



JULIANA MORINI KÜPPER CARDOSO PERSEGUINI

**“ESTUDO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM *Phaseolus vulgaris* L.
VISANDO O MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE FATORES BIÓTICOS E
ABIÓTICOS”**

**“LINKAGE DESEQUILIBRIUM STUDY IN *Phaseolus vulgaris* L. TO
PERFORM ASSOCIATIVE MAPPING OF BIOTIC AND ABIOTIC
TRAITS”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
JULIANA MORINI KÜPPER CARDOSO PERSEGUINI

**“ESTUDO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM *Phaseolus vulgaris* L. VISANDO
O MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS”**

Orientadora Profa. Dra. Luciana Lasry Benchimol Reis

**“LINKAGE DESEQUILIBRIUM STUDY IN *Phaseolus vulgaris* L. TO PERFORM
ASSOCIATIVE MAPPING OF BIOTIC AND ABIOTIC TRAITS”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de PósGraduação em Genética e Biologia
Molecular do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular
na área de concentração de Genética Vegetal e Melhoramento.

Doctorate thesis presented to the Genetics and Molecular Biology
Postgraduation Programme of the School of Biology Institute of the University of
Campinas to obtain the Ph.D. grade in Genetics and Molecular Biology in the concentration
area of Plant Genetics and Breeding.

Este exemplar corresponde à versão final
da tese defendida pela aluna Juliana
Morini Küpper Cardoso Perseguini, e
orientada pela Profa. Dra. Luciana Lasry
Benchimol Reis.

CAMPINAS

2013

Luciana Lasry Benchimol Reis
CPD de Rec. Genéticos Vegetais
RS 12983779-01
Pesquisadora Científica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P43e Perseguini, Juliana Morini Küpper Cardoso, 1984-
Estudo do desequilíbrio de ligação em *Phaseolus vulgaris* L. visando o mapeamento associativo de fatores bióticos e abióticos / Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Luciana Lasry Benchimol Reis.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Feijão comum. 2. Fatores bióticos. 3. Fatores abióticos. I. Benchimol-Reis, Luciana Lasry, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Linkage disequilibrium study in *Phaseolus vulgaris* L. to perform associative mapping of biotic and abiotic traits

Palavras-chave em inglês:

Common bean

Biotic factors

Abiotic factors

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Luciana Lasry Benchimol Reis [Orientador]

Sandra Helena Unêda Trevisoli

Claudia Teixeira Guimarães

Regina Helena Geribello Priolli

Walter José Siqueira

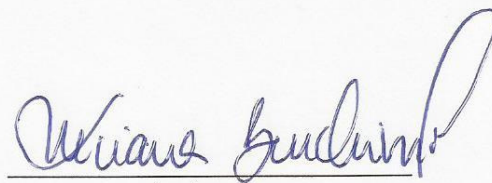
Data de defesa: 14-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

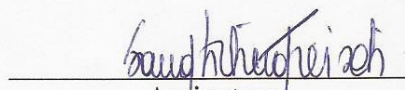
Campinas, 14 de outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

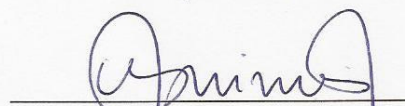
Dra. Luciana Lasry Benchimol Reis (Orientadora)
(orientador)


Assinatura

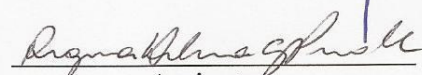
Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli


Assinatura

Dra. Claudia Teixeira Guimarães


Assinatura

Dra. Regina Helena Geribello PRIOLLI


Assinatura

Dr. Walter José Siqueira


Assinatura

Dra. Maria Imaculada Zucchi

Assinatura

Dra. Daiane Mariele De Laat

Assinatura

Dr. Oliveiro Guerreiro Filho

Assinatura

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a species with primary and secondary centers of diversity in South America. The 180 accessions selected to compose the panel membership were divided into four distinct groups according to the analysis performed with the program Structure. Linkage disequilibrium (LD) was estimated in the associative panel with SSRs and SNPs, markers total of in 90 SSRs were used to calculate the DL and 331 SNPs , by calculating the DL with SSRs was possible to verify that the DL is in common bean extends to 100 cM , that is , the common bean has a high extension DL, which is expected since the common bean is an autogamous plant. Unwhat regards it SNPs markers, was possible to detect a rapid decay in LD, despite having demonstrated a high DL in various regions of the chromosome, and the higher the value of r^2 , the higher the DL. A total of 103 SSRs were used to perform the association tests with the phenotyped traits. Upon associative mapping using MLM method, 17 associations were established between the genotyped with SSRs anthracnose race 4, 6 SSRs associated with race 0-39 of angular leaf spot, 26 associations with traits related to drought stress in which the greatest number of associations was found for the no irrigated leaf area; 10 SSRs associated with iron contend and 7 SSRs associated with zinc content, and a total of 25 associations established with traits related to grain yield. Eight SSRs markers associated to more than one phenotypic trait evaluated, indicating that these markers can be used to perform marker assisted selection for more than one character relevant to the obtaining of new culvivors, since to get cultivars resistant to the major diseases affecting the bean culture that present drought tolerance and has high nutritional content is the goal of many bean breeding programs. Regarding the associative mapping with SNPs markers, a total of 14 associations with race 4 of anthracnose were found, 10 SNPs associated with race 0-39 of angular leaf spot, and a total of 64 SNPs were associated to traits related to water deficit, 21 SNPs were associated with characters related to yield when over water deficit conditions, and a total of 10 associations have been established for iron and 6 for zinc content. The associative have a large genetic diversity, and can be exploited to make associations with other traits into new cultivars, and markers associated with phenotypes evaluated can be used to facilitate future studies of fine mapping and marker-assisted selection.

Keywords: molecular markers, association mapping, common bean.

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie com centros primários e secundários de diversidade na América do Sul. Um total de 180 genótipos de feijão comum pertencentes ao Banco de Germoplasma do IAC foram selecionados para o mapeamento associativo de caracteres bióticos e abióticos. O desequilíbrio de ligação (DL) foi estimado no painel associativo com marcadores SSRs e SNPs, ao todo foram utilizados 90 SSRs para calcular o DL e 331 SNPs, por meio do cálculo do DL com os SSRs foi possível verificar que o DL em feijão se estende até 100 cM, ou seja, o feijão apresenta uma alta extensão de DL. Com os marcadores SNPs foi possível detectar um decaimento rápido no DL, apesar de ter demonstrado um alto DL em várias regiões dos cromossomos. Um total de 103 SSRs foram utilizados para realizar os testes de associação com as características fenotipadas. Ao realizar o mapeamento associativo pelo método de MLM, 17 associações foram estabelecidas entre os SSRs genotipados com a raça 4 da antracnose, 6 SSRs associaram com a raça 0-39 da mancha angular, 26 associações com caracteres relacionados com o estresse hídrico, sendo que o maior número de associações foi encontrado para a característica área foliar não irrigada; 10 SSRs associaram com o teor de ferro e 7 SSRs associaram com o teor de zinco, e um total de 25 associações foram estabelecidas com caracteres relacionados com a produtividade de grãos. Ao realizar o mapeamento associativo com os marcadores SNPs um total de 14 associações foi estabelecida com a raça 4 da antracnose, 10 SNPs associaram a raça 0-39 da mancha angular, um total de 64 SNPs apresentaram associação para caracteres relacionados com o estresse hídrico, 21 SNPs apresentaram associação com caracteres relacionados a produtividade quando a planta é submetida a condições de estresse hídrico, um total de 10 associações foi estabelecida para o teor de ferro e 6 associações para o teor de zinco. Os marcadores associados aos fenótipos avaliados podem ser utilizados para viabilizar estudos futuros de mapeamento fino e de seleção assistida por marcadores moleculares.

Palavras-chave: marcadores moleculares, mapeamento associativo, feijão comum.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O feijoeiro comum.....	3
2.2 Marcadores moleculares.....	5
2.3 Mapeamento associativo e desequilíbrio de ligação (DL)	7
2.4 Fatores bióticos que limitam a produtividade do feijoeiro.....	11
2.4.1 Antracnose.....	11
2.4.2 Mancha angular	14
2.4.3 Estudos de mapeamento genético de antracnose e mancha angular	17
2.5 Fator abiótico.....	19
2.5.1 Estresse hídrico	19
2.6 Biofortificação do feijoeiro (Teores de Ferro e Zinco)	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material Vegetal.....	25
3.2 Extração e quantificação dos DNAs	26
3.3 Genotipagem dos SSRs nos 180 genótipos de feijão do painel associativo	26
3.4 Genotipagem com SNPs nos 180 genótipos de feijão do painel associativo	27
3.5 Estimativa dos perfis de diminuição dos desequilíbrios de ligação em <i>P. vulgaris</i> com marcadores SSRs e SNPs	28
3.6 Fenotipagem com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Sacc & Magnus e avaliação de resistência dos 180 genótipos de feijão comum à antracnose	29
3.7 Fenotipagem com <i>Pseudocercospora griseola</i> e avaliação da resistência dos 180 genótipos de feijão a mancha angular.....	30
3.8 Fenotipagem dos caracteres relacionados com estresse hídrico no painel associativo	30
3.9 Análises dos teores de ferro e zinco	32
3.10 Análises de dados fenotípicos para o mapeamento associativo	32
3.11 Análises de mapeamento associativo	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

4.1 Análise da estrutura dos marcadores SNPs para posterior utilização nas análises de mapeamento associativo.....	33
4.2 Análise do desequilíbrio de ligação (DL) utilizando marcadores SSRs e SNPs...	36
4.3 Fenotipagem da antracnose e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs.....	40
4.4 Fenotipagem com a raça 0-39 de mancha angular e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs	45
4.5 Fenotipagem dos caracteres relacionados com estresse hídrico no painel associativo.....	49
4.6 Fenotipagem dos teores de ferro (Fe) e zinco (Zn) no painel associativo e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs	66
4.7 Comparação das análises de mapeamento associativo (SSRs e SNPs) com todas os caracteres avaliados nos acessos do painel associativo.....	78
5. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
7. ANEXO	95

Aos meus avós
Maria Helena e Julcir,
DEDICO

Ao meu marido Flávio, cujo carinho e amor,
foram indispensáveis,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, a quem agradeço todos os dias, por conceder a oportunidade de aprender cada vez mais.
- À toda minha família, em especial meu avô Julcir por sempre me oferecer suporte para que eu realize meus sonhos, e ao meu marido Flávio pelo amor, carinho e paciência;
- À minha avó Maria Helena, a minha Sandra, ao meu pai Fernando, a meu tio Carlos por sempre estarem ao meu lado;
- À minha orientadora, Dra. Luciana Lasry Benchimol Reis pela paciência, amizade e pelos grandes ensinamentos;
- Aos Drs. Sérgio Augusto Morais Carbonell e Alisson Fernando Chiorato por fornecerem a estrutura para a realização deste estudo;
- Ao Dr. Antonio Augusto Franco Garcia e ao João Ricardo Bachega Feijó Rosa pela grande colaboração com as análises de desequilíbrio de ligação;
- Às funcionárias da Pós-graduação da UNICAMP, por simplificar as burocracias;
- Aos meus amigos de laboratório, que ofereceram muita ajuda e sugestões no decorrer da pesquisa, principalmente a Paula, Renata, Gliciane, Boris, Juliana Rosa, Denis, Pamela, Deibe, Jéssica, Érica, Caléo;
- Aos colegas da Pós-graduação, pela companhia e amizade;
- À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) por financiar este projeto e pela bolsa de doutorado concedida (FAPESP 2009/02502-8), e pelo auxílio à pesquisa concedido (processo 2009/05284-1).

1. INTRODUÇÃO

O feijão é uma Fabacea domesticada há mais de sete milhões de anos. Acredita-se que o feijão seja oriundo de dois centros de origem distintos: Andino e Mesoamericano (Gepts, 1998). Bitocchi et al. (2012) sugeriram que o feijão comum possa ter uma provável origem Mesoamericana, pois constataram uma grande variabilidade genética dentro dos genótipos mesoamericanos, maior do que a encontrada nos genótipos andinos.

Pesquisas em todo o mundo vêm sendo realizadas visando melhorar os cultivares de feijões já existentes, desenvolvendo cultivares mais tolerantes a períodos de estresse, mais produtivos e com resistência a vários patógenos. Além de apresentarem resistência a fatores bióticos e tolerância a fatores abióticos, os melhoristas tem buscado agregar valor de mercado a cultivares elites, ou seja, além dos caracteres já melhorados e fixados na cultivar, deseja-se obter cultivares que apresentem teores significativos de ferro e zinco, pois estes dois minerais são extremamente importantes para a dieta humana.

Atualmente, inúmeros grupos de pesquisa tem estudado o feijão a fim de assessorar o melhoramento da cultura. Dentre diversos trabalhos publicados no período de 2010 até 2012, destacam-se aqueles envolvidos no mapeamento de locos de interesse, com fatores nutricionais (Blair et al., 2010a; Blair et al., 2011a), resistência a doenças (Costa et al., 2010; David et al., 2010; Larsen et al., 2010; Liu et al., 2010, Mahuku et al., 2010; Miklas et al., 2006, 2011; Gonçalves-Vidigal et al., 2011), mapeamento associativo com o crestamento bacteriano (Shi et al., 2011), caracteres morfo-agronômicos (Pérez-Pérez et al., 2010; Pérez-Veja et al., 2010) e tolerância à seca (Chen et al., 2010; Blair et al., 2010b; Choudhury et al., 2011); assim como trabalhos para o conhecimento genômico da espécie (Gepts & Lin, 2010; Córdoba et al., 2010; Blair et al., 2011b; McConnell et al., 2011; Briñez et al., 2011; Bitocchi et al., 2012).

Atualmente o emprego de novas tecnologias no melhoramento genético vegetal tem proporcionado inúmeros avanços neste sentido, como a utilização dos marcadores moleculares para assessorar os melhoristas nos programas de melhoramento, e a identificação de genes responsáveis por diversas características agronômicas. De forma geral, muitas destas características são controladas por locos de efeito quantitativo (*Quantitative Trait Loci* – QTL), sendo que o mapeamento dessas regiões é de suma importância para que sejam atingidos patamares superiores de produtividade. O mapeamento genético busca estimar quantos e quais

são os QTL responsáveis pela variação nas características, localizar sua posição no genoma, estimar seus efeitos e identificar suas interrelações. O mapeamento genético possibilita a seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento e a clonagem gênica, reduzindo o tempo e recursos despendidos no desenvolvimento de novas cultivares.

O mapeamento de locos que controlam caracteres quantitativos tem sido frequentemente realizado através da análise de ligação, considerando a variação genética presente em progênies de cruzamentos biparentais. Neste caso, somente dois alelos por loco podem ser avaliados simultaneamente. Esta abordagem limita o número de recombinações possíveis, e os marcadores presentes identificados nas regiões dos QTL são restritos a população de mapeamento que foi desenvolvida.

Visando sanar estes fatores limitantes, outros métodos foram propostos para a construção de mapas genéticos e análise de regiões genômicas relacionadas a determinado fenótipo. O mapeamento associativo, também conhecido como mapeamento por desequilíbrio de ligação (DL) tem por base a detecção da variação fenotípica e genética presente em populações não estruturadas. Esta metodologia apresenta como vantagens a exploração de uma maior variabilidade genética na população de mapeamento, a qual pode ser composta por genótipos provenientes de populações naturais ou por acessos de bancos de germoplasma.

Para que os estudos de associação sejam efetivos, são necessárias informações prévias referentes à população em questão. O conhecimento acerca da estrutura populacional é um dos mais relevantes, de modo a evitar associações espúrias entre marcadores e fenótipo. Além disso, é de suma importância conhecer a extensão do desequilíbrio de ligação, já que o DL exerce papel central em análises de associação. Estas informações determinam o tipo, o número e a densidade de marcadores a serem utilizados, além dos métodos mais adequados para análise e interpretação dos resultados.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivos: 1) Calcular o desequilíbrio de ligação (DL) no painel associativo composto por 180 genótipos de feijão comum selecionados dos 500 acessos do BAG-IAC utilizando marcadores SSRs e SNPs; 2) Realizar o mapeamento associativo com marcadores para fatores bióticos como resistência à antracnose e à mancha angular; 3) Realizar o mapeamento associativo para fatores abióticos como caracteres relacionados com o estresse hídrico; 4) Realizar o mapeamento associativo para os teores de ferro (Fe) e zinco (Zn).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O feijoeiro comum

As leguminosas (Fabaceae) compõem o grupo de espécies de maior importância agrícola, depois dos cereais. Com cerca de 20.000 espécies, as leguminosas são a terceira maior família de plantas superiores (Gepts, 2005). O gênero *Phaseolus* é originário da América e contém 55 espécies, das quais cinco são amplamente cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A., Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (Debouck, 1993). Dessas cinco espécies, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a mais importante devido ao seu elevado teor de proteínas sendo considerada a principal cultura alimentar na África e na América Latina (Yu & Bliss, 1978).

O feijão comum é uma planta diplóide ($2n = 2x = 22$) e autógama, com taxa de fecundação cruzada estimada entre 3 a 5% (Burle et al., 2010). Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, Singh et al. (1991) estabeleceram a hipótese de três centros de origem para o feijão (no México e na América Central: Mesoamericano, Andino e Colombiano). Maciel et al. (2003) sugeriram alguma mistura entre os dois principais *pools* gênicos (Mesoamericano e Andino), pois identificaram a faseolina tipo ‘T’ no grupo mesoamericano, sabidamente encontrada somente em feijões andinos.

O feijoeiro é originário das Américas e foi domesticado inicialmente por povos indígenas no período pré-colombiano (Mensack et al., 2010). A domesticação da espécie ocorreu independentemente em áreas Andinas e Mesoamericanas que deram origem a dois centros primários de diversidade, ou seja, dois *pools* gênicos (Angioi et al., 2010). A classificação original dos centros de origem do feijoeiro foi sugerida por Singh et al. (1991), assim como a classificação de raças contidas em cada centro. Os *pools* gênicos e as diferentes raças têm sido validados por vários marcadores, tais como: tamanho dos grãos, morfologia da planta, isoenzimas e marcadores moleculares (Asfaw et al., 2009).

Estudos com marcadores moleculares têm mostrado que a propagação dos *pools* gênicos Andino e Mesoamericano pelo mundo, seguidos pela hibridização destes e a seleção para diferentes características de interesse agrônomo, específicas para cada área de cultivo, favoreceu a ocorrência de variações genéticas em outros centros secundários de diversidade em regiões da América do Sul, Europa, Ásia e África (Chen et al., 2010; Zhang et al., 2008; Singh,

2001). Burle et al. (2010) observaram por meio de estudos com marcadores moleculares que, apesar de o Brasil não ser um centro primário de diversidade do feijoeiro, há uma ampla gama de variabilidade genética da espécie no país que é justificada pelo histórico da domesticação da cultura em épocas de pré e pós colonização europeia. Dada a grande variabilidade observada, os autores sugerem que o Brasil deva ser considerado um centro secundário de diversidade da espécie.

Contudo, apesar da ampla variabilidade, devido à pressão de mercado, as cultivares atuais apresentam uma estreita base genética, sendo que este fator é um sério obstáculo para manter e melhorar a produtividade das culturas, devido à vulnerabilidade destas novas cultivares, a variações de fatores bióticos e abióticos (Abdurakhmonov & Abdukarimov 2008). Recursos contidos em bancos de germoplasma em todo o mundo, composto por espécies selvagens, cultivares modernas, e parentes silvestres, são reservatórios naturais das variações genéticas, sendo que a conservação e a exploração deste conjunto de genótipos é vital para superar os problemas futuros associados à estreita base genética das cultivares modernas. O Banco de Germoplasma de feijoeiro do Instituto Agrônomo (IAC, Campinas, SP, Brasil) possui mais de 1.500 genótipos, e estes representam os dois principais centros de origem (Andino e Mesoamericano). Além disso, o banco possui ecótipos de diferentes países sul-americanos e um grande número de linhagens, de programas de melhoramento genético, nacionais e internacionais, obtidos por meio de intercâmbio de germoplasma (Chiorato et al., 2006).

Esta uniformidade genética torna difícil a obtenção de novas cultivares que apresentem uma prolongada resistência a fatores bióticos (antracnose e mancha angular) e abióticos (tolerância a seca) que acometem a cultura do feijoeiro. Ao mesmo tempo, estesótipos devem apresentar qualidades tecnológicas e nutricionais que atendam as demandas de mercado, além do fator preferencial de cada região pelos diferentes tamanhos e colorações de grão.

Novas estratégias estão sendo adotadas para a obtenção de cultivares que sejam resistentes a múltiplas doenças e que atendam às necessidades de mercado. Uma destas estratégias é o mapeamento genético dos genes que controlam as características de resistência a um determinado patógeno, bem como conferem tolerância a um determinado tipo de estresse que prejudica a produtividade da cultura.

2.2 Marcadores moleculares

As diferenças na sequência de DNA ao longo do genoma de uma determinada espécie são traduzidas pelos marcadores moleculares. 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).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais variadas finalidades, como por exemplo: identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, estudo de fluxo gênico, estimativas de taxas de cruzamento e parentesco, análise da diversidade genética entre indivíduos, construção de mapas genéticos e na seleção assistida por marcadores (Souza, 2001). Além dessas aplicações, os marcadores moleculares são ferramentas que permitem a clonagem de genes úteis no melhoramento transgênico (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Buso et al., 2003). Atualmente existe uma grande variedade de marcadores moleculares, cuja escolha dependerá de uma série de fatores, relacionados ao objetivo da pesquisa, recursos financeiros e infraestrutura disponível (Ciampi et al., 2007).

