que com seu emprego é possível realizar análises de diversidade genética, mapear genes e realizar seleção assistida, via incorporação de marcas associadas ao gene de interesse. Trabalhos vêem sendo

publicados mostrando a eficiência deste processo (MIKLAS, 2002; KELLY et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005; MIKLAS(a) et al., 2006; NAMAYANJA et al., 2006; WANG et al., 2009).

Os marcadores microssatélites têm sido cada vez mais usados para a análise genética em feijão comum, pois a seleção de resistência baseada na presença de marcadores moleculares é rápida e confiável, já que não depende da interação do genótipo com ambiente (ARUS & MERONO-GONZÁLEZ, 1993).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares, os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* - TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989) tem se destacado por serem codominantes, de herança mendeliana e por apresentarem alto nível de polimorfismo e heterozigosidade, ou seja, é possível identificar os heterozigotos. Além disso, podem ser analisados a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA para amplificação nas reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction* - MULLIS & FALOONA, 1987). A reação de PCR é realizada a partir de oligonucleotídeos ancorados nas regiões flanqueadoras às repetições, que são altamente conservadas e únicas.

Mapas genéticos de feijão vêm sendo produzidos na expectativa de identificar o maior número possível de QTL (*Quantitative Trait Loci*) de interesse agronômico (KELLY et al., 2003; GRISI et al., 2007; RODRIGUEZ-SUAREZ et al., 2008). A construção de mapas genéticos baseia-se na análise de ligação entre locos no genoma. O ponto central desta análise é a existência de desequilíbrio de ligação entre os locos. Através das frações de recombinação é possível verificar a existência do desequilíbrio de ligação (LIU, 1998; CARNEIRO & VIEIRA, 2002). A fração de recombinação entre os locos é acessada a partir da avaliação genotípica, baseada em marcadores moleculares, dos indivíduos utilizados no estudo de mapeamento. Esses indivíduos devem ser obtidos através de cruzamento controlado entre variedades geneticamente divergentes, gerando uma população de mapeamento com alto nível de desequilíbrio de ligação.

Em feijão comum, a população de mapeamento mais utilizada é a ‘BAT 93’/’Jalo EEP558’ (BJ), composta de 75 RILs (*Recombinant Inbred Lines*). Esta população foi utilizada na obtenção do mapa consenso de feijão (*Core Map* – BIC, 2009) por FREYRE et al. (1998), em que mais de 500 marcadores moleculares foram mapeados. Trabalhos posteriores foram realizados para saturar este mapa via da

integração dos novos marcadores moleculares, dentre SSRs (YU et al., 2000; GRISI et al., 2007), RGAs (*Resistance Gene Analog Polymorphism* – MUTLU et al., 2006), ou ainda marcadores TRAPs (*Targeted Region Amplifief Polymorphism* – MIKLAS(b) et al., 2006), entre outras. O objetivo dos trabalhos de mapeamento é identificar locos de interesse agronômico, como fatores fisiológicos (KWAK et al., 2008), e principalmente de resistência a doenças (TSAI et al., 1998; MIKLAS(b) et al., 2006; MUTLU et al, 2006; BLAIR et al., 2007).

Contudo, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com diferentes populações de mapeamento, gerando diversos mapas genéticos aplicados à identificação dos mais variados QTL (MIKLAS et al., 2003; YAN et al., 2004; BLAIR(a) et al., 2006; HANAI(a) et al., 2008, TIAN et al., 2007; CHECA et al., 2008).

A resistência genética de plantas cultivadas vem sendo cada vez mais procurada, uma vez que é a mais apropriada, segura e eficiente estratégia de controle de doenças disponível para pequenos e grandes agricultores (NAMAYANJA et al., 2006). A seleção de resistência baseada na presença de marcadores moleculares é rápida e confiável, já que não depende da interação dos genótipos com o ambiente (ARUS & MERONO-GONZÁLEZ, 1993).

Isso faz do uso da estratégia de seleção assistida por marcadores (SAM) para a piramidação de genes de resistência uma importante ferramenta para o melhorista (NAMAYANJA et al., 2006; BALBI et al., 2006; MIKLAS(a) et al., 2006). Além disso, o estudo de genes de resistência via marcadores moleculares também possibilita maior entendimento da relação entre patógeno-hospedeiro, acrescentando conhecimentos na busca por novas formas de resistência.

Deste modo, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto Agronômico de Campinas (PMF–IAC) tem investido na busca e no desenvolvimento de ferramentas robustas que possam assessorar programas de seleção assistida para a transferência de genes de resistência em cultivares de interesse econômico desde 2002. Foi desenvolvida uma população contrastante, resultante do cruzamento da variedade ‘IAC-UNA' (Mesoamericana) resistente a antracnose, suscetível a mancha-angular e da linhagem ‘CAL 143’(Andina), suscetível a antracnose e resistente a mancha-angular. Possui contrastante para outros fatores bióticos e abióticos tais como, hábito de crescimento, produção de grãos, resistência à ferrugem. As características divergentes entre os genitores possibilitam o mapeamento de QTL das mesmas.

O mapa UC desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (CAMPOS, 2009; OBLESSUC, 2009; CAMPOS et al., 2010) apresenta o maior número de SSRs mapeados até o momento, dentre os mapas genéticos publicados em literatura para a cultura do feijoeiro. O mapeamento das características qualitativas (cor de flor, hábito de crescimento e formato do ápice da vagem) e de resistência a mancha angular foi efetuado. Paralelamente, foi possível propor um novo modelo de herança para uma das características qualitativas (CAMPOS et al., 2010). No entanto, o mapa 'IAC-UNA' x 'CAL 143' UC apresenta *gaps* nos grupos de ligação B1, B2, B4 e B9, e o grupo B8 foi dividido em B8a e B8b. Para que o mapa UC se torne ainda mais informativo e robusto, é necessário integrar um maior numero de marcadores moleculares aos grupos de ligação, empreendendo a saturação do mapa genético, uma vez que a população é grande o suficiente para permitir a detecção de segregantes.

O presente estudo visou contribuir com a saturação do mapa genético UC com a incorporação de novos SSRs e a mapear locos de resistência à antracnose. A localização de marcadores ligados a genes de resistência à antracnose torna mais fácil a realização de programas de seleção assistida por marcadores, ou ainda estudos de mapeamento fino e/ou clonagem posicional. O aprofundamento no entendimento dos mecanismos de resistência do feijoeiro leva a uma maior compreensão da interação patógeno-hospedeiro e dos tipos de interação entre os genes envolvidos neste processo de resposta à infecção pelo agente causal da antracnose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do Feijoeiro

As leguminosas são a terceira maior família de plantas com aproximadamente 643 gêneros. Depois dos cereais, as leguminosas incluem as mais importantes espécies de interesse agrícola, considerando área cultivada e total de produção (GEPTS et al., 2005). O gênero *Phaseolus* originou-se das Américas, sendo que possui 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK, 1993). Dentre

estas, o feijão-comum, *Phaseolus vulgaris* L., é a mais importante, pois é a espécie que ocupa a maior área cultivada e também a mais utilizada em todo mundo.

Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas foi estabelecida a hipótese de três centros de origem para o feijão: 1) o primeiro no México e na América Central (Mesoamericano), 2) o segundo na região Andina, e 3) e o terceiro, de menor importância, na Colômbia (GEPTS et al. 1986; KOENIG, SINGH & GEPTS 1990; GEPTS & BLISS 1985; SPRECHER 1988; KOENIG & GEPTS 1989). Para a determinação destes centros de origem, os autores se basearam em características como o tipo de faseolina, principal proteína de reserva de feijões selvagens e cultivados e também no tamanho das sementes.

Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (GEPTS & DEBOUCK, 1991; SINGH, 2001).

Os grãos de feijão se destacam como importante fonte protéica na dieta humana desde a antiguidade, com registros de seu cultivo no Antigo Egito e na Grécia. É reconhecidamente uma excelente fonte protéica, contém grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e isoflavonas (ANDERSON et al., 1999; VIEIRA et al., 1998), além de ser uma importante fonte de ferro, fósforo, magnésio e manganês e em menor escala de zinco, e cálcio (BROUGHTON et al., 2003).

O Brasil é o maior produtor mundial, porém, a produtividade nacional de feijão ainda é inferior ao seu potencial, com produtividade média de 898 kg/ha na safra de 2009/10 (CONAB, 2010).

O cultivo dessa leguminosa tem se difundido muito em todo o território nacional, tanto no sistema de monocultura, como consorciado com outras espécies cultivadas. É reconhecida como cultura de subsistência em pequenas propriedades. Muito embora tenha havido, nos últimos 20 anos, crescente interesse de produtores de outras classes, com o uso de tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada. Dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas (safra das águas – setembro a novembro, safra seca ou “safrinha” – janeiro a março, safra inverno – maio a julho), de tal forma que sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, contribuindo para o abastecimento interno.

Essa baixa produtividade ocorre devido a vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas. A cultura do feijoeiro é assolada por mais de 45 diferentes doenças que podem correr no Brasil (BORÉM,

1998), sendo a antracnose, ferrugem, mosaico comum e crestamento bacteriano comum, algumas das doenças de maior importância na cultura. Devido à grande importância sócio-econômica da cultura do feijão, busca-se agregar características de resistência a doenças e produtividade. Para tanto, o melhoramento genético de plantas tem se mostrado uma importante ferramenta.

Neste contexto, o uso de marcadores moleculares vem sendo cada vez mais empregado. Com seu uso é possível mapear genes e realizar seleção assistida por marcadores, incorporando-se aos genótipos superiores marcas associadas ao gene de interesse. Muitos trabalhos vêm sendo publicados mostrando a eficiência deste processo (MIKLAS, 2002; KELLY et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005; MIKLAS et al., 2006; NAMAYANJA et al., 2006; WANG et al., 2009).

2.2. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares traduzem as diferenças na seqüência de DNA ao longo do genoma de uma determinada espécie. Estas variações são chamadas de polimorfismos, sendo originadas por rearranjos cromossômicos, como inserções, duplicações, deleções, mutações, entre outros. O polimorfismo dos marcadores moleculares pode ser herdado de forma Mendeliana e ser acompanhado através das gerações (GRIFFITHS et al., 2006). Existem muitos tipos de marcadores moleculares, que variam de acordo com a técnica de detecção do polimorfismo.

A escolha do tipo de marcador molecular também é de grande importância na produção de um mapa genético, uma vez que influencia no método de genotipagem da população segregante a ser adotado e, principalmente, no tipo de informação gerada no final, ao se fazer o mapa. Vários marcadores podem ser utilizados na construção do mapa, considerando-se alguns aspectos: número de locos que podem ser detectados, grau de polimorfismo, características de dominância e cobertura do genoma. Portanto, é importante conhecer as características de cada tipo de marcador que originará o mapa genético (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

É vantajoso o uso da informação obtida com os marcadores moleculares de natureza espécie – específicos e codominantes, uma vez que os dois alelos do indivíduo podem ser visualizados ao mesmo tempo. Diferentemente, os marcadores não específicos e dominantes não revelam essa informação (SOUZA, et al., 2001).

Os marcadores moleculares podem ser ordenados no genoma de tal forma que promovam uma boa representação do mesmo, possibilitando a identificação de genes de interesse, tanto de herança qualitativa como quantitativa (QTL – *Quantitative Trait Loci*), e sua utilização no melhoramento de plantas (SOUZA, et al., 2001).

2.2.1. Marcadores Microssatélites (SSRs)

Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat* - TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989) são combinações de 1 a 6 bases repetidas em *tandem*. Sua variação ocorre devido aos diferentes números de repetições e ao tipo dos motivos que o compõem. A técnica é baseada na amplificação das seqüências repetidas, utilizando-se oligonucleotídeos ancorados nas regiões flanqueadoras às repetições, que são altamente conservadas (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Os SSRs são classificados de acordo com o tipo de repetição, que pode ser:

- Perfeitos – motivos não interrompidos, ex: $(AT)_{10}$;
- Imperfeitos – apresentam bases não pertencentes ao motivo, ex: $(TA)_6CG(TA)_8$;
- Compostos – contém dois motivos adjacentes, ex: $(AT)_7(GT)_{13}$.

A grande variabilidade observada origina-se de mecanismos naturais de mutação como erros durante a meiose, *crossing-over* desigual, ou deslizamento da DNA-polimerase durante a replicação do DNA (OLIVEIRA et al., 2006). Estes eventos podem resultar em variação do número de cópias da unidade básica de repetição (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992). O polimorfismo é detectado quando existe diferença no tamanho do produto amplificado.

Estudos comparativos entre regiões codantes e não-codantes em diferentes espécies de plantas mostram que repetições de tri e hexa-nucleotídios são mais comuns em íntrons, sendo os demais tipos encontrados em éxons (TÓTH et al., 2000). METZGAR et al. (2000) e MORGANTE et al. (2002) mostraram haver uma pressão seletiva atuando sob as regiões 3´ e 5´ não traduzidas (UTR – *Untranslated Regions*) dos genes, favorecendo a maior freqüência de SSRs nessas regiões que em todo o resto do genoma, sendo que a região 5´UTR apresenta maior número de repetições do tipo CT e CTT, e a região 3´UTR mostra-se rica em AG e AAG. Há, ainda, fortes evidências de que os microssatélites podem ser encontrados nas regiões promotoras e reguladoras

de genes, exercendo importante papel na regulação da expressão de vários genes (O´DONNELL et al., 1994).

Este tipo de marcador apresenta como vantagem a codominância, alto nível de polimorfismo e de heterozigosidade, e tem padrão de herança Mendeliana. Além disso, podem ser analisados a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA. Há diferentes metodologias para a genotipagem dos indivíduos, podendo dispensar o uso de radioatividade, utilizando uma tecnologia de baixo custo baseada na amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR - *Polimerase Chain Reaction* - MULLIS & FALOONA, 1987) e análise em gel de poliacrilamida corado com prata, ou em seqüenciador via técnica de PCR-marcado com fluorescência (OETTING et al., 1995; SCHUELKE, 2000).

As principais técnicas para a resolução de microssatélites são: coloração com nitrato de prata e marcação de *primers* fluorescentes. O sistema fluorescente permite a precisa detecção dos alelos através de um sistema automatizado, um aspecto particular muito importante em análises de populações, uma vez que evita erros de genotipagem (SCHWENGEL et al., 1994; BONIN et al., 2004; HOFFMAN & AMOS, 2005). Neste método, um dos *primers* usados na amplificação tem a extremidade 5’ marcada com fluorocromo.

Os resultados da análise por fluorescência são mais robustos em comparação com os obtidos com a coloração com prata, uma vez que a leitura é automatizada, e, além disso, há um aumento na velocidade e na qualidade dos dados gerados (MISSIAGGIA & GRATTAPAGLIA, 2006).

Entretanto, o custo da síntese de *primers* fluorescentes é um fator limitante em muitos laboratórios, pois o *primer* marcado custa de 5 a 10 vezes mais em relação a um *primer* não marcado. Na tentativa de reduzir os custos da análise por fluorescência, Oetting *et al*. (1995) propuseram a estratégia via PCR de *multiplex* com 3 componentes: 1) *primers forward* possuindo uma extensão de 18 pb na extremidade 5’ com a seqüência de um *primer* M13, 2) *primer reverse* sem modificações, e 3) *primer* M13 marcado com fluorescência.

Os *primers* extendidos com a cauda M13 contém a seqüência complementar do *primer* M13 marcado, gerando produtos fluorescentes que podem ser detectados em um seqüenciador automático. A grande vantagem consiste em sintetizar apenas um *primer*

M13 fluorescente universal, enquanto que pelo método convencional para cada microssatélite a ser analisado seria necessário sintetizar um *primer* marcado específico.

O *primer* universal mais usado até hoje é o M13, derivado do bacteriófago M13, um importante vetor já há muito tempo usado no seqüenciamento de DNA (DAVID et al., 1993). Na genotipagem por fluorescência, ele é muito usado por caracterizar uma seqüência muito diferente de seqüências de plantas, o que garante que ele irá anelar, durante a PCR, apenas com a seqüência de interesse (INAZUKA et al., 1996; KRISHNA et al., 2004).

Por isso, outros pesquisadores optaram por seqüências diferentes do M13, como foi o caso de MINAMIYAMA et al. (2006). Estes autores tinham maior facilidade na obtenção de seqüências humanas, uma vez que seu laboratório tem parceria com laboratório de estudos humanos. Em seu trabalho de genotipagem com microssatélites em *Eucalypitus*, foram escolhidos como *primers* universais três seqüências de 20pb do genoma humano, sem complementaridade significativa com seqüências de plantas. A escolha por três *primers* diferentes foi devido ao interesse de realizar a genotipagem via *multiplex*, marcando cada *primers* universal com fluoróforos de cores diferentes, permitindo a diferenciação de três SSRs em uma mesma leitura em seqüenciador de DNA.

No estudo do feijão, o uso de PCR-marcado com fluorescência foi primeiramente usado por MASI et al. (2003), que genotiparam 264 indivíduos coletados de três diferentes regiões da Itália, com 30 marcadores SSR selecionados a partir de seqüências do *GeneBank*. A técnica usada foi um pouco diferente uma vez que todos os *primers* diretos eram marcados com fluorescência (IRD 700 ou 800), não havendo o *primer* universal. O objetivo do artigo, foi mostrar a eficiência do uso de PCR *multiplex* acompanhada de automatização da análise em gel de acrilamida 6% em seqüenciador de gel (377). Segundo MASI et al. (2003), o uso de SSRs no estudo de espécies com pouca informação genômica, como é o caso do feijão, têm grandes vantagens, uma vez que este é um marcador de alto poder discriminatório, por ser multi-alélico e codominante. Sua grande abundância ao longo do genoma, pouca quantidade de DNA necessário à PCR, e sua possível detecção por via automatizada, são outras importantes vantagens dos SSRs. Os autores também consideram que o único problema dos SSRs é o tempo e a mão de obra necessária para geração dos dados por via convencional (gel de acrilamida e coloração por nitrato de prata) que são excessivos. Assim, a amplificação

de mais de um SSR em uma única PCR (*multiplex*) e automatização da análise dos dados via seqüenciador, tornam o seu uso muito mais eficiente e barato.

Os microssatélites têm sido cada vez mais usados em feijão comum, com os mais variados objetivos, como: análises de efeitos de seleção natural (RODRIGUES & SANTOS, 2006) e conhecimento da variabilidade genotípica (BLAIR (a) et al., 2006; BUSO et al., 2006). Um importante uso dos SSRs é no processo de incorporar caracteres de interesse agronômico através da seleção assistida. Essa técnica tem sido utilizada na obtenção de genótipos resistentes a doenças (CORRÊA et al., 2001; SILVA et al., 2005; ALZATE-MARIN et al., 2005; BLAIR (b) et al., 2006; MIKLAS et al., 2006). Assim, muitos mapas genéticos para feijão continuam sendo produzidos, na expectativa de identificar o maior número possível de QTL de interesse agronômico.

2.3. População de Mapeamento

A escolha da população de mapeamento deve ser estudada com cautela, uma vez que deve se considerar o tempo para geração de progênie, sistema reprodutivo da espécie (alógama, autógama), objetivo do estudo, disponibilidade de variabilidade genética, entre outros. Abaixo estão relacionados os principais tipos de populações usadas em mapeamento:

- Populações F_2: São produzidas por autofecundação de plantas F_1, originadas do cruzamento entre dois genótipos homozigotos contrastantes para as características de interesse. Apresenta como característica a informações dos três genótipos possíveis se considerado apenas um loco (AA, Aa e aa), aumentando a precisão das estimativas. Além disso, é possível identificar as interações gênicas do tipo dominante e aditiva. Uma vantagem interessante é sua rápida obtenção, uma vez que apenas dois ciclos reprodutivos são necessários para gerá-la. No entanto, há uma perda de precisão na mensuração de características quantitativas, uma vez que não é possível a multiplicação de indivíduos da população. Essa desvantagem é contornada por meio da propagação vegetativa, ou com a utilização de população $F_{2:n}$, geralmente $F_{2:3}$. Os genótipos das plantas são determinados na geração F_2, enquanto as características fenotípicas são avaliadas em plantas F_3 (LIU, 1998).

- Populações de Retrocruzamento (RC): São obtidas a partir do cruzamento de plantas F_1 com um dos genitores (recorrente). A vantagem dessa população é por ser um método usualmente utilizado em programas de melhoramento de plantas convencional. Sendo assim, a população obtida não precisa ser específica para o mapeamento. Como apenas dois genótipos são obtidos, heretozigotos (Aa) e homozigotos para o genitor recorrente (AA ou aa), não é possível estimar independentemente os componentes genéticos ligados aos efeitos aditivos e desvios de dominância (SCHUSTER & CRUZ, 2008).

- Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs): Geradas a partir de sucessivas autofecundações (F_2, F_3, F_4,..., até F_n) de uma planta F_1, formando uma população muito endogâmica. Toda a variabilidade presente em F_2 será representada por linhas endogâmicas. Esse tipo de população permite a produção de grande número de sementes geneticamente iguais, com a vantagem de permitir estudos futuros. Sendo assim, é possível avaliar interação genótipo x ambiente realizando repetições dos experimentos. Permite, ainda, o estudo de diferentes características em uma mesma população. No entanto, essa população permite identificar apenas dois genótipos (AA e aa), impedindo a identificação de relações de dominância entre os genes (LYNCH & WALSH, 1998).

- População de *pseudo-testcross*: Originadas do cruzamento controlado entre dois indivíduos altamente heterozigotos, produzindo uma população F_1 com diferentes genótipos, essa população de mapeamento é usada para espécies alógamas que sofrem alta depressão por endogamia. A segregação dos alelos em F_1 não é conhecida, podendo ser de 1:1, 1:2:1, 1:1:1:1, entre outros, dependendo do genótipo dos genitores. Devido a isso, existe a necessidade de usar algoritmos específicos na produção do mapa genético com esse tipo de população. Resultando em dois mapas um para cada parental, assim a interpretação dos resultados torna-se mais difícil. Esse problema pode ser resolvido com o uso de mapa de ligação integrados. (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994; LIU, 1998; WU, et al., 2002; MARGARIDO, et al., 2007).

2.4. Construção de Mapas Genéticos

O conhecimento de diversas áreas da genética como o da genética Mendeliana, citogenética, genética molecular, genética quantitativa e genética de populações, é necessário em estudos de mapeamento genético (SCHUSTER & CRUZ, 2008).

O entendimento do funcionamento de genomas, com o profundo conhecimento dos genes que os compõe e as mais diversas interações entre eles, são o grande desafio deste século (FLINT-GARCIA, 2003). Os estudos direcionados ao entendimento de como genes e alelos controlam características fenotípicas complexas (QTL) têm sido de grande importância nesta busca. Uma ferramenta bastante usada, nesse contexto, é a obtenção de mapas genéticos.

A construção e saturação de mapas genéticos baseiam-se na análise de ligação entre marcas no genoma. O ponto central desta análise é a existência de desequilíbrio de ligação entre essas marcas. O desequilíbrio de ligação é decorrente do processo de recombinação homóloga que ocorre entre cromátides irmãs durante a meiose, em geral de forma randômica ao longo dos cromossomos (LIU, 1998; CARNEIRO & VIEIRA, 2002). O desequilíbrio de ligação é determinado pela fração de recombinação ‘ ’ entre as marcas, que é a razão entre as quantidades de gametas recombinantes e o total de gametas. Assim, se ‘ ’ for menor que 0,5, quer dizer que as marcas estão em desequilíbrio. Desta forma, podemos inferir que as marcas analisadas estão ligadas. É desta relação entre ‘ ’ e ligação física que surgem os mapas genéticos (LIU, 1998).

Para a construção e saturação do mapa genético é necessário ter uma interação entre as estimativas estatísticas com os dados biológicos. Para isso, os dados de genotipagem da população de mapeamento são analisados via a testes estatísticos por programas desenvolvidos para este fim. Há muitos programas computacionais disponíveis para construção de mapas genéticos: Mapmaker/Exp (LANDER, et al., 1987; LINCOLN et al., 1992), Crimap (GREEN et al., 1990), GMendel (LIU & KNAPP, 1992), JoinMap (STAM, 1993), Multimap (MATISE et al., 1994), Outmap (BUTCHER et al.,2002), AntMap (IWATA & NINOMIYA, 2006) e OneMap (MARGARIDO et al., 2007), sendo o MapMaker/EXP e o JoinMap os mais usados atualmente.