Dentre os marcadores moleculares empregados no mapeamento genético, uns dos mais utilizados são os marcadores microssatélites, também denominados *Simple Sequence Repeats* (SSRs). Os SSRs são combinações de 1 a 6 bases repetidas em *tandem*. O comprimento do microssatélite varia normalmente entre 15 e 50 pb (Petes et al., 1997). As repetições podem ser simples perfeitas, simples imperfeitas, compostas perfeitas ou compostas imperfeitas (Reddy et al., 2001). Os SSRs baseiam-se no uso de pares de *primers* na reação de PCR para detectar variações em locos destas sequências repetitivas. A técnica dos SSRs revela polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes em que um motivo se repete naquele loco. A sua natureza multialélica e codominante permite o estabelecimento da genotipagem de indivíduos dentro de populações ou entre genótipos relacionados, por isso, a técnica de microssatélites tem sido usada para identificação individual, análise de diversidade, estudos de evolução e de estrutura de populações de espécies relacionadas (Powell et al., 1996). Além destas aplicações, os marcadores microssatélites são amplamente utilizados no mapeamento genético e na análise de QTL. Muitos microssatélites já foram desenvolvidos para feijão comum (Yu et al., 1999; 2000; Gaitán-Solís, et al., 2002; Métais et al., 2002; Blair et al., 2003; Guerra-

Sanz, 2004; Buso et al., 2006, Grisi et al., 2007; Hanai et al., 2007; Benchimol et al., 2007, Campos et al., 2007; Cardoso et al., 2008; Blair et al., 2008).

Na última década, novas classes de marcadores foram desenvolvidas, principalmente visando obter uma maior cobertura genômica, em menos tempo e com menor custo. Dentre estes, destacam-se os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), encontrados abundantemente ao longo dos genomas. Os SNPs, definidos como variações em uma única posição nucleotídica em uma única fita de DNA, compreendem uma nova geração de marcadores (Wang et al., 1998). Estes variantes ocorrem entre diferentes indivíduos dentro de uma mesma espécie. Em geral, os SNPs são a forma mais comum de polimorfismo presente entre os alelos no DNA. Marcadores SNPs são úteis em uma variedade de aplicações, incluindo a construção de mapas de alta resolução, traços genéticos de mapeamento, diagnósticos genéticos, análise da estrutura genética de populações e análise filogenética (Rafalski, 2002). Seu aspecto binário e sua estabilidade de geração em geração, tornam os SNPs passíveis de automatização gerando grande volume de resultados, e os tornam atraentes para estudos de mapeamento de QTL e de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de plantas. Métodos baseados na separação de produtos de PCR em géis de agarose ou poliacrilamida para determinação dos SNPs incluem os CAPS, AS-PCR, SSCP (Konieczny & Ausubel, 1993; Prosser, 1993). Estes métodos têm limitação na sua capacidade de geração de dados/tempo. Estas limitações levaram ao desenvolvimento de uma ampla gama de plataformas de alto desempenho de genotipagem de SNPs que se utiliza de princípios de mini-sequenciamento, análise de heteroduplex e hibridização alelo específica (Henry, 2001). Há revisões na literatura que discutem extensivamente as metodologias de SNPs (Syvänen, 2005).

Gaitán-Solís et al. (2008) identificaram SNPs em *P. vulgaris* comparando sequências de regiões expressas e de regiões não expressas obtidas no GenBank e no DNA genômico do feijão. A análise das sequências foi conduzida utilizando 10 genótipos cultivados e genótipos selvagens, sendo que estes genótipos são de origem Mesoamericana e Andina. Para os 10 genótipos avaliados, um total de 20.964 pb foram analisadas em cada genótipo e comparadas. Esta avaliação resultou na descoberta de 372 novos SNPs em 41 STSs (*Sequence-Tagged Sites*) diferentes.

Hyten et al. (2010) selecionaram em feijão comum, utilizando uma representação reduzida de biblioteca, um total de 3.487 SNPs que continha 2.795 sequências genômicas

flanqueadoras suficientes para o desenvolvimento de ensaio SNP. Além disso, foi elaborado um ensaio *GoldenGate* que continha 1.050 SNPs dos 3.487 previstos. Um total de 827 dos 1.050 SNPs produziram um ensaio *GoldenGate* de trabalho (79%). Ao autores concluíram que através da combinação de duas técnicas de sequenciamento de nova geração, foi possível desenvolver um método que permite a descoberta *high-throughput* de SNPs em qualquer organismo diploide, sem a necessidade da sequência de genoma completo ou da criação de bibliotecas de cDNA normalizadas.

Cortés et al. (2011) desenvolveram 94 SNPs em feijoeiro e testaram estes marcadores em 70 genótipos que têm sido utilizados como genitores de populações de mapeamento e foram previamente avaliados com SSRs. Os autores avaliaram 84 regiões gênicas e 10 locos não gênicos usando a tecnologia Kaspar. SNPs apresentaram níveis elevados de diversidade genética, um excesso de polimorfismo de frequência média, e uma distribuição de incompatibilidade dentro dos pools gênicos, como esperado para as populações afetadas por súbitas expansões demográficas depois de gargalos de domesticação. Este conjunto de marcadores foi útil para distinguir a origem andina e mesoamericana dos genótipos mas menos útil para distinguir dentro de cada *pool* gênico. Os autores discutem que o marcador genético ideal para fazer o mapeamento, diversidade e estudos de associação em feijão deve considerar uma mistura de marcadores SNPs e marcadores microssatélites.

No estudo de Souza et al. (2012), fragmentos de DNA que abrigam SNPs foram identificados em *amplicons* de seis genótipos de *P. vulgaris*. contrastantes dos *pools* gênicos Andino (Jalo EEP 558, G 19833, e E 277) e Mesoamericano (BAT 93, DOR 364 e Rudá). Um total de 677 SNPs foram identificados, incluindo 555 mudanças de uma única base (295 transições e 260 transversões) e 122 pequenas inserções/eliminações de nucleotídeos (*indels*). Estes SNPs são úteis para análise da diversidade e estudos de microsintenia entre as espécies de leguminosas.

2.3 Mapeamento associativo e desequilíbrio de ligação (DL)

O mapeamento genético pode ser realizado principalmente de duas maneiras (1) usando as populações experimentais (também denominada como população "biparental" ou população de mapeamento), sendo este conhecido como mapeamento de QTL, ou "mapeamento genético", e (2) utilizando diversos genótipos pertencentes a populações naturais ou coleções de

germoplasma, sendo este denominado de mapeamento por DL (desequilíbrio de ligação) ou "mapeamento associativo". Tradicionalmente, as abordagens de mapeamento de QTL foram baseadas na análise de populações oriundas de cruzamentos bi-parentais que segregam para a característica de interesse. Um número relativamente grande de mapas de ligação foi desenvolvido para o feijão comum, divergindo nos genitores utilizados, no tipo de população segregante analisado, nas características avaliadas e para o número e tipo de marcadores moleculares utilizados (Beattie et al., 2003; Blair et al., 2003; Broughton et al., 2003; Kelly et al., 2003; Blair et al., 2006; Rodríguez Suárez et al., 2007; Checa & Blair, 2008; Grisi et al., 2007; Pérez-Vega et al., 2010; Campos et al., 2011).

Existem duas estratégias que podem ser utilizadas no mapeamento associativo: a) mapeamento de associação por genes candidatos já identificados (*Candidate Gene Approach*); b) mapeamento de associação genômico (*Whole Genome Scan*), utilizando marcadores moleculares de forma a cobrir o genoma inteiro, visando identificar regiões que são associadas a um fenótipo de interesse.

O mapeamento associativo é um método alternativo que pode ser usado para associar um marcador molecular a um caráter de interesse em populações naturais ou em uma coleção de cultivares de um programa de melhoramento (Oraguzie et al., 2007). O princípio subjacente a esta abordagem é que ocorra o desequilíbrio de ligação (DL), uma vez que este é necessário para a associação entre marcador e fenótipo, e porque a extensão destas regiões determinará a resolução do mapeamento. O DL é definido como a associação não aleatória de diferentes locos (Flint-Garcia et al., 2003).

Lewontin (1964) propôs uma medida relativa do DL, sendo esta denominada de D' , que possibilita comparar os DL's de diferentes pares de locos, uma vez que os máximos valores teóricos são levados em consideração, conforme a fórmula a seguir:

$$D' = \frac{|D|}{D^{max}}$$

onde D' é a medida relativa do DL, D é o conceito básico calculado com base nas frequências dos haplótipos, e D^{max} é o máximo valor teórico do DL entre um possível par de locos. Ao contrário do conceito básico do DL, que pode variar entre -0,25 e 0,25, o D' pode variar entre 0 e 1.

Uma outra medida relativa do DL é o r^2 , esta medida foi proposta por Hill & Robertson (1968). O r^2 é indicada pelo quadrado do coeficiente de correlação, e mede o grau de associação entre locos (covariância) de acordo com a variação dos seus alelos. Assim como a medida do D' , o r^2 depende das frequências dos haplótipos. O r^2 é calculado da seguinte forma:

$$r_{XY}^2 = \frac{Cov(X, Y)}{V(X)V(Y)} = \frac{D_{XY}^2}{f_X f_x f_Y f_y} = \frac{D_{XY}^2}{f_X(1 - f_X)f_Y(1 - f_Y)}$$

onde r_{XY}^2 (coeficiente de determinação, ou quadrado do coeficiente de correlação) é a medida relativa do DL entre dois locos bialélicos quaisquer X e Y, $Cov(X, Y)$ é a covariância entre esses locos, $V(X)$ e $V(Y)$ são suas respectivas variâncias, D_{XY}^2 é o conceito básico do DL entre X e Y, e $f_{X,x}, f_{Y,y}$ são as frequências dos alelos referentes aos locos X e Y ($X: f_X + f_x = 1$), $V(X) = f_X f_x$; $Y: f_Y + f_y = 1$; $V(Y) = f_Y f_y$.

Do mesmo modo que D' , o r^2 pode variar entre 0 e 1. D' e r^2 são as medidas mais comuns utilizadas para o cálculo do DL entre pares de locos bialélicos. Embora ambas não sejam adequadas para mensurar o DL em amostras pequenas, apresentando ou não baixas frequências alélicas, cada qual possui suas vantagens. Enquanto r^2 capitaliza eventos de mutação e recombinação ocorridos historicamente, D' apenas capitaliza eventos de recombinação, sendo a medida mais adequada para detectá-los. Entretanto, D' é fortemente afetada por amostras pequenas, de modo que a comparação entre locos contendo baixas frequências alélicas torna-se inadequada com essa medida em função de estimativas altamente viciadas do DL (Flint-Garcia et al., 2003). Portanto, no caso de estudos de associação, onde o tamanho da amostra é limitado por questões de tempo e custo envolvidos nos processos de genotipagem e fenotipagem, deve-se priorizar o r^2 para verificar a extensão do DL.

Diversos fatores influenciam o DL verificado em uma população ou espécie: taxa de mutação e recombinação, sistema de cruzamento, deriva genética, estrutura populacional, grau de parentesco, seleção, epistasia e rearranjos cromossômicos (Abdurakhmonov & Abdurakarimov, 2008). Estes fatores podem gerar falsas associações entre marcadores e fenótipo no mapeamento associativo, de modo que devem ser consideradas nas análises. Pouca informação está disponível para a extensão do DL em feijoeiro comum (Kwak & Gepts, 2009; Rossi et al., 2009; Blair et al., 2010).

De acordo com Rossi et al. (2009), a estratégia de mapeamento mais adequada para cada população pode ser escolhida a partir dos vários níveis de DL. Quando o nível de DL é baixo, geralmente, prefere-se associação por genes candidatos, pois seriam necessários muitos marcadores para cobrir a variação de todo o genoma. No entanto, quando o nível de DL é moderado ou alto, o mapeamento de associação genômico tende a ser o mais apropriado. Estes autores estudaram o desequilíbrio de ligação e a estrutura de populações selvagens e domesticadas de feijão comum e encontraram altos valores de DL, indicando que é viável o mapeamento de associação genômico com o conjunto de genótipos utilizados neste estudo.

As tecnologias genômicas em larga escala têm favorecido para que muitas sequências de genes candidatos estejam disponíveis, bem como os SNPs. Enquanto os resultados do mapeamento tradicional desenvolvido em uma população experimental derivada de um cruzamento biparental podem ser transponíveis para populações geneticamente relacionadas, os resultados derivados do mapeamento associativo podem ser aplicados a um germoplasma cuja base genética é bem maior.

O mapeamento associativo possibilita explorar alelos de genótipos exóticos, variedades locais ou populações naturais para o germoplasma de trabalho do melhoramento através de retrocruzamentos avançados ou bibliotecas de introgressão (Bresseghello & Sorrels, 2006). Estudos de associação têm sido realizados para diferentes culturas (arroz - Agrama et al., 2007; trigo - Neumann et al., 2010; cevada - Haseneyer et al., 2010).

Em feijão, estudos de mapeamento associativo também estão sendo realizados. Shi et al. (2011) fizeram uso do mapeamento associativo para associar marcadores moleculares com um patógeno que acomete a cultura do feijoeiro. Neste trabalho, os autores estabeleceram associação entre marcadores SNPs e o crestamento bacteriano. Galeano et al. (2012) utilizaram 170 SNPs para genotipar um painel de diversidade genética de feijão do CIAT composto por 93 acessos de feijão, além da genotipagem, foi realizada a fenotipagem de vários caracteres relacionados a tolerância a seca, onde os dados da genotipagem e da fenotipagem foram utilizados para realizar análises de mapeamento associativo. Neste trabalho, os autores estabeleceram associação de 30 marcadores com diferentes características relacionadas à tolerância a seca pelo método GLM (*General Linear Model*) e 28 associações utilizando o método MLM (*Mixed Linear Model*).

A metodologia de modelos mistos (MLM) é uma das mais recentes e promissoras técnicas para corrigir os falsos efeitos causados pela estrutura da população. Neste método, preconizado

por Yu et al. (2006), marcadores aleatórios são utilizados para estimar as matrizes que representam a estrutura populacional (Q) e os coeficientes de parentesco (K) da população. Essas matrizes são incorporadas ao escopo da metodologia de modelos mistos para estimar as associações do marcador com o fenótipo (Zhu et al., 2008). Q é uma matriz de co-ancestralidade do tipo $n \times p$, (onde n é o número de indivíduos e p é o número de subpopulações definidas) e K consiste em uma matriz de parentesco do tipo $(n \times n)$, na qual, os elementos fora da diagonal são uma estimativa da probabilidade de identidade por descendência, baseada em marcadores moleculares. Os elementos da diagonal de K equivalem a 1, para endogâmicos e $[0,5 \times (1 + F_x)]$ para não-endogâmicos, onde F_x é o coeficiente de endogamia (Zhu et al., 2008).

2.4 Fatores bióticos que limitam a produtividade do feijoeiro

2.4.1 Antracnose

Dentre as doenças do feijoeiro que ocorrem no Estado de São Paulo, 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.

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 classificadas como 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. 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 suscetíveis a esse isolado. Os cultivares suscetíveis 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.

O patógeno causador da antracnose é um fungo hemibiotrófico, e caracteriza-se por apresentar uma grande variabilidade, com 50 raças fisiológicas identificadas no Brasil. As principais raças, que ocorrem no Estado de São Paulo com maior frequência nos últimos anos, são as raças 31, 65, 73, 81 e 89 (Carbonell et al., 1999; Silva apud Davide, 2006).

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).

Tabela 1. Lista dos doze cultivares diferenciadores para a identificação da raça fisiológica para *C. lindemuthianum* 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

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

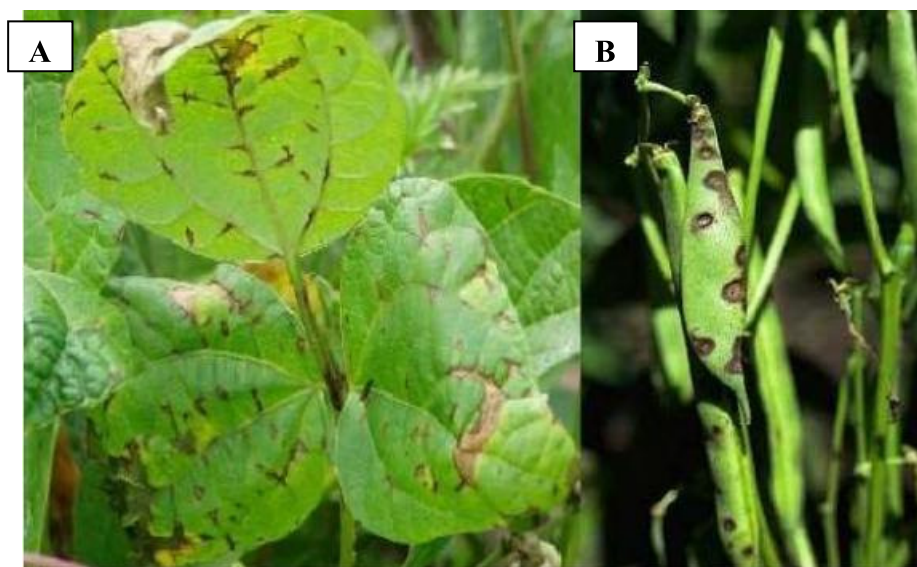


Figura 1. Sintomas de antracnose causados pelo fungo *C. lindemuthianum* em feijão. Sintomas em folhas (A) e vagens (B).

Já foram identificados 14 genes de maior efeito condicionados a doença da antracnose pelo patógeno *C. lindemuthianum* que incluem os genes (*Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*,

Co-7, Co-8, Co-9, Co-10, Co-11, Co-12, Co-13, Co-14, Co-u, Co-v, Co-w, Co-x, Co-y, e Co-z, sendo que os locos *Co-1, Co-3, Co-4, e Co-5* apresentam resistência múltipla (Ferreira et al, 2013).

Estudos de mapeamento têm mostrado que esses locos residem em sete principais regiões cromossômicas que possuem resistências específicas já identificadas. Estas encontram-se nos grupos de ligação Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv07, Pv08, e Pv11 (Ferreira et al, 2013).

Os *pools* gênicos parecem ter co-evoluído com populações de patógenos locais, tanto que acessos de um *pool* gênico são geralmente suscetíveis às raças de patógenos da mesma região, mas relativamente mais resistentes para aqueles oriundos de outro centro de diversidade. Este fenômeno tem sido observado para o fungo causador da antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum* (Balardin & Kely, 1998; Gefroy et al., 1999).

2.4.2 Mancha angular

A mancha a angular é outra doença que afeta a cultura do feijão, sendo causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, e vem tendo sua importância aumentada nas ultimas duas décadas. A doença incide em mais de 60 países do mundo, inclusive no Brasil, e pode causar perdas na lavoura de até 80% quando ocorrem severas condições de infecção (Schwartz et al., 1982; Jesus Júnior et al., 2001).

A doença da mancha angular é provavelmente uma das doenças mais importantes da parte aérea do feijoeiro (Amaro, 2006). O plantio da cultura no outono-inverno (safra seca), emprego de irrigação por aspersão, uso de cultivares suscetíveis e possíveis alterações das raças do patógeno ao longo dos anos, são importantes fatores que agravam a incidência desta doença (Paula Júnior et al., 2004).

A principal problemática da Mancha Angular está no fato do fungo *P. griseola* causar lesões nas folhas, caule, pecíolos e vagens do feijoeiro (Seattler, 1991), o que gera a diminuição de produtividade além da perda de grãos contaminados. Os sintomas de infecção nas vagens consistem em lesões epiteliais circulares vermelho-amarronzadas, enquanto que nas folhas as lesões iniciam-se pequenas, marrom ou cinza, tornando-se necróticas e ficando confinadas nas nervuras foliares em formato angular (Figura 2). Essas lesões levam ao desfolhamento prematuro do pé de feijão, reduzindo sua produtividade em número e qualidade dos grãos, com sementes mal desenvolvidas e/ou totalmente enrugadas (Correa et al., 2001; Amaro, 2006).

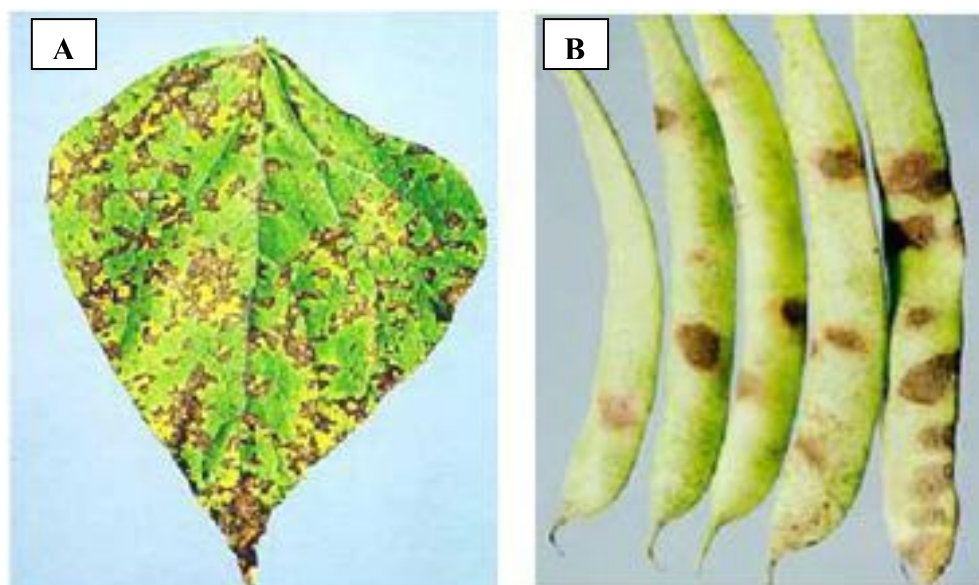


Figura 2. Sintomas se infecção por *Pseudocercospora griseola*. A – folhas contaminadas: lesões necróticas, marrom ou cinza, em formato angular. B – vagens doentes: lesões epiteliais circulares vermelho-amarronsadas. Fonte: Romero, 2006.

Phaeoisariopsis griseola é um fungo imperfeito da classe Hifomyceta, ordem Moniliales, família Stibaceae (Stenglein et al., 2003). Há uma grande variedade de raças fisiológicas deste fitopatógeno (Sartorato, 1991; Nietsche, 1998; Correa Victoria, 1987; Pastor-Corrales & Jará, 1995; Sartorato, 2002; Freire et al., 2006).