Tais programas indicarão os marcadores ligados, formando os respectivos grupos de ligação; qual a ordem correta entre essas marcas; e a distância em cM (centiMorgans) entre elas. Para isso, devem-se seguir os seguintes passos: (1) verificar o padrão de segregação Mendeliana esperada para o tipo de população de mapeamento escolhido, chamado de teste de segregação; (2) realizar o teste de ligação, verificando a freqüência de recombinação entre cada par de marcas, o que possibilita identificar os desequilíbrios de ligação e conseqüentemente formar os grupos de ligação, (3) empreender a ordenação das marcas a partir das distâncias entre elas e (4) fazer a conversão das distâncias em centiMorgans (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

O teste de segregação mais comumente utilizado é o teste estatístico Qui-quadrado (X^2), dado pela formula $X^2 = \sum \frac{(fo - fe)^2}{fe}$ em que: fo = freqüência observada em cada uma das classes; fe = freqüência esperada em cada uma das classes (proporção Mendeliana do modelo genético adotado). A hipótese (Ho) não admite a ocorrência de distorção, ou seja, os dados genotípicos devem seguir a distribuição Mendeliana esperada para a população de mapeamento adotado.

Uma forma de verificar a significância (α) estatística do X^2 é convertê-lo em seu respectivo *p-valor*, que pode ser definido como a probabilidade de se observar uma amostra fora do padrão, assumindo que a hipótese nula é verdadeira. Quanto menor o valor do *p-valor*, mais forte é a evidência de rejeição de Ho (LIU, 1998).

O fato de realizar o X^2 repetidas vezes, uma para cada marca, gera um problema intrínseco deste tipo de análise: erros ditos do tipo I (BENJAMINI & HOCHBERG, 1995), ou seja, falsos positivos (LIU, 1998).

Desta forma, usa-se uma correção que elimina os erros do tipo I baseado em valores de significância dos testes de segregação derivados de cada marca. A mais usada é a correção de Bonferroni (LYNCH & WALSH, 1998), que assume uma significância individual (α), a partir da razão da significância total pelo número de testes: $\alpha = \frac{\alpha^*}{n}$, em que α^*= nível de significância global e n = número de testes independentes, que correspondem ao número de marcadores utilizados.

Contudo, deve-se ressaltar que esta correção pressupõe independência entre os testes, o que não é verdade quando estamos tratando de sistemas biológicos (genes), uma vez que a proximidade entre os locos causa interferência nos resultados (SCHUSTER & CRUZ, 2008).

Apesar de não se conhecer a causa da distorção no desvio de segregação de locos ao longo do genoma, trabalhos recentes mostram a importância desses locos na identificação de QTL a partir de mapas genéticos. XU (2008) estabelece uma teoria para o surgimento de locos com desvio de segregação, e afirma que o poder de detecção de QTL pode ser sutilmente reduzido quando se faz as análises ignorando os locos com desvio, mas também ressalta que se o mapa for bem saturado, e tais locos apresentarem distribuição randômica no genoma, as perdas são insignificantes. Finalmente, o autor defende que estes locos com desvio de segregação sejam utilizados na obtenção de mapa genéticos e identificação de QTL.

Diferentes tratamentos podem ser realizados para a formação dos grupos de ligação. Estatisticamente, ligação genética é definida como a associação de genes ligados em um mesmo cromossomo (LIU, 1998), ou seja, que segregam juntos durante a meiose. As estatísticas usadas para esta análise podem ser o X^2, a razão de verossimilhança, a freqüência de recombinação, dentre outras (MOLLINARI, 2007). Assim, um grupo de ligação (GL) é formado por marcadores genéticos que possuam menos de 50% de recombinação ($r < 0{,}5$) com pelo menos um dos marcadores do grupo (LIU, 1998). Nesta fase, todos os pares de marcadores são testados; ao final, a propriedade transitiva é usada para o estabelecimento dos grupos de ligação, ou seja, se o loco A estiver ligado ao B, e se o loco B ligado ao C, independentemente da freqüência de recombinação estimada entre A e C, conclui se que os marcadores A, B e C pertencem ao mesmo grupo de ligação (OBLESSUC, 2009). A fim de estabelecer critérios para inferir se dois locos estão, ou não, ligados é necessário definir a freqüência máxima de recombinação e o LODscore mínimo. LODscore (*Logarithm of Odds* - LYNCH & WALSH, 1998) é um teste baseado na razão de verrossimilhança, que testa a hipótese de dois locos estarem ligados, e utiliza o logaritmo na base 10 para facilitar o entendimento. Assim sendo, se um LODscore com valor de três indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável do que a segregação independente (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

O teste que realiza esta análise é chamado de teste de Dois-Pontos. Para o modelo de teste de Dois-Pontos, a ligação é detectada testando a independência entre cada par de marcas na população segregante (LIU, 1998).

A melhor forma de se estabelecer a ordem dos locos é por meio da “Busca Exaustiva”, que como o nome sugere, verifica todas as ordens possíveis e define como melhor aquela de menor comprimento. No entanto, este método apresenta uma

limitação computacional, pois há um grande número de possíveis ordens quando um GL possui um grande número de locos. Assim, os métodos computacionais e/ou algorítmicos, para ordenação exata das marcas, são limitados a um pequeno número de locos por GL. O teste de “Três-Pontos” é uma alternativa muito usual para GL grandes. É baseada na idéia central do teste de Busca Exaustiva, porém ao invés de realizar os cálculos com todos os locos, dois a dois. A ordem é formada em pequenos grupos de três em três. Ou seja, o teste é feito a cada 3 marcas em seqüência, com sobreposição, montando-se assim a ordem final.

Definidos os grupos de ligações e a ordem em cada grupo é primordial verificar a distância entre cada loco ordenado. A distância é determinada pela fração de recombinação entre as marcas. O método mais indicado para se obter ‘r’ neste estágio da construção do mapa é a análise Multiponto (CARNEIRO & VIEIRA, 2002), na qual as distâncias são calculadas considerando-se as frações de recombinação entre cada par de marcas simultaneamente. Assim, a estimativa da distância entre os locos A e B e entre os locos B e C são incluídos na estimativa da distância entre os locos A e C, considerando que a ordem entre os locos é ABC (LIU, 1998).

Estabelecidas as frações de recombinação entre cada marcador, estes valores devem ser convertidos em centiMorgans, unidade usada para distância entre locos em mapas genéticos, em homenagem a Thomas Hunt Morgan que estabeleceu a relação em freqüência de recombinação e distância entre genes (GRIFFITHS et al., 2006).

Assim, as funções de mapeamento transformam as freqüências de recombinação em distâncias aditivas. As principais são a função de Haldane (HALDANE, 1919), que admite que a ocorrência de permuta se dá na ausência de interferência. A função de Kosambi (KOSAMBI, 1944) admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes. Esta função admite interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, que decresce com o aumento da distância, sendo nula para locos independentes (SCHUSTER & CRUZ, 2008; HANAI, 2008). Desta forma, torna-se mais apropriado o uso desta função de mapeamento quando se trabalha com marcas distribuídas ao longo do genoma, como é o caso de marcadores moleculares.

Mapas de ligação vêm sendo feitos para várias espécies de importância cientifica e/ou econômica. A construção desses mapas envolve, para cada espécie, diferentes populações de mapeamento, tipos diferentes de marcadores, com diferentes estratégias de mapeamento, incluindo o uso de programas estatísticos sofisticados. Estes são os

principais pontos para a construção de um mapa genético e devem ser definidos de acordo com as características e o objetivo de cada pesquisa.

2.5. Identificação de QTL

Uma importante utilidade dos mapas genéticos é, sem dúvida, o mapeamento de genes e QTL. A partir do mapeamento de QTL é possível estudar a base genética dos caracteres complexos (PATERSON, 1995). Do ponto de vista do melhoramento, é interessante que os mapas genéticos possam ser completamente mapeados indicando a localização de genes e QTL, sejam eles para resistência a pragas e doenças, desempenho agronômico, adaptabilidade, síndrome da domesticação, qualidade, ou qualquer outro caráter importante. Estas informações podem ser usadas tanto para a obtenção de novas cultivares pela seleção assistida por marcadores, quanto no auxílio aos melhoristas na melhor compreensão dos efeitos e modo de ação dos locos controlando os caracteres de interesse (HANAI, 2008).

Com o mapa de ligação e a análise fenotípica de determinados caracteres é possível identificar regiões genômicas que estão envolvidas no controle de características complexas, denominadas QTL. Para isso, os dados obtidos tanto do mapa genético quanto das análises fenotípicas, devem ser avaliados assim, irão fornecer as posições, a magnitude dos efeitos de cada região e indicar as interações gênicas entre elas. Dentre os programas mais utilizados para este fim estão QTLCartographer vs.2.5 – WinQTLCart (WANG et al., 2005) e QGENE 3.05 (NELSON, 1997).

As análises de detecção de QTL vêm avançando no sentido de aumentar a precisão dos testes estísticos e com isso aumentar a confiabilidade nos resultados encontrados. Inicialmente, os QTL eram identificados por uma relação direta entre o genótipo de marcadores dos indivíduos da população de mapeamento, com suas características fenotípicas. Este método é denominado Análise por Marcas Individuais (SMA), podendo ser baseado no método de máxima verossimilhança, ou ainda em análises de regressão linear (LYNCH & WALSH, 1998; SCHUSTER & CRUZ, 2008).

Com o passar do tempo, novas metodologias foram sendo geradas, objetivando suprir as falhas da SMA. O primeiro avanço foi no sentido de analisar a existência de QTL a cada intervalo entre dois marcadores, ao invés de a cada um único marcador. Assim surgiu o Mapeamento por Intervalo (LANDER & BOTSTEIN, 1989).

O mapeamento por intervalo (IM) permite percorrer o genoma sistematicamente em busca de QTL, usando a informação das marcas flanqueadoras ao intervalo, como fração de recombinação e posição genômica, para estimar a presença e magnitude de QTL. Assim, também é possível fazer inferências sobre a posição dos QTL identificados. Uma desvantagem deste método é que outros QTL, fora do intervalo em questão, não são considerados (LANDER & BOTSTEIN, 1989).

ZENG (1994) propôs o Mapeamento por Intervalo Composto (CIM). Nesse método, as estimativas de locais e efeitos do QTL são individualizadas, assim uma região não influencia na análise de outra região de QTL. Isso é realizado pelo uso do método de regressão múltipla, o que reduz a variância residual entre os locos e aumenta, portanto, o poder de detecção de cada QTL e a precisão na estimação de seus efeitos (ZENG, 1994; JANSEN & STAM, 1994).

Com isso é possível construir um modelo para cada posição do genoma, sendo testadas a significância dos efeitos aditivos e de dominância de cada modelo através de máxima verossimilhança e LODscore. Para cada experimento de mapeamento, um grande número de testes é realizado, a significância em cada caso pode ser obtida por vários métodos, sendo o teste de permutação o mais indicado (CHURCHILL & DOERGE, 1994; ZENG, 1994).

Outro método denominado Mapeamento por Múltiplos Intervalos (MIM), proposto por KAO et al. (1999), incorpora a epistasia ao modelo e considera múltiplos intervalos simultaneamente. O método baseia-se na seleção e comparação de modelos, é dividido em quatro componentes: avaliação, procura, estimação e predição. Para isso é gerado um pré-modelo para cada análise através de regressão múltipla e seleção de cofatores, assim como na análise CIM. Contudo, agora o número de QTL e as possíveis interações entre eles são considerados parâmetros da análise, o que permite eliminar os resultados não significativos. Assim, o modelo selecionado segue para efetiva análise dos QTL com estes “novos” parâmetros, definidos de forma real pelas análises dos dados. Este procedimento é repetido diversas vezes, até que não hajam QTL pouco significativos para serem eliminados das análises. Desta forma, este método torna-se mais vantajoso por proporciona maior eficiência e precisão na busca por QTL e suas interações.

Atualmente, devido as suas vantagens, o método de MIM vem sendo mais indicado para busca de novos QTL, principalmente por sua precisão estatística, que leva resultados mais eficientes, inclusive no uso desses QTL em estudos de seleção assistida.

Contudo, o método mais utilizado em diversos trabalhos ainda é o CIM, que também vem servindo de maneira adequada aos interesses dos pesquisadores (MAXWELL et al., 2007; SABADIN et al., 2008).

2.6. Mapeamento com Marcadores Moleculares em Feijão

O feijão comum é uma espécie diplóide (2n=22) com um genoma pequeno, próximo de 637 Mb (ARUMUGANATHAM & EARLE, 1991), representando aproximadamente 1200 cM (VALLEJOS et al., 1992). Outros estudos indicam que 60% do genoma do feijoeiro é composto por seqüências de cópia simples (TALBOT et al., 1984). Essas características simplificam a detecção de marcadores moleculares distribuídos ao longo de todos os cromossomos, o que aumenta a possibilidade de localizar locos associados às características quantitativas (QTL), pois é possível se obterem mapas genéticos altamente saturados.

Há mapas genéticos para feijão comum publicados em literatura, mas nenhum completamente saturado com microssatélites (BASSET, 1991; VALLEJOS et al., 1992; NODARI et al., 1993; ADAM-BLONDOM, 1994; JUNG et al., 1996; BAI et al., 1997; ARIYARATHNE et al., 1999; FREYRE et al., 1998; BLAIR et al., 2003; HANAI, 2008). O mapeamento genético do genoma do feijoeiro foi iniciado com a publicação do primeiro mapa de ligação, o qual foi baseado em marcadores morfológicos e isoenzimas (BASSET, 1991). Posteriormente, foram produzidos mapas genéticos baseados em marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism* - BOTSTEIN et al., 1980) (VALLEJOS et al., 1992; GEPTS et al., 1993; NODARI et al., 1993; ADAM-BLONDOM et al., 1994)

O mapa consenso de ligação – C*ore Map* foi detalhadamente descrito por FREYRE et al. (1998). É baseado em 550 marcadores moleculares, principalmente RFLPs e RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* - WILLIAMS et al., 1990; BAI et al., 1997; FALEIRO et al., 2003), que foram mapeados na população de linhagens do tipo RIL do cruzamento de ‘BAT93’ x ‘Jalo EEP558’ (BJ). Algumas regiões não apresentaram saturação, como por exemplo, os grupos G2, G3, G8 e G10, havendo discrepâncias com mapas anteriores. Por estes motivos, tem-se buscado a integração dos novos marcadores moleculares, principalmente microssatélites, a este mapa consenso (YU et al., 2000; BLAIR et al., 2003; BLAIR (a) et al., 2006; GRISI et al., 2007).

Essa população de mapeamento é segregante para vírus do mosaico do feijoeiro, ferrugem, mancha angular, antracnose e crestamento bacteriano comum (FREYRE et al., 1998). Entretanto, a população BJ apresenta algumas limitações. Tem um tamanho amostral pequeno, é formada por 75 linhagens endogâmicas, tornando a produção de um mapa altamente saturado impossível, uma vez que 1% de fração de recombinação, ou seja, 1 cM implica em 1 recombinante para cada 100 indivíduos. Assim sendo, a possibilidade de ter uma linhagem recombinante é de 0,75% para a população BJ. Além disso, os genitores não apresentam divergência para várias características de interesse da cultura, como resistência a estresses hídrico, salino, entre outros.

GRISI et al. (2007) adicionaram novos marcadores SSRs ao *Core Map* (BIC, 2009) de feijão, totalizando 199 marcas SSR em 13 grupos de ligação, com 1358 cM e distância mínima de 7,23 cM entre duas marcas. Nesse mesmo trabalho, também foi produzido um mapa, somente com marcadores microssatélites, com população BJ (mapa *core*). O mapa possui no total 606,8 cM e 123 SSR mapeados em 12 grupos de ligação devido à fragmentação do grupo B7 em B7a e B7b.

Marcadores microssatélites tem sido uma ótima ferramenta não só para o mapeamento genético. Devido às vantagens a eles associadas vários grupos têm desenvolvido SSRs para feijão comum (YU et al., 1999; 2000; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002; MÉTAIS et al., 2002; BLAIR et al., 2003; GUERRA-SANZ, 2004; BLAIR et al., 2008; BLAIR et al., 2009). Inclusive, grupos nacionais têm se destacado nesta busca (CAIXETA et al., 2005; BUSO et al., 2006, HANAI et al., 2007; CAMPOS et al., 2007; BENCHIMOL et al., 2007; GRISI et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; HANAI(a), 2008).

2.7. Antracnose e Fontes de Resistência

A resistência à doenças pode ser avaliada de duas maneiras: qualitativa (presença ou ausência de infecção) e quantitativa (restrição ao desenvolvimento do patógeno).

Portanto, a classificação da resistência à doenças pode ser baseada em duas categorias denominada vertical e horizontal (ROBINSON, 1976; PARLEVLIET, 1979). Resistência horizontal é aquela efetiva para todas as raças de um patógeno. É também denominada resistência geral, de campo, não-específica, ou quantitativa. A resistência

vertical é aquela efetiva para raças específicas de um patógeno. É também denominada resistência específica, ou qualitativa.

No caso da resistência vertical, a resistência/suscetibilidade de planta é em função da interação entre os genes que conferem resistência raça-específica (genes R) da planta e que atuam diferentemente com o genótipo do patógeno (raça fisiológica). Essa interação é modulada pelo ambiente, de acordo com a teoria gene-a-gene (FLOR, 1971). Segundo esta teoria, para cada gene que confere resistência ao hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona avirulência.

Dentre as doenças do feijoeiro, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus é uma das mais importantes, devido a sua ocorrência nas três épocas de cultivo, causando, assim, uma redução na produção e na qualidade dos grãos produzidos (CHIORATO et al., 2006). O patógeno caracteriza-se por apresentar uma grande variabilidade, com mais de 140 raças fisiológicas identificadas em todo mundo (PADDER et al., 2007).

A antiga classificação da variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* era representada pelos grupos *Alfa, Beta, Gama, Delta*, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro I e Brasileiro II, e as raças fisiológicas dentro destes grupos de *Alfa, Alfa BR, Epsilon, Eta, Gama, Delta, Teta, Lambda, Capa, Mu*, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro I, *Zeta*, Brasileiro II e *Sigma*. A partir de 1998, um novo sistema de classificação de número binário foi proposto na primeira Reunião Latino Americana de Antracnose do Feijoeiro realizada em Cali (Colômbia – CIAT, 1990), deixando-se a antiga denominação usada desde 1918 (CARBONEL et al. 1999). De acordo com YOUNG et al. (1998), a raça fisiológica do isolado é determinada através da somatória dos valores binários da reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras. Assim, determina-se cada raça fisiológica do patógeno. Como por exemplo, o isolado Peru (Tabela 1) que recebeu a denominação de sua raça fisiológica como raça 6 pois duas das doze variedades de feijão diferenciadoras da antracnose foram suscetível a esse isolado. Os cultivares suscetível ao isolado Peru (raça 6) foram o MDRK (Michigan Dark Red Kidney) que tem o valor binário estabelecido de 2 e a cultivar Perry Marrow com valor binário de 4. Somando os valores binários de cada cultivar suscetível ao isolado testado é possível definir a raça do isolado.

Tabela 1. Lista dos doze cultivares diferenciadores para a identificação da raça fisiológica para *C. lindemunthianum* com os respectivos valores binários e dois exemplos de isolados (Beraldo, 2007).

Ordem	Cultivares Diferenciadoras	Valor Binário	Exemplo de isolado	
			Peru	Costa Rica
1	Michelite**	1	R	S (1)
2	MDRK*	2	S (2)	R
3	Perru Marrow*	4	S (4)	R
4	Cornell 49242**	8	R	S (8)
5	Widusa*	16	R	S (16)
6	Kaboon*	32	R	R
7	México 222**	64	R	S (64)
8	PI 207262**	128	R	S (128)
9	TO**	256	R	S (256)
10	TU**	512	R	R
11	AB 136**	1024	R	S (1024)
12	G 2333**	2048	R	S (2048)
	Raça[1]		6	3545

[1] A designação das raças é obtida pela soma dos valores binários das cultivares diferenciadoras suscetíveis; * Genótipo Andino; ** Genótipo Mesoamericano.

Os sintomas são visíveis em todas as partes da planta, inicialmente com pequenas manchas marrons escuras e posteriormente negras, em estágio avançado, podendo causar necrose dos tecidos próximos às nervuras das folhas ou caules. Quando a fonte da infecção é a semente, os primeiros sintomas são lesões necróticas nas folhas cotiledonares. Esses sintomas são facilmente observados nas vagens, depreciando drasticamente o produto para comercialização (Figura 1). Em condições ambientais favoráveis, ocorre a formação de uma massa de esporos com coloração rosada, no meio das lesões. Se a infecção for severa as vagens novas chegam a murchar e secar. Quando a infecção atinge as sementes, é possível observar lesões deprimidas de cor marrom e freqüentemente apresentam-se sem pigmentação. O desenvolvimento dos sintomas da antracnose acontece, principalmente, em regiões de temperaturas entre 13°C a 27°C, com alta umidade relativa do ar e quando ocorre reutilização de sementes infectadas pelo patógeno, sendo que as perdas podem chegar a 100% (MEDEIROS, 2004; BERALDO, 2007).

A disseminação da doença pode ocorrer por meio de respingos de chuvas, ventos, implementos agrícolas, homem, insetos e vários outros agentes, sendo que a maior fonte de inóculo, do ponto de vista epidemiológico, é representada pelas sementes

infectadas. Essas são responsáveis pela disseminação da doença em longas distâncias. A sobrevivência do fungo de uma estação para a outra ocorre em restos de cultura e tem a capacidade de sobreviver por um, ou dois anos (ZAUMEYER & THOMAS, 1957 *apud* DAVIDE, 2006). O fator limitante para o controle da antracnose no feijoeiro é a existência de um grande número de raças de *C. lindemuthianum* (diferentes patótipos, com diferentes tipos, ou números de genes de avirulência).

Figura 1. Sintomas de antracnose causando pelo fungo *C. lindemuthianum* em feijão. A esquerda sintomas em uma folha e a direita vagem com sintomas.

Fenômenos como mutação, recombinação sexual, transposons, fatores citoplasmáticos e o polimorfismo cromossômico são responsáveis pela grande diversidade em fungos. Ambas as formas do patógeno (mitospórica e meiospórica) possuem ampla variabilidade genética, que são diferenciadas por meio de estudos de patogenicidade em plantas hospedeiras. Há variações dentro de populações selvagens de fungos que não apresentam ciclo sexual na natureza. Há também muitos relatos de variabilidade em isolados monospóricos, quando mantidos e cultivados em laboratório (ROCA et al., 2004).

Mais de 13 genes condicionados à doença da antracnose pelo patógeno *C. lindemuthianum* já foram identificados: *Co*-1 ao *Co*-13. Dentre os genes descritos, somente o *co*-8 foi caracterizado como recessivo. Todos os outros genes identificados

até o momento, *Co*-1, *Co*-2, *Co*-3, *Co*-4, *Co*-5, *Co*-6, *Co*-7, *Co*-9, *Co*-10, *Co*-11, *Co*-12 e *Co*-13, foram caracterizados como tendo ação gênica dominante. O *Co*-1, *Co*-3 e o *Co*-4, apresentam variantes alélicas (*Co*-1, *Co*-1^2, *Co*-1^3, *Co*-1^4, *Co*-1^5, *Co*-3, *Co*-3^2, *Co*-4, *Co*-4^2, *Co*-4^3) (BERALDO, 2007; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009).

Estudos de mapeamento têm mostrado que os genes de resistência à antracnose estão localizados em diferentes grupos de ligação (GL). O loco *Co*-1 foi localizado no GL B1; *Co*-2 no B11; *Co-3*, *Co*-9 e *Co-10* no B4 *Co*-4 no B8; *Co-5* e *Co*-6 no B7 e os locos *Co*-7, *Co*-8, *Co*-11, *Co*-12 e *Co*-13 ainda não foram mapeados (GEFFROY et al., 1999; MIKLAS et al., 2000; KELLY & VALLEJO, 2004; GONÇALVES-VIDIGAL & KELLY, 2006; MÉNDEZ-VIGO et al., 2005; MAHUKU & RIASCOS, 2004; RODRÍGUEZ-SUÁREZ et al., 2007; GONÇALVES-VIDIGAL, et al., 2008 e 2009).

Os *pools* gênicos do feijão parecem ter sofrido co-evolução com populações de patógenos locais, tanto que acessos de um *pool* gênico são geralmente susceptíveis às raças de patógenos da mesma região, mas moderadamente resistentes àqueles oriundos de outro centro de diversidade. Este fenômeno tem sido observado para o fungo causador da antracnose *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (BALARDIN & KELLY, 1998; GEFFROY et al., 1999; ALZATE-MARIN et al., 1999; CHIORATO et al., 2006).

O melhoramento genético do feijoeiro busca ferramentas que agilizem a transferência de genes que confiram características de interesse, como a resistências à antracnose, para as cultivares elites, objetivando assegurar o desempenho e estabilidade em campo destas cultivares e garantindo a aceitação dos produtores (XU & CROUCH, 2008).

A localização de marcadores microssatélites ligados a genes de resistência à antracnose auxilia a realização de programas de seleção assistida por marcadores, ou ainda estudos de mapeamento fino e/ou clonagem posicional. O aprofundamento no entendimento dos mecanismos de resistência do feijoeiro a tal patógeno leva a uma maior compreensão da interação patógeno – hospedeiro e dos tipos de interação entre os genes envolvidos neste processo de resposta à infecção pelo agente causal da antracnose.

Tabela 2. Genes de resistência a antracnose com suas fontes de resistência, os respectivos *pool* gênico e grupo de ligação no *Core Map* (BIC, 2009; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009).

Gene	Fonte Resistência	*Pool* gênico	GL
Co-1	MDRK		
Co-1^2	Kaboon		
Co-1^3	Perry Marrow	Andino	B1
Co-1^4	AND227		
Co-1^5	Widusa		
Co-2	Cornell 49242	MA	B11
Co-3	Mexico 222	MA	B4
Co-3^2			
Co-4	TO		
Co-4^2	SEL1308	MA	B8
Co-4^3	PI 207262^Y		
Co-5	TU	MA	B7
Co-6	AB 136	MA	B7
Co-7	HI G 2333	MA	NA
co-8	AB136	MA	NA
Co-9	BAT93	MA	B4
Co-10	Ouro Negro	MA	B4
Co-11	Michelite	MA	NA
Co-12	Jalo Vermelho	Andino	NA
Co-13	Jalo Listras Pretas	Andino	NA

NA – Não avaliado; MDRK – Michigan Dark Red Kidney;MA – Mesoamericano;

2.8. Mapa Genético ‘IAC-UNA’ x ‘CAL-143’ (UC)

Uma população de mapeamento tipo RIL foi elaborada pelo cruzamento dos genitores ‘IAC-UNA’ e ‘CAL 143’. A variedade ‘IAC-UNA’ é resistente a antracnose, e suscetível a mancha-angular. E a linhagem ‘CAL 143’ é suscetível a antracnose, e resistente a mancha-angular. Essa população de mapeamento é contrastante para outros fatores bióticos e abióticos, como hábito de crescimento, produção de grãos e resistência

à ferrugem (OBLESSUC, 20009; CAMPOS, 2009). Um grande número de SSRs foi obtido (488 locos) com a parceria entre o grupo de pesquisa do Instituto Agronômico (IAC) – Laboratório de Biologia Molecular e o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG). Os pares de *primers* correspondentes a cada SSR foram desenhados a partir de duas bibliotecas enriquecidas, uma para 'CAL 143' e outra para 'IAC-UNA' (BENCHIMOL et al., 2007; HANAI et al., 2007; CAMPOS et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010). O polimorfismo observado para os genitores da população de mapeamento UC com os microssatélites desenhados pelo grupo de pesquisa foi de 34% (165 SSRs). Foram utilizados 260 microssatélites obtidos de literatura com 38% (99 SSRs) de SSRs polimórficos para os genitores 'IAC-UNA'e 'CAL 143' (YU et al., 2000; GAITÁN-SOLÍS, et al., 2002; MURRAY et al. 2002; Blair et al., 2003; GUERRA-SANZ, 2004; CAIXETA et al., 2005; BUSO et al., 2006; GRISI et al., 2007; HANAI et al., 2007). No total, 264 locos polimórficos foram utilizados na genotipagem das 380 linhagens endogâmicas, 247 apresentam padrão nítido de bandas, revelando 93,5% de aproveitamento.

De forma geral, o mapa genético UC (Figura 2A e 2B) com a parceria entre grupo de pesquisa do Instituto Agronômico (IAC) – Laboratório de Biologia Molecular e Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) mostrou-se robusto, sendo mantidas apenas as marcas com alto grau de confiabilidade em relação ao grupo de ligação e posição de mapa. CAMPOS et al. (2010) obtiveram um total 198 marcadores microssatélites distribuídos em 11 grupos de ligação, totalizando 1.864,2 cM, com densidade média de mapa de 9,4 cM entre marcas. Tanto os microssatélites com segregação Mendeliana esperada de 1:1, como os sem segregação Mendeliana foram utilizados na construção mapa UC. Do total de marcadores mapeados, apenas 5,6 SSRs/Grupo de Ligação, em média, foram ancorados, indicando uma boa distribuição dos marcadores que não haviam sido mapeados anteriormente, tanto produzidos por nosso grupo como os obtidos de literatura. Este estudo adicionou nova informação aos estudos de identificação de QTL, fornecendo informação de mapa para 134 novos marcadores microssatélites nunca mapeados anteriormente.

CAMPOS et al. (2010) constataram que o grupo de ligação que apresentou maior saturação foi o B2, com 37 marcas ligadas. Este resultado era esperado, pois este também foi o maior grupo encontrado nas análises do mapa consenso de feijão (FREYRE et al., 1998). Posteriormente, GRISI et al. (2007), também identificaram o

grupo B2 como sendo o maior, com 26 marcadores ligados, dentre eles 15 SSRs, totalizando 224,3 cM para este GL, valor próximos dos 275,2 cM encontrados no mapa UC. Consequentemente, este também foi o grupo com maior número de locos ancorados (12 SSRs) para obtenção do mapa UC.

O grupo com a maior distância de mapa foi o B7, com 330,4 cM e um total de 26 SSRs ligados. Este grupo apresenta uma distância grande (36,6 cM) entre os locos SSR-IAC06 e SSR-IAC64. Esta distância é coerente biologicamente, pois os locos posicionados antes da marca SSR-IAC06 tiveram desvio de segregação para alelos do genitor Andino, em quanto que os locos localizados posteriormente a marca SSR-IAC64 apresentaram desvio para o alelo do genitor Mesoamericano. Este resultado é robusto, uma vez que um loco com desvio de segregação pode levar a distorção de locos vizinhos no cromossomo (XU, 2008). Este tipo de observação acontece também nos grupos B2, B3, B9 e B10, onde os locos com desvio de segregação se encontram agrupados de acordo com o genitor para o qual apresentam maior número de alelos (OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010).

Entretanto, o mapa UC contém ainda *gaps* nos grupos de ligação B1, B2, B4 e B9, e o grupo B8 foi dividido em B8a e B8b. Portanto, para que o mapa UC torne-se ainda mais informativo e robusto, é interessante integrar outros marcadores moleculares aos grupos de ligação, empreendendo saturação do mapa genético. Desta forma foi possível identificar marcadores moleculares ligados a locos de interesse agronômico, como por exemplo, os de resistência à antracnose. Esses locos de interesse, mapeados tornam-se úteis para programas de seleção assistida por marcadores a fim de piramidar de genes de resistência a doenças.

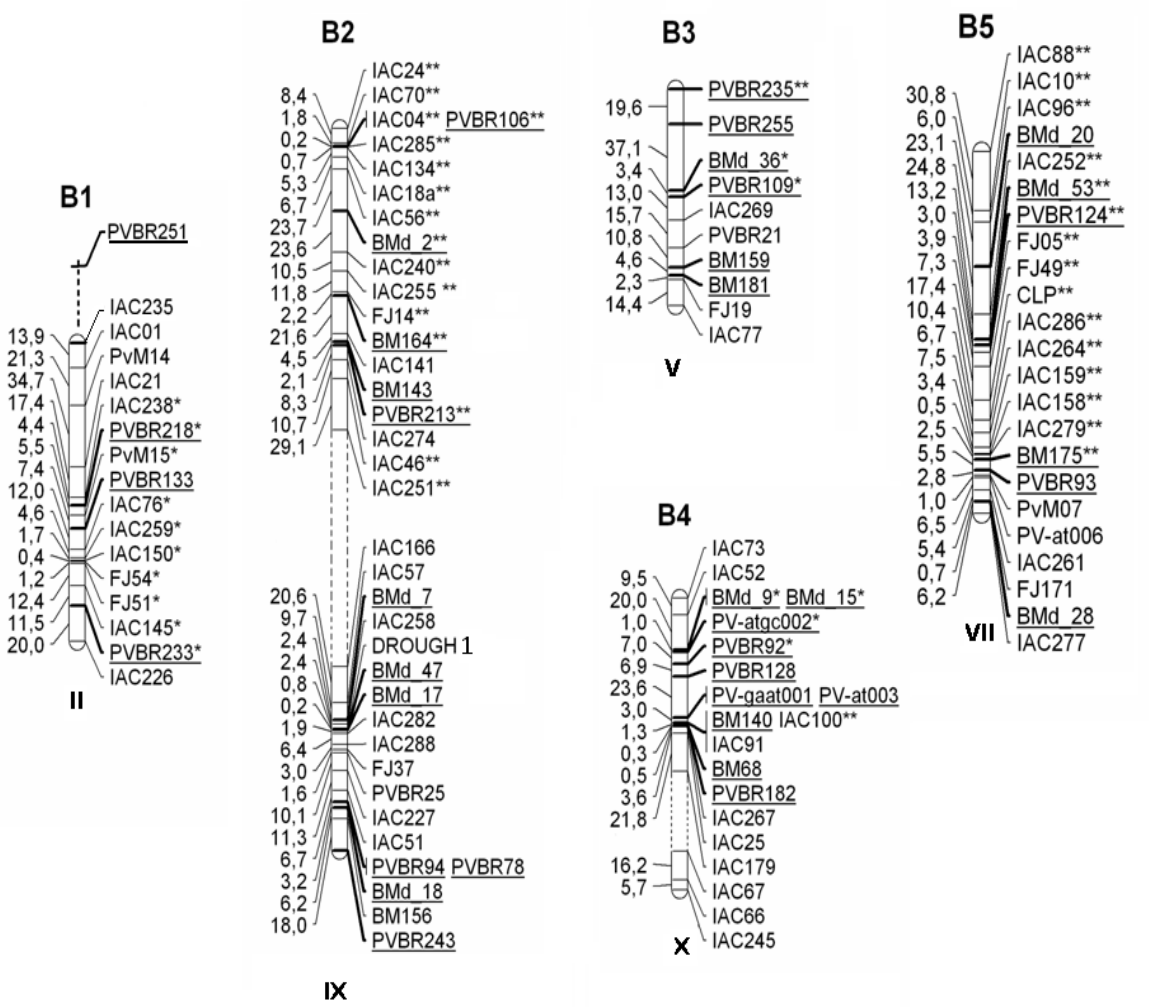


Figura 2A. Mapa genético UC para feijão comum com os grupos de ligação B1, B2, B3, B4 e B5, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante ‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível de significância de 5% (OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010).

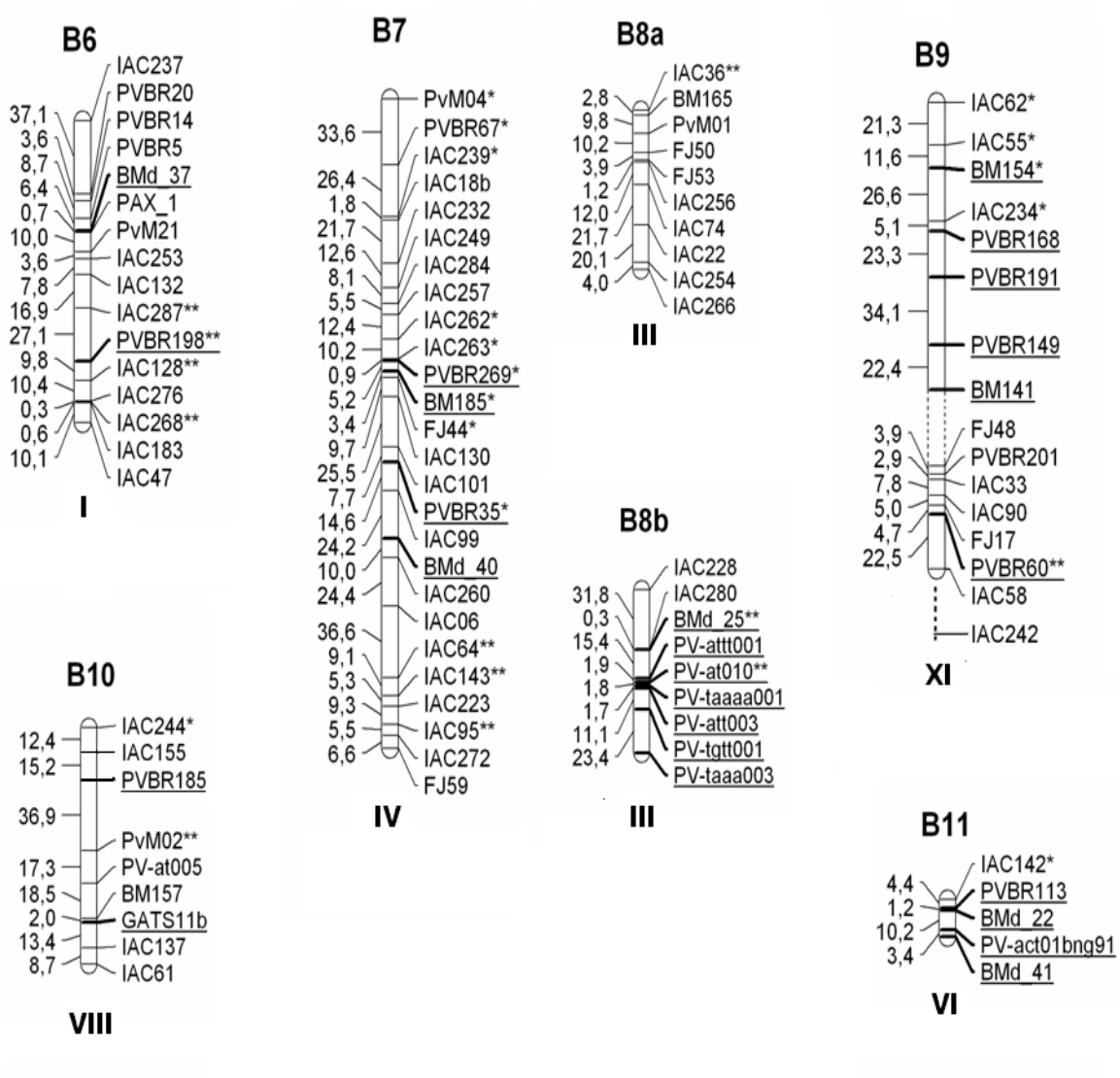


Figura 2B. Mapa genético UC para feijão comum com os grupos de ligação B6, B7, B8a, B8b, B9, B10 e B11, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante ‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível de significância de 5% (OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de Mapeamento ‘IAC-UNA’ x ‘CAL-143’ (UC)

Dentre as linhagens presentes no Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico, foram escolhidas como genitores da população de mapeamento a ‘IAC-UNA’ e a ‘CAL 143’, por serem de grupos gênicos divergentes. A variedade ‘IAC-UNA’, tem sementes pretas, é resistente a antracnose e tem origem Mesoamericana. A linhagem ‘CAL 143’ possui sementes rajadas de vermelho (fundo bege) tipo calima, é suscetível a antracnose e de origem Andina. Dois cruzamentos foram realizados, um no qual a planta de ‘IAC-UNA’ foi a doadora de pólen (‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’), e outro no qual a planta de ‘CAL 143’ foi a que doou os gametas masculinos para fertilização da planta ‘IAC-UNA’ (‘CAL 143’ x ‘IAC-UNA’). Esta individualização foi apenas para acompanhar possíveis efeitos maternos ao longo das gerações. O primeiro cruzamento (‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’) originou 9 vagens, com um total de 31 sementes. O segundo (‘CAL 143’ x ‘IAC-UNA’) gerou 18 vagens, totalizando 58 sementes. Três sementes $F_{1,}$ representantes de todas as vagens, foram plantadas em 27 vasos separados, que por autofecundação geraram as sementes F_2. Assim foram definidas as 27 famílias da população de mapeamento. As plantas F_1 do primeiro cruzamento gerou 723 sementes F_2 e as plantas do segundo cruzamento gerou 790 sementes F_2. Essas sementes foram todas colhidas e plantadas em 9 vasos por família, sendo sempre 3 sementes por vaso. Assim, 729 sementes foram plantadas, por ciclo reprodutivo de autofecundação, ou seja, a cada geração, F_3, F_4, F_5, F_6, até F_7, as sementes eram colhidas em conjunto por vaso (método de *Bulk*), das quais outras 3 eram plantadas em mais 9 vasos.

Na geração F_8, foram abertas linhas endogâmicas. As sementes foram colhidas individualmente por planta e mantidas individualizadas nos plantios seguintes, sendo uma semente por vaso. Este procedimento foi mantido até F_{10}, onde tiveram suas folhas coletadas, individualmente, para posterior extração de DNA. Ao todo, foram obtidas 540 linhagens endogâmicas F_{10} (Anexo 1). Objetivando diminuir o número de indivíduos para a genotipagem foram amostrados aleatoriamente 380 indivíduos, que representam as 27 vagens obtidas em F_1, para compor a população de mapeamento RIL modificada, que é a base deste projeto de mapeamento.

3.2. Extração e Quantificação de DNA

Amostras de folhas de cada uma das 380 linhagens recombinantes F_{10} e dos genitores “IAC-UNA" e “CAL 143” foram coletadas. Depois de congeladas em nitrogênio líquido, as amostras foram liofilizadas e moídas. Em seguida, foi feita a extração do DNA de acordo com a metodologia do CTAB descrita por HOISINGTON et al. (1994).

A quantificação do DNA final das 380 linhagens foi feita em gel de agarose 1% por comparação de intensidade das bandas com o padrão de fago λ (Invitrogen). Foram utilizadas concentrações de 25 ng a 250 ng do padrão, somando-se 25 ng a cada poço de aplicação.

3.3. Caracterização dos Microssatélites

Cada par de *primer* foi caracterizado quanto à temperatura ideal de anelamento para PCR. As reações de amplificação foram realizadas com 30 ng de DNA, 1U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,15 mM de cada dNTP, 0,8 pmol/μL de cada *primer* (direto e reverso) e 1x de tampão da enzima, num volume total de 15 μL.

As amplificações foram realizadas em gradiente de temperatura, de acordo com as seguintes condições: 1) 94^{o}C, 1 min; 2) 94^{o}C, 1 min; 3) temperatura de anelamento (Ta) de 45ºC-56ºC ou 56ºC-65ºC por 1 min.; 4) 72^{o}C, 1 min, 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72^{o}C por 5 min.; 7) 15^{o}C, incubação final. Também o programa *Touchdown*, em alguns casos, foi utilizado em termocicladores My Cycler e Icycler (BioRad).

Após a amplificação, os microssatélites foram visualizados em gel de agarose 3%, onde foi possível definir a Ta ideal para cada um. Em seguida o produto de PCR que apresentou maior especificidade, com padrão nítido de banda única, foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

Os géis de acrilamida 6% foram feitos a partir de solução de poliacrilamida 6% (150 mL de acrilamida 40%, 420 g de uréia, 200 mL de TBE 5X, volume completo para 1L) filtrada e polimerizada por aproximadamente 2h com 960 μL de PSA (Persulato de Amônio) e 50 μL de TEMED. Após aquecimento do gel em cuba de eletroforese (*Nucleic Acid Sequencing Systems – CBS Scientific Company,* INC) por 1h à 200 W, 5

μL de cada uma das linhagens foram aplicadas nos poços, preparados a partir de 10 μL de produto de PCR com 5 μL de formamida, em 8 entradas de 48 amostras por vez. A corrida foi de aproximadamente 5h à 50 W e 800 V-900V.

3.4. Inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus e Avaliação de Patogenicidade

As sementes das 380 linhagens foram germinadas em papel toalha especial para germinação (germitest) em BOD "*Biochemical oxygen demand*" à 25 ºC por três dias. Ao terceiro dia, essas sementes foram transplantadas para caixas com vermiculita autoclavada e permanecendo em casa de vegetação por seis dias, para então, as caixas com plântulas serem levadas para a sala de inoculação com umidade e temperatura controlada.

O isolamento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* raça 04, 38, 55 e 2041 foi realizado em meio BDA + antibiótico (batata-dextrose-ágar + tetraciclina a 250 ppm), mediante o plaqueamento da suspensão de esporos em água estéril, obtida de lesões individuais de folhas e vagens infectadas.

Para avaliar a resistência à *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus, a inoculação por pulverização em ambas as superfícies foliares (concentração 10^6 esporos/mL) foi feita em plantas com 7 dias pós-germinação. O inóculo foi produzido através do cultivo do fungo em meio de MATHUR, onde os isolados foram incubados a 22^{o}C (±1 ^{o}C), no escuro, durante 8-10 dias.

As avaliações foram feitas em casa de vegetação em condições estáveis de temperatura (23ºC) e umidade (95-100%, nas primeiras 48h), com fotoperíodo de 12h. Para minimizar possíveis erros humanos e variação ambiental, foram feitas 4 repetições para cada raça de antracnose testada, em cada repetição foram avaliadas 4 plantas por genótipo. Para cada repetição, foi feito um sorteio ao acaso da ordem dos indivíduos da população de mapeamento, essas sementes foram separadas previamente para evitar erros na hora de germiná-las.

A avaliação da severidade foi efetuada entre 7 a 10 dias pela escala de notas do CIAT (1995). A escala é composta de nove graus, onde o grau 1 representa a ausência de sintomas visíveis da doença e o grau 9 representa mais de 80% da área foliar afetada. O índice de doença foi calculado usando a formula de MCKINNEY (1923), que

exprime a porcentagem do índice de doença (PDI) (Equação 1). O PDI é proporcional à média ponderada das notas, pois corresponde à razão entre ela e a nota máxima da escala adotada (CZERMAINSKI, 1999; FUNIKO et al., 2008; ANAND et al., 2009; ANAND et al., 2010).

Equação 1: $PDI = 100 \times \sum [(f \times V) \div (n \times X)]$

f = numero de plantas

V = nota

n = numero total de plantas

X = nota máxima

3.5. Construção e saturação do Mapa Genético UC

A partir do mapa genético UC (item 2.9 da revisão de literatura – OBLESSUC, 2009; CAMPOS, 2009; CAMPOS et al., 2010), com o auxilio do programa MAPMAKER/EXP v. 3.0b (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992) utilizando um valor de limite de detecção (LODscore) de 3,0 e uma distância máxima de 37,5 cM, foi feita a construção do novo mapa UC saturado. Os marcadores já mapeados no mapa genético UC foram ancorados com uso do comando *anchor* e a distância entre cada dois SSRs foi determinada usando análise "Multiponto", pelo comando "*map*", definindo o *framework* de cada grupo de ligação.

Foi feito o teste de segregação dos novos marcadores SSRs utilizados na saturação do mapa UC foram submetidos ao teste de segregação (X^2) e foi empregada a correção de Bonferroni. Essas análises foram realizadas com o uso do programa "R" (version 2.5.1 – *The R Foundation for Statistical Computing*, 2007). Todos os marcadores foram usados na construção do mapa genético. Esses marcadores, foram inseridos um a um pelo comando "*try*", checando a posição mais favorável a cada inserção de uma nova marca. Para refinar as análises, primeiro foram testados os marcadores mais informativos, que não apresentaram desvio de segregação. Posteriormente, foram testados os SSRs menos informativos e/ou com desvio de segregação. As seqüências finais foram verificadas pelo comando "*ripple*", com janela de 6 marcas.

Por fim, a distância entre cada dois SSRs foi determinada usando análise "Multiponto", pelo comando "*map*", definindo o *framework* de cada GL. A conversão

da freqüência de recombinação para centiMorgans foi feita utilizando-se a distância de mapeamento de Kosambi. O desenho do mapa de ligação foi feito com uso do programa MapChart 2.2 (Voorrips, 2002), com auxílio do Adobe Photoshop 7.0 (Microsoft).

3.6. Mapeamento de QTL de Resistência à Antracnose

A partir do mapa genético UC saturado gerado pelo MapMaker/EXP e dos dados fenotípicos da população de mapeamento, as análises para identificação de locos ligados a resistência à antracnose foi realizada pelo programa QTL Cartographer vs.1.17 (BASTEN et al., 2005).

As notas de avaliação de resistência/suscetibilidade da população UC foram normalizadas com o auxilio do programa "R". Os dados foram inseridos na forma de vetor, gerando uma curva de padronização pelo pacote "MASS", disponível no programa. O pico da curva (λ) foi utilizado na normalização dos dados, sendo $dadosn = dados^{\lambda}$ (dadosn são os valores das notas normalizados; dados são os valores brutos). O objetivo foi reduzir erros de imprecisão na avaliação visual dos sintomas foliares, uma vez que as notas atribuídas aos diversos níveis de infecção são em escala linear.

As notas normalizadas de cada raça fisiológica juntamente com o arquivo de mapa gerado pelo MapMaker foram convertidos à arquivos de leitura do QTLCartographer pelos programas Rcross e Rmap, respectivamente. O mapeamento dos QTL foi feito individualmente para cada raça fisiológica da antracnose.