As raças serão definidas de acordo com um conjunto de 12 variedades diferenciadoras, naturalmente hospedeiras do patógeno (Borém, 1998 – Tabela 2). O isolado recebe um nome binário que corresponde a sua raça, sendo este valor gerado pela somatória dos valores atribuídos a cada cultivar diferenciador infectado, sendo um valor para a somatória dos cultivares andinas e outro para a somatória dos cultivares Mesoamericanas (Borém, 1998).

Tabela 2. Cultivares de feijão utilizadas como diferenciadoras para caracterizar raças de *Phaeoisariopsis griseola*.

Cultivar diferenciadora	Tamanho da semente ¹	Acervo genético	Valor binário quando suscetível ²
A. Don Timótio	G	Andino	1
B. G11796	G	Andino	2
C. Bolón Bayo	G	Andino	4

D. Montcalm	G	Andino	8
E. Amendoin	G	Andino	16
F. G5686	G	Andino	32
G. PAN 72	P	Mesoamericano	1
H. G2858	M	Mesoamericano	2
I. Flor de Mayo	P	Mesoamericano	4
J. México 54	M	Mesoamericano	8
K. BAT 332	P	Mesoamericano	16
L. Cornell 49-242	P	Mesoamericano	32

¹ G=grande, M=médio e P=pequeno.

² Valor binário para nomear as raças de *P. griseola*. Por exemplo, se um isolado ataca as cultivares diferenciadoras F (grupo Andino, valor binário igual a 32), G (grupo Mesoamericano, valor binário igual a 1) e K (grupo mesoamericano, valor binário igual a 16), a raça denomina-se 32.17. Obten-se o fenótipo de virulência da raça, somando-se os valores binários, primeiro os referentes ao acervo andino, e posteriormente, aos mesoamericanos com reação de compatibilidade.

Fonte: Pastor-Corrales & Jara (1995).

Diversas fontes de resistência a este patógeno já foram identificadas. Hoje são conhecidas 7 linhagens de feijoeiro resistente a *P. griseola*: ‘México 54’, ‘AND 277’, ‘Cornell 49-242’, ‘MAR 2’, ‘G 5685’, ‘BAT 332’ e ‘CAL-143’ (Nietsche *et al.*, 1998; Aparício *et al.*, 1998; Nietsche *et al.*, 2000; Sartorato, 2002; Caixeta, 2002; Oliveira, 2004; Aggarwal *et al.*, 2004). No entanto, ainda persiste, a busca por novas cultivares resistentes (Sartorato, 2006; Amaro, 2006).

Contudo, as variedades atuais de feijão apresentam diferentes espectros de resistência. Caixeta (2002) realizou testes de alelismo utilizando 4 variedades, fontes de resistência. Foram observados diferentes alelos (*Phg-1^a*, *Phg-2*, *Phg-2²*, *Phg-3*, *Phg-3²*, *Phg-4*, *Phg-4²*, *Phg-5*, *Phg-5²*, *Phg-6*, *Phg-6²*), revelando maior complexidade de herança em relação aos estudos anteriores.

Sartorato *et al.* (1999) foram os primeiros a identificar um marcador molecular próximo ao loco de resistência para Mancha Angular, utilizando população de mapeamento ‘México 54’ x ‘Rudá’. Os autores caracterizaram a resistência como sendo monogênica (*Phg-2*). Mais recentemente, López *et al.* (2003) identificaram locos ligados a resistência a *P. griseola* utilizando a população de mapeamento DG (‘DOR 364/G 19833’) com marcadores RGAs (*Resistance Gene Analogs*), sendo que 2 locos foram localizados no grupo de ligação Pv4 e 3 locos no grupo de ligação Pv10, caracterizando herança oligogênica. Até o momento, apenas um marcador SSR (PV-atct001) foi associado a um loco de resistência a Mancha Angular (Silva *et al.*, 2003), estando localizado a 7,6 cM do gene de resistência.

2.4.3 Estudos de mapeamento genético de antracnose e mancha angular

Diversos trabalhos de mapeamento genético já foram realizados para identificar QTL relacionados com a antracnose e com a mancha angular, contudo até o presente momento, nenhum trabalho de mapeamento associativo foi desenvolvido para estas duas doenças. Mahuku et al. (2010) identificaram locos de resistência à mancha angular na linhagem de feijão G10909. Dois QTL de resistência foram identificados através de mapeamento com população F₂ e de retrocruzamento entre as linhagens G10909 (resistente) x Sprite (suscetível). Marcadores SCAR PF13310, PF9260 e OPE04709 foram ligados em fase de acoplamento como loco *Phg* G10909B, a distâncias de 4,9, 7,4 e 9,9 cM, respectivamente. Estes marcadores foram mapeados no grupo de ligação Pv8 de feijão. Os autores ainda acrescentaram que, o marcador SCAR PF5330, previamente ligado a loco de resistência na linhagem G10474 (Mahuku et al., 2004) também encontra-se ligado ao loco *Phg*G10909B à distância de 5 cM. O outro loco de resistência identificado na linhagem G10909 (*Phg*G10909A) foi ligado ao marcador microssatélite PV-gaat001, à distância de 13 cM, no grupo de ligação B4. Os autores ressaltaram ainda que, ao realizar o teste de alelismo, ficou comprovado que estes locos apresentam diferentes genes de resistência dos contidos nas variedades resistentes México 54, MAR 2, G10474 e Cornell 49-242.

Gonçalves-Vidigal et al. (2011) buscaram identificar marcadores moleculares ligados aos genes *Phg-1* e *Co-1*⁴ presentes na linhagem AND 277, que conferem resistência à mancha angular e antracnose, respectivamente. Utilizando de estudos prévios de sintenia entre feijão e soja (McConnell et al. 2010) para obtenção de novos marcadores, além do uso de marcadores já desenvolvidos para feijão, os autores mapearam através da técnica de BSA (*Bulk Segregant Analysis*) e população de mapeamento F₂, (AND 277 x Rudá), os genes *Phg-1* e *Co-1*⁴, no grupo de ligação Pv1. Os genes mostraram estar completamente ligados (0 cM) entre si, e a distâncias de 0,7 e 1,3 cM dos marcadores TGA1.1570 e CV542014450, respectivamente.

Oblessuc et al. (2012) identificaram 7 QTL de resistência a mancha angular (ALS) em uma população do tipo RIL (IAC-UNA x CAL-143), em 5 grupos de ligação, e os experimentos foram realizados com a raça 4 da mancha angular em 3 ambientes diferentes, sendo que ALS10.1DG, apresentou efeito maior principal (R² entre 16% - 22%). Esse QTL foi encontrado ligado ao marcador GATS11b no cromossomo Pv10, o qual foi consistentemente amplificado através de um conjunto de plantas de feijoeiro e foi associado com a resistência a ALS. Quatro novos QTL foram identificados. Os autores concluíram que a mancha angular apresenta um

padrão de herança quantitativa e que os QTL identificados no cromossomo Pv10 são os que apresentam maior efeito, e o marcador GATS11b pode ser utilizado em trabalhos futuros de seleção assistida por marcadores para a mancha angular.

Oblessuc et al. (2013) realizaram a saturação da região do QTL ALS10.1 no grupo de ligação Pv10, previamente identificado, em uma população do tipo RIL (Oblessuc et al., 2012), sendo que a região deste QTL controla a resistência à mancha angular. Os autores saturaram a região do QTL utilizando marcadores SSRs e STS-DArTs. A posição do SSR ATA220 coincidiu com o maior LOD do QTL. Além disso, um novo QTL (ALS10.2UC) foi identificado no final da mesma região do grupo de ligação Pv10. A região *core* do QTL ALS10.1 apresenta diversas regiões relacionadas com a resposta à doenças em plantas.

A aplicação no melhoramento da cultura do feijão de marcadores ligados à QTL de resistência a doenças, obtidos nos diversos trabalhos de mapeamento, pode ser verificada na publicação de Costa et al. (2010). Os autores realizaram a introgressão na cultivar de sementes pretas Diamante Negro dos genes de resistência à antracnose (*Co-4*, *Co-6* e *Co-10*), ferrugem (*Ur-ON*) e mancha angular (*Phg-1*), previamente piramidados na cultivar Rudá (Ragagnin et al., 2009). Para isso, um programa de retrocruzamentos entre as cultivares Rudá e Diamante Negro foi realizado, juntamente com seleção assistida pelos marcadores: SCARY20830a (*Co-4*; Queiroz et al., 2004), SCARAZ20845a (*Co-6*; Queiroz et al., 2004), SACRF101050a (*Ur-ON*; Corrêa et al., 2000), SCARH13490a (*Phg-1*; Nietzsche et al., 2000). Os autores ressaltaram a importância das linhagens obtidas como potenciais cultivares geneticamente resistentes as raças 65, 89, 73 e 81 de antracnose, raças 21.3 e 29.15 de ferrugem e raças 63.21 e 63.23 de mancha angular, utilizadas nos experimentos.

Outro trabalho publicado recentemente ressalta a utilização dos marcadores moleculares na obtenção de cultivares resistentes as doenças que acometem o feijoeiro. Ferreira et al. (2012) introgridiram e fizeram a piramidação de genes que conferem resistência à antracnose e ao vírus do mosaico dourado na linhagem A25. Para tanto, os autores fizeram uso de testes de resistência a estas doenças, e também combinaram testes de resistência com a seleção utilizando marcadores moleculares. As linhagens A242, A321, A493, Sanilac BC-Are, e BRB130 foram utilizadas nos testes de resistência. Genes que conferem resistência à antracnose (*Co-2^C*, *Co-2^{A252}* e *Co-3/9*), e/ou genes que conferem resistência ao vírus do mosaico dourado (*I* e *BC-3*) foram introduzidos na linhagem A25 por seis retrocruzamentos paralelos, sendo que seis linhagens apresentaram o

mesmo tipo de grão após seis gerações de retrocruzamentos. Considerando-se o controle genético da resistência em linhas de doadores resistentes, as segregações observadas na última geração de retrocruzamentos, a reação contra os patógenos, e a amplificação dos marcadores moleculares foi também possível inferir a resistência aos genótipos até a décima geração. Como resultado deste programa de introgressão e piramidação de genes de resistência à antracnose, e ao vírus do mosaico dourado, genes que controlam a resistência à antracnose (*Co-2* e *Co-3/9*), e à resistência genética ao vírus do mosaico dourado foram introduzidos na linhagem A3308, que apresenta a mesma característica de grão da linhagem A25.

2.5 Fator abiótico

2.5.1 Estresse hídrico

Além dos fatores bióticos, os fatores abióticos também acometem a cultura do feijoeiro, reduzindo potencialmente a produtividade das cultivares. Em países em desenvolvimento, a seca é um dos principais redutores da produtividade em feijão comum, especialmente onde a irrigação para a cultura não é frequente.

O feijoeiro é considerado uma planta sensível ao estresse hídrico, principalmente em virtude da baixa capacidade de recuperação após a deficiência hídrica e sendo seu sistema radicular pouco desenvolvido (Guimarães, 1992). De acordo com Moreira et al. (1988), o consumo de água pelo feijoeiro depende do estágio de desenvolvimento, das condições do solo, época de cultivo e das condições climáticas durante todo o ciclo. A necessidade de água do feijoeiro com ciclo de 60 a 120 dias, varia entre 300 a 500 mm para obtenção de alta produtividade (Doorenbos & Kassam, 1979).

Didonet & Silva (2004) relataram que a cultura do feijoeiro, quando submetida ao estresse hídrico, apresenta redução da área foliar e aumento da resistência estomática. A fase reprodutiva é a mais sensível à deficiência hídrica, com vulnerabilidade do início da floração até o início da formação de vagens (Fageria et al., 1991), sendo que o período de 5 a 10 dias antes da antese é o mais crítico, podendo levar a uma redução de produtividade superior a 50% (Norman et al., 1995).

A redução na produção do feijoeiro sob estresse hídrico decorre da baixa porcentagem de vingamento das flores e ao abortamento de óvulos produzindo vagens chochas (Ramirez-Vallejo & Kelly, 1998). O número de dias em que o feijoeiro fica sujeito à redução de água no solo

influencia a diminuição da produtividade, proporcionando decréscimos de até 20% no rendimento (Magalhães & Millar, 1978). Assim sendo, existe correlação positiva alta entre disponibilidade de água no solo e alguns componentes de rendimento (Aguilar et al., 2008).

As estratégias de resistência à seca podem variar com o clima e as condições de solo sendo que, algumas plantas possuem adaptações que lhes permitem explorar ambientes mais áridos. Alguns mecanismos de resistência à seca estão divididos entre retardo da dessecação e tolerância à dessecação, que são referidas como tolerância à seca sob potenciais hídricos altos e baixos, respectivamente, e escape da seca, que engloba as plantas que completam seu ciclo durante a estação úmida, antes do início da seca. A inibição da expansão foliar e o alongamento de raízes são os mecanismos mais sensíveis aos déficits hídricos, e além destes ocorrem o aumento da resistência ao fluxo da água, aumento de depósito de cera na folha, fechamento estomático, indução do ácido abscísico que age reduzindo a perda de água pela planta, e alteração da dissipação de energia das folhas. O sorgo e a soja, por exemplo, possuem padrões de crescimento indeterminado que permitem que essas espécies sejam beneficiadas com chuvas de ocorrência tardia (Taiz & Zeiger, 2009).

A degradação de proteínas por proteases é fundamental para a resposta da planta a estresses abióticos como a seca. Existe um grande número de genes que codificam proteases em plantas. Apenas alguns dos genes envolvidos na resposta à seca foram caracterizados, e a sua regulação ainda é mal compreendida. Foram identificadas duas novas subtilases das folhas da cultivar Zorin de *Phaseolus vulgaris* (PvSLP1 e PvSLP2), resultados que sugerem um papel específico na resposta à seca e à senescência de feijão comum (Budic et al., 2013).

Na literatura, há poucos trabalhos publicados que relatam o desenvolvimento de mapas genéticos para feijão comum visando a detecção de QTL em populações contrastantes para a tolerância a seca. Blair et al. (2010) desenvolveram um mapa genético a partir de uma população mesoamericana x mesoamericana, contrastante para o déficit hídrico, e analisaram a herança dos caracteres relacionados com o rendimento sob condições de seca e totalmente irrigada. A fonte de tolerância à seca utilizada nos cruzamentos foi a linhagem avançada, BAT 477, de tegumento creme, que foi cruzada com a variedade de tegumento vermelho, DOR 364. A população segregante foi composta por 97 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), avançadas até a geração F₅. QTL foram detectados pelo método de mapeamento por intervalo composto (MIM) para as características de produção de sementes, peso das sementes, dias para o florescimento e

dias para maturidade para cada ambiente, que constituíram dois tratamentos (irrigado e não irrigado). O mapa genético foi baseado em marcadores AFLPs e RAPDs, ancorados a 60 marcadores de tipo SSRs, obtendo um comprimento total do mapa de 1.087,5 cM, distribuídos em 11 grupos de ligação, cobrindo o genoma total do feijão, com saturação de um marcador a cada 5,9 cM. Entretanto, alguns “gaps” permaneceram nos grupos de ligação Pv03, Pv09 e Pv11. Todas as características mapeadas (rendimento de sementes, rendimento por dia, peso de 100 sementes, dias para o florescimento e dias para maturidade) foram de herança quantitativa.

A adaptação ao estresse hídrico é um dos principais objetivos da maioria dos programas de melhoramento genético. Asfaw & Blair (2012), após analisarem características agronômicas na população endogâmica recombinante DOR 364 x BAT 477 (Blair et al., 2010), avaliaram a arquitetura das raízes na mesma população, encontrando informações genéticas fundamentais para o melhoramento e adaptação à seca nesta cultura. O genitor utilizado (BAT 477) apresenta uma característica importante como mecanismo de adaptação à seca que é uma estrutura radicular profunda, permitindo uma maior extração de umidade do solo à maior profundidade, sob condições de seca. A linhagem avançada para seca SEA 5, também foi usada como controle nos tratamentos. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, com dois tratamentos (estresse hídrico progressivo e sem estresse) analisando o comprimento de raiz em tubo. A fenotipagem foi feita analisando o comprimento das raízes, a temperatura das folhas, o conteúdo de clorofila e após 48 dias as plantas foram colhidas e analisadas quanto: a área foliar, a distribuição da biomassa, o tamanho total da raiz, a massa fresca e seca. Os resultados sugerem que os QTL associados ao comprimento da raiz são baseados na expressão constitutiva de genes e o estudo da tolerância a seca com o enfoque em características como profundidade da raiz, comprimento, grossura, volume e biomassa da raiz pode ser usada como abordagem molecular para o melhoramento da cultura.

Este tipo de estudo indica a dificuldade encontrada em estudos de caracteres complexos como a tolerância à seca, tornando as análises mais difíceis, com maior demanda de tempo e planejamento de estratégias precisas de fenotipagem e genotipagem que permitam evidenciar a diversidade genética associada aos fatores que compõem a herança desta característica quantitativa.

2.6 Biofortificação do feijoeiro (Teores de Ferro e Zinco)

Além da obtenção de cultivares que apresentem resistência às principais doenças que interferem na produtividade do feijoeiro e também cultivares que sejam tolerantes à seca, atualmente os programas de melhoramento do feijoeiro também estão incorporando a obtenção de novas cultivares que apresentem teores nutricionais elevados.

As deficiências de micronutrientes observadas na população humana são geralmente oriundas pela falta de alimentos suficientes. Contudo, os níveis de ferro, zinco e vitamina A em alimentos também sofrem variações que podem ser atribuídas a: 1) características da planta, como por exemplo, a idade, grau de maturação, espécie, variedade, cultivar, dieta; 2) característica do meio ambiente, como diferenças climáticas, tipo de solo, incidência de chuva, variação na estação do ano; e 3) fatores relacionados ao processamento do alimento, como método de preservação e preparo do alimento (Welch, 2002).

Dentre os minerais essenciais à dieta humana, o ferro e o zinco são uns dos constituintes mais importantes. O elemento ferro é um dos micronutrientes mais deficientes na dieta humana. Estima-se que 1 a 2 bilhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela deficiência de ferro. O sintoma mais conhecido, causado pela deficiência de ferro, é a anemia. Esta doença é caracterizada pela baixa produção de hemoglobina, essencial para o transporte de oxigênio para todo o organismo. Outros sintomas da falta de ferro podem ser citados como: dificuldade de aprendizado em crianças, aumento na suscetibilidade a infecções e redução na capacidade de trabalhar (Newell-McGloughlin, 2008). O zinco também é um nutriente limitante em muitas dietas de populações que dependem do feijão como alimento principal (Welch et al., 2000).

A biodisponibilidade do zinco em alimentos é importante, já que a não absorção da quantia necessária deste mineral acarreta no impedimento do desenvolvimento normal de uma criança, retarda a maturidade sexual e a maturidade do esqueleto, o sistema imunológico fica debilitado o que acarreta em um possível aumento no número de infecções, provoca diarreias, dermatite e alopecia (Sandberg, 2002; Welch, 2002).

Existe um crescente interesse na produção de plantas funcionais, que possuam elementos que melhorem a qualidade nutritiva dos alimentos, trazendo benefícios para a saúde. O aumento da quantidade de ferro nas plantas pode ser feito através da maior concentração de ferro no meio de cultura hidropônica ou no solo. Porém, o método é caro e o acúmulo de ferro na planta não

pode ser direcionado para as partes desejáveis. Além disto, o excesso de ferro pode suprimir o crescimento da planta e reduzir o valor comercial e produtividade da mesma (Goto et al. 1999).

As plantas, em geral, apresentam uma variação genética relativa à quantidade de nutrientes que elas produzem. Por este motivo, programas de melhoramento genético são utilizados para aumentar os níveis de minerais e vitaminas nestas plantas (Hirschi, 2009). Porém, tanto o melhoramento genético quanto as técnicas baseadas em biotecnologia são necessárias para a produção de plantas com as características desejadas.

O feijão possui teores consideráveis de microminerais (Beebe et al., 2000). Considerando que grande parcela da população brasileira tem o hábito de consumir feijão diariamente, a utilização de alimentos fortificados torna-se uma alternativa promissora, pois não altera a rotina, é prática e não requer custos adicionais para a administração da dieta.

A biofortificação trata-se do aumento da concentração dos nutrientes nas partes comestíveis das plantas, e esse procedimento pode ser realizado de duas formas: utilizando fertilizantes minerais ou por meio de técnicas de melhoramento genético. O aumento do teor de nutrientes utilizando fertilizantes minerais é denominado de “Biofortificação Agronômica” (Welch, 2008) e o aumento dos teores de nutrientes resultante de melhoramento genético é denominado somente de “Biofortificação” (Nestel et al., 2006).

Dois programas internacionais apresentam atividades de pesquisa em Biofortificação: o *Harvest Plus* que é financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates, pelo Banco Mundial e por outras instituições; e o programa *AgroSalud*, que é financiado pela Agência Canadense para o Desenvolvimento Internacional (CIDA) (Moraes et al., 2009).

No Brasil, algumas instituições têm desenvolvido atividades de melhoramento genético voltadas à biofortificação do feijoeiro, como a Embrapa Arroz e feijão (CNPAP), inserida no Programa *Harvest Plus*, o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) com o projeto BIOFORTA, financiado pelo Ministério de Desenvolvimento Social (MDS) e as Universidades Federais de Lavras (UFLA) e de Santa Maria (UFSM).

Os programas de melhoramento genético que visam aumentar o teor de nutrientes normalmente tomam por base quatro etapas: 1) conhecer a variabilidade genética disponível; 2) fazer a introgressão de alelos favoráveis em genótipos com tolerância a estresses bióticos e abióticos e alto desempenho produtivo; 3) realizar testes de estabilidade para teores de nutrientes

nos ambientes em que serão cultivados, e 4) disponibilizar as sementes das cultivares melhoradas para os agricultores.

Cichy et al. (2005) realizaram o cruzamento entre duas cultivares de origem mesoamericana ‘Albion’ (baixo teor de zinco) e ‘Voyager’ (alto teor de zinco). Os autores verificaram uma herança monogênica com interação alélica do tipo dominante para o teor de zinco em sementes de feijão. Contudo, Blair et al. (2009) avaliaram a herança do acúmulo de ferro e zinco em uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) em gerações avançadas ($F_{7:11}$), obtidas a partir de híbridos oriundos de acessos andinos e mesoamericanos, e verificaram que o teor de zinco na população apresentou distribuição contínua, sugerindo uma herança quantitativa, sendo que o teor de ferro também apresenta uma herança quantitativa. Neste estudo, os autores identificaram 26 QTL, sendo que 11 QTL (5 de ferro e 6 de zinco) foram agrupados na metade superior do grupo de ligação Pv11, sugerindo que marcadores moleculares presentes nessa região podem ser utilizados para realizar a seleção assistida de altos teores de ferro e zinco nas sementes de feijão.

Em trabalhos desenvolvidos com germoplasma de feijão da coleção do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, constatou-se que há variabilidade genética suficiente para aumentar em 80% o conteúdo de ferro nos grãos e em 50% o teor de zinco (Beebe et al., 2000). Além disso, observou-se a presença de variabilidade genética para teores de diversos microminerais em cultivares de feijão (Barampama & Simard, 1993; Beebe et al., 2000; Guzmán-Maldonado et al., 2000; Araújo et al., 2003; Cichy et al., 2005). Assim, o aumento da concentração de ferro e de zinco nos grãos, por meio de métodos convencionais de melhoramento genético, poderá ser eficiente também no incremento da biodisponibilidade desses microminerais (Welch et al., 2000; House et al., 2002).

A herança do conteúdo de ferro e zinco em uma RIL de 110 linhagens, provindas de duas cultivares de origem mesoamericana, também foi avaliada por Blair et al. (2010). Os autores construíram um mapa genético oriundo com base em marcadores RAPD e SSR abrangendo os 11 cromossomos do feijão comum. Neste estudo, foi encontrada uma sobreposição de QTL para ferro e zinco no grupo de ligação Pv6, sugerindo a existência de um possível loco pleiotrópico de fisiologia comum à absorção ou ao transporte de ferro e zinco.

Blair et al. (2012) avaliaram uma população de 138 genótipos RC₂ F_{3,5} derivadas de introgressão do genótipo selvagem G10022 com altos níveis de ferro. Através de mapeamento

por intervalo composto (CIM) e por análise de ponto (SPA), os autores identificaram associações de marcadores e ferro e zinco nos grupos de ligação Pv01, Pv06, Pv07, Pv08, Pv10 e Pv11 para o ferro, para o zinco nos cromossomos Pv01, Pv04 e Pv10. Os autores concluíram que o programa com retrocruzamento avançado produziu algumas linhas com introgressão de traços de minerais de alta acumulação usando um genitor doador selvagem.

Entretanto, para que seja possível o desenvolvimento de cultivares de feijão com teores elevados de microminerais é necessário saber a composição desses elementos em grãos de cultivares brasileiras de feijão e os efeitos da interação genótipo x ambiente sobre esses caracteres. Ribeiro et al. (2008) determinaram a composição de micronutrientes (ferro, zinco, cobre, manganês e boro) em 19 cultivares de feijão comum utilizadas no Brasil. Os experimentos foram conduzidos em dois locais para avaliar a interação genótipo x ambiente. Os grãos de feijão foram constituídos em maior parte por ferro seguido de zinco, sendo que a cultivar Guateian 6662 apresentou alto teor de microminerais, independentemente do local de cultivo, sendo indicada na biofortificação de dietas e para derivações no programa de melhoramento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Um total de 180 genótipos de feijão comum foram selecionados para compor o painel associativo, a diversidade genética destes genótipos foi previamente avaliada por Silva (2011). Os genótipos selecionados são compostos por linhagens e cultivares que apresentam alta variabilidade quanto à morfologia dos grãos, fatores bióticos, como resistência a pragas e doenças, e fatores abióticos, como tolerância ao estresse hídrico.

Dez sementes de cada acesso foram germinadas com temperatura à 25°C e fotoperíodo de 12h, por três dias. Ao terceiro dia as sementes germinadas foram transplantadas para vasos com terra, para o crescimento e desenvolvimento das plantas até o momento da coleta. Após 60 dias o material foliar de cada genótipo foi coletado foi liofilizado, moído, acondicionado em frasco plástico hermeticamente fechado e armazenado em freezer a -20°C.

3.2 Extração e quantificação dos DNAs

O DNA genômico total de cada um dos 180 acessos, obtido na forma de *bulk* com 10 plantas por genótipo, foi extraído de acordo com a metodologia CTAB, descrita por Hoisington et al. (1994) e a quantificação do DNA foi realizada por comparação visual de intensidade das bandas com um padrão de concentração crescente de DNA de fago λ (Invitrogen), migrados em gel de agarose 1%. Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas em solução tampão TE (Tris pH 8,0, 10mM; EDTA pH 8,0, 1 mM), para uma concentração final de 10ng/ μ l e estocadas à 4°C.

3.3 Genotipagem dos SSRs nos 180 genótipos de feijão do painel associativo

Um total de 103 marcadores microssatélites foram utilizados para realizar a genotipagem nos 180 genótipos de feijão comum (Campos et al., 2010; Baroni, 2010). As reações de amplificação para todos os marcadores utilizados 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 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 1x de tampão da enzima, num volume final de 15 μ l. As condições de amplificação utilizadas para os SSRs genômicos foram: 1) 94°C, 1 min.; 2) 94°C, 1 min.; 3) temperatura de anelamento (*Ta*) específica para cada SSR por 1 min.; 4) 72°C, 1 min., 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72°C, 5 min.; 7) 15°C, incubação final. Para estas reações foi utilizado o termociclador MyCycler (BioRAD).

Para verificar a qualidade das amplificações, primeiramente os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo para visualização das bandas. Os locos que apresentaram padrão adequado de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante 6%, corados com nitrato de prata, de acordo com Creste et al. (2001).

Os géis de poliacrilamida 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 μ L de PSA (Persulfato de Amônio) e 60 μ L de TEMED. Após aquecimento do gel em cuba de eletroforese (*Nucleic Acid Sequencing Systems – CBS Scientific Company, INC*) por 20 min. à 900 V, 5 μ L de reação de cada acesso foram aplicados no gel, preparados a partir de 15 μ L de produto de PCR com 5 μ L de formamida. Foram feitas 2 entradas por placa, sendo que cada uma continha 48 amostras de DNA mais o

“ladder” de 50 pares de base (*Invitrogen*), utilizando-se um total de 5 placas para genotipar cada microssatélite para os 500 acessos. A corrida foi de aproximadamente 4h à 800-900V. A leitura das bandas polimórficas foi realizada utilizando peso molecular em pares de base de cada marcador microssatélite.

3.4 Genotipagem com SNPs nos 180 genótipos de feijão do painel associativo

A genotipagem para os 384 SNPs foi conduzida via tecnologia Vera Code® em plataforma BeadXpress (Illumina) no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão (Goiás, GO). Um conjunto de 384 marcadores SNPs, validados através do *Prelim file* (<https://icom.illumina.com/Custom/UploadOpaPrelim/>), previamente identificados para *Phaseolus vulgaris* (Vianello et al. *em submissão*), foram selecionados para compor o *Oligo Pool Assay* (OPA) de marcadores SNPs. Primeiramente foi realizado um teste de polimorfismo no painel associativo. Durante o procedimento de detecção dos SNPs na plataforma BeadXpress, foram utilizados três oligonucleotídeos, sendo dois alelo-específicos (ASO) para cada uma das variações de um mesmo SNP e o terceiro loco-específico (LSO), ligando-se à região 3' do fragmento de DNA contendo o SNP alvo. Após a hibridização, o processo consistiu na extensão das regiões entre o ASO e o LSO, seguido pela fusão das mesmas a partir de uma enzima ligase formando, assim, um único fragmento alelo-específico. Posteriormente esse fragmento foi amplificado utilizando a enzima Titanium *Taq* DNA polimerase e *primers* complementares à região ASO, marcados com as fluorescências Cy3 e Cy5. Ao final, os produtos derivados da PCR foram hibridizados através da complementaridade da região LSO com as sequências presentes na superfície das *beads* holográficas.

A genotipagem dos SNPs foi realizada por meio do programa *GenomeStudio* versão 1.8.4 (Illumina, EUA) utilizando valores de *Call Rate* variando de 0,80 a 0,90 e *GenTrain* $\geq$ 0,26 para o agrupamento dos SNPs. A clusterização (agrupamento) para a chamada dos alelos referentes a cada SNP foi feita, *a priori*, de modo automatizado com base na intensidade dos sinais emitidos a partir dos fluoróforos Cy3 e Cy5. Para a análise dos dados, os agrupamentos foram individualmente e manualmente ajustados determinando os melhores *clusters*.

3.5 Estimativa dos perfis de diminuição dos desequilíbrios de ligação em *P. vulgaris* com marcadores SSRs e SNPs

As sequências dos 103 SSRs e dos SNPs foram submetidos a uma análise de BLAST no genoma de feijão comum disponível no site *Phytozome* (www.phytozome.net) para verificar em qual cromossomo cada marcador molecular estava alocado. O critério utilizado para correlacionar os cromossomos putativos com os marcadores inclui E-values $\leq 1 \times 10^{-15}$ e uma identidade mínima de 70% entre a ‘query’ e as ‘sequências’ do banco de dados.

O desequilíbrio de ligação (DL) ao longo do genoma foi analisado considerando 90 marcadores SSR e 331 marcadores SNP, com base em um painel contendo 180 genótipos de feijão. Para os marcadores SSRs, utilizou-se o teste exato de Fisher (Fisher, 1935) como uma medida aproximada do DL, uma vez que nenhuma abordagem desse parâmetro obteve grande aceitação para locos multialélicos (Slatkin, 2008). Neste contexto, o teste exato de Fisher foi utilizado para todas as possíveis combinações de pares envolvendo 90 marcadores SSR, resultando, portanto, em múltiplos testes. Dessa forma, para evitar a ocorrência do erro tipo I, ou seja, a rejeição equivocada de uma hipótese verdadeira utilizou-se inicialmente a correção de Bonferroni (Weir, 1996). No entanto, como esse procedimento tende a ser bastante conservativo, no sentido que o controle do erro tipo I acaba promovendo o erro tipo II, utilizou-se, adicionalmente, o método do FDR – *False Discovery Rate* (Benjamini & Hochberg, 1995), com o objetivo de promover a correção para múltiplos testes considerando uma visão menos conservativa.

A queda do DL com a distância genética também foi investigada considerando os SSRs. Dos 90 marcadores utilizados no painel associativo, 43 estiveram presentes em mapas de ligação previamente construídos (Hanai, 2010; Campos, 2011) e 81 puderam ser alinhados no genoma sequenciado. Dessa forma, com a referência de posição desses SSRs no genoma, foi possível plotar as probabilidades dos testes de Fisher, envolvendo pares de SSRs situados em um mesmo grupo de ligação ou cromossomo, contra às distâncias genéticas dos mesmos, de modo a investigar o comportamento do DL ao longo do genoma.

Para o caso dos SNPs, utilizou-se o quadrado da correlação – r^2 (Hill & Robertson, 1968) como medida própria do DL. Para cada um dos 11 cromossomos disponíveis, foram gerados gráficos do tipo *heatmap* para a visualização dos padrões do DL encontrados, envolvendo SNPs fisicamente ligados. Além disso, a queda do DL com a distância genética foi investigada

considerando o r^2 entre os SNPs fisicamente ligados nos cromossomos do feijão, tendo-se a obtenção de ajuste de um modelo não linear para explicar o fenômeno genético.

Para os dois tipos de marcadores moleculares (SSRs e SNPs), tanto as distâncias em pares de bases (pb) quanto em centimorgans (cM) foram consideradas para visualização e comparação dos padrões do DL, tendo-se como referência a relação de 150.000 pb para cada cM, apresentada por Heslop-Harrison (1991) para *Arabidopsis thaliana*, que é uma espécie modelo. Dois mapas foram construídos contendo as posições genômicas dos SSRs e dos SNPs, como forma de visualizar a distribuição dos marcadores amostrados ao longo do genoma.

Todas as análises foram realizadas pelo software R (R Development Core Team, 2013), com o suporte dos pacotes estatísticos *LDheatmap* (Shin et al., 2006) e *Synbreed* (Wimmer et al., 2012).

3.6 Fenotipagem com *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magnus e avaliação de resistência dos 180 genótipos de feijão comum à antracnose

As sementes dos 180 genótipos de feijão comum foram germinadas em papel toalha especial para germinação (germitest) em BOD (*Biochemical oxygen demand*) à 25 °C por três dias. Ao terceiro dia, essas sementes foram transplantadas para caixas contendo vermiculita autoclavada, 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. A casa de vegetação e a sala de inoculação estão localizadas na Fazenda Santa Eliza, centro experimento do IAC.

O isolamento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* raça 04 (raça Andina, agressiva, cedida pelo Dr James Kelly) foi realizado em meio BDA + antibiótico (batata-dextrose-água + 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°C (± 1 °C), no escuro, durante 8-10 dias.

As avaliações foram feitas em casa de vegetação em condições estáveis de temperatura (23°C) e umidade (95-100%, nas primeiras 48h), com fotoperíodo de 12h. Para minimizar

possíveis erros humanos e variação ambiental, foram feitas 4 repetições, e em cada repetição foram avaliadas 4 plantas por genótipo. Para cada repetição, foi feito um sorteio da ordem dos genótipos, onde essas sementes foram separadas previamente para evitar erros na hora de germiná-las.

A avaliação da severidade foi efetuada entre 7 a 10 dias após a inoculação 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 (Baroni, 2010).

3.7 Fenotipagem com *Pseudocercospora griseola* e avaliação da resistência dos 180 genótipos de feijão a mancha angular

As sementes dos 180 genótipos de feijão comum que foram selecionadas para compor o painel associativo foram germinadas em papel toalha especial para germinação (germitest) em BOD à 25 °C por três dias. Após a germinação 4 sementes de cada genótipo foram semeadas em caixas (29,5 cm x 46,5 cm x 12,5 cm) com terra adubada, cada uma com 3 genótipos diferentes. O delineamento experimental utilizado também foi o de blocos casualizados com quatro repetições. O inóculo da raça 0-39 foi obtido a partir de cultura monospórica do fungo que foi cultivada em meio V8 a 24°C, durante 10 a 12 dias. A inoculação por pulverização em ambas as superfícies foliares (concentração 10^4 esporos/ml) foi realizada quando a plântula apresentou folhas do primeiro trifólio expandidas (estágio V3), sendo mantidas em condições controladas de temperatura (22-24°C) e umidade (95-100%, nas primeiras 48h), com fotoperíodo de 12h, ideais para o crescimento do fungo (Monda et al., 2001; Ragagnin et al., 2005). A avaliação da severidade foi realizada com auxílio de uma escala diagramática com nove níveis de severidade (CIAT, 1995; Godoy et al., 1997) quinze e vinte dias após a inoculação (Oblessuc, 2009).

3.8 Fenotipagem dos caracteres relacionados com estresse hídrico no painel associativo

No Instituto Agronômico de Campinas (IAC), foram construídas duas casas de vegetação, uma para o experimento com o tratamento “estresse” (Figura 3 - A) a qual possui cobertura para evitar que entre água nos dias de chuva; outra para o tratamento “controle” (Figura 3 - B), sendo que esta casa de vegetação não apresenta cobertura. As casas de vegetação foram adaptadas com

um sistema de irrigação individual para cada vaso, permitindo controlar a quantidade de água de entrada e o estresse gerado para cada um dos vasos.

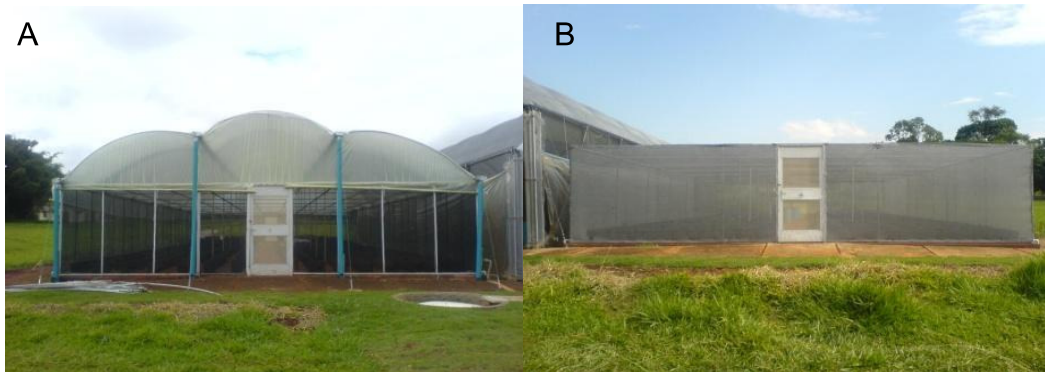


Figura 3. Casas de vegetação para experimentos de estresse hídrico: a) Tratamento, b) controle.

Cada experimento apresentou três repetições, com delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram dispostas duas sementes em cada vaso de 14 litros, contendo 12 kg da mistura de terra com areia e adubo. O estresse empregado foi do tipo terminal e aplicado na fase vegetativa das plantas, ou seja, as plantas da casa de vegetação do tratamento não irrigado após atingirem o estágio V3 foram submetidas ao estresse terminal, no qual é cessada a irrigação, e o potencial matricial do solo é controlado por meio de medidores Watermark (Irrometer, Riverside, CA, EUA), e quando a capacidade de campo é atingida por todos os 15 sensores instalados nos vasos a irrigação é retomada, já que o ponto de murcha permanente do feijoeiro (-199 Kpa) é atingido. O tratamento controle foi irrigado normalmente durante todo o experimento.

Após os 20 dias de estresse hídrico em que as plantas do tratamento não irrigado foram submetidas, o conteúdo de clorofila (unidade = unidades SPAD) usando o equipamento SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc, Osaka, Japão) e a temperatura das folhas ($^{\circ}\text{C}$), utilizando um termômetro infravermelho (Telatemp model AG-42D, Telatemp, CA, EUA) foram mensurados.

Para quantificar outras diferenças fisiológicas na tolerância ao estresse hídrico, vários atributos foram medidos através de amostragens destrutivas, separando as folhas dos caules de uma única planta de cada um dos vasos. A massa fresca das folhas e do caule foram mensuradas utilizando uma balança analítica (unidade = gramas). A área foliar (unidade = cm^2) foi medida num scanner LICOR modelo LI-3000 (Centro de Grãos e Fibras, IAC). As folhas e o caule de

cada planta foram colocadas em sacolas e secas para medir a produção de matéria seca (unidade = gramas) e distribuição dentro das diferentes partes. Todas as características mensuradas nas plantas da casa de vegetação do tratamento não irrigado também foram mensuradas no tratamento irrigado no mesmo período.

Para quantificar caracteres relacionados com a produtividade, um novo experimento foi montado, sendo que seguiu o mesmo delineamento experimental que o utilizado ao avaliar caracteres da parte aérea da planta relacionados com o estresse hídrico. Neste segundo experimento, o número de sementes (NS), o número de sementes por vagem (NSV), o peso de cem sementes (PCS) – (unidade = gramas) e o número de vagens (NV) foram avaliados.

3.9 Análises dos teores de ferro e zinco

Tendo em vista que o teor de ferro (Fe) e zinco (Zn) pode sofrer variação de acordo com o genótipo do feijão, os teores destes dois micronutrientes foram estimados no presente estudo. Sementes dos 180 genótipos de feijão foram semeadas em vasos contendo o mesmo tipo de solo, os genótipos foram mantidos em condições controladas em casa de vegetação no IAC até a coleta das vagens de cada genótipo. Cerca de 100g de sementes de cada um dos 180 acessos que compõem o painel associativo foram lavadas em água sanitária, posteriormente secas em estufa por 3 dias. As sementes foram moídas e depois enviadas para análise do teor de Fe e Zn no Instituto Brasileiro de Análises (IBRA - <http://www.ibra.com.br/>), sendo que o método de análise mineral: *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS; Blair et al., 2009) foi utilizado para fornecer os teores de Fe e Zn nos 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo.

3.10 Análises de dados fenotípicos para o mapeamento associativo

Análises de variância (ANOVA) de todos os fenótipos avaliados (antracnose – raça 4, mancha angular - raça 0-39, caracteres relacionados com o estresse hídrico e teores de ferro e zinco) foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS v.8.2 (Instituto SAS, Cary, NC, EUA) para cada característica avaliada, sendo utilizado o nível de significância de 0,05.

3.11 Análises de mapeamento associativo

As análises de mapeamento associativo foram realizadas utilizando o programa TASSEL 2.3. O Modelo linear misto (*Mixed Linear Model* - MLM) presente no programa Tassel, versão

2.1 (www.maizegenetics.net) foi utilizado, sendo que os marcadores que foram testados e as subpopulações que foram geradas pelas análises (matriz Q) foram considerados como fatores de efeito fixo, e a matriz de parentesco foi considerada como efeito aleatório. O nível de significância considerado para que um marcador apresente associação significativa foi o um p valor $\leq 0,05$.

As matrizes Q de cada marcador (SSRs e SNPs) foram obtidas através de análises separadas utilizando o programa Structure 2.3.3. Para esta análise foi utilizado um arquivo com dados de genotipagem e foram gerados 19 arquivos de parâmetros, com valores de K=2 a K=20. Os arquivos foram submetidos para análise Structure no site da Universidade de Cornell (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx>), sendo realizadas cinco repetições para cada valor de K, usando o modelo *admixture* com 200.000 períodos de *burn* e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeia de Markov (MCMC). Para verificar qual K era o mais adequado para inferir os agrupamentos, foi calculada a razão de verossimilhança (LnPD) de acordo com os critérios propostos por Evanno et al. (2005).