Em seguida foi realizada a análise de mapeamento pelo método CIM (modelo 6 – Zmapqtl). O modelo baseia-se na hipótese de que um QTL envolvido em uma característica está localizado em um intervalo entre dois marcadores adjacentes a este QTL. As marcas ligadas a QTL prováveis, fora do intervalo em análise, foram tomadas como covariáveis do modelo. A evidência de QTL foi verificada a cada intervalos de 1 cM e janela de 10 cM, através de estatísticas de máxima verossimilhança (LRT). A conversão dos valores de LRT para LOD foi relacionada através da formula: LOD=0.2172*LRT. Os cofatores utilizados na análise de CIM foram obtidos com emprego do método de regressão múltipla (*stepwise*), com valor de significância de 5% (ZENG,1994).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e Quantificação de DNA

As extrações de DNAs dos 380 indivíduos, representantes das linhagens endogâmicas da população de mapeamento do tipo RIL, gerada a partir do cruzamento entre 'IAC-UNA' x 'CAL 143' foi feita com a população em F_{10}. Os DNAs foram visualizados em gel de agarose 1% para quantificação dos mesmos (Figura 3). Para a quantificação dos DNAs das linhagens endogâmicas, foram feitos gel de agarose 1%, contendo o marcador de peso molecular e o DNA dos indivíduos na concentração original e sua concentração pela metade. Isso foi feito para diminuir erro de quantificação, principalmente para as linhagens que tinham alta concentração de DNA, como é o caso do indivíduo 115 (Figura 3).

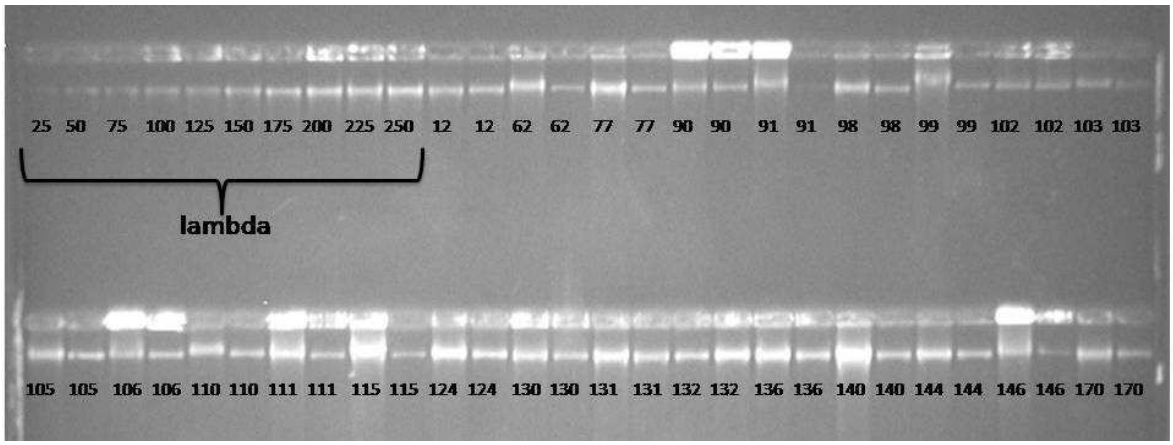


Figura 3. Quantificação de DNA em gel de agarose 1%. As primeiras 10 amostras correspondem ao marcador Lambda de 25 ng a 250 ng. DNA de amostras de feijão, sendo uma amostra a cada dois poços. O primeiro poço de cada amostra contém a metade da concentração original e o segundo, a concentração original. Os números abaixo correspondem a cada linhagem da população UC.

4.2. Caracterização de microssatélites e genotipagem da população de mapeamento

Para a saturação no mapa genético UC foram caracterizados 200 marcadores microssatélites, além daqueles que já haviam sido usados no mapa anteriores, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (CAMPOS et al., 2007; BENCHIMOL et

al., 2007; CARDOSO et al., 2008) como também obtidos de literatura (YU et al., 2000; CAIXETA et al., 2005; GRISI et al., 2007; BLAIR et al., 2003; HANAI et al., 2007; BLAIR et al., 2008; HANAI, 2008). Desse total, 100 (50%) apresentaram perfil polimórfico para a população UC.

Do total de SSRs caracterizados, 85 microssatélites são da serie “ATs” (BLAIR et al., 2008) os quais foram cedidos em alíquotas pelo Pesquisador Dr. Matthew W. Blair (CIAT - *International Center for Tropical Agriculture*, Cali, Colômbia) para o teste de polimorfismo na população UC. Os microssatélite ricos em ATs são de difícil amplificação (BLAIR, et al., 2008). Essa dificuldade também foi observada no presente trabalho, sendo que 36,4% (31) dos SSRs polimórficos para a população de mapeamento UC, destes apenas 48,3% (15) apresentaram padrão de bandas nítidas para leitura.

A estratégia para a caracterização de todos os microssatélites, tanto os desenvolvidos pelo nosso grupo de trabalho como os provenientes de literatura, consistiu em realizar testes de amplificação com os SSRs em gel de agarose 3% (Figura 4) e avaliar seu polimorfismo nos genitores da população de mapeamento UC em gel de poliacrilamida 6%. Apenas os microssatélites que apresentaram polimorfismo entre os genitores foram utilizados na genotipagem da população de mapeamento UC.

As 380 linhagens da população de mapeamento F_{12} foram colocadas em ordem crescente, sendo 48 amostras por linha, seguidas de um dos genitores como padrão de tamanho dos alelos. Em um gel de poliacrilamida, foram feitas até oito aplicações por gel, possibilitando a visualização de toda a população em um único gel (Figura 5). A utilização de várias entradas foi muito importante, pois acelerou o tempo gasto para cada SSR, facilitando a leitura dos géis e barateando o processo. As bandas foram lidas em relação a presença do alelo do genitor ‘CAL 143’ (A) ou ‘IAC-UNA’ (B).

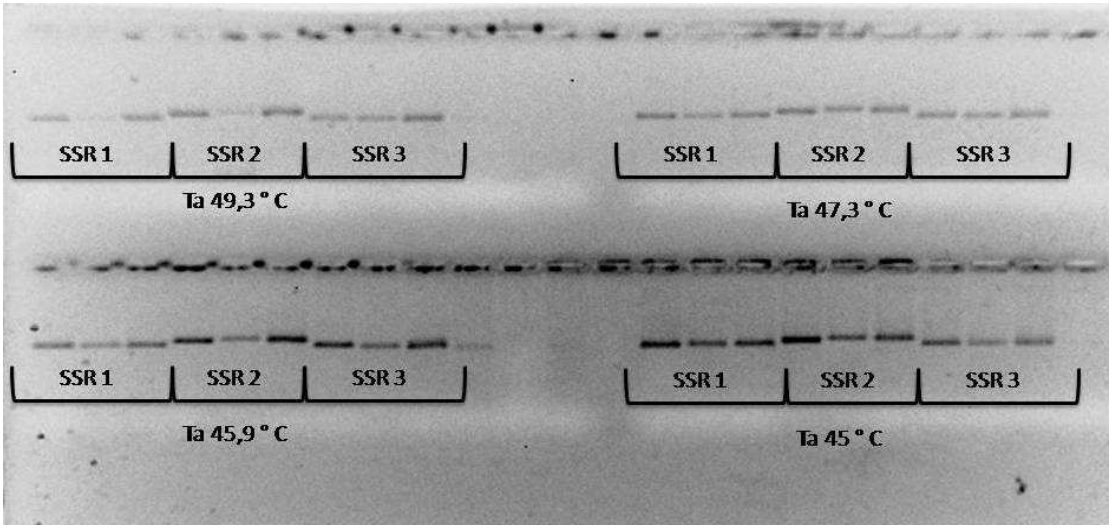


Figura 4. Caracterização dos SSRs em gel de agarose 3%. PCR realizada em gradiente nas temperaturas de 56°C à 45 °C. Para cada microssatélite, os DNAs amplificados de 'CAL 143', 'IAC-UNA' e F_1, respectivamente, foram visualizados.

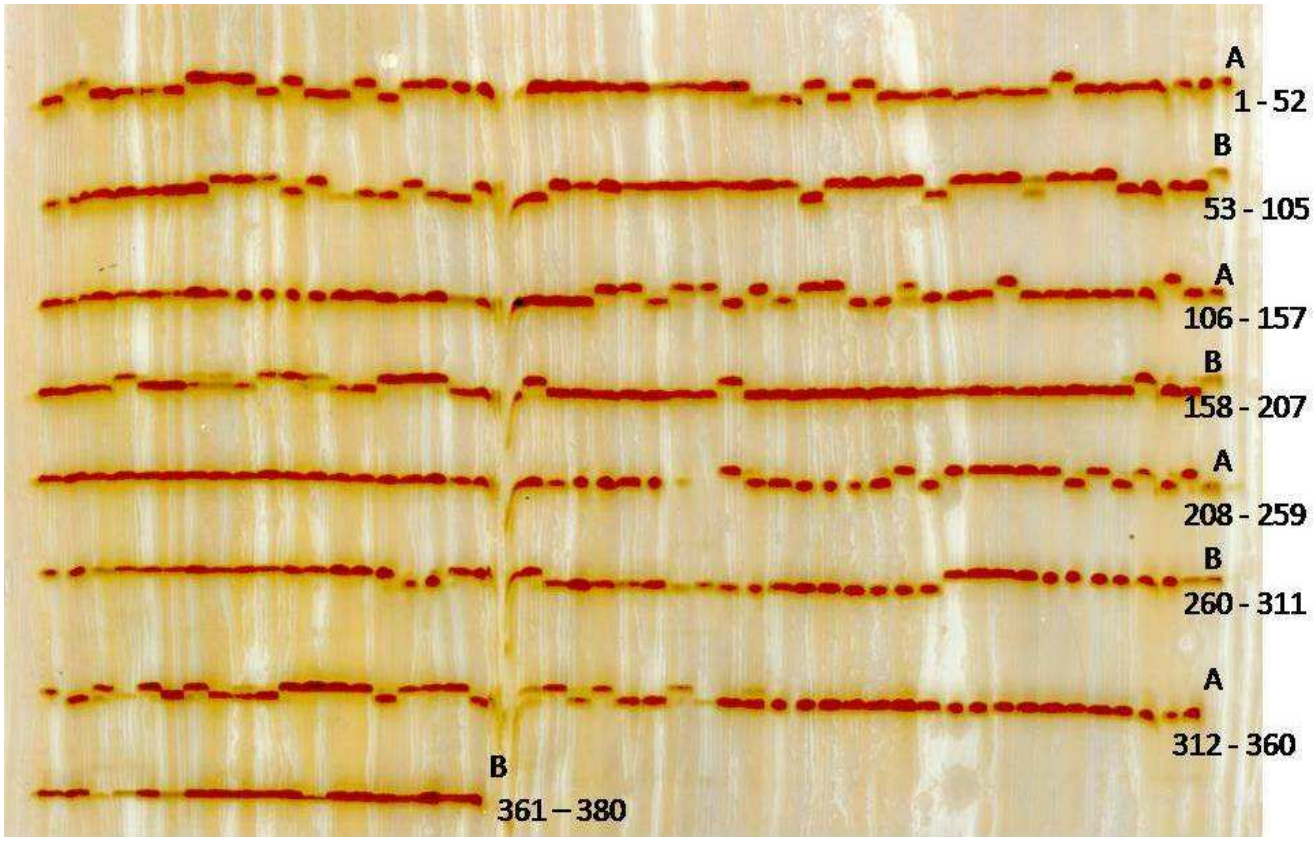


Figura 5. Genotipagem das 380 linhagens da população de mapeamento UC, com o microssatélite ATA3. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata com 8 aplicações. Cada linha contém 48 amostras além do DNA de um genitor por vez. "A" referente ao genitor 'CAL 143' e "B" ao genitor 'IAC-UNA'.

4.3. Saturação do Mapa UC

O perfil de segregação obtido para a população de mapeamento UC foi de 100 microssatélites. Foi feito o teste de segregação via X^2, considerando correção de Bonferroni com auxílio do programa "R". O nível de probabilidade conjunta de erro tipo I considerado foi de α^* = 0,05. Como foram realizados um total de 298 testes, o valor da correção de Bonferroni para cada um deles foi de $\alpha = 1{,}68 \times 10^{-4}$. Esse número total de SSRs (298) corresponde aos marcadores já mapeados no mapa UC (198) (CAMPOS, 2009; OBLESSUC, 2009; CAMPOS et al., 2010) e aos novos (100) que foram genotipados nesse trabalho. Todos os dados citados serão referentes somente aos novos marcadores que integrarão ao mapa UC saturado. No total, 64 marcas apresentaram segregação Mendeliana esperada de 1:1.

Desta forma, foram identificados 36 locos com desvio de segregação. Do total de SSRs com desvio de segregação, 44,4% apresentaram desvio para o alelo do genitor Andino, 'CAL 143', enquanto 55,6% dos SSRs apresentaram desvio de segregação para o alelo do genitor Mesoamericano, 'IAC-UNA'. FREYRE et al. (1998), BLAIR et al. (2003) e CAMPOS et al. (2010) também relataram locos com desvio de segregação, sendo encontrados *clusters* de distorção para o alelo do genitor Andino no grupo B1, assim como no presente trabalho. BLAIR et al. (2003) observaram também *cluster* de distorção para o alelo do genitor Mesoamericano no grupo B5, também foi visto por CAMPOS et al. (2010) no mapa UC. Este mesmo *cluster* foi encontrado no mapa UC saturado no presente trabalho. FREYRE et al. (1998) encontraram preferência de transmissão do alelo do genitor Mesoamericano no GL B2, também comprovado por CAMPOS et al. (2010) e evidenciado, neste trabalho, no mapa UC saturado.

Os novos marcadores moleculares foram, então, testados em todos os grupos de ligação conforme descrito no Material e Métodos, pelo comando *try*. Com isso, foram integrados ao mapa UC, 46 novos SSRs (Figura 6A e 6B). Os marcadores tiveram uma boa distribuição (4,1 SSRs\GL) e todos os grupos de ligação tiveram novos marcadores integrados, exceto o GL B8b (Tabela 3; Figura 6B). Os grupos de ligação com o maior número de marcadores integrados foram os GL B1 e B7, com oito SSRs em cada. Os grupos que tiveram a menor quantidade de marcadores integrados foram o B5 e B6, com apenas um microssatélite integrado. O comprimento total do mapa UC aumentou;

passou de 1864,2cM para 2098,4cM. Porém, a densidade média do mapa diminuiu de 9,4cM para 8,6cM (Tabela 4). Isso indica o tamanho do mapa aumentou e o mapa mais saturado.

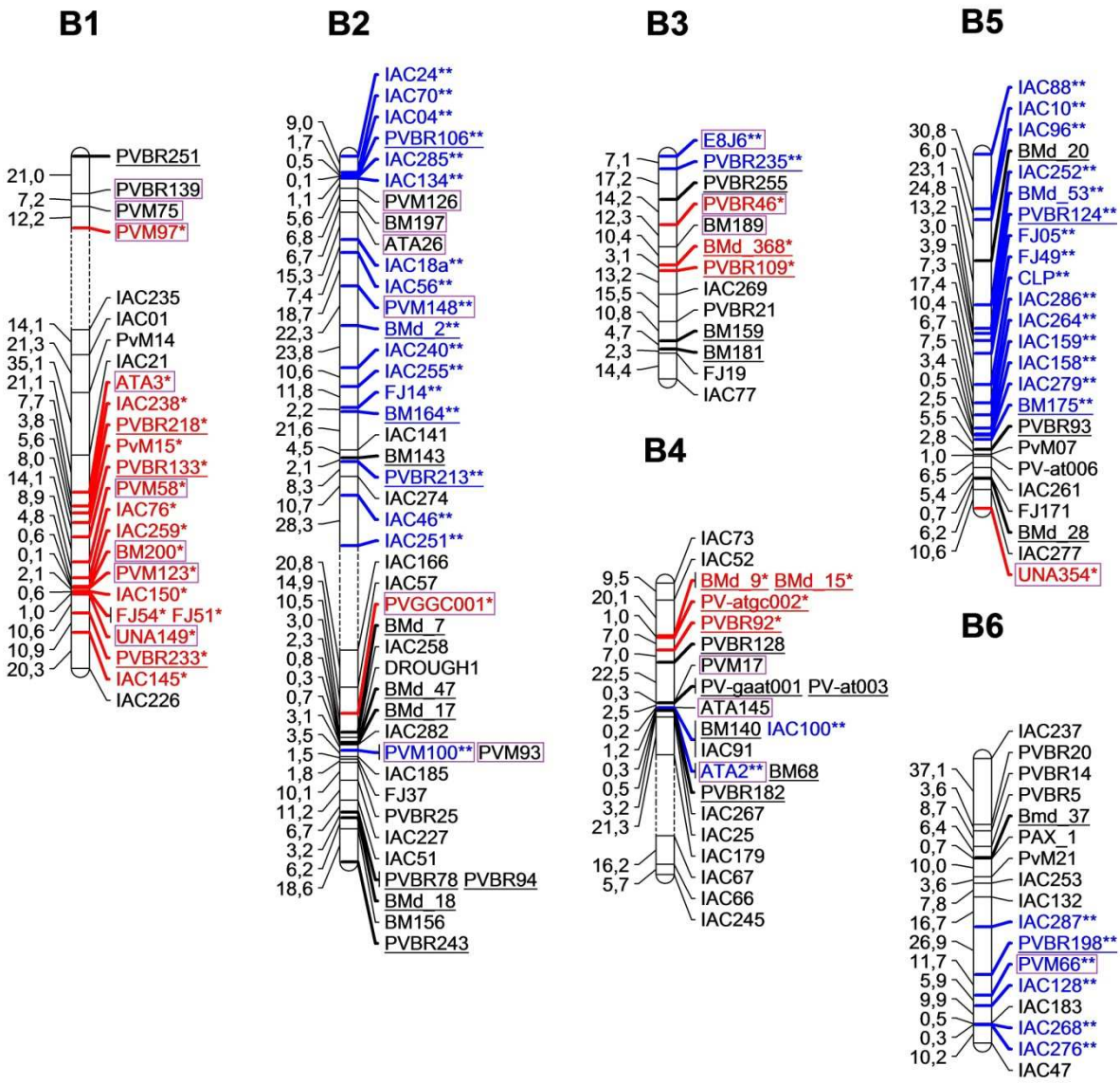


Figura 6A. Mapa genético UC com os novos SSRs. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. Os novos microssatélites estão destacados com uma caixa. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’) estão em vermelho. (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’) estão em azul. Nível de significância conjunto de 5%. Grupos de ligação B1, B2, B3, B4, B5 e B6.

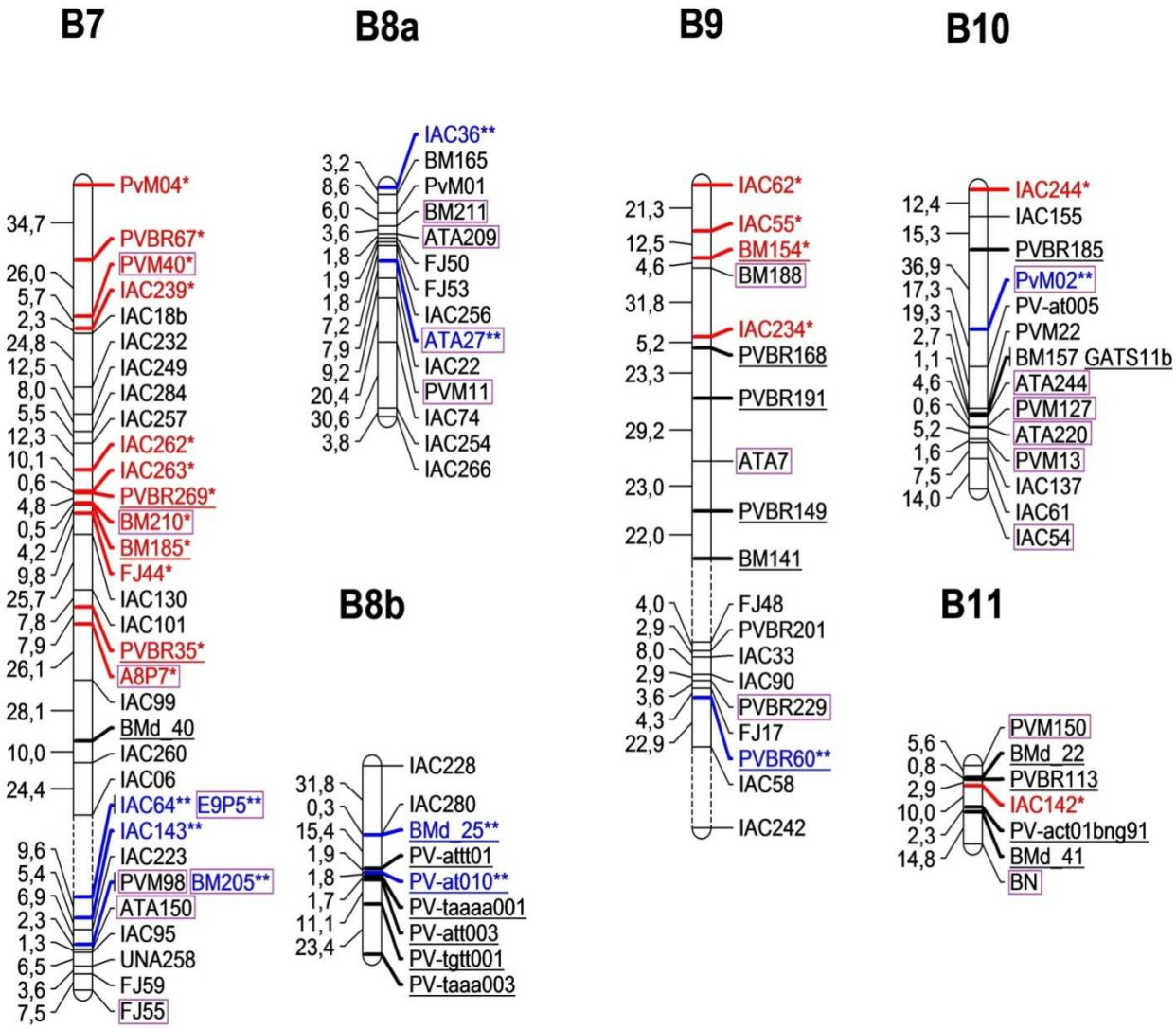


Figura 6B. Mapa genético UC com os novos SSRs. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. Os novos microssatélites estão destacados com uma caixa. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’) estão em vermelho. (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’) estão em azul. Nível de significância conjunto de 5%. Grupos de ligação B7, B8a, B8b, B9, B10 e B11.

Tabela 3. Distribuição dos SSRs mapeados nos 11 grupos de ligação de feijão comum em comparação do mapa genético 'IAC-UNA' / 'CAL 143' (UC). Mapa UC (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) e Mapa UC Saturado.

GL	Mapa UC		Mapa UC Saturado		N° de *loci* ligados - Total
	N° de *loci* ligados	Comprimento (cM)	N° de *loci* integrados	Comprimento (cM)	
B1	17	168,3	8	231,2	25
B2	37	275,2	7	338,4	44
B3	10	121	3	125,1	13
B4	20	120,6	3	118,6	23
B5	23	189,4	1	199,3	24
B6	16	152,9	1	159,9	17
B7	26	330,4	8	335,2	34
B8a	10	86,1	4	106,1	14
B8b	9	87,9	0	87,9	9
B9	16	191,2	3	221,6	19
B10	9	124,5	6	138,6	15
B11	5	16,7	2	36,5	7
Total	198	1864,2	46	2098,4	244

Tabela 4. Média aritmética da distância entre locos, comparando com o Mapa UC (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) e após a saturação, com os 46 marcadores microssatélites.

GL	Média Aritmética da distância entre locos	
	Mapa UC	Mapa UC Saturado
B1	9,9	9,2
B2	7,4	7,6
B3	12,1	9,6
B4	6,0	5,1
B5	8,2	8,3
B6	9,5	9,4
B7	12,7	9,8
B8a	8,6	7,5
B8b	9,7	9,7
B9	11,9	11,6
B10	13,8	9,2
B11	3,3	5,2
Total	9,4	8,6

O grupo de ligação B7 possui comprimento total de 335,2 cM e 34 SSRs ligados. Em CAMPOS et al. (2010), este grupo de ligação apresentou uma grande distância de 36,6 cM entre os locos SSR-IAC06 e SSR-IAC64. Com a saturação do mapa UC, a distância entre as marcas no grupo de ligação B7 (37,9 cM) manteve-se a mesma com a integração de oito SSRs ao grupo de ligação. Esta distância é coerente biologicamente, uma vez que os locos posicionados anteriormente a marca SSR-IAC06 apresentaram desvio de segregação para o genitor Andino, enquanto os locos localizados posteriormente a marca SSR-IAC64 apresentaram desvio para o genitor Mesoamericano. Este resultado é robusto, pois um loco com desvio de segregação pode levar a distorção de locos vizinhos no cromossomo (XU, 2008).

Foi possível observar resultados similares nos grupos B1, B2, B4 e B9 que tinham *gaps* no mapa UC, e foram mantidos, mesmo com a integração de 8, 7, 3 e 3

marcadores moleculares, respectivamente. Apesar de esses grupos de ligação manterem os *gaps* apresentados no mapa UC, esses grupos se tornaram mais saturados, exceto o grupo de ligação B2 (Tabela 4). O GL B4 antes tinha um comprimento total de ligação 120,6 cM, com a integração de 3 marcadores, seu comprimento total passou a ser de 118,6cM.