A matriz de parentesco foi obtida utilizando o *software* SPAGeDi, versão 1.2 (Hardy & Kemans, 2002) para os marcadores SSRs, enquanto que para os marcadores SNPs a matriz de parentesco foi calculada utilizando a função *Kinship* do programa Tassel, versão 3.0 (www.maizegenetics.net).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da estrutura dos marcadores SNPs para posterior utilização nas análises de mapeamento associativo

Um total de 332 SNPs foram utilizados para realizar as análises de associação com as características fenotípicas avaliadas, pois dos 369 SNPs 13 não amplificaram para mais de 50% das amostras e foram descartados para as análises de DL e mapeamento associativo, e 21 SNPs não apresentaram posição definida no genoma do feijão (www.phytozome.net). Para realizar as associações no programa TASSEL, foi necessário primeiramente realizar a análise parentesco com os marcadores SNPs, e para tanto o programa Structure foi empregado para estimar estes coeficientes de parentesco. De acordo com as análises do Structure com os 332 SNPs, o

agrupamento mais adequado para os 180 genótipos de feijão comum, tomando por base o método de Evanno et al. (2005), foi o $K=7$ (Figura 4 e 5).

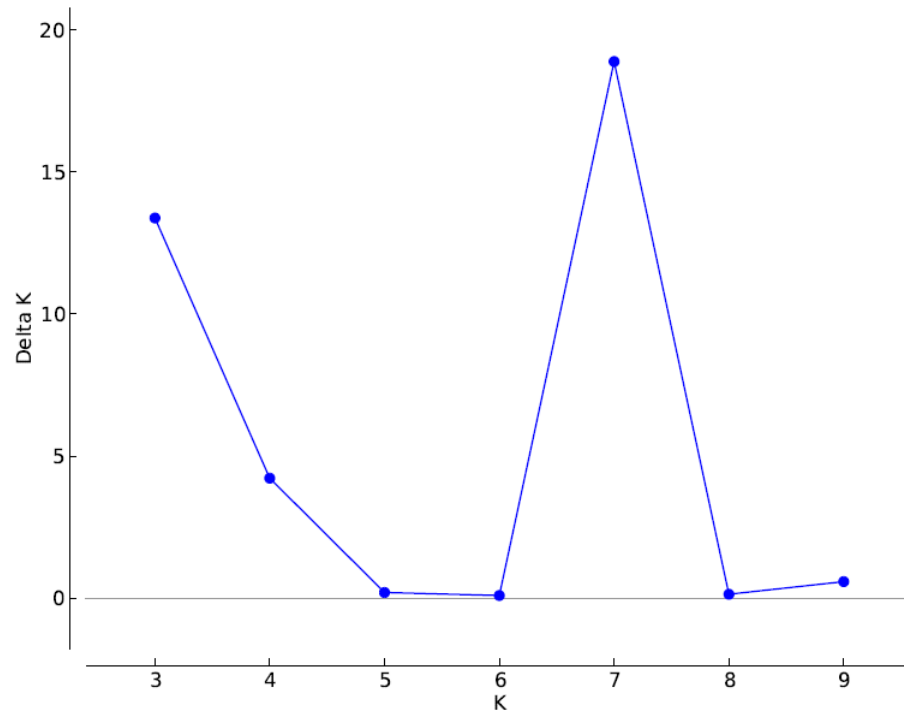


Figura 4. Representação gráfica do número ideal de grupos no programa Structure inferido utilizando o critério de Evanno et al. (2005). A análise foi baseada em dados obtidos a partir de 332 SNPs nos 180 genótipos de feijão avaliados quanto à diversidade genética. A melhor divisão atribuída é em sete grupos ($K=7$).

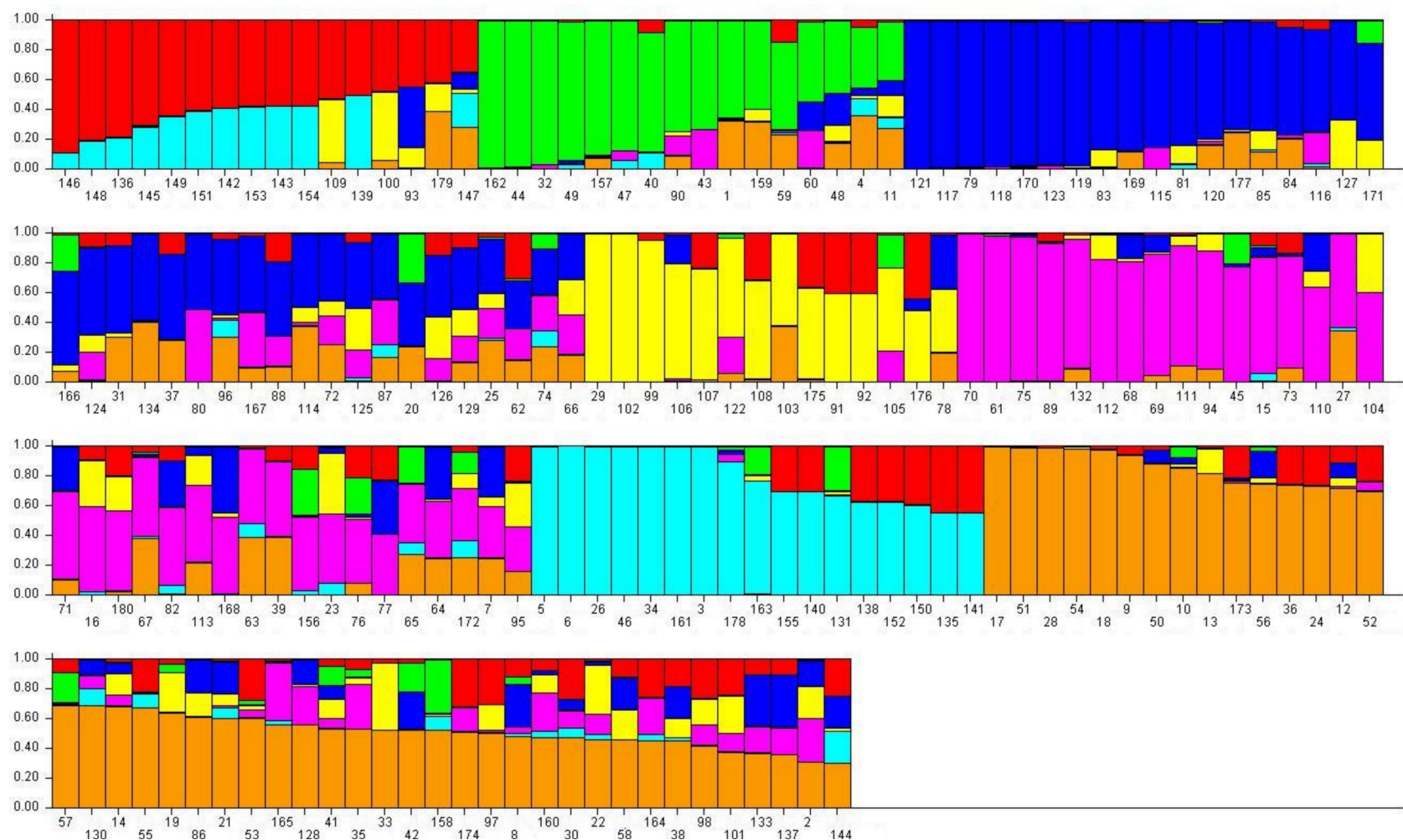


Figura 5. Representação dos 180 genótipos de feijão comum de acordo com a análise bayesiana do programa Structure tomando por base a genotipagem com os marcadores SNPs. Os acessos avaliados foram divididos em 7 grupos (K=7). Os números correspondem à ordem dos acessos na Tabela 3.

4.2 Análise do desequilíbrio de ligação (DL) utilizando marcadores SSRs e SNPs

O DL com os marcadores SSRs que apresentam posição de mapa e foram genotipados nos 180 genótipos de feijão que compõem o painel associativo. Por meio destas análises, foi possível verificar que o DL em feijão se estende até 15 mega bases (Figura 6), ou seja, o feijão apresenta uma alta extensão de DL, o que é esperado, já que o feijão é uma planta autógama. Os SSRs utilizados para efetuar o cálculo do DL estão distribuídos ao longo de genoma (Figura 7).

Em feijão comum, altos níveis de DL têm sido encontrados ($r^2=0,1$), sendo que os maiores índices de DL foram observados em populações domesticadas ($r^2=0,18$), quando comparados aos níveis de DL estimados em populações selvagens ($r^2=0,08$) (Rossi et al., 2009). Tendo em vista que o nível de DL na população em estudo é alto, o mapeamento de associação genômico (*Whole Genome Scan*) é o método mais adequado para realizar o estudo associativo em feijão comum.

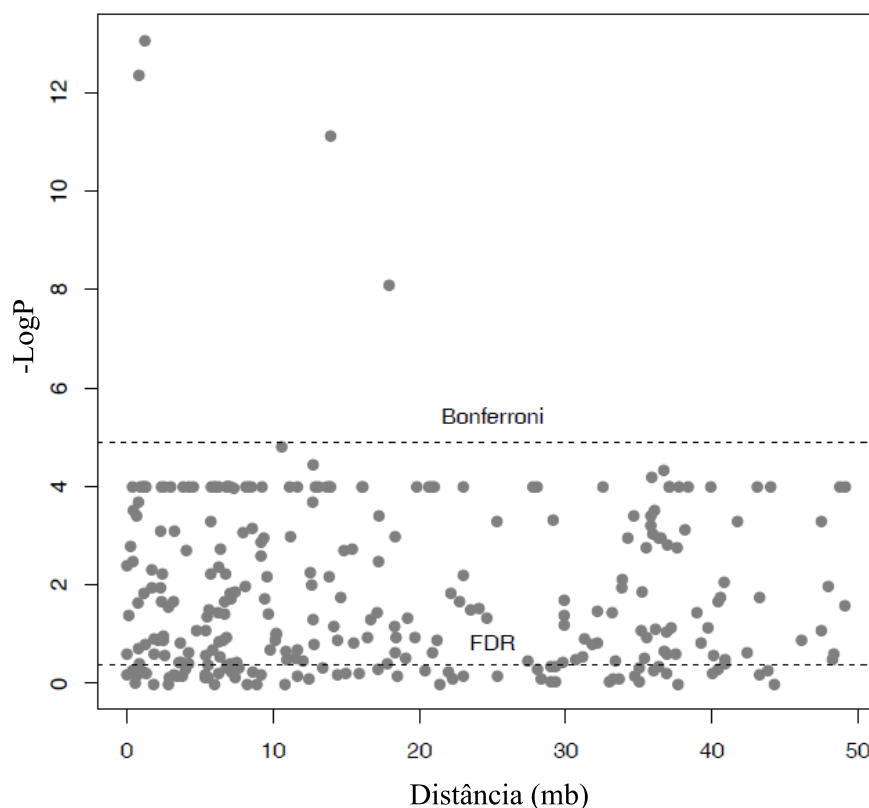


Figura 6. Desequilíbrio de ligação em pares de base para os marcadores SSRs. Os limiares correspondentes às correções de Bonferroni e FDR (*False Discovery Rate*) estão indicadas em escala logarítmica, mostrando as associações significativas (em DL) e não-significativas acima e abaixo dos vetores, respectivamente.

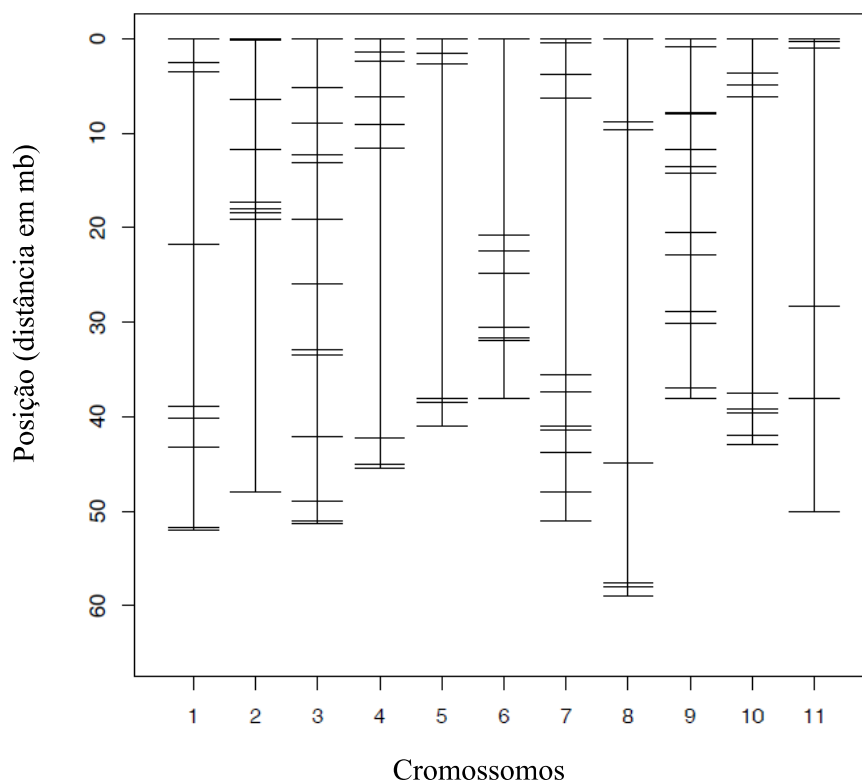


Figura 7. Distribuição dos 90 marcadores SSRs nos 11 cromossomos de feijão comum.

Dos 384 SNPs, 369 (96,09%) foram utilizados para a genotipagem e 15 (3,91%) foram descartados. Estes 15 SNPs foram excluídos devido aos seguintes motivos: um falhou completamente, nove foram monomórficos e cinco estavam muito fracos, dificultando a genotipagem.

Do total de SNPs que amplificaram, 158 SNPs (41,15%) funcionaram com elevada eficiência amplificando para o conjunto total de indivíduos avaliados. Para os demais SNPs, 197 amplificaram para mais de 90% dos genótipos avaliados, 13 amplificaram para mais de 50% das amostras e um funcionou para menos de 50% das amostras. Com base no teste de reprodutibilidade do software *Genome Studio*, não houve erros de replicatas entre as duplicatas BAT477, Pérola, amostras 70, 115 e 149. O desequilíbrio de ligação foi calculado com 331 SNPs, pois dos 369 SNPs, os 13 que não amplificaram para mais de 50% das amostras foram descartados para as análises de DL e mapeamento associativo, e 21 SNPs não apresentaram posição no genoma do feijão.

Com os marcadores SNPs, foi possível detectar um decaimento rápido no DL (Figura 8), apesar de ter demonstrado um alto DL em várias regiões dos cromossomos (Figura 9), sendo que quanto maior o valor de r^2 mais elevado é o DL. O DL em feijão se estende até 40

mega bases, segundo os resultados obtidos com o cálculo do DL realizado com os marcadores SNPs (Figura 9). O decaimento rápido não era esperado, já que o feijão trata-se de uma planta autógama, e espera-se que este decaimento ocorra de uma forma moderada ou até mesmo lenta. Este fato deve estar atribuído a estes SNPs terem sido desenvolvidos a partir de sequências que estão relacionadas com o estresse hídrico, e estas regiões encontram em *clusters* no genoma, sendo assim os marcadores não estão distribuídos aleatoriamente, o que interfere no cálculo do desequilíbrio de ligação. Esta distribuição em blocos pode ser observada na Figura 10. Blair et al. (2010) encontraram níveis moderados de DL ao longo do genoma do feijão ao avaliarem locos APA em 105 genótipos de feijão comum. Os autores genotiparam um total de 100 marcadores SSRs, sendo que 5 foram selecionados para a caracterização da região ATA (*ATA-rith* – regiões ricas em repetições ATA no genoma). O maior DL encontrado pelos autores foi no grupo de ligação Pv4, enquanto que no presente trabalho os maiores DLs foram encontrados nos cromossomos Pv3 e Pv8.

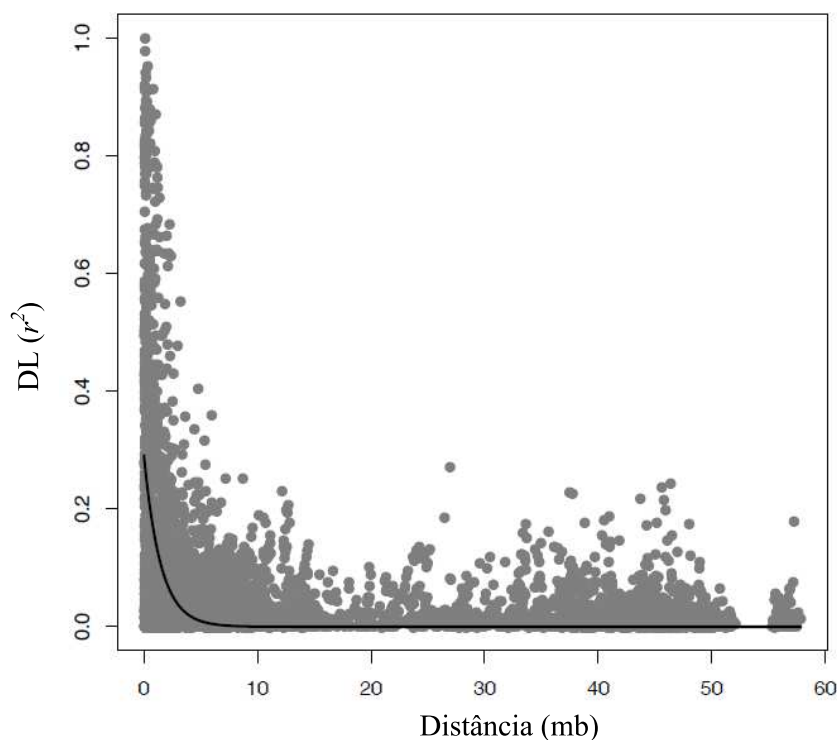


Figura 8. Desequilíbrio de ligação (DL) com marcadores SNPs ligação em pares de base.

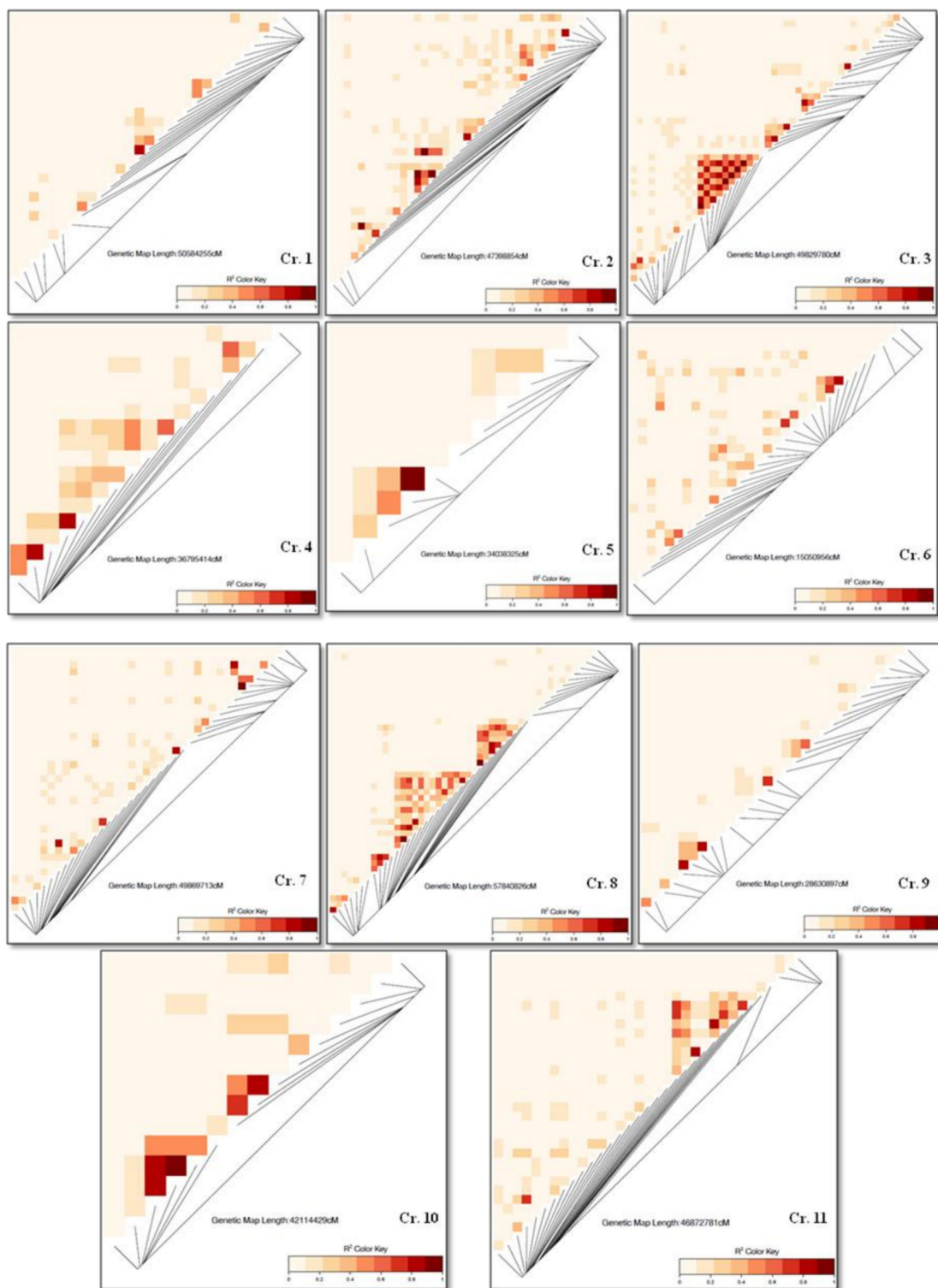


Figura 9. Matrizes do desequilíbrio de ligação de pares de SNPs em cada um dos 11 cromossomos de *Phaseolus vulgaris* L.

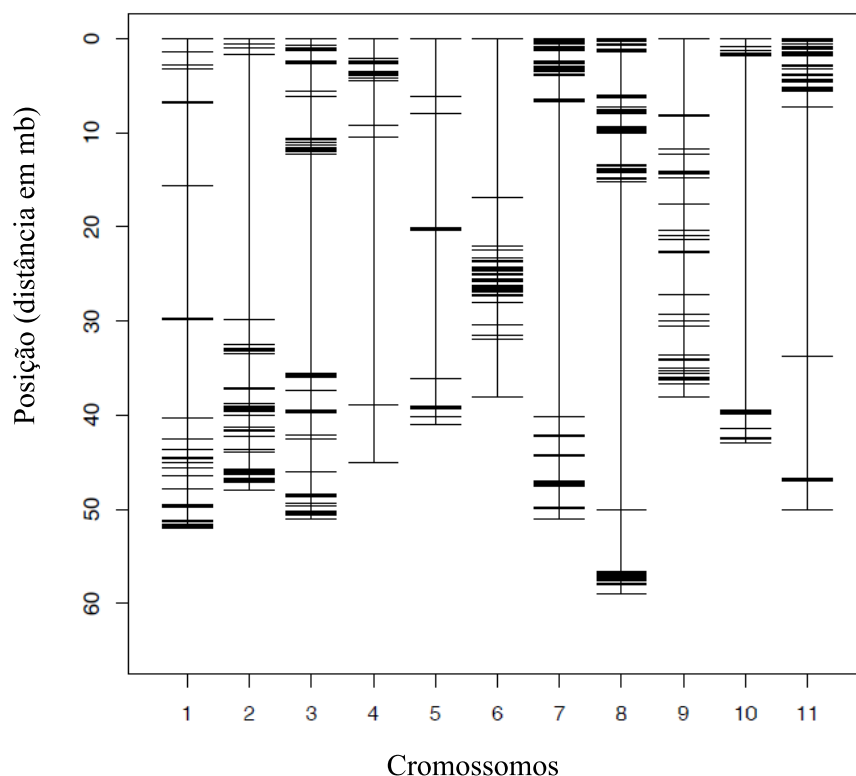


Figura 10. Distribuição dos 331 marcadores SNPs nos 11 cromossomos de feijão comum.

Considerando que o tamanho estimado para o genoma do feijão fica entre 450 à 650 mega bases (mb), e os mapas genéticos gerados tem uma estimativa média de 1600 cM, e que o genoma do feijão sequenciado até o momento tem tamanho de 516 mb, o número de marcadores SSRs necessários para realizar o mapeamento associativo utilizando a metodologia de *Whole Genome Scan* é de 35 marcadores SSRs, e 13 marcadores SNPs. Contudo o número de marcadores necessários para realizar o mapeamento associativo de forma confiável deve ser realizado com o maior número de marcadores possíveis, para evitar falsas associações entre marcadores e característica fenotípica associada.

4.3 Fenotipagem da antracnose e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs

A inoculação com a raça 4 de antracnose apresentou as características da ocorrência da doença no feijoeiro, ou seja, as lesões provocadas pelo fungo se concentram nas nervuras das folhas (Figura 11 - A). A raça 4 da antracnose é uma raça andina e, portanto, é bastante agressiva para genótipos mesoamericanos.

Para facilitar e padronizar as notas do sintoma de antracnose foi feito uma escala própria baseada nas notas do CIAT (Figura 11 - B; Baroni, 2010). 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 avaliações fenotípicas de resistência/suscetibilidade das linhagens do painel associativo foram feitas individualmente, em cada uma das quatro plantas por genótipo, por repetição.

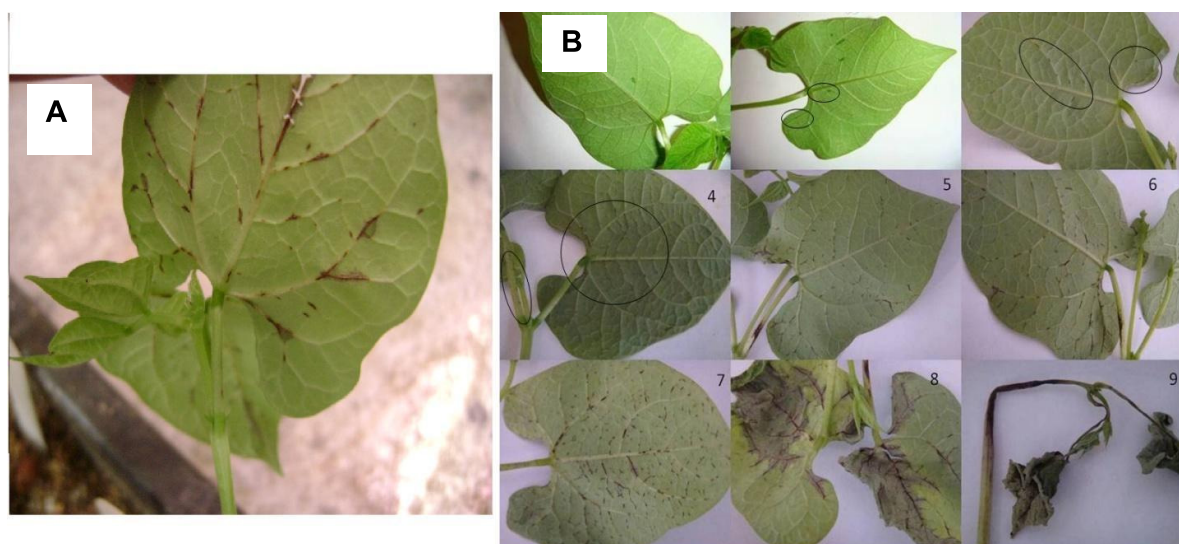


Figura 11. (A) Sintoma característico de antracnose na folha do feijoeiro. (B) Padronização da escala de notas do CIAT para uniformizar as notas de avaliação no painel associativo (180 genótipos de feijão comum). Círculos mostram as áreas com sintomas de antracnose (Baroni, 2010).

Para os dados fenotípicos obtidos no experimento com a raça 4 de antracnose, foram realizados testes estatísticos para verificar se os dados estavam ou não normalizados, a fim de utilizá-los nas análises de mapeamento associativo. Os testes utilizados para esta avaliação foram o Skewness, Kurtosis e Shapiro-Wilk. O valor de Skewness foi de 0,28, de Kurtosis 4,19 e o de Shapiro-Wilk 0,93 (p -valor $< 0,0001$). Sendo assim, como mais de uma das análises estatísticas apresentou diferenças significativas, os dados obtidos desta fenotipagem foram submetidos à normalização. Os valores significativos foram submetidos à transformação Box-cox (Osborne, 2010), com auxílio do programa estatístico R, a qual gera curvas para a normalização dos dados. O objetivo dessa normalização é que os valores esperados das observações transformadas sejam descritos por um modelo de estrutura

simples, a variância seja constante e as observações estejam normalmente distribuídas. Os valores não significativos foram mantidos, pois já estavam normalizados.

A partir do parâmetro lambda (λ), foi escolhido o modelo de normalização mais adequado a ser aplicado nos valores dos dados fenotípicos (Figura 12). Como a curva do λ posicionou próximo do valor 0 (zero), e os valores dos dados fenotípicos da raça 4 de antracnose foram transformados fazendo o logaritmo das médias das repetições de cada bloco (Figura 13).

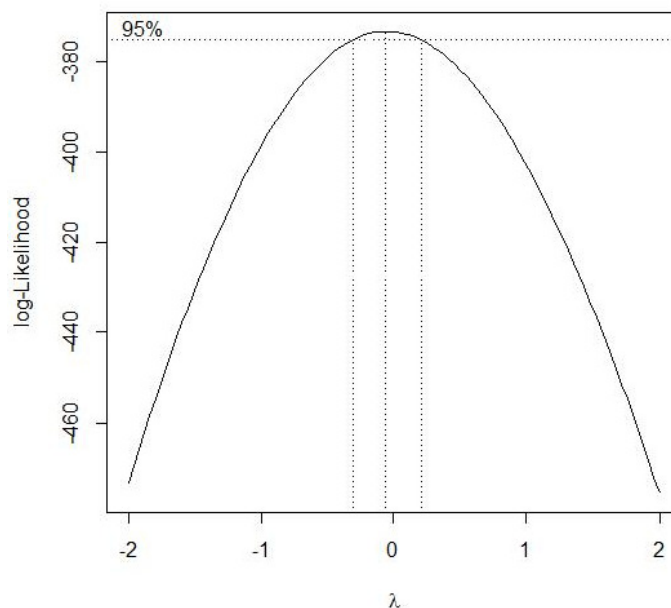


Figura 12. Curva de normalização dos dados fenotípicos obtidos da avaliação da raça 4 de antracnose, no experimento em casa de vegetação, com os 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo. O valor de λ foi próximo ao valor zero.

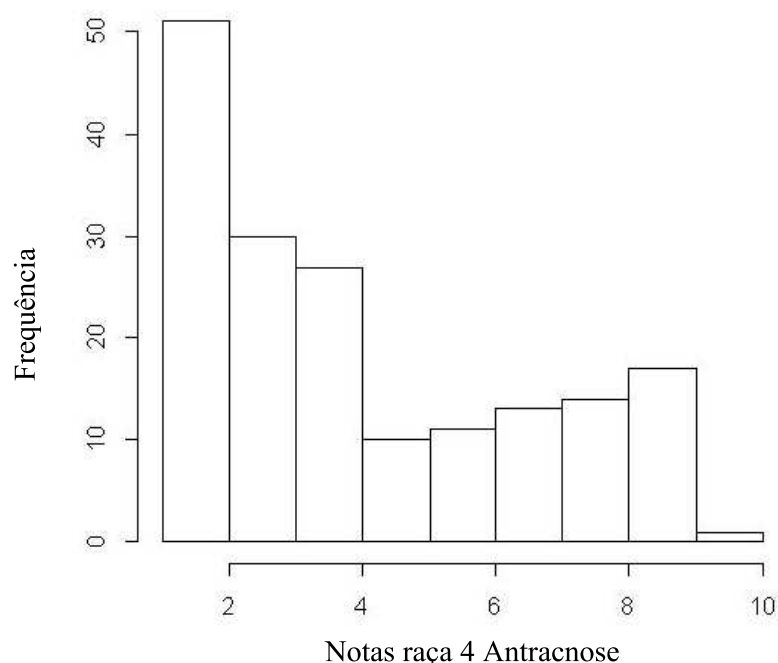


Figura 13. Histograma dos dados fenotípicos obtidos da avaliação da raça 4 de antracnose, no experimento em casa de vegetação, com os 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo.

Os dados normalizados foram então utilizados para fazer as análises de mapeamento associativo. Um total de 103 marcadores SSRs foram utilizados para fazer a associação com os dados fenotípicos da raça 4 da antracnose. Dos 103 marcadores SSRs utilizados, 17 SSRs apresentaram associação com a raça 4 de antracnose, sendo que, os marcadores PvM153 e SSR-IAC254 foram os mais significativos ($p \leq 0,001$). As associações dos SSRs foram observadas em quase todos os cromossomos do feijão comum, exceto nos cromossomos Pv4, Pv7, Pv9 e Pv10 (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de associação entre os marcadores microssatélites e a severidade a antracnose (raça 4) utilizando o modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador ^b
Pv1	38929831	PvM123	0,0216*	0,0253
Pv1	43158884	PvM15	0,0031**	0,0752
Pv1	3418307	PVEST233	0,0479*	0,0243

Pv2	17304020	SSR-IAC156	0,0455*	0,0144
Pv2	18030949	PvM93	0,0148*	0,0459
Pv2	101937	PvM153	0,000018084***	0,0858
Pv3	101937	PvM126	0,0024**	0,0637
Pv3	13097849	SSR-IAC167	0,0109*	0,0427
Pv3	51281699	PvM95	0,0246*	0,0253
Pv3	32935927	PVEST236	0,0388*	0,0429
Pv5	38025102	PvM07	0,0332*	0,0476
Pv6	22466322	PvM14	0,0232*	0,0465
Pv8	51758522	SSR-IAC254	0,001***	0,0541
Pv8	47263247	SSR-IAC240	0,0059**	0,0515
Pv11	38007080	PvM98	0,00085827***	0,0651
Pv11	28334385	SSR-IAC127	0,0132*	0,0297
Pv11	260848	PvM56	0,0065**	0,0404

^a *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

^b R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Um total de 14 associações entre os 335 marcadores SNPs e a raça 4 de antracnose foi encontrado (Tabela 4), sendo que o SNP scaffold00045_345513 foi o que apresentou maior nível de significância entre o marcador e o caráter avaliado ($p \leq 0,01$). Este marcador está alocado no cromossomo Pv3 de feijão comum. Um número semelhante de associações com a raça 4 de antracnose foi encontrado com os marcadores SSRs (17 associações – Tabela 3).

Tabela 4. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a raça 4 da antracnose (ANT) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv1	43706695	scaffold00131_116230	0,05*	0,033
Pv1	49718897	scaffold00024_916410	0,02*	0,045
Pv2	45685402	scaffold00066_233171	0,02*	0,034
Pv2	39658669	scaffold00057_195147	0,04*	0,024
Pv3	2555912	scaffold00010_290583	0,05*	0,036

Pv3	49687291	scaffold00016_1345826	0,04*	0,039
Pv3	50422228	scaffold00045_345513	0,01**	0,056
Pv6	16845897	scaffold00084_32192	0,02*	0,045
Pv7	1144163	scaffold00021_89379	0,03*	0,058
Pv9	36679972	scaffold00101_378095	0,05*	0,022
Pv9	33605694	scaffold00040_865949	0,03*	0,0431
Pv10	1829086	scaffold00008_1640029	0,02*	0,0451
Pv11	46690329	scaffold00096_100594	0,03*	0,0272
Pv11	46975591	scaffold00096_341983	0,02*	0,0484

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Oblessuc et al. (2013), ao realizarem o mapeamento com três raças da antracnose (raças 4, 38 e 55) identificaram 13 QTL na população UC (Campos et al, 2011). Três locos de maior efeito foram mapeados pela análise conjunta em dois cromossomos, o Pv2 (ANT02.1) e o Pv7 (ANT07.1 e ANT07.3). QTL nos grupos de ligação Pv6, Pv8 e Pv11 também foram identificados. Ao realizar a comparação entre os resultados obtidos por Oblessuc et al. (2013) e as associações realizadas com a raça 4 com marcadores SSRs foi possível verificar que houve correspondência entre os locos detectados neste trabalho com SSRs para resistência à antracnose com aqueles identificados para a raça 4 por mapeamento genético convencional na população de mapeamento UC. Outros trabalhos também identificaram QTL em regiões semelhantes. Um QTL relacionado com a resistência à antracnose foi previamente mapeado no grupo de ligação Pv2 usando a população BAT 93 x Jalo EEP558 (BJ) (Greffroy et al., 2000. Este QTL mapeado no Pv2 por Geffroy et al (2000), estava ligado a um gene de celulase, cuja enzima degrada materiais lignocelulolíticos e lisam parede de células de fungos fitopatogênicos.

4.4 Fenotipagem com a raça 0-39 de mancha angular e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs

Uma escala de notas foi padronizada para avaliar a severidade de mancha angular, sendo que esta padronização seguiu nas normas do CIAT (Figura 14; Oblessuc, 2009). As avaliações fenotípicas de resistência/suscetibilidade das linhagens do painel associativo foram feitas individualmente em cada uma das quatro plantas por genótipo, por repetição.

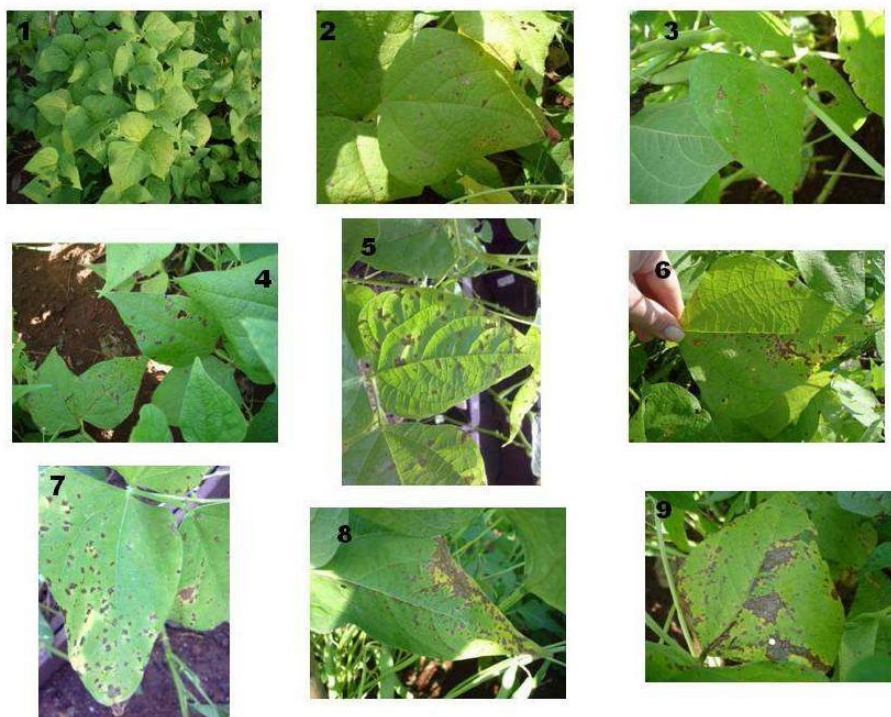


Figura 14. Escala diagramática para determinar o padrão de notas (1 - 9) para infecção por mancha angular (Oblessuc, 2009).

Para os dados fenotípicos obtidos no experimento da fenotipagem da raça 0-39 de mancha angular foram realizados testes estatísticos para verificar se os dados estavam ou não normalizados, a fim de utilizá-los nas análises de mapeamento associativo. Como na avaliação para antracnose, os testes utilizados para esta avaliação foram o Skewness, Kurtosis e Shapiro-Wilk. O valor de Skewness foi de -0,18, o valor de Kurtosis foi de 0,41 e o valor de Shapiro-Wilk foi de 0,99 (p -valor < 0,09). Sendo assim como mais de uma das análises estatísticas não apresentou diferenças significativas, os dados obtidos com a fenotipagem não foram submetidos à normalização, sendo que os dados do LsMeans obtidos na análise de variância do programa SAS foi utilizado para verificar a distribuição dos mesmos (Figura 15).

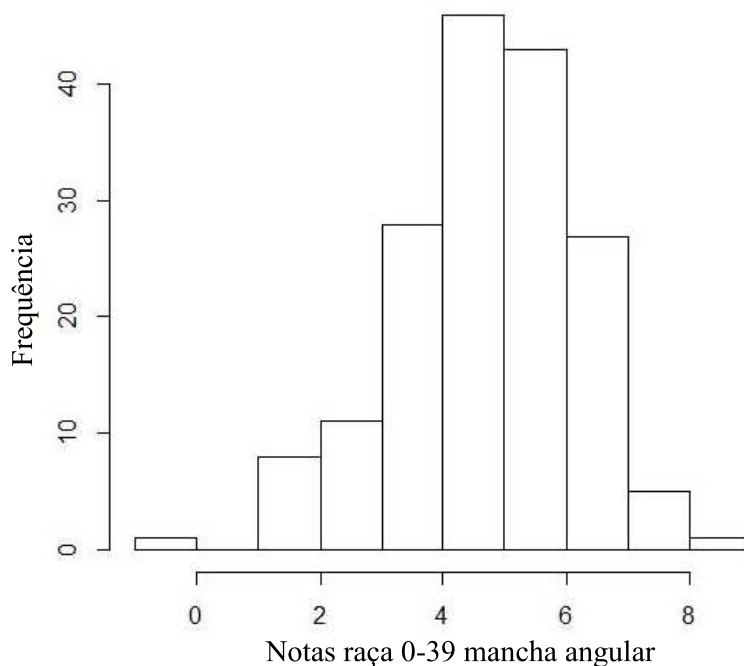


Figura 15. Histograma dos dados fenotípicos obtidos da avaliação da raça 0-39 de mancha angular, no experimento em casa de vegetação, com os 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo.

Um total de 103 marcadores SSRs foram utilizados para fazer a associação com os dados fenotípicos da raça 0-39 da mancha angular. Dos 103 marcadores SSRs utilizados, 6 SSRs apresentaram associação com a raça 0-39 da mancha angular. Os marcadores SSR-IAC52 e BMc225 foram os mais significativos ($p \leq 0,01$) – (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de associação entre os marcadores microsatélites e a severidade a mancha angular (raça 0-39 - ALS) utilizando o modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador ^b
Pv1	51661315	PvM97	0,0108*	0,037
Pv3	8866756	BMc215	0,0283*	0,0293
Pv4	45455004	SSR-IAC52	0,0063**	0,0928
Pv4	42281419	BMc225	0,01**	0,0721
Pv10	39573682	BMc273	0,02*	0,0663
Pv11	28334385	SSR-IAC127	0,0483*	0,0185

^a *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

^b R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

O marcador SSR-IAC127 alocado no cromossomo Pv11 apresentou associação tanto para a antracnose, quanto a mancha angular, indicando que este marcador pode ser empregado em estudos futuros de seleção assistida para estas duas doenças, sendo que, para tanto experimentos de *screening* em feijões contrastantes para as duas doenças devem ser efetuados, a fim de verificar se a marca está associada de fato à resistência ou suscetibilidade a antracnose e a mancha angular.

Um total de 10 associações entre os marcadores SNPs e a raça 0-39 de mancha angular foi encontrado (Tabela 6). Todos os marcadores apresentaram o mesmo nível de significância entre o marcador e o caráter avaliado. Um número menor de associações foi encontrado entre os marcadores SSRs com a raça 0-39 de mancha angular (6 associações – Tabela 5) quando comparado com os marcadores SNPs.

Tabela 6. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a raça 0-39 de mancha angular utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv1	49479604	scaffold00024_679184	0,02*	0,0352
Pv3	50138512	scaffold00045_613223	0,03*	0,0292
Pv3	35570456	scaffold00081_38357	0,04*	0,0403
Pv3	49319901	scaffold00016_993072	0,02*	0,0325
Pv6	23703618	scaffold00037_358238	0,05*	0,0415
Pv6	27124440	scaffold00001_1240723	0,03*	0,0481
Pv6	24346810	scaffold00037_980389	0,03*	0,0461
Pv8	1260983	scaffold00006_772302	0,02*	0,0518
Pv10	39733145	scaffold00015_853408	0,02*	0,0317
Pv11	5282172	scaffold00019_960179	0,03*	0,0417

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Shi et al. (2011) realizaram estudo de mapeamento associativo com marcadores do tipo SNPs. Neste trabalho, os autores utilizaram 395 linhagens de feijão comum e 132 SNPs para avaliar a associação entre os marcadores e a característica fenotípica mensurada através de inoculações do patógeno responsável por provocar o crestamento bacteriano, e para tanto fizeram uso de 2 repetições em blocos inteiramente casualizados (metodologia semelhante a utilizada no presente projeto). Os autores constataram associações significativas de 18 SNPs com o fenótipo de severidade de crestamento bacteriano, o que corresponde a um total de 13% de associação encontrada entre marcador e fenótipo. O número de associações estabelecidas entre os marcadores moleculares utilizados com a antracnose e com a mancha angular (raça 4 e raça 0-39, respectivamente) estão corroborando com trabalhos de mapeamento associativo em feijão com outras doenças que acometem o feijoeiro, como o de Shi et al. (2011).