O grupo que apresentou maior saturação foi o B2, com 44 marcas ligadas. Este resultado era esperado, uma vez que este também foi o maior grupo encontrado nas análises do mapa consenso de feijão (FREYRE et al., 1998). GRISI et al. (2007), também identificaram o grupo B2 como sendo o maior, com 26 marcadores ligados, dentre eles 15 SSRs, totalizando 224,3 cM para este GL. Posteriormente, no mapa UC (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) o B2 foi o GL com maior saturação com 275,2 cM. Esse perfil se manteve e o grupo B2 foi o de maior comprimento total (338,4 cM).

HANAI (2008) mapeou na população BJ (*Core Map*) com SSRs da série "PvM" (HANAI et al., 2007), os quais também foram usados neste trabalho. Os resultados reforçam a robustez do mapa UC. No grupo B1, foram posicionados os SSRs PVM97 e PVM123; no grupo B2, os mapas têm em comum os locos PVM100 e PVM93; o SSR PVM66 mapeou no grupo B6; no GL B8, o loco PVM11; enquanto os marcadores PVM127 e PVM13 foram ligados no B10, e no B11, o PVM150 foi ligado em ambos os mapas.

A série de marcadores "ATs", usados no presente trabalho, foi mapeada na população DOR364 x G19833 (DG) por BLAIR et al. (2008). No GL B1, os mapas têm em comum o microssatélite ATA3; o marcador ATA150 no grupo B7, e no grupo de ligação B10 foi mapeado o SSR ATA220. No mesmo artigo, BLAIR et al. (2008) relataram a distribuição diferencial, do microssatélites de série "ATs", ao longo do genoma em relação aos demais tipos de SSRs. Porém, os autores ressaltam a dificuldade na amplificação dos SSRs ricos em ATs.

GRISI et al. (2007) saturando o mapa consenso (*Core Map* – BJ) e BLAIR et al. (2008) com a população DG mapearam marcadores moleculares da serie "BM" (GAITÁN-SOLÍS et al., 2002), usados na saturação do mapa genético UC. Houve correspondência entre os grupos de ligação mapeados por GRISI et al. (2007) com os mapeados nessa população, atestando a transferibilidade dos marcadores microssatélites. O loco BM200 mapeado no grupo B1 e BM210 no GL B7 também foram encontrado nos mapas BJ e DG; no grupo B3, o marcador BM189 e o loco

BM211 no GL B8 tem mesma posição de mapa encontrado por GRISI et al. (2007); e finalmente BLAIR et al. (2008) mapeou o SSR BM188 no grupo de ligação B9, resultado esse igualmente obtido na saturação do mapa UC.

A co-localização dos marcadores em comparação com outros mapas de feijão, eleva a robustez e a confiabilidade do mapa genético UC. Isso faz com que as marcas mapeadas tornem-se importantes alvos em trabalhos de melhoramento, uma vez que, independente da população de mapeamento utilizada, ou seja, independente do genótipo analisado para construção dos mapas de ligação, essas marcas representam locos bem caracterizados e conservados na espécie.

A saturação de mapas genéticos é de grande importância para estudos genéticos e desenvolvimento de cultivares melhoradas. A integração de 46 marcadores microssatélite ao mapa UC possibilitou diminuir a distância entre marcadores no mapa (Tabela 4 e Figura 7A, 7B e 7C). Por isso quanto maior o número de marcas alocadas maiores são as chances de saturar os *gaps* existentes no mapa, o que é importante para a seleção assistida por marcadores e para o mapeamento de QTL, pois, a eficiência, tanto do mapeamento de QTL quanto da seleção assistida, é aumentada pela presença de marcadores regularmente espaçados ao longo dos grupos de ligação.

O mapa genético UC também está sendo saturado com marcadores RGAs (*Resistance Gene Analogs* – MUTLU et al., 2006), que são marcadores derivados de Genes Análogos de Resistência, esses marcadores possui regiões conservadas de resistência a patógenos. Além disso, a população de mapeamento UC será genotipada com marcador do tipo DArT (*Diversity Arrays Tecchnology* – JACCOUD et a., 2001), que é baseada em hibridização em uma plataforma que utiliza a tecnologia de microarranjos, esses marcadores disponibiliza a detecção de centenas a milhares de marcadores, levando a uma alta saturação do mapa genético.

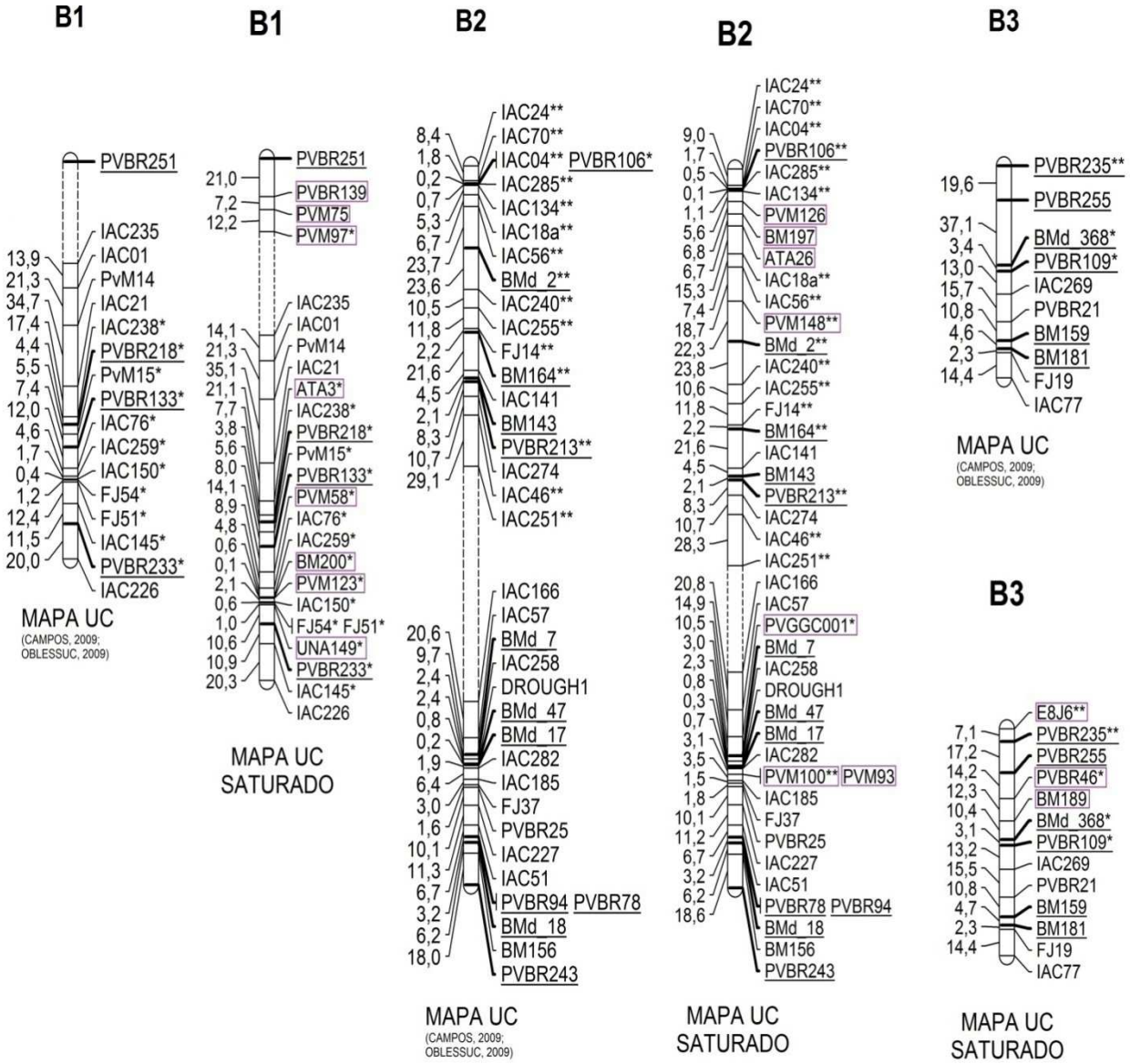


Figura 7A. Comparação do Mapa genético ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ Saturado. O grupo de ligação B8b permaneceu igual após a integração de novos SSRs ao mapa UC saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível conjunto de significância de 5%.

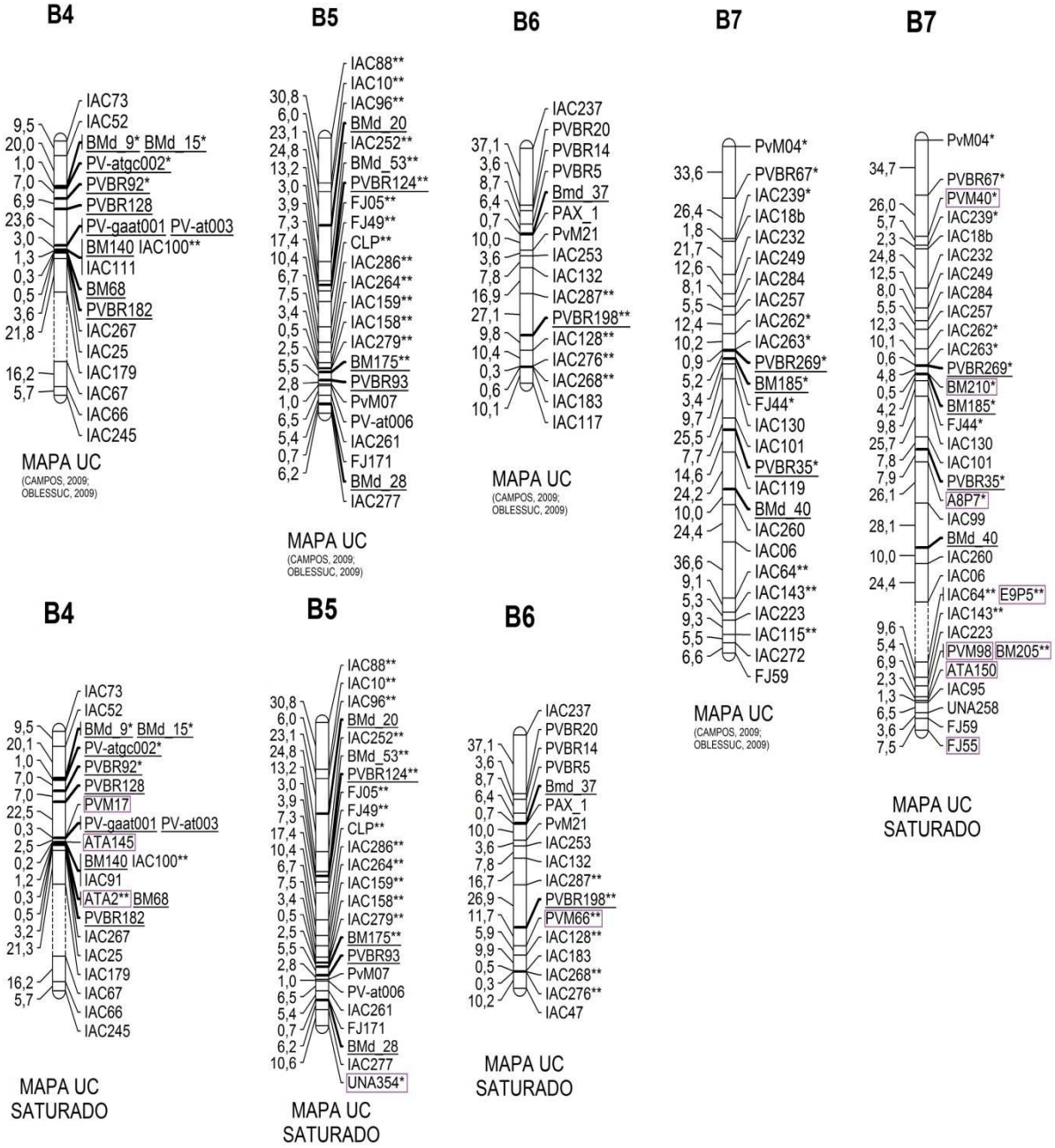


Figura 7B. Comparação do Mapa genético 'IAC-UNA'/ 'CAL 143' (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa 'IAC-UNA'/ 'CAL 143' Saturado. O grupo de ligação B8b permaneceu igual após a integração de novos SSRs ao mapa UC saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino ('CAL 143'). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano ('IAC-UNA'). Nível conjunto de significância de 5%.

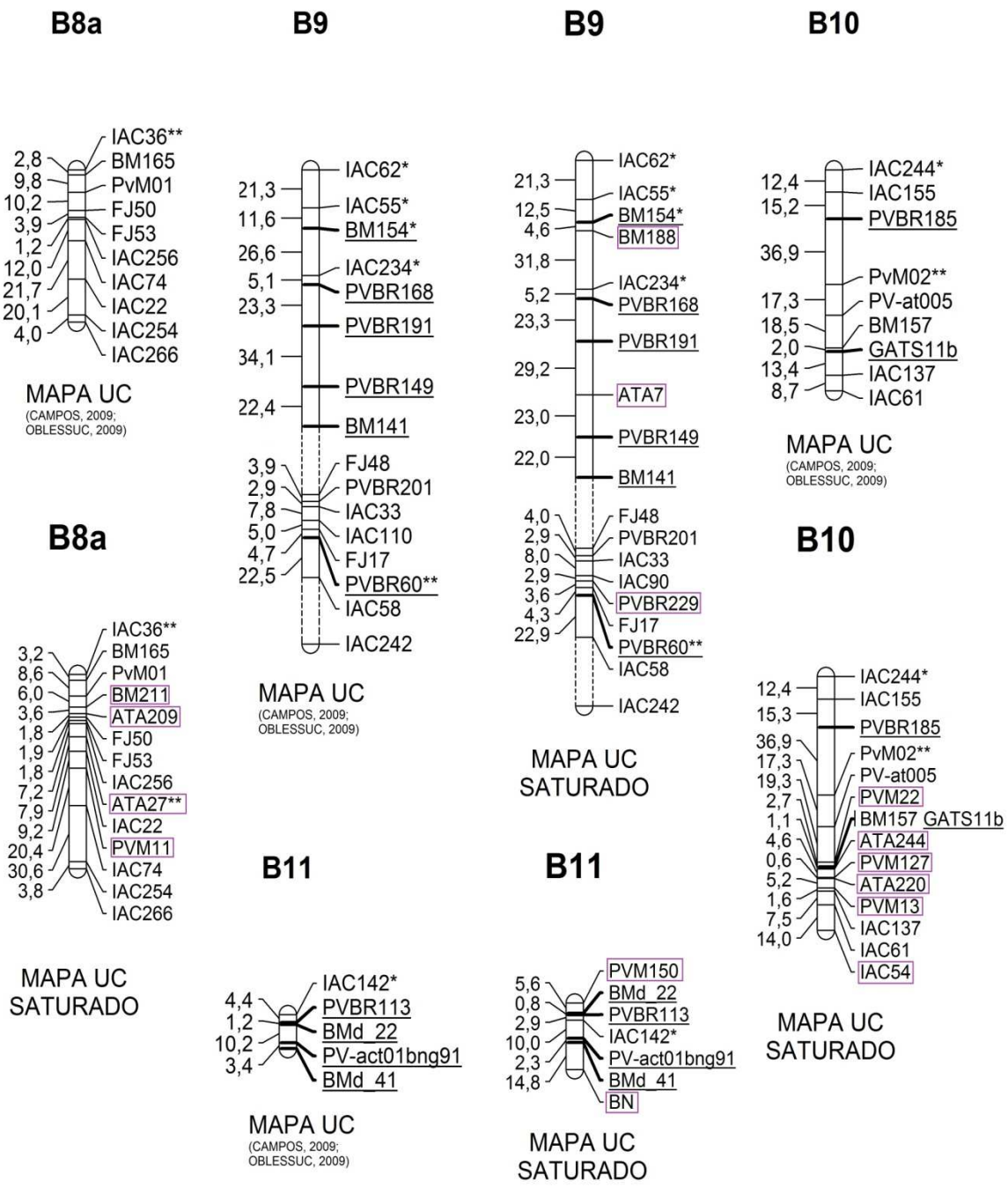


Figura 7C. Comparação do Mapa genético ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ (CAMPOS, 2008; OBLESSUC, 2009 e CAMPOS et al., 2010) com o Mapa ‘IAC-UNA’/ ‘CAL 143’ Saturado. O grupo de ligação B8b permaneceu igual após a integração de novos SSRs ao mapa UC saturado. Os novos microssatélites estão destacados com caixa. Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos

com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível conjunto de significância de 5%.

4.4. Fenotipagem da população de mapeamento

Para facilitar e padronizar as notas do sintoma de antracnose foi feito uma escala visual própria baseada nas notas do CIAT (Figura 8). Plântulas que apresentaram notas de 1 a 3 foram consideradas resistentes e as que receberam notas de 4 a 9 foram consideradas suscetíveis (SARTORATO, 2002; VITAL, 2006). As notas foram convertidas em índice de doença através da formula de MCKINNEY (1923), como descrito no Material e Métodos.

As avaliações fenotípicas de resistência/suscetibilidade das linhagens da população de mapeamento UC foram feitas individualmente em cada uma das quatro plantas por genótipo, por repetição. A porcentagem do índice de doença (PDI) foi calculada para cada genótipo (com as quatro plântulas) e foi estimada a média das quatro repetições, procedimento realizado para cada raça.

Para os dados obtidos para a raça 04, a curva de normalização se posicionou em zero ($\lambda = 0$) revelando a necessidade de aplicar a transformação de log neperiano (LN) para a raça 04. Entretanto, para os dados obtidos para a raça 38 e raça 2041, a curva de normalização ficou em -1 ($\lambda = -1$), em que as notas foram submetidas a $\frac{1}{Nota}$. Para a raça 55, $\lambda = -0,5$, os valores foram elevados a (- ½) (Figura 9).

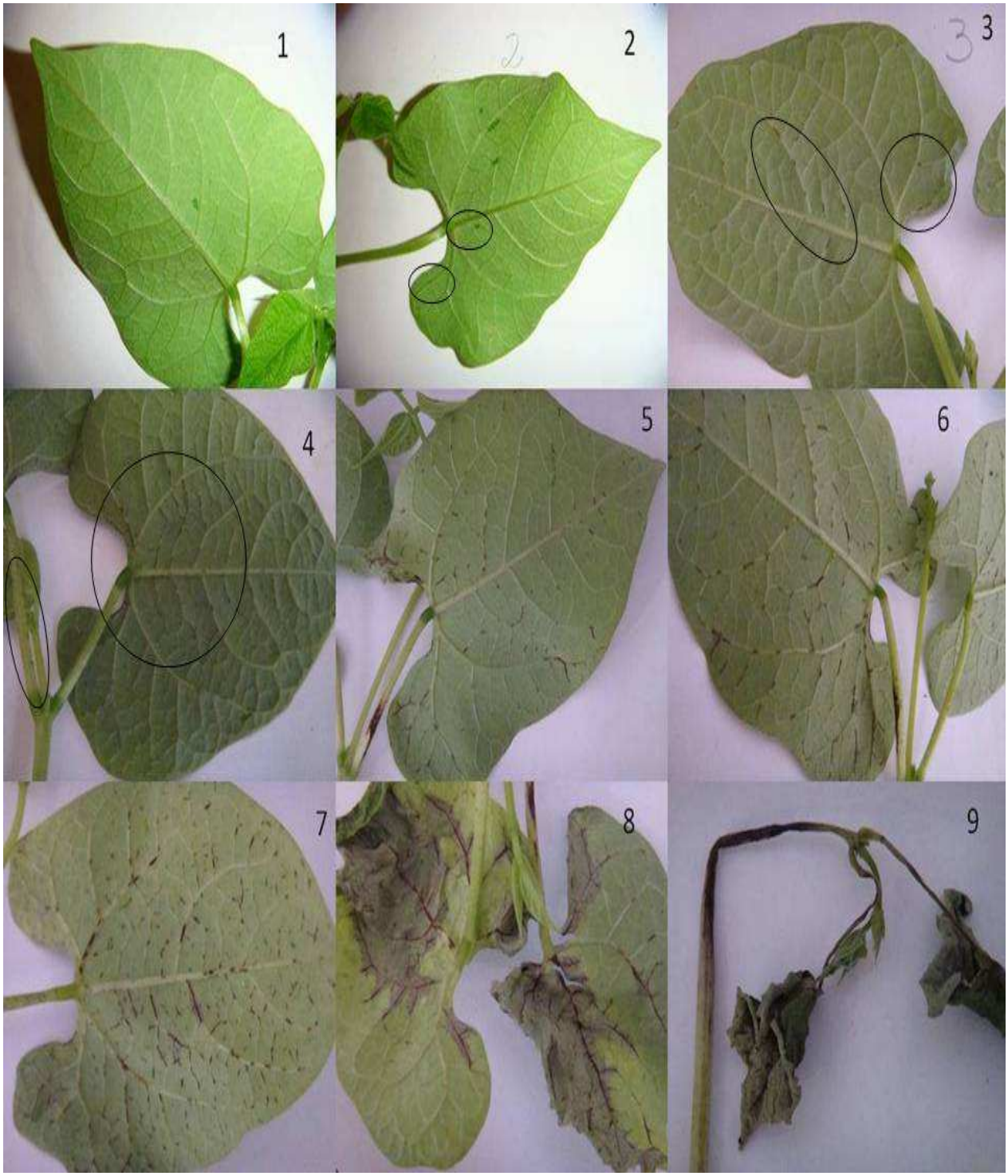


Figura 8. Padronização da escala de notas do CIAT para uniformizar as notas de avaliação da população de mapeamento UC. Círculos mostram as áreas com sintomas de antracnose.

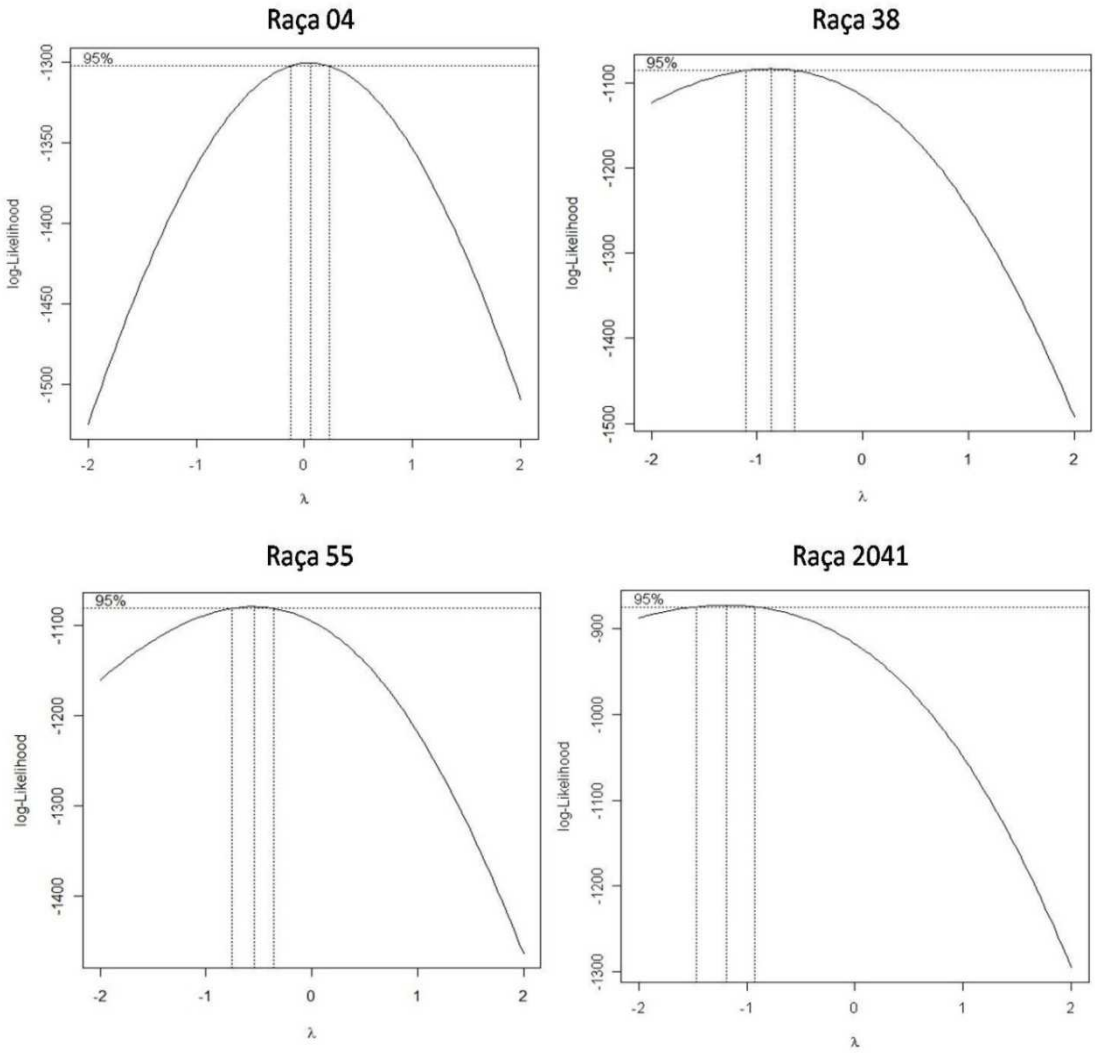


Figura 9. Curvas de normalização dos dados fenotípicos de resistência/susceptibilidade à antracnose, das linhagens recombinantes da população segregante 'IAC-UNA' x 'CAL 143' (UC). Raça 04 (λ = 0), raça 38 (λ = -1), raça 55 (λ = - 0,5) e raça 2041(λ = -1).