Oblessuc et al. (2012) identificaram 7 QTL relacionados com a raça 0-39 da mancha angular, sendo que um QTL no cromossomo Pv2, um QTL no Pv3, dois no Pv4, três no Pv5 e um QTL no Pv10. Ao comparar os resultados obtidos por Oblessuc et al. (2012) com as associações estabelecidas para a raça 0-39 da mancha angular é possível verificar que associações em regiões semelhantes foram encontradas nos cromossomos Pv3, Pv4 e Pv10 e Pv11.

4.5 Fenotipagem dos caracteres relacionados com estresse hídrico no painel associativo e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs

Do total de 180 genótipos que compõem o painel associativo, somente 120 foram selecionados para realizar a fenotipagem das características relacionadas com o estresse hídrico, posto que nas casas de vegetação na qual os experimentos foram instalados só havia espaço para este número de genótipos com três repetições cada um.

Durante o período em que os genótipos da casa de vegetação do tratamento não irrigado ficaram sem água (20 dias – estresse terminal), a temperatura da casa de vegetação apresentou uma média de 29,39°C, e a umidade uma média de 40%, enquanto que na casa de vegetação onde a irrigação foi constante (tratamento irrigado – Controle), a temperatura teve uma média de 28,67°C, e a umidade uma média de 33%. Durante o período de estresse hídrico foi possível notar diferenças no “comportamento” dos genótipos, onde alguns apresentavam-se vistosos, com suas folhas verdes, enquanto que outros genótipos estavam com suas folhas murchas, e após o estresse 112 genótipos sobreviveram (Figura 16).



Figura 16. Casa de vegetação do tratamento não irrigado (estresse terminal – 20 dias sem água).

Após 20 dias de estresse hídrico, as plantas da casa de vegetação do tratamento não irrigado, e do tratamento irrigado (controle) foram coletadas para fazer as medições das características que estão relacionadas com o estresse hídrico (área foliar, peso fresco folha, peso fresco do caule, quantidade de clorofila).

Durante o experimento de estresse hídrico aplicado nas casas de vegetação em vasos, a média de temperatura e umidade da casa de vegetação do tratamento irrigado foi de 28,67°C e 33% e da casa de vegetação não irrigada foi de 29,4°C e 40%, respectivamente. As análises de variância apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) no tratamento não irrigado nos 120 genótipos de feijão comum para as seguintes características: área foliar (AF), massa fresca do caule (MFC), massa fresca da folha (MFF) e temperatura da folha (TF), enquanto que para o tratamento irrigado, nenhuma das características avaliadas apresentaram diferenças significativas (Tabela 7).

Tabela 7. Estatística descritiva para as medidas de características quantitativas nos 120 genótipos de feijão comum do experimento de tratamentos irrigado e não irrigado nos vasos, em casa de vegetação.

Características	Irrigado		Não irrigado	
	Média dos 120 genótipos	Diff.	Média dos 120 genótipos	Diff.
Teor de clorofila	37,44	ns	32,25	ns
Área foliar	431,02	ns	166,31	*

Massa fresca da folha	6,55	ns	1,47	*
Massa fresca do caule	3,45	ns	1,61	*
Massa seca da folha	3,41	ns	3,19	ns
Massa seca do caule	0,62	ns	0,57	ns
Temperatura da folha	19,88	ns	31,71	*

* Diferenças significativas à probabilidade de 0,05; ns: não significativo; Diff: diferenças entre os 120 genótipos de feijão comum.

Gonçalves (2013) avaliaram os parâmetros fisiológicos e morfológicos além da produtividade nas distintas fases do desenvolvimento do feijoeiro (vegetativa, pré-floração e pós-floração). O experimento foi realizado utilizando cultivares considerados tolerantes a seca como BAT 477, SEA 5, IAPAR 81 e IPR Uirapuru, e suscetíveis a seca como o Carioca comum, IAC-Alvorada, IAC-Carioca Tybatã e o IAC-Diplomata. No solo, foram instalados sensores para avaliação do potencial matricial de água no solo. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, com parcelas subdivididas com três repetições. Como conclusão, o estudo relatou que o déficit hídrico na fase vegetativa promoveu maior redução da produtividade.

No que se refere à temperatura foliar, os genótipos que foram submetidos à condição de estresse hídrico apresentaram uma maior temperatura quando comparados com os genótipos do tratamento irrigado (controle). A relação entre temperatura foliar e a temperatura do ar ou mesmo a diferença entre ambas, têm sido empregadas por diversos pesquisadores como indicadoras das condições hídricas das plantas (Oliveira et al., 2005). Em sua pesquisa, Guimarães et al. (2006) constataram que a temperatura do dossel se correlacionou significativamente com o potencial da água nas folhas e sua medição, por ser rápida e não destrutiva, mostrou tratar-se de uma técnica útil no processo de seleção de genótipos de feijoeiro para regiões sujeitas a deficiência hídrica.

Para os dados fenotípicos que apresentaram diferenças significativas (Tabela 7), obtidos no experimento de tolerância à seca dos 120 genótipos de feijão comum, foram realizados testes estatísticos para verificar se eles estavam ou não normalizados, a fim de utilizá-los nas análises de mapeamento associativo. Os testes utilizados para esta avaliação foram o Skewness, Kurtosis e Shapiro-Wilk (Tabela 8). As características que apresentaram mais de um dos testes significativos foram submetidas à transformação Box-cox (Osborne,

2010), com auxílio do programa estatístico R, a qual gera curvas para a normalização dos dados para os dois experimentos. Os valores não significativos foram mantidos, pois já estavam normalizados. A partir do parâmetro λ indicado nestas curvas, foi escolhido o modelo de normalização mais adequado a ser aplicado nos valores dos dados fenotípicos (Figura 17).

Após os dados dos 120 genótipos de feijão comum para as características de peso fresco da folha no tratamento não irrigado, o peso fresco do caule no tratamento não irrigado e a temperatura da folha no tratamento não irrigado serem normalizados, histogramas dos valores de cada característica foram construídos (Figura 18), e os valores normalizados foram utilizados para fazer o mapeamento associativo. Para a característica de área foliar do tratamento não irrigado os valores do LsMean foram utilizados para realizar as análises de mapeamento associativo.

Tabela 8. Estatísticas descritivas para características relacionadas com o estresse hídrico avaliadas no painel associativo do experimento realizado em vasos em casa de vegetação em condição não irrigada.

Características	Skewnes	Kurtosis	Shapiro-wilk	<i>p</i> valor
Área foliar (AF)	0,04192357	0,58294575	0,994059	0,7017 ^{ns}
Massa fresca da folha	0,93286103	4,73862196	0,913273	<0,0001*
Massa fresca do caule	0,59413283	1,8784384	0,969681	<0,0001*
Temperatura da folha	0,36177525	0,52603411	0,987287	0,0068*

* Nível de significância corresponde a $p < 0,01$.

^{ns}: não significativo

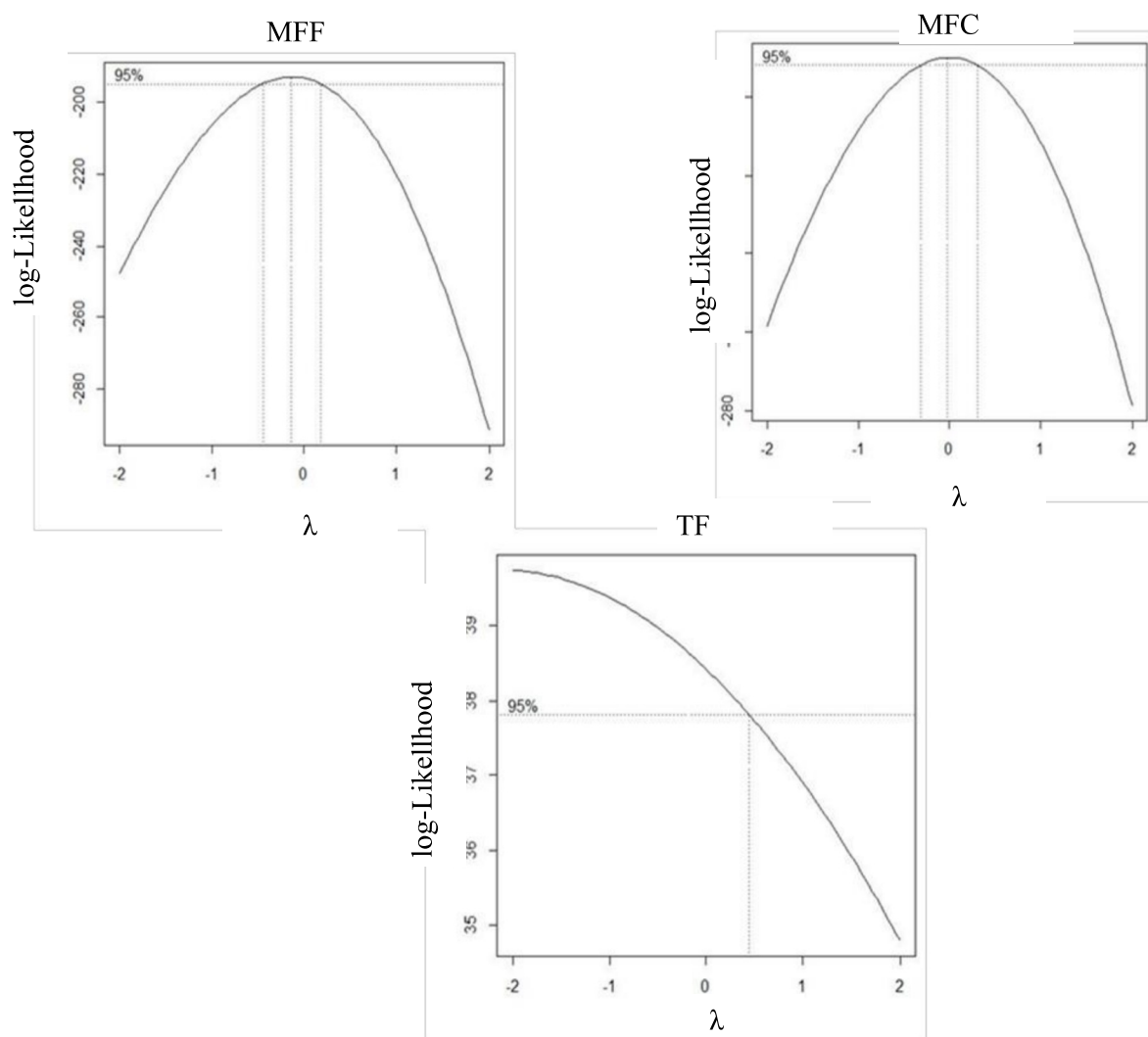


Figura 17. Curvas de normalizações dos dados fenotípicos obtidos das avaliações da MFF (massa fresca da folha), MFC (massa fresca do caule) e TF (temperatura da folha), no experimento em casa de vegetação em condição não irrigada, com os 120 genótipos de feijão comum.

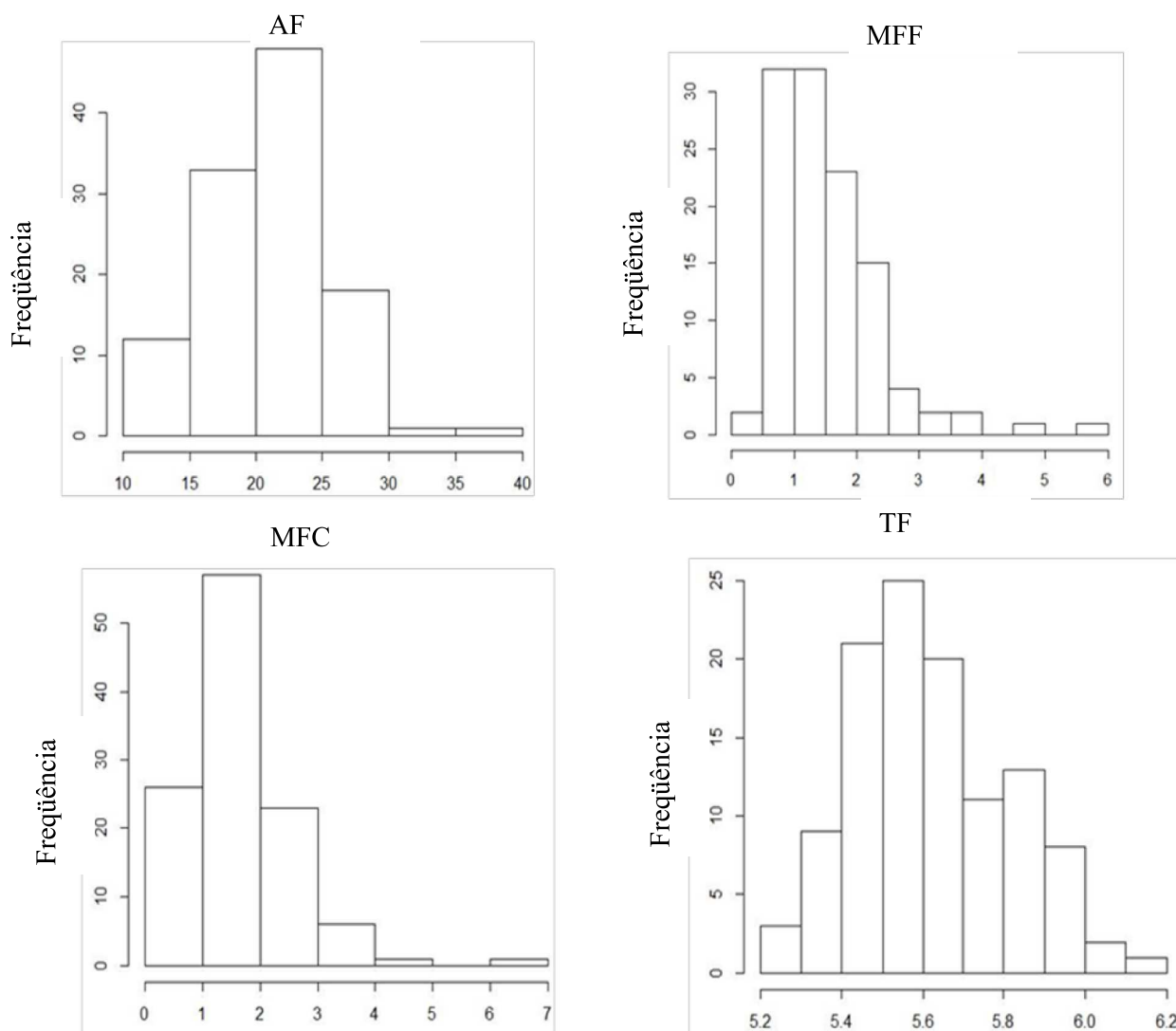


Figura 18. Histogramas dos dados fenotípicos obtidos das avaliações da AF (área foliar), MFF (massa fresca da folha), MFC (massa fresca do caule) e TF (temperatura da folha), no experimento em casa de vegetação na condição não irrigada, com os 120 genótipos de feijão comum.

Um total de 23,33% dos marcadores SSRs (Tabela 9) apresentaram associação às quatro características relacionadas com a tolerância à seca que apresentaram diferenças significativas na ANOVA (Tabela 8). Para a característica de área foliar (AF) 7,76% dos marcadores SSRs apresentaram associação; para a característica massa fresca do caule (MFC) 6,79% dos marcadores SSRs apresentaram associação; para a característica massa fresca da folha (MFF), 4,85% dos SSRs foram associados e para a característica temperatura da folha (TF), 5,82 dos SSRs apresentaram associação. A característica área foliar (AF) foi a que

apresentou um maior número de marcadores associados, sendo um total de 8 SSRs associados a esta característica. Os marcadores PvM120, PvM14 e BMc265 apresentaram associação para mais de uma característica, sendo que, o SSR PvM120 teve associação com a característica área foliar (AF) e com a temperatura da folha (TF). O marcador PvM14 apresentou associação tanto com a característica área da folha (AF), quanto para a massa fresca da folha (MFF). O SSR BMc265 teve associação com as características massa fresca do caule (MFC) e massa fresca da folha (MFF). Estes marcadores podem ser fortes candidatos para utilização em processos de *screening* em linhagens de feijão comum que estão em processo de seleção para obtenção de cultivares tolerantes à seca, sendo que, para tanto, é necessário realizar a fenotipagem das quatro características que apresentaram diferenças significativas e que apresentam associações significativas com estes marcadores.

Tabela 9. Teste de associação entre os marcadores SSRs e as características de tolerância à seca que apresentaram diferenças significativas utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Característica	Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^e	R^2 marcador ^f
AF ^a	Pv1	3418307	PvM120	0,0046**	4,07 ⁻⁰⁵
AF	Pv1	21760647	BMc271	0,0018**	2,05 ⁻⁰⁵
AF	Pv2	18030949	PvM93	0,0364*	5,94 ⁻⁰⁴
AF	Pv3	48995926	PvM124	0,0204*	1,99 ⁻⁰⁴
AF	Pv3	8866756	BMc215	0,0262*	2,68 ⁻⁰⁴
AF	Pv3	41040484	PvM78	0,0348*	3,39 ⁻⁰⁴
AF	Pv6	22466322	PvM14	0,0094**	0,0731
AF	Pv8	57600106	PvM118	0,022*	0,0716
MFC ^b	Pv1	40172705	PvM58	0,01**	0,0554
MFC	Pv1	38929831	PvM123	0,01**	0,0411
MFC	Pv1	21581787	SSR-IAC136	0,0462**	0,1083
MFC	Pv3	42107050	PvM22	0,0421**	0,0816
MFC	Pv6	31633955	BMc265	0,002**	0,1643
MFC	Pv7	3703820	BMc236	0,0009697***	0,0019
MFC	Pv11	908035	PvM150	0,0019**	0,0024
MFF ^c	Pv3	13097849	SSR-IAC167	0,0204*	0,0653
MFF	Pv3	12286652	BMc259	0,0396*	0,052
MFF	Pv6	22466322	PvM14	0,0476*	0,0552
MFF	Pv6	31633955	BMc265	0,0372*	0,0839
MFF	Pv8	57600106	PvM118	0,0157*	0,0616
TF ^d	Pv1	38929831	PvM123	0,034*	0,0441
TF	Pv1	3418307	PvM120	0,0295*	0,0359
TF	Pv2	11747353	BMc228	0,0448*	0,024
TF	Pv3	33489392	PvM132	0,0085*	0,0671
TF	Pv7	40924356	PvM28	0,0264*	0,0483

TF	Pv9	37004890	PvM79	0,0427*	0,0408
----	-----	----------	-------	---------	--------

^(a) AF=Área foliar;

^(b) PFC=Massa fresca do caule;

^(c) MFF=Massa fresca da folha;

^(d) TF=Temperatura da folha;

^(e) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(f) R^2 _marcador foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Um novo experimento foi conduzido para mensurar caracteres relacionados com a produtividade. O mesmo delineamento experimental utilizado para mensurar os caracteres da parte aérea da planta foi empregado, fazendo uso dos 120 genótipos de feijão comum. O número de sementes (NS), o número de sementes por vagem (NSV), o peso de cem sementes (PCS), o número de vagens (NV) e o peso seco das vagens (PSV) foram avaliados. As análises de variância apresentaram diferenças significativas no tratamento não irrigado nos 120 genótipos de feijão comum para as seguintes características: número de sementes por vagem (NSV), número de sementes (NS) e peso de cem sementes (PCS), enquanto que para o tratamento irrigado as características número de vagens (NV) e o peso de cem sementes (PCS), contudo apresentaram um grande coeficiente de variação, e por isso não foram utilizadas nas análises de mapeamento associativo.

As características que foram significativas foram submetidas a análises estatísticas para verificar a normalidade da distribuição dos dados. Os testes utilizados para esta avaliação foram o Skewness, Kurtosis e Shapiro-Wilk (Tabela 10). As características que apresentaram mais de um dos testes significativos foram submetidas à transformação Box-cox, e os valores não significativos foram mantidos, pois já estavam normalizados. A partir do parâmetro λ indicado nestas curvas, foi escolhido o modelo de normalização mais adequado a ser aplicado nos valores dos dados fenotípicos (Figura 19). Os histogramas de cada um dos caracteres significativos foram construídos a partir dos dados normalizados (Figura 20).

Tabela 10. Estatísticas descritivas para características relacionadas com o estresse hídrico avaliadas no painel associativo do experimento realizado em vasos em casa de vegetação, na condição não irrigada.

Características	Skewnes	Kurtosis	Shapiro-wilk	p valor
Número de sementes (NS)	0,048721094	2,03119231	0,988708	<0,0001*
Número de sementes por vagem (NSV)	-0,1993184	0,2663872	0,977039	<0,0009*

Peso de cem sementes (PCS)	0,95602474	9,4942904	0,899881	<0,0001*
-----------------------------------	------------	-----------	----------	----------

* Nível de significância corresponde a $p < 0,01$.