4.5. Loco de resistência à Antracnose

O mapeamento dos QTL foi realizado separadamente para cada raça. Portanto, os valores normalizados foram colocados em arquivos separados, para análises das raças separadamente.

Os valores de *threshold* utilizados para análises foram de LODscore 3,0, sendo este o valor estabelecido como indicativo da presença dos QTL e LODscore 2,0 como

sugestivo de QTL, ou seja, LODscore acima de 3,0 evidenciam a identificação de QTL ligados a resistência à antracnose (Figura 10, 11, 12 e 14).

Os efeitos aditivos foram identificados através da conversão dos valores à unidade original dos dados, de acordo com o valor de normalização de cada raça. Os efeitos de valor positivo foram relativos ao incremento gerado pelo alelo do parental 'CAL 143' e os valores negativos, relativos ao genitor 'IAC-UNA'.

Foram detectados 7 QTL de resistência a raça 04, distribuídos nos GL B1 (ATR4), B2 (ATR7), B4 (ATR9), B7 (ATR14 e ATR18), B8a (ATR20) e B9 (ATR22) (Figura 10). Destes, cinco tiveram LODscore acima de 3,0 (ATR9, ATR14, ATR18, ATR20 e ATR22). No GL B4 (ATR9) foi encontrado um QTL com LOD 4,18 que explica 2,8% da variação fenotípica e está localizado entre os marcadores IAC67 e IAC245, e o pico à 2,6 cM do marcador IAC245. GEFFROY et al. (2009) sugerem a presença de dois *clusters* de resistência no grupo de ligação B4. Um desses *clusters*, sugerido pelos autores, encontra-se no final do GL B4, e este pôde ser confirmado pela presença do QTL ATR9 mapeado nesse trabalho.

No GL B7, encontraram-se dois QTL, ATR14 (LODscore 19,37) e ATR18 (LODscore de 6,78) e explicando 32,86 e 4,36%, respectivamente da variação fenotípica.O QTL ATR14 está a 8cM do marcador SSR PVM40. Já o ATR18 está a zero cM do SSR BM185(completamente ligado). O marcador PVM40 faz parte dos SSRs que saturaram o mapa UC.

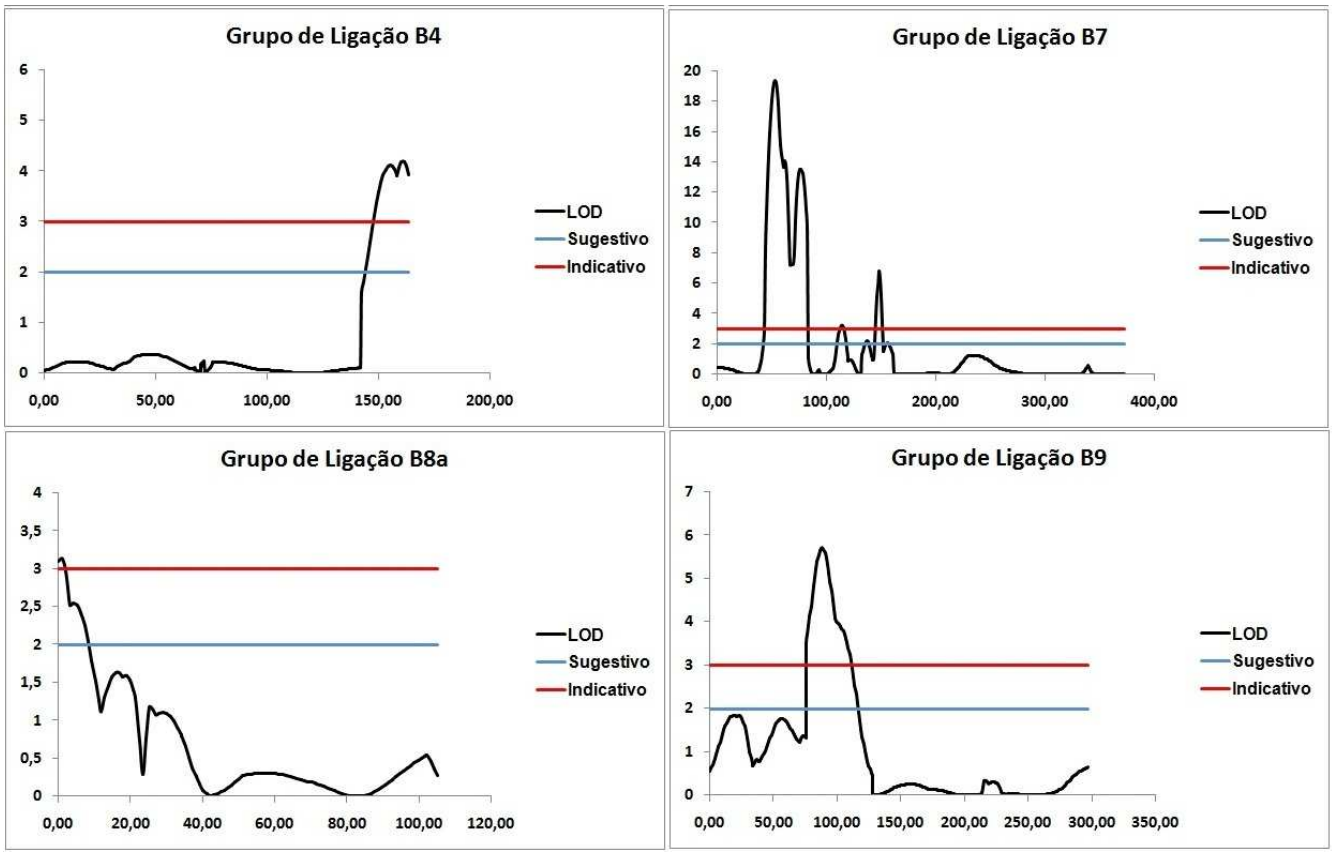


Figura 10. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 04 no mapa UC.

Os dois últimos QTL ATR20 e ATR22 foram observados, um no B8a com LODscore de 3,13 e explicando 2,07% da variação fenotípica e outro no B9, LODscore de 5,70 e explicando 7,72% da variação fenotípica, respectivamente. O ATR20 está a 1cM do IAC36 e a 2,2cM do marcador BM165. Já o QTL ATR22 está entre os marcadores PVBR168 e PVBR191. Todos os QTL da raça 04 tiveram alelo favorável para o genitor 'CAL 143'.

Segundo o *Core Map* (BIC, 2009), os locos de resistência mapeados no GL B4 são o *Co*-3, *Co*-9 e *Co*-10, no B7 os *Co*-5 e *Co*-6, no B8 apenas o loco *Co*-4 foi mapeado e no grupo de ligação B9, não foi mapeado até o momento nenhum loco de resistência à antracnose. Porém, todos os locos são do *pool* gênico Mesoamericano.

É importante ressaltar que, o 'CAL 143' tem como um dos genitores o 'AND277' (Andino). Sendo assim, é possível que a raça 04 (Andina) esteja relacionada um loco de resistência à antracnose ainda não mapeado. Gonçalves-Vidigal (2008; 2009) identificou dois novos locos de resistência à antracnose, *Co*-12 e *Co*-13, provenientes do cultivar Jalo Vermelho e Jalo Listras Pretas, respectivamente, relativos

ao *pool* gênico Andino que ainda não foram mapeados. Dessa forma, esses QTL mapeados no mapa UC podem ser o *Co*-12 e *Co*-13 encontrados pelo autor citado, ou é possível que se tenham identificado novos genes de resistência à antracnose para a raça 04.

RODRIGUEZ-SUÁREZ (2007) localizou genes específicos para seis raças de antracnose (6, 31, **38**, 39, 65 e 357) em feijão comum. Para a raça 38 foram encontrados dois genes, um no grupo de ligação B4 e outro no B11. Recentemente, um gene de resistência à antracnose designado provisoriamente *Co*-u, do *pool* gênico Mesoamericano, foi mapeado no GL B2, tal como no presente trabalho foi mapeado um QTL no GL B2 (GEFFROY et al., 2008). Além disso, CAMPA et al. (2009) avaliaram a resistência à antracnose em nove raças: 3, 6, 7, 31, **38**, 39, 102, 449 e 1545. Os autores encontraram no grupo de ligação B7 um *cluster* de genes que confere resistência às raças específicas 3, 6, 7, 31, **38**, 39, 102 e 449, junto a esse *cluster* inclui o gene *Co*-5.

No presente trabalho, foram encontrados quatro locos de resistência à antracnose para a raça 38 em três grupos de ligação, B2 (ATR6), B7 (ATR16 e ATR17) e no B9 (ATR21), explicando 11,98, 5,34, 7,30 e 5,98% da variação fenotípica, respectivamente (Figura 11). Os QTL mapeados para a raça 38 tiveram os alelos favoráveis para o genitor 'IAC-UNA' que é de origem do pool gênico Mesoamericano. O QTL ATR6 com LODscore de 8,17, explica aproximadamente 12% da variação fenotípica, que é um indício forte da presença de gene de resistência nesse grupo de ligação, como já visto por GEFFROY et al. (2008) com o loco *Co*-u. Esse loco mapeado (ATR6) está a 3,1 cM do marcador IAC255 mapeado no B2.

No GL B7, o loco de resistência ATR17 (LOD 6,06) está a 1,6cM do marcador BM210 e a 1,1cM do marcador BM185. O SSR BM210 está a 16,8cM do gene R^{38} mapeado por CAMPA et al. (2009). Esse fato mostra a robustez dos dados de fenotipagem e do mapa genético UC. O último loco relacionado à raça 38 é o ATR21 (LOD 3,74) localizado no GL B9 e que está a 9 cM do marcador IAC62. Em literatura, nenhum gene de resistência a antracnose foi mapeado até o momento no grupo de ligação B9.

Próximo do QTL ATR21 existe mapeado um QTL de resistência a crestamento bacteriano comum (*Core Map* – BIC, 2009). Como já visto por outros autores (GEFFROY, 2008; CAMPA et al., 2009; GEFFROY et al., 2009), genes de resistência a doenças tendem ficar em *clusters* ao longo do genoma.

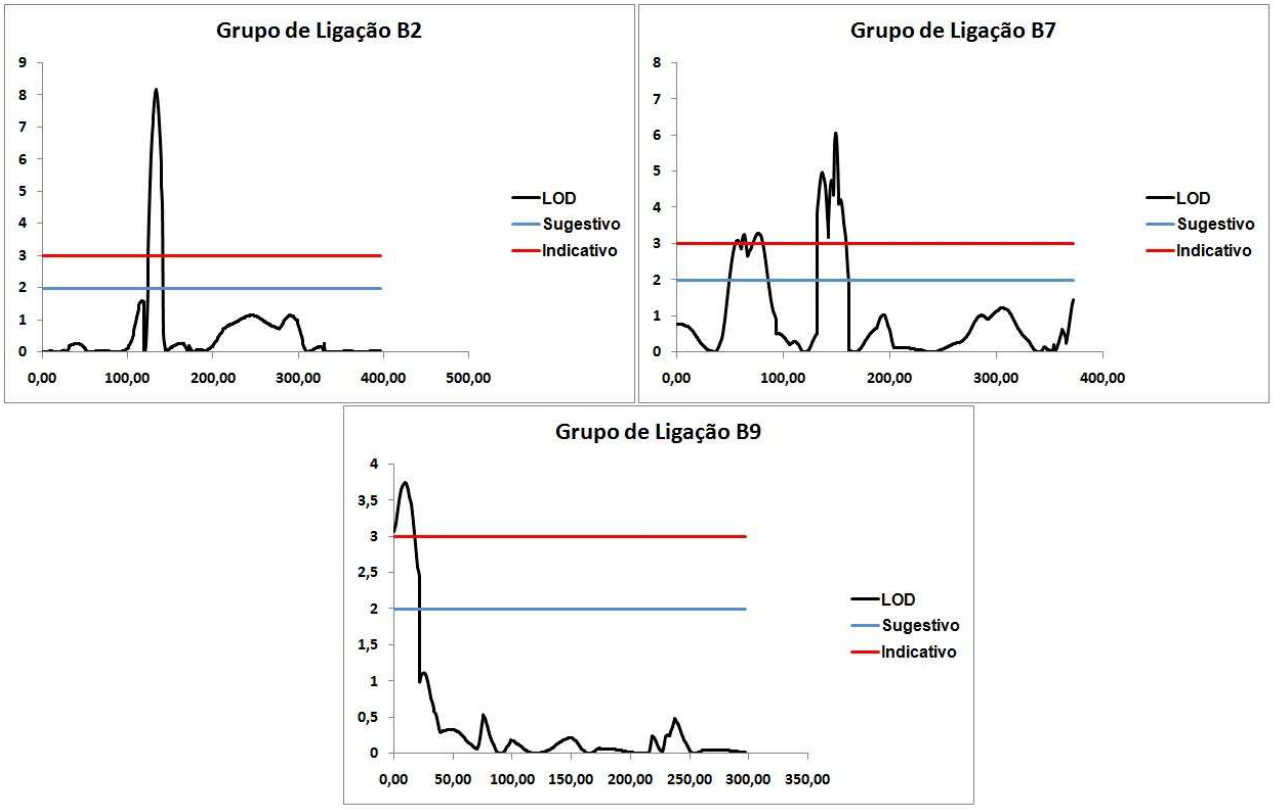


Figura 11. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 38 no mapa UC.

Para raça 55, foi possível mapear sete QTL; ATR2, ATR5, ATR8, ATR10, ATR13, ATR15 e ATR19, nos respectivos grupos de ligação B1, B2, B3, B5, B6, os dois últimos no GL B7 (Figura12). Cinco locos tiveram alelo favorável para o genitor 'IAC-UNA' de origem Mesoamericana (ATR2, ATR5, ATR13, ATR15 e ATR19); os outros dois locos (ATR8 e ATR10) apresentaram alelo favorável para o genitor 'CAL 143' do pool gênico Andino. Estes têm LODscore sugestivo (2,0 – 3,0). Ao todo, três locos tiveram LODscore superior a 3,0, dois (ATR15 e ATR19, com LODscore 7,22 e 8,14 respectivamente) estão localizados no B7 e um (ATR5, LODscore 7,56) no B2.

Os genótipos Cornell 49-242 (*Co*-2 – B11), México (*Co*-3 – B4), TO (*Co*-4 – B8), G233 (*Co*-4^2 – B8), PI 207262 (*Co*-4^3 – B8 e *Co*-9 – B4), TU (*Co*-5 – B7) e AB 136 (*Co*-6 – B7) (BALARDIN et al., 1997; KELLY & VALLEJOS, 2004; ALZATE-MARIN et al., 2007; BERALDO, 2007; BIC, 2009) são resistentes a raça 55.

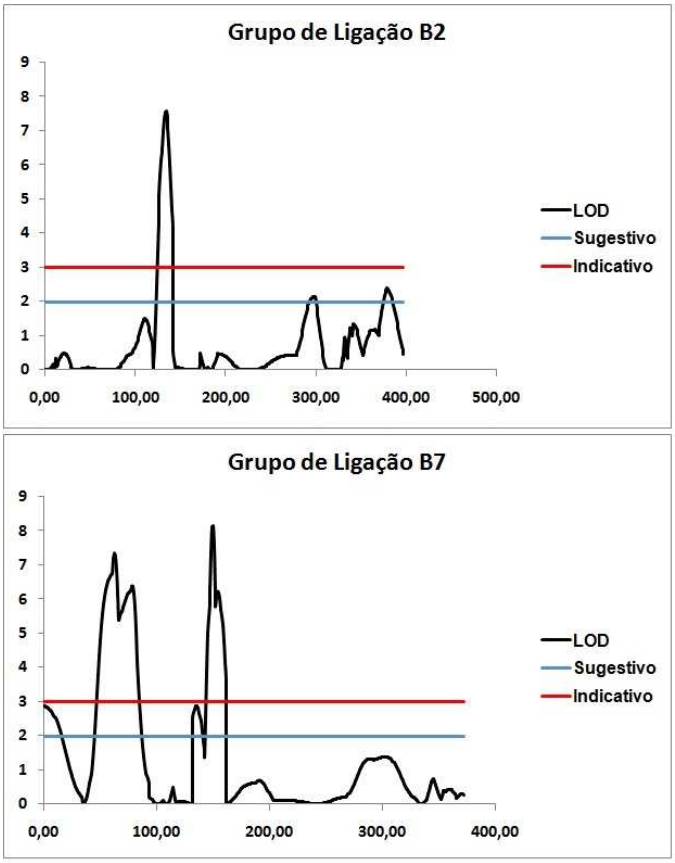


Figura 12. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 55 no mapa UC.

O QTL ATR5 a 4 cM do marcador IAC255, explica 10,45% da variação do fenótipo e está mapeado na mesma região do ATR6 (raça 38). Como os dois QTL têm alelo favorável para o pool gênico Mesoamericano e encontram-se posicionados na mesma região do GL B2 acredita-se que possam ser o mesmo gene. Sendo assim, o único loco mapeado no grupo de ligação B2 é o *Co*-u (GEFFROY, 2008), portando a raça 38 e 55 pode ter disparado gene de resistência comum à antracnose. Ou ainda, podem ser genes diferentes para cada raça (38 e 55) que estão ligados. Os dois locos mapeados no B7, ATR15 e ATR19 explicam 8,26 e 8,61% da variação fenotípica encontrada. O ATR15 está a 2,7cM do marcador IAC 239 e a 3cM do PVM40, já o ATR19 têm três marcadores próximos o BM185 (2,1cM), FJ44 (2,1cM) e o BM210 (2,6cM). Como a raça 55 é resistente ao genótipo TU e AB 136 portador do gene *Co*-5 e *Co*-6, respectivamente, ambos mapeados no grupo de ligação B7, isto sugere que os QTL mapeados no B7 para essa raça podem ser os genes *Co*-5 e *Co*-6.

Assim sendo, a raça 38 também teve dois QTL (ATR16 e ATR17) mapeados na mesma região dos encontrados na raça 55, mostrando que a raça 38 também é resistente

aos genótipos TU e AB 136, e os QTL mapeados na raça 38 podem corresponder aos genes *Co*-5 e *Co*-6.

GEFFROY (2008) sugere que no final do grupo de ligação B2 exista um *cluster* de genes de resistência. Esse fenômeno também foi observado, em outro trabalho do mesmo autor (GEFFROY et al., 2009), onde este sugere que existam dois blocos distintos de fonte de resistência (genes R) para diversos patógenos (fungo, bactéria, vírus, etc.) localizados no GL B4. No presente trabalho, foi possível constatar resultados semelhantes no grupo de ligação B7, já que as raças 04, 38 e 55 tiveram QTL mapeados em duas regiões distintas do GL B7 separadas em grupo 1 (ATR14, ATR15 e ATR16) e grupo 2 (ATR17, ATR18, ATR19) (Figura 13).

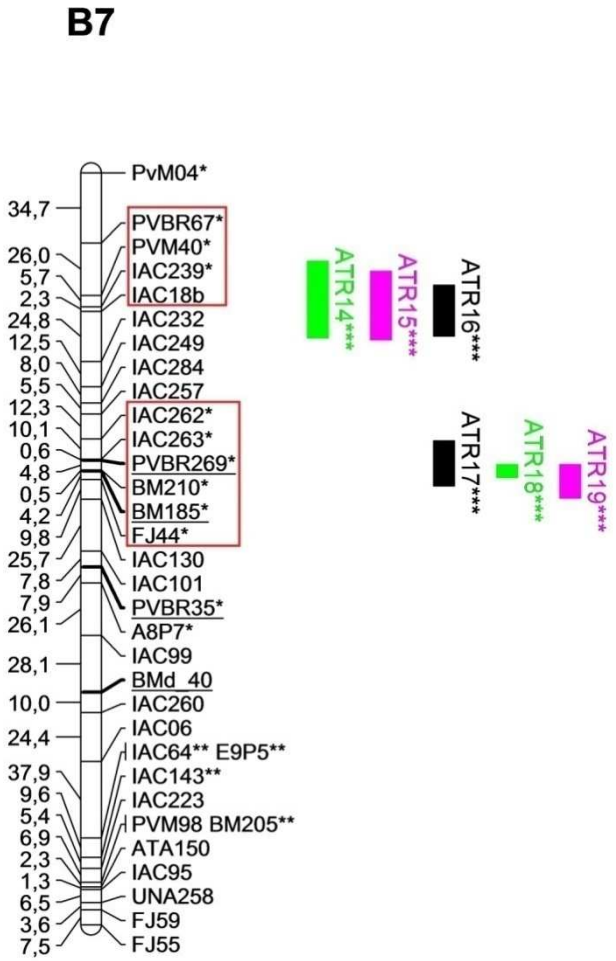


Figura 13. Grupo de ligação B7 do mapa genético UC, em evidencia (caixa vermelha) os dois blocos de resistência. Lado direito os QTL mapeados, em verde raça 04, preto raça 38 e rosa raça 55. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). (***) QTL com LODscore maior que 3.

A raça 2041 apresentou sintomas da doença apenas na repetição quatro, isso pode ter acontecido devido à esporulação baixa do fungo, ou baixa concentração do preparado do fungo para inoculação. Portanto, a identificação de locos de resistência foi comprometida. Contudo, foram identificados cinco QTL (ATR1, ATR3, ATR11, ATR12, ATR23), sendo três com LODscore maior que 3,0 (ATR3, ATR11 e ATR23) (Figura 14).

A variação fenotípica explicada do loco de resistência encontrado no grupo de ligação B1 (ATR3) foi de 3,45% e LOD 3,03 e o alelo fornecido é do genitor 'IAC-UNA' (Mesoamericano). O microssatélite PVBR139 está a 5 cM do QTL ATR1. Esta raça mapeou mais dois QTL, um no GL B5 (ATR11) com LODscore de 4,06, e outro no GL B9 (ATR23) com LODscore de 3,87, explicado 5,22 e 14,23% do fenótipo associado a resistência, respectivamente. Ambos QTL tiveram alelo favorável para o genótipo 'CAL 143' (Andino). De acordo com o *Core Map* (BIC, 2009), o único loco de resistência à antracnose do *pool* gênico Andino, mapeado até o momento foi o *Co*-1 no B1, sugerindo que novos genes de resistência foram mapeados na população UC.

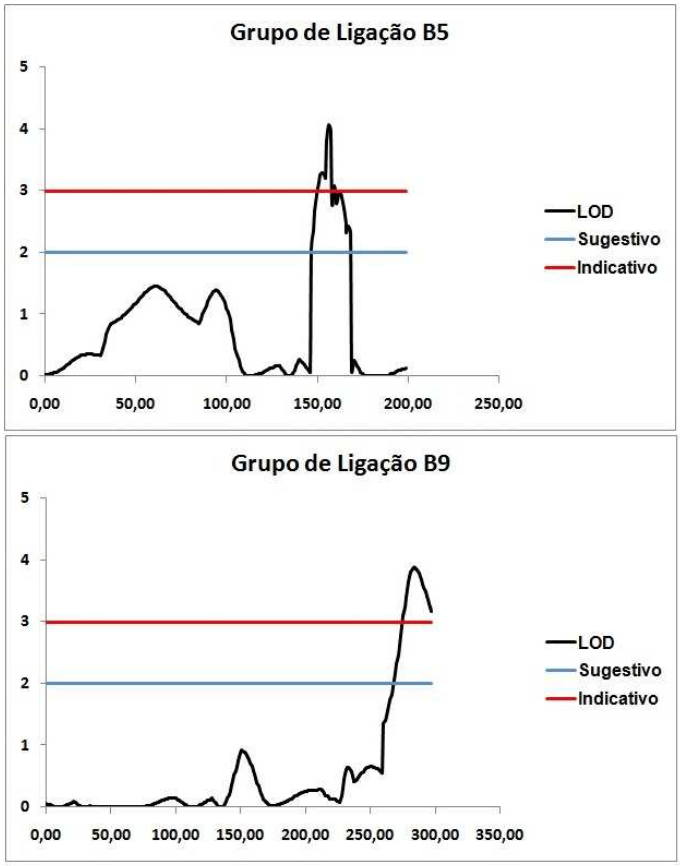


Figura 14. Gráficos dos valores de LODscore encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTL de resistência à antracnose raça 2041 no mapa UC.

No total, vinte e três QTL foram obtidos relativos à resistência à antracnose, nomeados de ATR1 à ATR23 (Tabela 5). Sete QTL referentes às raças 04 e 55 foram localizados, sendo dois QTL localizados no GL B7; quatro QTL para a raça 38, com dois QTL no GL B7 e cinco QTL encontrados na raça 2041, com dois locos no GL B1 (Tabela 6).

A variação fenotípica explicada variou de 1,8%, com o ATR13 (raça 55), localizado no grupo B6, a 32,86%, com o ATR14 (raça 04), localizado no GL B7. Os LODscore indicativos, ou seja, maiores que 3,0 variaram de 3,03 para o ATR3 (raça 2041) no GL B1 a 19,37 no GL B7 para o loco ATR14 (raça 04). No total, foram encontrados quinze locos de resistência com LODscore maior que 3,0 e oito com LODscores com valores entre 2,0 e 3,0 (Figura 15A e 15B).

Estes resultados, obtidos por todas as raças (04, 38, 55 e 2041), indicam o controle de vários genes na resistência à antracnose. Alguns QTL revelaram efeito de um gene maior e raça – específico, indicando resistência vertical. Enquanto, outros QTL foram comuns a mais de uma raça evidenciando genes ligados a resistência horizontal,

de herança poligênica. GEFFROY et al. (2000) sugeriram que a resistência à antracnose tenha herança poligênica. O feijão apresenta níveis diferentes de infecção a doença no caule e na folha, indicando a ação de muitos genes no processo de resistência/suscetibilidade, como observado também por GEFFROY et al. (2000) e ALZATE-MARIN et al. (2009).

A resistência genética de plantas cultivadas vem sendo cada vez mais estudada, uma vez que sua manipulação é a mais apropriada e segura, através da introgressão de genes por seleção assistida por marcadores, visando a piramidação de genes de resistência à antracnose e outras características desejáveis, garantido assim a resistência genética almejada. Por muitos anos, os cultivares de feijão vêm sendo estudados à procura de resistência genética à antracnose, e muitos já foram identificados (MÉNDEZ-VIGO, 2005; GARZON et al., 2008; GEFFROY et al., 2008; RAGAGNIN et al., 2009). A principal estratégia usada nesta busca é através da identificação de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, pois esta estratégia é rápida e confiável, já que não depende da interação com ambiente (ARUS & MORENO-GONZÁLEZ, 1993).

Desta forma, o presente trabalho irá contribuir não só para o melhoramento da cultura do feijoeiro, disponibilizando um maior número de marcadores ligados a genes de resistência à antracnose, como também para melhor compreensão dos mecanismos de interação patógeno - hospedeiro, agregando novas informações ao entendimento do tipo de interações entre os genes envolvidos na resistência à antracnose. Inclusive, a identificação de marcadores ligados a estes genes possibilitará estudo futuros como seleção assistida por marcadores moleculares, mapeamento fino, ou ainda clonagem posicional, caracterização dos genes contidos nos locos de resistência, e obtenção de cultivares elites melhoradas por engenharia genética.

Com isso, o programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico (IAC – Campinas, SP) poderá incorporar novos genes associados à resistência a antracnose em cultivares elites, evitando ou diminuindo o uso de agrotóxicos e permitindo a melhora do produto final.

Tabela 5. Descrição dos QTL para resistência à antracnose, encontrados via análise de Mapeamento por Intervalo Composto (CIM), utilizando o mapa genético UC saturado. Os QTL identificados foram nomeados de ATR1 à ATR23. Foram descritos o intervalo no mapa e a posição do pico dos gráficos de cada QTL (cM), em seus respectivos grupos de ligação. O LODscore de cada pico, efeitos aditivos e efeitos na variância fenotípica (R^2) de cada QTL também foram apresentados. Em negrito, estão os QTL com LODsore maior que 3,0.

Raça	Grupo de Ligação	Loco de Resistência	Intervalo	Posição (cM)	LOD	Efeito aditivo	R^2 (%)
04	B1	ATR4	IAC76-IAC259	241,24	2,17	1,12	1,40
04	B2	ATR7	IAC57-DROUGH	329,20	2,30	1,18	1,50
04	**B4**	**ATR9**	**IAC66-UNA261**	**161,29**	**4,18**	**1,15**	**2,80**
04	**B7**	**ATR14**	**PVBR67-IAC18**	**52,76**	**19,37**	**1,18**	**32,86**
04	**B7**	**ATR18**	**PVBR269-BM185**	**147,91**	**6,78**	**1,31**	**4,36**
04	**B8a**	**ATR20**	**IAC36-BM165**	**1,01**	**3,13**	**1,13**	**2,07**
04	**B9**	**ATR22**	**PVBR168-PVBR191**	**88,45**	**5,70**	**1,26**	**7,72**
38	**B2**	**ATR6**	**IAC240-IAC255**	**132,72**	**8,17**	**-87,71**	**11,98**
38	**B7**	**ATR16**	**PVBR67-IAC18**	**56,76**	**3,08**	**-138,88**	**5,34**
38	**B7**	**ATR17**	**IAC262-FJ44**	**148,91**	**6,06**	**-113,63**	**7,30**
38	**B9**	**ATR21**	**IAC62**	**9,01**	**3,74**	**-140,84**	**5,98**
55	B1	ATR2	PRBR251-PVM75	24,03	2,72	-9,95	30,72
55	**B2**	**ATR5**	**IAC240-IAC255**	**133,72**	**7,56**	**-6,57**	**10,45**
55	B3	ATR8	E8J6-PVBR235	11,11	2,69	9,44	3,42
55	B5	ATR10	IAC289-IAC264	149,60	2,27	10,84	1,85
55	B6	ATR13	IAC268-IAC276	149,74	2,21	-10,91	1,80
55	**B7**	**ATR15**	**PVBR67-IAC18**	**63,72**	**7,22**	**-7,08**	**8,26**
55	**B7**	**ATR19**	**PVBR269-FJ44**	**149,91**	**8,14**	**-6,93**	**8,61**
2041	B1	ATR1	PVBR251-PVM75	16,01	2,53	175,43	4,72
2041	**B1**	**ATR3**	**IAC21-ATA3**	**189,17**	**3,03**	**-196,07**	**3,45**
2041	**B5**	**ATR11**	**IAC264-IAC279**	**156,14**	**4,06**	**158,73**	**5,22**
2041	B6	ATR12	PVBR5-PVM21	61,44	2,72	-178,57	4,37
2041	**B9**	**ATR23**	**IAC242**	**283,53**	**3,87**	**101,01**	**14,23**

Tabela 6. Descrição dos QTL para resistência à antracnose separados por raça (04, 38, 55, 2041) e seus respectivos grupos de ligação (GL). (*) QTL com LODscore maior que 3,0.

GL	QTL Raça 04	QTL Raça 38	QTL Raça 55	QTL Raça 2041
B1	ATR4	-	ATR2	ATR1 ATR3*
B2	ATR7	ATR6*	ATR5*	-
B3	-	-	ATR8	-
B4	ATR9*	-	-	-
B5	-	-	ATR10	ATR11*
B6	-	-	ATR13	ATR12
B7	ATR14* ATR18*	ATR16* ATR17*	ATR15* ATR19*	-
B8a	ATR20*	-	-	-
B8b	-	-	-	-
B9	ATR22*	ATR21*	-	ATR23*
B10	-	-	-	-
B11	-	-	-	-

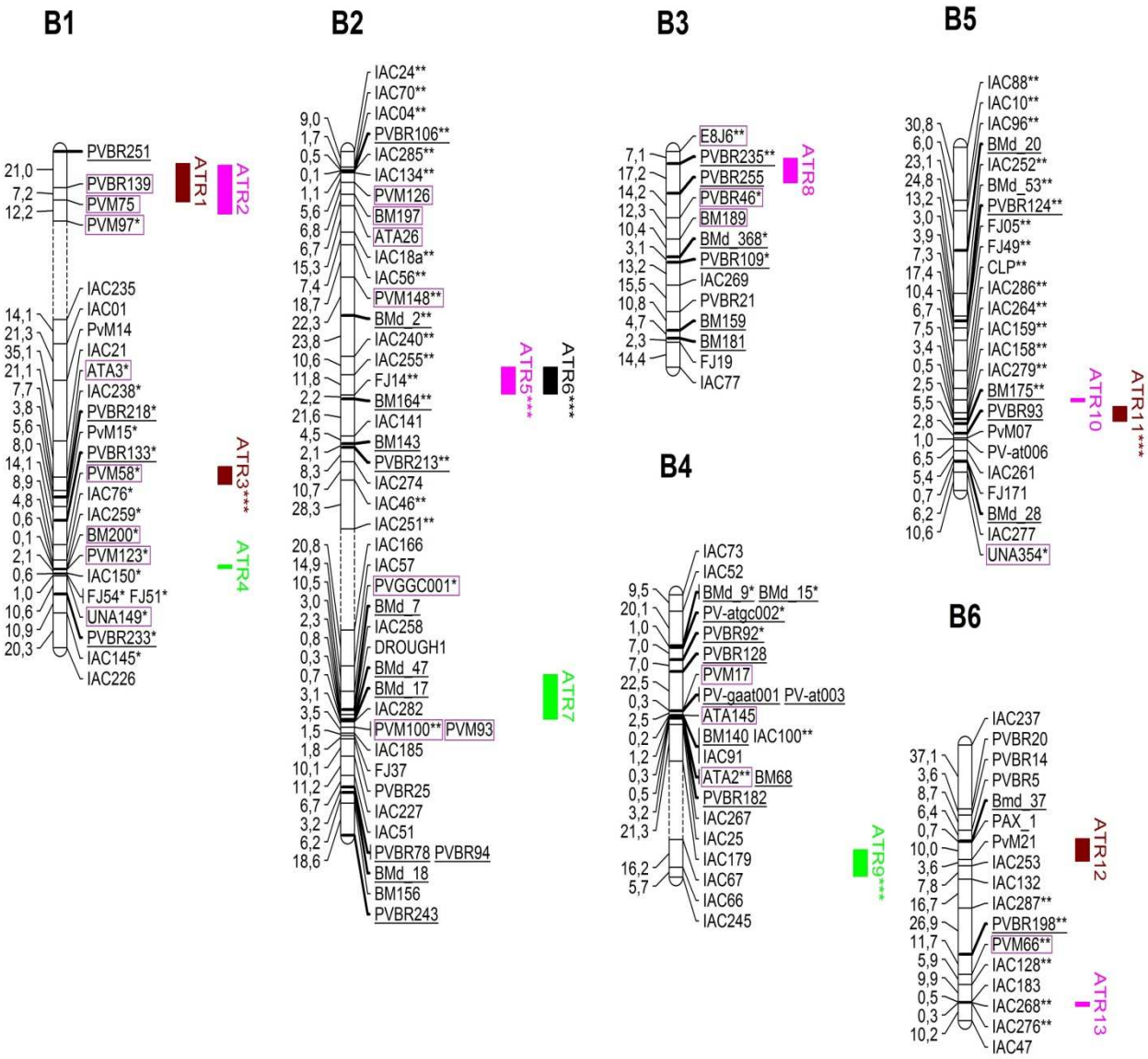


Figura 15A. Mapa genético UC saturado, SSRs integrados estão destacados em caixa, mostrando a localização dos vinte e três QTL (ATR1 a ATR23) encontrados para resistência à antracnose. Os QTL em verde são derivados da raça 04. Os QTL em preto são derivados da raça 38. Os QTL em rosa são derivados da raça 55. Os QTL em vermelho referentes a raça 2041. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). (***) QTL com LODscore maior que 3.

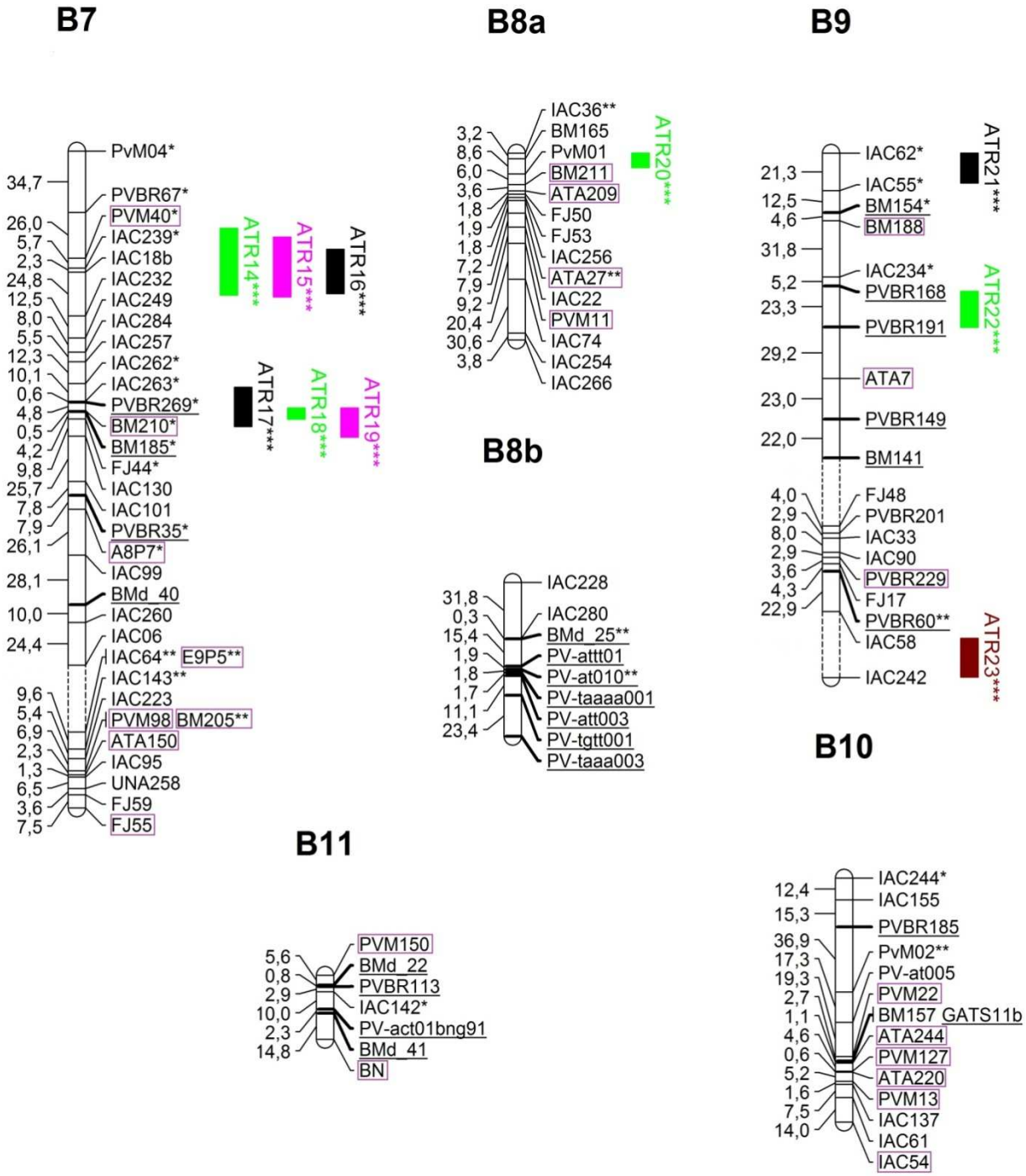


Figura 15B. Mapa genético UC saturado, SSRs integrados estão destacados em caixa, mostrando a localização dos vinte e três QTL (ATR1 a ATR23) encontrados para resistência à antracnose. Os QTL em verde são derivados da raça 04. Os QTL em preto são derivados da raça 38. Os QTL em rosa são derivados da raça 55. Os QTL em vermelho referentes a raça 2041. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). (***) QTL com LODscore maior que 3.

5 CONCLUSÕES

O mapa genético ‘IAC-UNA’ x ‘CAL 143’ (UC) foi saturado e genes/QTL para resistência à antracnose (raças 04, 38, 55 e 2041) foram mapeados.

Os microssatélites mapeados tiveram distribuição homogênea no genoma do feijoeiro, tendo sido posicionados em todos os grupos de ligação.

Genes de efeito maior, raça – específico, foram identificados para algumas raças (04 e 2041). QTL comuns as raças (04, 38 e 55) de antracnose foram identificados, sugerindo que estão atuando tanto em mecanismos gene a gene, raça especifico (genes R) como QRL (*Quantitative Resistance Loci*) de ação basal em resposta à doenças.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON A., SÉVIGNAC M., DRON M. (1994) A Genetic Map of Common Bean to Localize Specific Resistance Genes Against Anthracnose. **Genome** 37:915-924.

ALZATE-MARIN A.L, SCHUSTER I., MOREIRA M.A., BARROS E.G. Association of Dominant and Recessive Genes Confers Anthracnose Resistance in Stem and Leaves of Common Bean. **J. Phytopathology**, v.157, p.70–72, 2009.

ALZATE-MARIN A.L., CERVIGNI G.D.L., MOREIRA M.A., BARROS E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.

ALZATE-MARIN, A.L.; DE BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Co-evolution model of Colletotrichum lindemuthianum (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 115-118, 1999.

ALZATE-MARIN, AL.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.M.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-43* and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262), **Euphytica**, v. 154, p. 1-8, 2007.

ANAND, T. & BHASKARAN, R. Exploitation of plant products and bioagents for ecofriendly management of chilli fruit rot disease. **Journal of Plant Protection Research**, v.49, n. 2, 2009

ANAND, T.; CHANDRASEKARAN, A.; KUTTALAM, S.; SENTHILRAJA, G.; SAMIYAPPAN, R. Integrated control of fruit rot and powdery mildew of chilli using the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* and a chemical fungicide. **Biological Control**, v.52, p. 1–7, 2010.

ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 464-474, 1999.

ARIYARATHNE H.M., COYNE D.P., JUNG G., SKROCH P.W., VIDAVER J.R., STEADMAN A.K., MIKLAS P.N., BASSET M.J. Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. **Journal of the American Society of Horticultural Science,** v. 124, p. 654-662, 1999.

ARUMUGANATHAM K. & EARLE E.D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry **Plant Molecular Biology Report**, v. 9, n. 3, p. 229-241, 1991.

ARUS P. & MORENO-GONZÁLEZ J. Marker–assisted selection. In: HAYWARD M.D., BOSEMARK N.O., ROMAGOSA I. (Eds) **Plant breeding: Principles and Prospects**. Plant breeding series, Chapman and Hall, 1993, v. 1, p. 314–331.

BAI Y., MICHAELS T.E., PAULS K.P. Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Genome,** v. 40, p. 544-551, 1997.

BALARDIN, R.S. & KELLY, J.D. Interaction between races of Colletotrichum lindemuthianum and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris* L. **Genome,** v. 40, p. 544-551, 1998.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, v.87, p.1184-1191, 1997.

BALBI B.P., SANGLARD D.A., DAMASCENO J.D., BARROS E.G., MOREIRA M.A. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares na Obtenção de Genótipos de Feijoeiro Resistentes à Mancha Angular. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética – SBG**,** 2006, Resumo em CD-ROM.

BASSET M.J. A revised linkage map of common bean. **HortScience,** v. 26, p. 834-836, 1991.

BASTEN C.J., WEIR B.S., ZENG Z.B. 2005. QTL cartographer version 1.17: a reference manual and tutorial for QTL mapping. Raleigh, USA: North Carolina State University.

BENCHIMOL L.L., CAMPOS T., CARBONELL S.A.M., COLOMBO C., CHIORATTO A.F., FORMIGHIERI E.F., GOUVÊA L.R.L., SOUZA A.P. Structure of genetic diversity among commom bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 3, p.1747-1762, 2007.

BENJAMINI Y. & HOCHBERG Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society,** v.7, n. 1, p. 289-300, 1995.

BERALDO A.L.A. Utilização de *SCARs* para avaliação de genes de resistência à antracnose em feijoeiro. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.

BIC - Bean Improvement Cooperative - Michigan State University. http://www.css.msu.edu/bic/

BLAIR M. W., BUENDÍA H. F., GIRALDO M. C., MÉTAIS I., PELTIER D. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics,** v.118, p. 91–103, 2008.

BLAIR M.W., PEDRAZA F., BUEDIA H.F., GAITÁN-SOLÍS E., BEEBE S.E., GEPTS P., TOHME J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics,** v. 107, p. 1362-1374, 2003.
BLAIR M.W., RODRIGUEZ P.L.M., PEDRAZA F., MORALES F., BEEBE S. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm*-1 and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics,** v. 114, n. 2, p. 261-271, 2007.

BLAIR(a) M.W., GIRALDO M.C., BUENDÍA H.F., TOVAR E., DUQUE M.C., BEEBE S.E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 100–109, 2006.

BLAIR(b) M.W., IRIARTE G., BEEBE S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1149–1163, 2006.

BLAIR, M.W.; TORRES, M.M.; GIRALDO, M.C.; PEDRAZA, F. Development and diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v, 9, p. 100, 2009.

BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; BRONKEN, E.P.; POMPANON, F. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**, v. 13 p. 3261-3273, 2004.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 2.ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BORÉM, A. & CAIXETA, T. Marcadores Moleculares. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics,** v. 32, p. 314-331, 1980.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.W.; BEEBE, S. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

BUSO, G.S.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris.* **Molecular Ecology**, v.6, p. 252-254, 2006.

BUTCHER, P. A.; WILLIAMS, E. R.; WHITAKER, D.; LING, S.; SPEED, T. P.; MORAN, G. F. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees: an example from Acacia mangium. **Theor and Applied Genetics,** Berlin, v. 104, p. 1185-1191, 2002.

CAIXETA E.T., BORÉM A., KELLY J.D. Development of microsatellite markers based on BAC common bean clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p.125-133, 2005.

CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDRK and TU. **Theor Appl Genet**, v.119, p.1–11, 2009.

CAMPOS, T.; OBLESSUC, P.R.; SFORÇA, D.A.; CARDOSO, J.M.K.; BARONI, R.M.; SOUSA, A.C.B.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; RUBIANO, L.L.B.; SOUZA, A.P. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, em submissão, 2010.

CAMPOS, T. Desenvolvimento de marcadores microssatélites, mapeamento genético e mapeamento de características qualitativas em feijoeiro (*Phaseulos vulgaris* L.). 2009. 138f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Instituto de Biologia – UNICAMP, Campinas.

CAMPOS, T.; BENCHIMOL, L. L.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; SOUZA A. P. Microssatélites para estudos genéticos e programas de melhoramento em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n. 4, p. 589-592, 2007.

CARBONELL, S.M.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A.L.L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.1, p.60-65, 1999.

CARDOSO, J.M.K.; OBLESSUC, P.R.; DE CAMPOS, T.; SFORÇA, D.A.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGHIERI, E.F.; SOUZA, A. P.; BENCHIMOL, L. L. New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 929-936, 2008.

CARNEIRO, M.S. & VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p.89-100, 2002.

CHECA, O. E. & BLAIR, M. W. Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biomedical and Life Sciences**, v. 22, n. 2, p. 201-215, 2008.

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; MOURA, R. R. DE, ITO M. F., COLOMBO C. A. Co-evolução entre raças fisiológicas de colletotrichum lindemuthianum e feijoeiro. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 381-388, 2006.

CONAB COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, http://www.conab.gov.br/conabweb, acessado em janeiro de 2010.

CORRÊA, R.X.; PEDRO, I.V.; OLIVEIRA, M.L.P.; NIETSCHE, S.; MOREIRA, M.; BARROS, E.G. Herança da resistência a mancha angular do feijoeiro e a identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 27-32, 2001.

CRESTE, S; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphism in denaturating Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesq. agropec. bras**., v.34, n.9, p.1545-1555, 1999.

DAVID, L.S.; SCOTT, L.S.; STEPHEN C. R. An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. **BioTechniques**, v. 15, n. 4, p. 580-582, 1993.

DEBOUKC, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of Phaseolus vulgaris in northwestren South América. **Economy Botanic**, v. 47, p. 408-423, 1993.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira,** v. 28, p.59-66, 2003.

FLINT-GARCIA, S.A. & THORNSBERRY, J.M. Sructure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Reviews in Plant Biology,** v. 54, p. 357-374, 2003.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology,** v.19, p.125-188, 1971.

FREYRE, C.I.; SKROCH, P.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.; LLACA, V.; NODARI, R.; PEREIRA, P.; TSAI, S.M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean 4 Development of a core map and alignment of RFLP maps**. Theor. Appl. Genet**, v. 97, p. 847-856, 1998.

FUKINO, N.; OHARA, T.; MONFORTE, A.J.; SUGIYAMA, M.; SAKATA, Y.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO, S. Indentification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery reistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). **Theor Appl Genet**, v.118, p. 165–175, 2008.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M.C.; EDWARDS, K.J.; TOHME, J. Microsatellite in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in - *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, v. 42, p. 2128-2136, 2002.

GARZÓN, L.N.; LIGARRETO, A.; BLAIR, M.W. Molecular marker-assisted backcrossing of anthracnose resistance into andean climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Science**, v. 48, p. 562–570, 2008.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; OLIVEIRA, J. C. F.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; THOQUET, P.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; DRON, M. Inheritance of Partial Resistance Against Colletotrichum lindemuthianum in Phaseolus vulgaris and Co-localization of Quantitative Trait Loci with Genes Involved in Specific Resistance. **The American Phytopathological Society**, v.13, n. 3, p. 287–296, 2000.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; BILLANT, P.; BRON, M.; LANGIN, T. Resistance to *Colletotrichum lindemutchianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes**. Theor. Appl. Genet**, v. 116, p. 407-415, 2008.

GEFFROY, V.; MACADRÉ, C,; DAVID, P.; PEDROSA-HARAND, A.; SÉVIGNAC, M.; DAUGA, C.; LANGIN, T. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site – leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 181, p. 405–419, 2009.

GEFFROY, V.; SICARD, D.; DE OLIVEIR, J.C.F.; SÉVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of ancestral resistance gene cluster involved in the co-evolution process between Phaseolus vulgaris and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 74-84, 1999.

GEPTS, P., BEAVIS, W.D., BRUMMER, E.C., SHOEMAKER, R.C. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiol**, v. 137, p. 1228-1235, 2005.

GEPTS, P.L. & DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Common Beans: Research for crop improvement. Cali – Colombia. CIAT, p.7-53, 1991.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (Phaseolus vulgaris) from Colombia. **Economy Botanic**, v. 40, p. 469-478, 1986.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (Phaseolus vulgaris L.). In: Van Schoonhoven A., Voysest, O. Common bean: research for crop improvement. CIAT, Cali, Colombia ,v. 1, p. 7-53, 1985.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. & KELLY, J.D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, p. 411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO, P.S. A new gene conferring resistance to anthracnose in andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar "Jalo Vermelho". **Plant Breeding**, v.127, p. 592-596, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, v. 49, p. 133-138, 2009.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p. 1121-1137, 1994.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRI-MAP.** Saint Louis: Washington University School of Medicine. 1990. Disponível em: <http://linkage.rockfeller.edu/soft/crimap/>

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **An introduction to genetic analysis**. New York: W. H. Freeman, 2006. 720p.

GRISI, M.C.M.; BLAIR, M.W.; GEPTS, P.; BRONDANI, C.; PEREIRA, P.A.A.; BRONDANI, R.P.V. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Ressearch**, v. 6, n. 3, p. 691-706, 2007.

GUERRA, R.R.; RAMISEZ-RUEDER, M.T.; DE LA VEGA, M.; SIMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates Mexico. **Plant Pathol**, v. 52, p. 228–35, 2003.

GUERRA-SANZ, J.M. New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. **Plant Breeding**, v.123, p. 87-89, 2004.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics,** v.8, p. 299-309, 1919.

HANAI, L.R. Desenvolvimento de marcadores SSR-EST e construção de mapas genéticos em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). 2008. 120f. Tese de Doutorado – Biblioteca Central Esalq, Piracicaba,

HANAI, L. R.; CAMPOS, T.; CAMARGO L. E. A.; . BENCHIMOL; L.L; SOUZA A. P.; MELOTTO M.; CARBONELL S. A. M.; CHIORATTO A. F.; CONSOLI L.; FORMIGUERI E. F.; SIQUEIRA M. V. B. M.; MUI TSAI S.; VIEIRA M. L. C. Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, 50: 266-277, 2007.

HOFFMAN, J.I. & AMOS, W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. **Molecular Ecology**, v.14 p.599-612, 2005.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico DF: CIMMYT, 1994.

INAZUKA, M.; TAHIRA, T.; HAYASHI, K. One-tube post-PCR fluorescent labeling of DNA fragments. **Genome Resources**, v. 6, p. 551-557, 1996.

IWATA, H.; NINOMIYA, S. AntMap: Constructing Genetic Linkage Maps Using an Ant Colony Optimization Algorithm. **Breeding Science,** Tokyo, v. 56, p. 371-377, 2006.

JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Res** 29: E25, 2001.

JANSEN, R.C. & STAM, P. High Resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics** 136:1447-1455, 1994.

JUNG, G.; COYNE, D.P.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; BOKOSI, J.M.; STEADMAN, J.R. RAPD marker linked to a gene for specific rust resistance in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative,** v.39, p.59-60, 1996.

KAO, C.H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics,** v.152, p.1203-1216, 1999.

KELLY, J.D. & VALLEJO, V.A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, p. 1196-1207, 2004.

KELLY, J.D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P.N.; COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crop Research,** v. 82, n. 2-3, p. 135-154, 2003.

KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild Phaseolus vulgaris: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 809-817, 1989.

KOENIG, R.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (Phaseolus vulgaris, Fabaceae). **Economy Botanic**, v. 44, p.50–60, 1990.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombinant values. **Annals of Eugenics,** v. 12, p. 172-175, 1944.

KRISHNA, G.K.K.; ZHANG, J.; BUROW, M.; PITTMAN, R.N.; DELIKOSTADINOV, S.G.; YINGZHI, L.; PUPPALA, N. Genetic Diversity Analysis in Valencia Peanut (*Arachis hypogaea* L.) using Microsatellite Marker. **Cellular & Molecular Biology letters**, v. 9, p. 685-697 , 2004.

KWAK, M.; VELASCO, D.; GEPTS, P. Mapping Homologous Sequences for Determinacy and Photoperiod Sensitivity in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Heredity**, v.99, n. 3, p. 283-291, 2008.

LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics,** v. 121, p.185-199, 1989.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics,** v.1, p.174-181, 1987.

LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. **Constructing genetic maps with Mapmaker Exp 3.0.** Cambridge: Whitehead Institute for Biometrical Research,1992, 230p.

LIU B.H. **Statistical Genomics**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1998, p.630.

LIU, B. H.; KNAPP, S. J. GMENDEL, a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny population using log-likelihooh ratios. **Journal of Heredity,** Washington, v. 8, p. 407-418, 1992.

LYNCH, M. & WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998, 980p.

MAHUKU, G.S. & RIASCOS J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **Eur. J. Plant Path**, v. 110, p. 253-263, 2004.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas,** Lund, v. 144, p. 78-79, 2007.

MASI, P.; SPA, P.L.; GNOLETTI ZEULI; DONINI, P. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Molecular Breeding**, v. 11, p. 303–313, 2003.

MATISE, T. C.; PERLIN, M.; CHAKRAVARTI, A. Automated construction of genetic-linkage maps using an expert-system (MULTIMAP) - a human genome linkage map. **Nature Genetics,** New York, v. 6, p. 384-390, 1994.

MAXWELL, J.J.; BRICK, M.A.; BYRNE, P.F.; SCHWARTZ, H.F.; SHAN, X.; OGG, J.B.; HENSEN, R.A. Quantitative Trait Loci Linked to White Mold Resistance in Common Bean. **Crop Breeding & Genetics,** v. 47, p. 2285-2294, 2007.

MÉNDEZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PÃNEDA, A.; FERREIRA, J. J.; GIRALDEZ, R. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, v. 141, p. 237–245, 2005.

MÉTAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.1346-1352, 2002.

METZGAR, M.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, v. 10, p. 72-80, 2000.

MIKLAS P.N. Marker assisted selection for disease resistance in common bean**. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative,** p. 1-3, 2002.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, n. 1-2, p.105-131, 2006.

MIKLAS(b) P.N.; GRUNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science,** v. 46, p. 910-916. 2006.

MISSIAGGIA, A. & GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 72-78, 2006.

MOLLINARI, M. **Comparação de algoritmos usados na construção de mapas genéticos**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194-200, 2002.

MULLIS, K. & FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction**. Methods Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

MURRAY, J.; LARSEN, J.; MICHAELS, T.E.; SCHAAFSMA, A.; VALLEJOS, C.E.; PAULS, K.P. Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. **Genome,** v. 45, p. 1013–1024, 2002.

MUTLU, N.; MIKLAS, P.N.; COYNE, D.P. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. **Molecular Breeding,** v. 17, n. 2, p. 127-135. 2006.

NAMAYANJA, A.; BURUCHARA, R.; MAHUKU, G.; RUBAIHAYO, P.; KIMANI, P.; MAYANJA, S.; EYEDU, H. Enheritance of resistance to angular leaf spot in common bean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection outside the mapping population. **Euphytica,** v. 151, n. 3, p. 361-369, 2006.

NELSON, J. C. QGENE: Software for marker-based genome analysis and breeding. **Molecular Breeding,** v. 3, p. 239-245, 1997.

O'DONNELL, K.H.;CHEN, C.T.; WENSINK, C. Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha1 tubulin gene. **Molecular and Cell Biology**, v. 14, p. 6398-6408, 1994.

OBLESSUC, P.R. Mapeamento genético da resistência à mancha angular em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*). 2009. 112f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Instituto de Biologia – UNICAMP, Campinas.

OETTING, W.S.; LEE, H.K.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics**, v. 30, p. 450-458, 1995.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PADDER, B.A.; SHARMA, P.N.; SHARMA, O.P.; KAPOOR, V. Genetic diversity and gene flow estimates among five populations of *Colletotrichum lindemuthianum* across Humachal Pradesh**. Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 8–12, 2007.

PATERSON, A. H. Molecular dissection of quantitative traits - progress and prospects. **Genome Research,** Woodbury, v. 5, p. 321-333, 1995.

RAGAGNIN, V.A.; DE SOUZA, T.L.P.O.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; COSTA, M.R.; ALZATE-MARIN, A.L.; DE S. CARNEIRO, J.E.; MOREIRA, M.A.; DE BARROS, E.G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, v. 128, p. 156-163, 2009.

ROBINSON, R.A. Plant pathossistems. Springer Verlag, Berlim, Heidelberg, New York, 1976. *apoud* MEDEIROS, L.A.M. Resistência genetic do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.ao *Colletotrichum lindemuthianum*. 2004. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Santa Maria – UFSM, Santa Maria.

ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; DAVIDE, L.M.C.; MENDES-COSTA, M.C.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. Conidial anastomosis fusin between *Colletotrichum* species. **Mycological Research**, v.108, n.11, p. 1320-1326, 2004.

RODRIGUES T.B. & SANTOS J.B. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 345-352, 2006.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A; GIRALDEZ, R. 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,** v. 116, p. 807–814, 2008.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; MÉNDEZ-VIGO, B.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J. J.; GIRALDEZ R. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Theor Appl Genet**, v. 114, p. 713-722, 2007.

SABADIN, P.K.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. QTL mapping for yield components in a tropical maize population using microsatellite markers. **Hereditas**, v. 145, p. 194-203, 2008.

SCHLÖTTERER, C. & TAUTZ, D. Slippage synthesis of sample sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 211-215, 1992.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SCHUSTER, I. & CRUZ, C.D. Estatística genômica – Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados. Universidade Federal de Viçosa, 2008. 568p.

SCHWENGEL, D.A.; JEDLICKA, A.E.; NANTHAKUMAR, E.J.; WEBER, J.L. Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. **Genomics**, v. 22, p. 46-54, 1994.

SILVIA F. B.; ARANTES L. O.; RAMALHO M. A. P.; SANTOS J. B. Validação de Marcadores Microssatélites na Identificação de Genótipos de Feijoeiro Resistente ao *Meloidogyne incognit.* In: **Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão –VIII CONAFE**, 2005. Resumo expandido CR-ROM.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO,I.S.; VALADARES-INGLIS,M.C. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 940-965, 2001.

SPRECHER, S.L. Isozyme differences between the large seeded and small seeded gene pools in Phaseolus vulgaris L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 31, p. 36-37, 1988.

STAM P. Construction of integrated genetic maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal,** v. 3, p. 739-744, 1993.

TALBOT, D.R.; ADANG, M.J.; SLIGHTON, J.L.; HALL, T.C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular and General Genetic**, v.198, p.42-49, 1984.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Resources**, v.17, p. 6463-6471, 1989.

TIAN, J.; VENKATACHALAM, P.; LIAO, H.; YAN, X.; RAGHOTHAMA, K. Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biomedical and Life Sciences**, v. 227, n. 1, p. 151-165, 2007.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research,** v. 10, p. 967-981, 2000.

TSAI, S.M.; NODARI, R.O.; MOON, D.H.; CAMARGO, L.E.A.; VENCOVSKY, R.; GEPTS, P. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil,** v. 204, n. 1, p. 135-145, 1998.
v. 24, n.1, p. 60-65, 1999.

VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marder-basead linkagem map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics,** v. 131, p. 733-740, 1992.

VIEIRA, R.F.; CARDOSO, C.; MOSQUIM, E.J.B.N. Foliar application of Molybdenum in common bean: II. nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of low fertility. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2141-2151, 1998.

VOORRIPS R.E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **The Journal of Heredity,** v. 93, p. 77-78, 2002.

WANG, S.; BASTEN, C.J.; ZENG, Z.B. Windows QTL Cartographer ver. 2.5. Departament of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2005.

WANG, Y.; WANG, X.M.; ZHU, Z.D.; ZHAO, X.Y.; ZHANG, X.Y.; WANG, S.M. Mapping os a novel anthracnose resistance gene using SSR markers in common bean (*Phaseolus vulgaris* L**.) Acta Agronomica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 432-437, 2009.

WEBER, R.D.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WU, R.; MA, C. X.; PAINTER, I.; ZENG, Z.B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theor. Popul. Biol.** v. 61, p. 349-363, 2002.

XU S. Quantitative Trait Locus Mapping Can Benefit From Segregation Distortion. **Genetics,** v.180, p. 2201-2208, 2008.

XU Y. & CROUCH J.H. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. **Crop Science,** v. 48, p. 391-407, 2008.

YAN, X.; LIAO, H.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W.; LYNCH, J. P. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. **Plant and Soil**, v. 265, n. 1, p.17-29, 2004.

YOUNG, R.; MELOTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of tho oligogenic anthracnose resistence in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87-94, 1998.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vigna*). **Genome,** v. 42, p. 27-34, 1999.

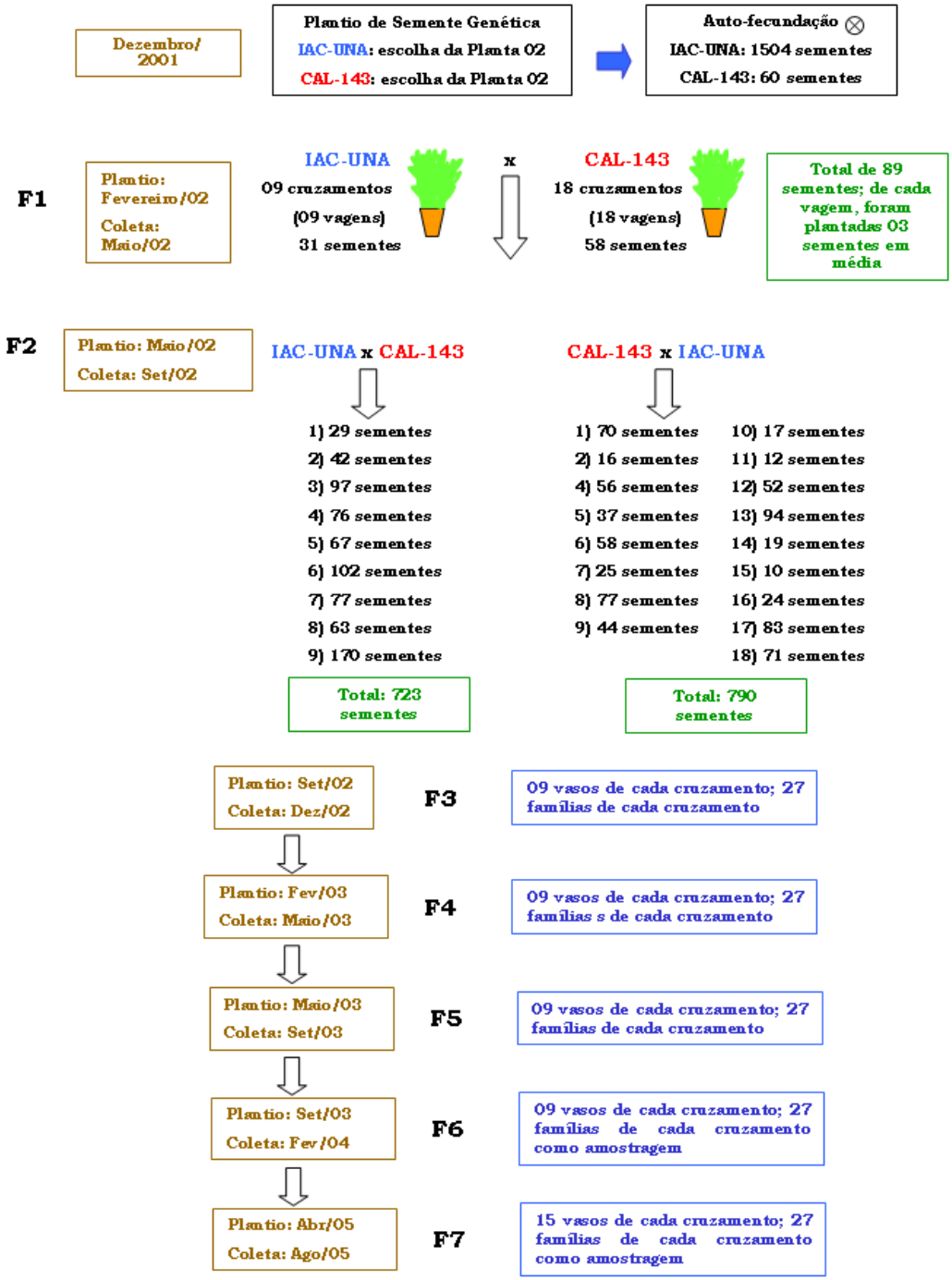
YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, v. 91, p. 429-434, 2000.

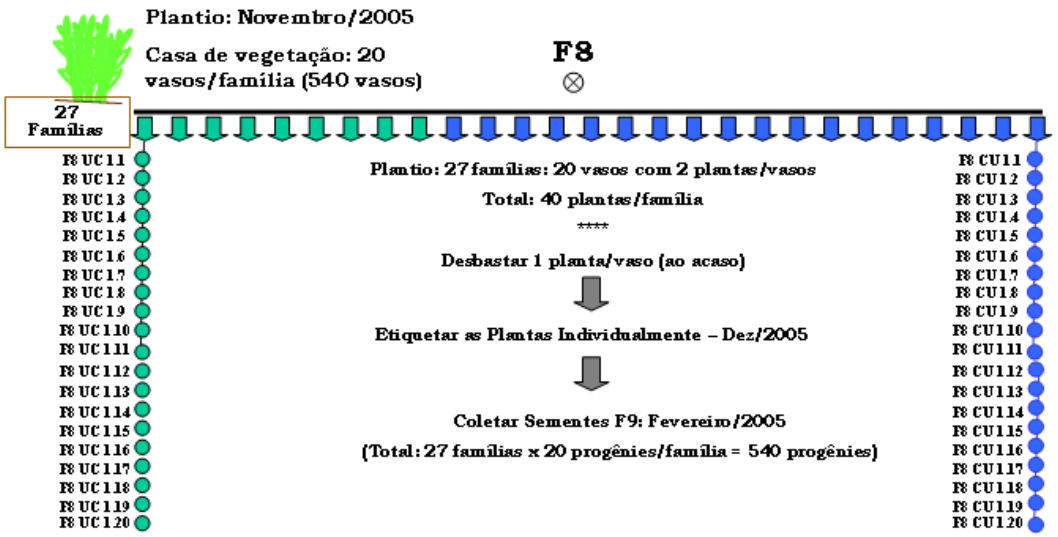
ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for theirs control**. Washington: USDA, 1957. 225p. (USDA. Bulletin, 869) *apoud* DAVIDE, L.M.C. Comprovação da variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, p.59, 2006.

ZENG Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics,** v. 136, p.1457-1466, 1994.

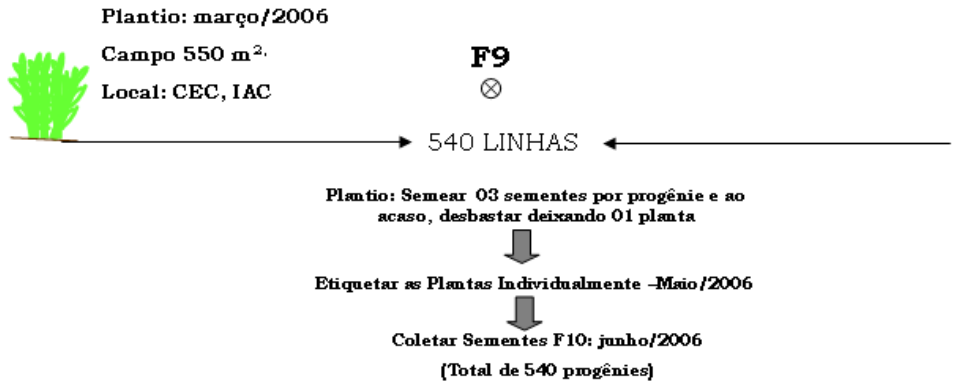
7 ANEXOS

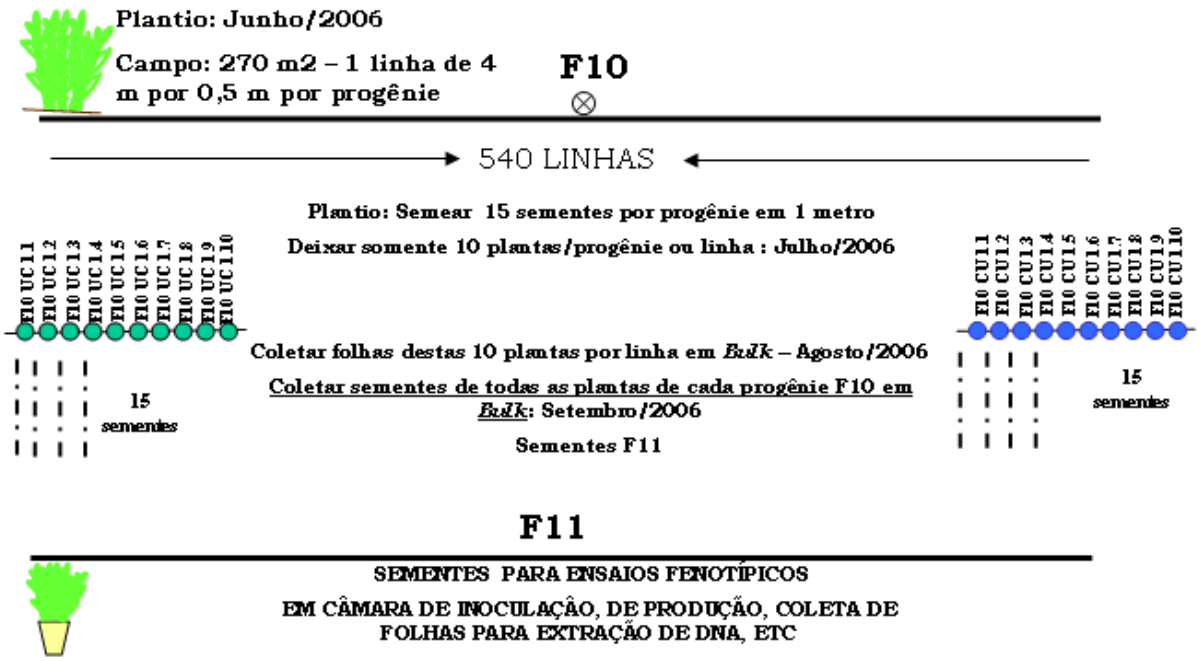
Anexo 1. Esquema de obtenção da população de mapeamento segregante 'IAC-UNA' / 'CAL 143'.





Avançar a geração conservando a individualidade de cada uma das 540 linhas puras ou progênie




Plantio: Junho/2006
Campo: 270 m2 – 1 linha de 4 m por 0,5 m por progênie
F10
540 LINHAS
Plantio: Semear 15 sementes por progênie em 1 metro
Deixar somente 10 plantas/progênie ou linha : Julho/2006
F10 UC11 F10 UC12 F10 UC13 F10 UC14 F10 UC15 F10 UC16 F10 UC17 F10 UC18 F10 UC19 F10 UC110
15 sementes
Coletar folhas destas 10 plantas por linha em Bulk – Agosto/2006
Coletar sementes de todas as plantas de cada progênie F10 em Bulk: Setembro/2006
Sementes F11
F10 CU11 F10 CU12 F10 CU13 F10 CU14 F10 CU15 F10 CU16 F10 CU17 F10 CU18 F10 CU19 F10 CU110
15 sementes
F11
SEMENTES PARA ENSAIOS FENOTÍPICOS
EM CÂMARA DE INOCULAÇÃO, DE PRODUÇÃO, COLETA DE FOLHAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA, ETC