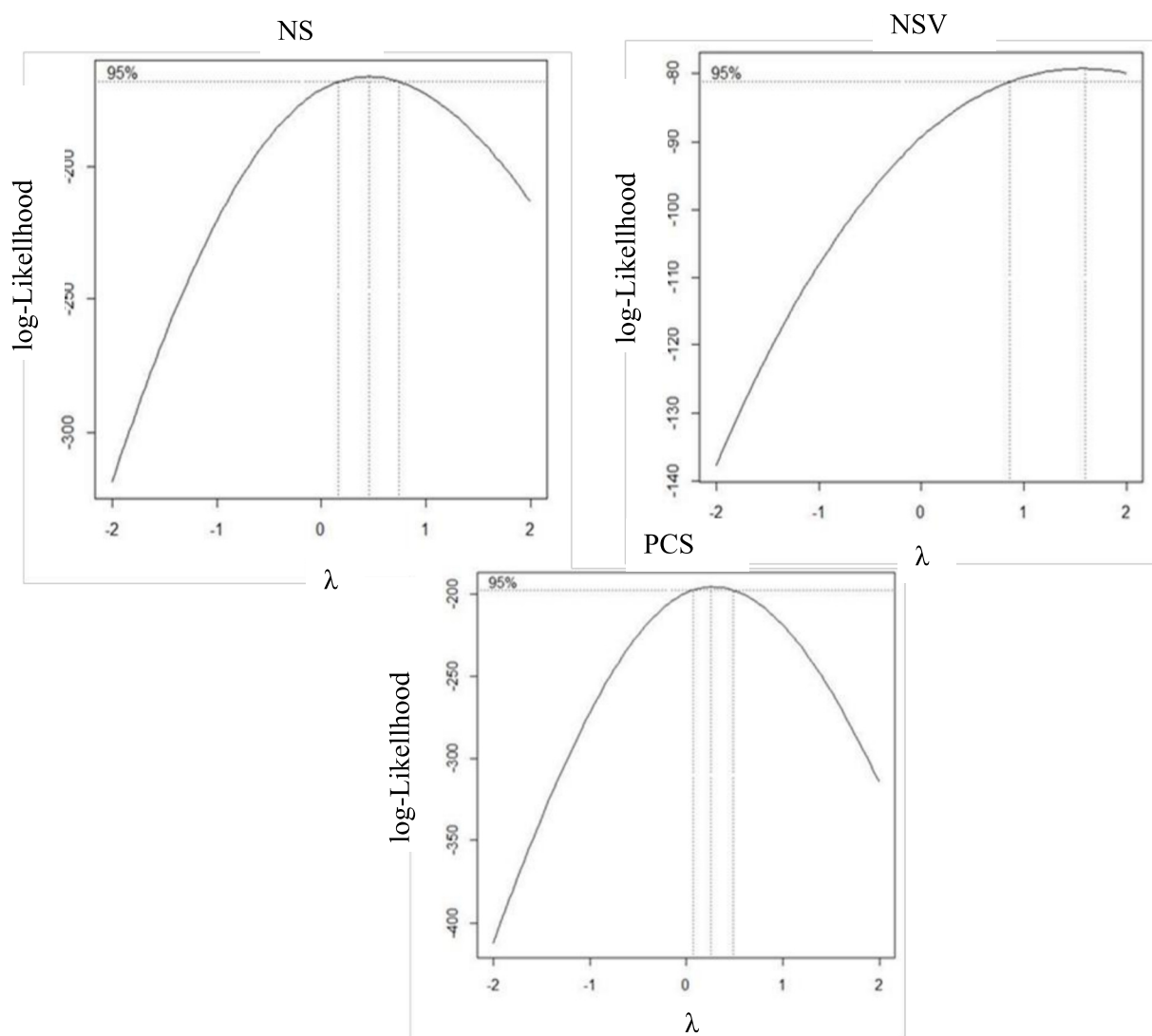


Figura 19. Curvas de normalizações dos dados fenotípicos obtidos das avaliações do NS (número de sementes), NSV (número de sementes por vagem) e PCS (peso de cem sementes), no experimento em casa de vegetação na condição não irrigada, com os 120 genótipos de feijão comum.

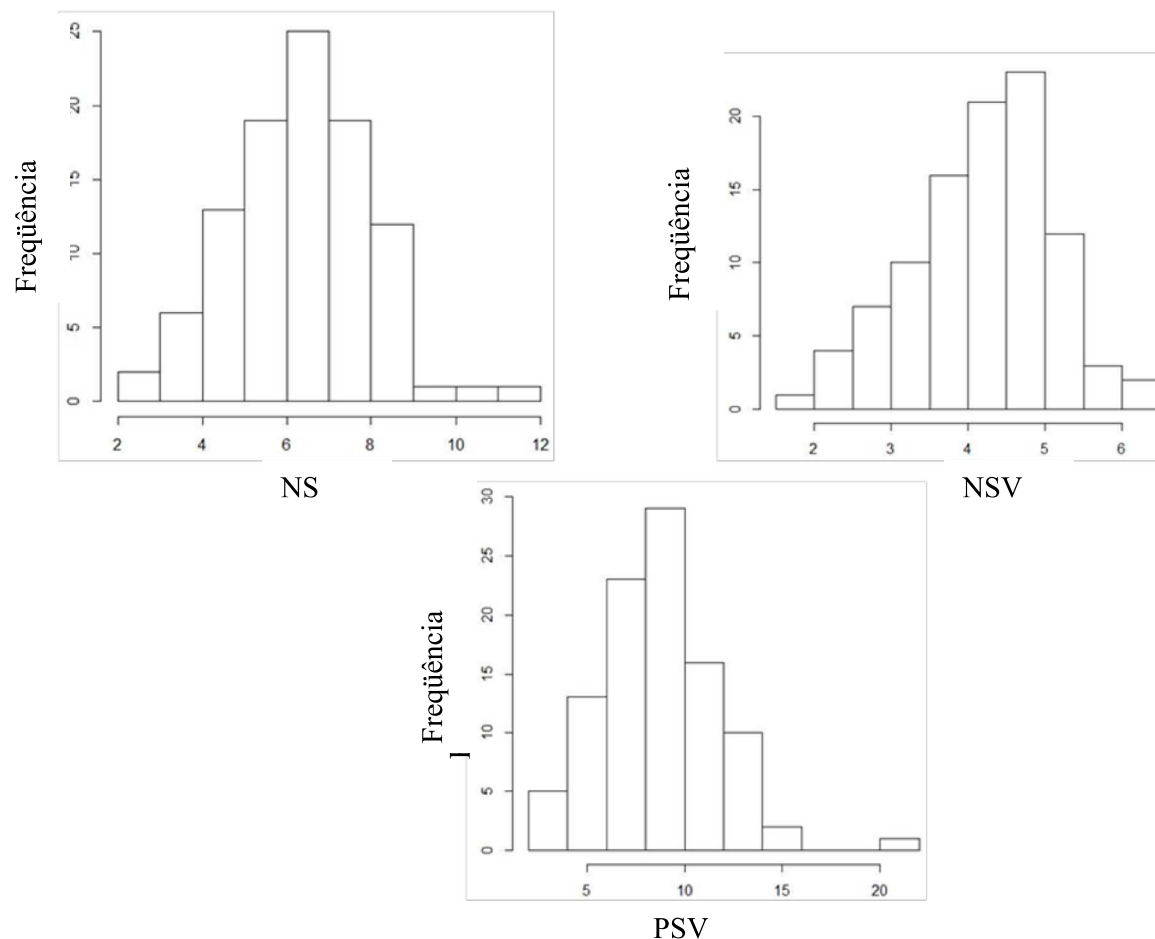


Figura 20. Histogramas dos dados fenotípicos obtidos das avaliações do NS (número de sementes), NSV (número de sementes por vagem) e PCS (peso de cem sementes), no experimento em casa de vegetação na condição não irrigada, com os 120 genótipos de feijão comum.

Um total de 25 associações foram estabelecidas entre os marcadores microsatélites com os três caracteres relacionados com a produtividade na condição não irrigada, sendo que para o NS um total de 7 associações foram estabelecidas, para NSV 6 marcadores apresentaram associação e para a característica PCS um total de 12 associações foram estabelecidas (Tabela 11). Os marcadores PvM22, PVEST236, SSR-IAC52, PvM145 e PvM04 apresentaram associação com mais de um caráter relacionado com a produtividade, sendo que, os marcadores PvM22, PVEST236, SSR-IAC52, PvM145 apresentaram associação tanto com NS quanto para PCS, e o marcador PvM04 apresentou associação com NSV e PCS. Os marcadores PvM145 e PvM95 foram os que apresentaram maior nível de significância ($p \leq 0,001$).

Tabela 11. Teste de associação entre os marcadores SSRs e as característica relacionadas com a produtividade que apresentaram diferenças significativas em plantas sob estresse hídrico (não irrigado) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Característica	Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	P^d	R^2 marcador^e
NS^a	Pv3	42107050	PvM22	0,02*	0,108
NS	Pv3	48995926	PvM124	0,02*	0,0526
NS	Pv3	32935927	PVEST236	0,03*	0,1018
NS	Pv4	45455004	SSR-IAC52	0,01**	0,1424
NS	Pv5	40339000	PvM145	0,000789***	0,1089
NS	Pv6	31633955	BMc265	0,02*	0,102
NS	Pv10	3615084	SSR-IAC62	0,02*	0,1605
NSV^b	Pv3	51281699	PvM95	0,001***	0,0833
NSV	Pv3	41040484	PvM78	0,03*	0,0399
NSV	Pv6	22466322	PvM14	0,02*	0,0648
NSV	Pv7	6202704	PvM40	0,02*	0,1203
NSV	Pv8	57978940	PvM04	0,04*	0,1818
NSV	Pv10	39573682	BMc273	0,01**	0,0649
PCS^c	Pv1	21581787	SSR-IAC136	0,01**	0,2157
PCS	Pv2	11747353	BMc280	0,03*	0,1222
PCS	Pv3	42107050	PvM22	0,02*	0,1114
PCS	Pv3	32935927	PvM126	0,02*	0,0712
PCS	Pv3	8866756	BMc215	0,04*	0,0407
PCS	Pv3	32935927	PVEST236	0,04*	0,093
PCS	Pv4	45455004	SSR-IAC52	0,01**	0,1296
PCS	Pv4	6186738	BMc284	0,03*	0,0685
PCS	Pv5	2643211	PvM52	0,0079**	0,1665
PCS	Pv5	40339000	PvM145	0,000072***	0,1461
PCS	Pv8	57978940	PvM04	0,01**	0,2426
PCS	Pv8	44861163	PvM68	0,01**	0,0621

(^a) NS=Número de vagens;

(^b) NSV=Número de sementes por vagem;

(^c) PCS=Peso de cem sementes;

(^d)*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

(^e) R^2 marcador foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Um total de 28 associações foi estabelecido entre os SNPs com a área foliar não irrigada - AF (Tabela 12). Este número foi bem superior ao número de associações estabelecidas pelos marcadores SSRs. O marcador scaffold00005_52733,7 foi o que apresentou o maior nível de significância para a área foliar - AF ($p \leq 0,001$). Para a massa fresca do caule (MFC) um total de 13 associações foram estabelecidas com os marcadores

SNPs (Tabela 13). Os marcadores scaffold00065_56887, scaffold00065_56887 e scaffold00126_153519 foram os que apresentaram maior nível de significância para a massa fresca do caule - MFC ($p \leq 0,01$). Um total de 16 marcadores SNPs apresentaram associação com a massa fresca da folha - MFF (Tabela 14) e 7 associações para a temperatura das folha - TF (Tabela 15). Os marcadores scaffold00065_56887 e scaffold00072_666446 foram os que apresentaram associações mais significativas com a MFF ($p \leq 0,01$), enquanto que todos os marcadores que apresentaram associação com a TF apresentaram o mesmo nível de significância ($p \leq 0,05$).

Todas as características apresentaram um maior número de associações dos marcadores SNPs quando comparadas com o número de associações estabelecidas com os marcadores SSRs. Isso se justifica pelo fato destes marcadores SNPs, utilizados na genotipagem dos 180 acessos de feijão comum, terem sido desenvolvidos a partir de sequências de genótipos de feijão que foram submetidos ao estresse hídrico, e sendo assim estes marcadores estão extremamente relacionados com caracteres que são alterados quando a planta está sob condição de estresse hídrico, sugerindo que estes marcadores podem ser empregados em projetos de seleção assistida por marcadores moleculares.

Tabela 12. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a área foliar (AF) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo	R^2 marcador			
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	b
Pv1	29728769	scaffold00115_422822	0,03*	0,0644
Pv1	51532674	scaffold00005_527337	0,001***	0,1645
Pv1	6812253	scaffold00026_358227	0,01**	0,0844
Pv1	2775096	scaffold00053_234882	0,05*	0,0603
Pv2	37194942	scaffold00065_56887	0,008**	0,1000
Pv2	39463636	scaffold00057_410077	0,006**	0,1079
Pv2	39992112	scaffold00057_488370	0,002**	0,1302
Pv2	39100333	scaffold00057_764241	0,02*	0,0776
Pv3	50321257	scaffold00045_427055	0,009**	0,0993
Pv3	2305912	scaffold00070_805875	0,007**	0,1065
Pv4	10398128	scaffold00067_459754	0,02*	0,0522

Pv6	26390992	scaffold00001_1947432	0,02*	0,0800
Pv6	27295217	scaffold00001_1059821	0,03*	0,0757
Pv6	21986441	scaffold00072_666446	0,02*	0,0819
Pv6	26202897	scaffold00001_2118513	0,02*	0,0803
Pv7	1229821	scaffold00021_4449	0,04*	0,0436
Pv7	842739	scaffold00021_378273	0,04*	0,0436
Pv8	56970815	scaffold00077_33580	0,05*	0,0591
Pv8	7520491	scaffold00105_514843	0,01**	0,0854
Pv8	9396781	scaffold00112_141156	0,04*	0,0664
Pv8	13415511	scaffold00097_323110	0,04*	0,0670
Pv8	58031254	scaffold00041_40251	0,01**	0,0910
Pv8	190428	scaffold00006_1833047	0,02*	0,0818
Pv8	13564157	scaffold00097_164240	0,04*	0,0669
Pv9	34149016	scaffold00040_326613	0,03*	0,0445
Pv9	35027822	scaffold00130_399706	0,04*	0,0410
Pv11	5157471	scaffold00019_842901	0,04*	0,0633
Pv11	4356700	scaffold00019_65795	0,04*	0,0413

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 13. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a massa fresca do caule (MFC) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv2	39992112	scaffold00057_488370	0,04*	0,0757
Pv2	37194942	scaffold00065_56887	0,01**	0,1028
Pv2	37194942	scaffold00065_56887	0,01**	0,1028
Pv2	39992112	scaffold00057_488370	0,04*	0,0757
Pv6	26390992	scaffold00001_1947432	0,06*	0,0607
Pv6	24902839	scaffold00128_449435	0,02*	0,0849
Pv7	33582	scaffold00021_1189313	0,05*	0,0647

Pv7	6578255	scaffold00126_153519	0,002**	0,1349
Pv8	56819566	scaffold00077_183472	0,04*	0,0711
Pv8	14796008	scaffold00034_860044	0,05*	0,0626
Pv8	13415511	scaffold00097_323110	0,02*	0,0871
Pv8	13564157	scaffold00097_164240	0,02*	0,0860
Pv11	102810	scaffold00039_4981	0,03*	0,0743

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 14. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a massa fresca da folha (MFF) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do Marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv1	51934795	scaffold00005_122847	0,03*	0,0707
Pv1	6812253	scaffold00026_358227	0,05*	0,0598
Pv2	37072066	scaffold00065_176985	0,05*	0,0674
Pv2	37194942	scaffold00065_56887	0,01**	0,1004
Pv2	41570934	scaffold00123_289766	0,04*	0,0494
Pv2	39992112	scaffold00057_488370	0,04*	0,0692
Pv3	50321257	scaffold00045_427055	0,04*	0,0675
Pv6	21986441	scaffold00072_666446	0,01**	0,0959
Pv7	6578255	scaffold00126_153519	0,05*	0,0649
Pv7	1229821	scaffold00021_4449	0,03*	0,0506
Pv7	842739	scaffold00021_378273	0,03*	0,0506
Pv8	13415511	scaffold00097_323110	0,05*	0,0623
Pv8	13564157	scaffold00097_164240	0,05*	0,0625
Pv9	36679972	scaffold00101_378095	0,05*	0,0409
Pv11	46792866	scaffold00096_204246	0,05*	0,0654
Pv11	4356700	scaffold00019_65795	0,05*	0,0410

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 15. Teste de associação entre os marcadores SNPs com a temperatura da folha (TF) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador^b
Pv3	42546823	scaffold00023_355857	0,02*	0,0600
Pv3	39792490	scaffold00004_176602	0,05*	0,0677
Pv7	49815682	scaffold00028_353326	0,04*	0,0798
Pv8	13934081	scaffold00034_5771	0,04*	0,0543
Pv10	39818224	scaffold00015_760530	0,03*	0,0499
Pv11	2862790	scaffold00009_1195016	0,04*	0,0492
Pv11	917632	scaffold00039_816774	0,03*	0,0519

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2 marcador foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Para os caracteres relacionados com a produtividade de grãos, um total de 21 associações foi estabelecida entre os marcadores SNPs com os três caracteres mensurados, em condição não irrigada. Para o número de sementes (NS), um total de 10 marcadores SNPs apresentou associação (Tabela 16); o número de sementes por vagem (NSV) apresentou 7 associações (Tabela 17) e o peso de cem sementes (PCS), 4 marcadores SNPs associados (Tabela 18). O marcador scaffold00064_659401, que apresentou associação com o PCS, foi o que apresentou o maior nível de significância ($p \leq 0,01$).

Tabela 16. Teste de associação entre os marcadores SNPs com o número de sementes (NS) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				R^2 marcado
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	r^b
Pv2	32890792	scaffold00106_196397	0,05*	0,0667
Pv2	38824731	scaffold00057_1023832	0,02*	0,0582
Pv3	723657	scaffold00074_883356	0,02*	0,0551
Pv3	50553437	scaffold00045_211258	0,03*	0,0772
Pv5	20053221	scaffold00064_659401	0,03*	0,0569
Pv6	30405877	scaffold00089_439714	0,05*	0,0683

Pv7	47440603	scaffold00111_115892	0,04*	0,0449
Pv7	2637994	scaffold00088_364454	0,02*	0,0915
Pv9	22618678	scaffold00002_1373462	0,02*	0,0551
Pv11	102810	scaffold00039_4981	0,05*	0,0708

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 17. Teste de associação entre os marcadores SNPs com o número de sementes por vagem (NSV) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv1	42559955	scaffold00071_331931	0,03*	0,0699
Pv2	42220983	scaffold00018_1173685	0,03*	0,0790
Pv3	723657	scaffold00074_883356	0,03*	0,0532
Pv6	25098678	scaffold00128_644430	0,05*	0,0675
Pv6	23703618	scaffold00037_358238	0,03*	0,0797
Pv9	27154767	scaffold00044_642489	0,04*	0,0463
Pv10	849992	scaffold00008_660057	0,04*	0,0703

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 18. Teste de associação entre os marcadores SNPs com o peso de cem sementes (PCS) em condição não irrigada utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv4	4236399	scaffold00060_745532	0,04*	0,0447
Pv5	20053221	scaffold00064_659401	0,01**	0,0709
Pv8	7672862	scaffold00105_337136	0,03*	0,0785
Pv9	36679972	scaffold00101_378095	0,05*	0,0465

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Briñez et al. (2013) mapearam 80 SSRs e 251 SNPs em uma população contrastante do tipo RIL (AND 277 x SEA 5) para caracteres relacionados com o estresse hídrico. Um total de 12 QTL foram identificados para o tratamento não irrigado e 29 QTL para o tratamento irrigado. Alguns QTL de maior efeito foram encontrados para clorofila, massa fresca do caule e massa fresca da folha, massa seca da folha, temperatura da folha, número de vagens, número de sementes, massa de sementes, dias para florescimento, massa seca das vagens e produtividade nos dois tratamentos. Um QTL para massa fresca do caule foi identificado no grupo de ligação Pv03, na condição não irrigada, sendo que uma associação foi encontrada no cromossomo Pv03 para a mesma característica (MFC), indicando que o marcador que se associou a esta característica pode ser utilizado para selecionar genótipos que apresentem esta característica que está relacionada com o estresse hídrico.

Galeano et al. (2012) utilizaram 170 SNPs para genotipar um painel de diversidade genética de feijão do CIAT composto por 93 acessos de feijão. Além da genotipagem, foi realizada a fenotipagem de vários caracteres relacionados à tolerância à seca, os dados de genotipagem e de fenotipagem foram utilizados para realizar análises de mapeamento associativo. Neste trabalho, os autores estabeleceram associação de 30 marcadores com diferentes características relacionadas à tolerância a seca pelo método GLM (*General Linear Model*) e 28 associações utilizando o método MLM (*Mixed Linear Model*). Os autores concluem que o método MLM é mais adequado para realizar análises de mapeamento associativo em feijão, pois o método GLM gerou muitas associações espúrias.

O número de associações estabelecidas entre os marcadores SNPs com os caracteres relacionados com o estresse hídrico corrobora com o que é encontrado na literatura, quando comparado ao número de associações estabelecidas por Galeano et al. (2012) o número de marcadores SNPs associados são semelhantes. Sendo assim, o presente projeto vem somar esforços nesta abordagem de mapeamento, que tem demonstrado ser promissora, e pode vir a contribuir nos programas de melhoramento do feijoeiro.

4.6 Fenotipagem dos teores de ferro (Fe) e zinco (Zn) no painel associativo e mapeamento associativo por meio de marcadores SSRs e SNPs

Os teores de ferro e zinco foram mensurados nos 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo. Além destes, o genótipo AND277 (181) foi enviado para o instituto IBRA para análise do teor de ferro e zinco, para verificar se a população AND277 x SEA5 proveniente do CIAT (desenvolvida para avaliar características de tolerância à seca) também apresentava contraste para os teores de ferro e zinco.

Uma grande variação no teor de ferro e de zinco foi observada no painel associativo (Tabela 19). Os teores de ferro variaram de 104,07 mg/Kg (acesso 173 do painel associativo – genótipo F/19-6 – Figura 21) a 49,56 mg/Kg (acesso 155 do painel associativo – genótipo U x C 3.3 – Figura 21), enquanto que os teores de zinco variaram de 98,36 mg/Kg (acesso 68 do painel associativo – genótipo Campeão II – Figura 22) – 29,38 mg/Kg (acesso 03 do painel associativo – genótipo Chileno Branco – Figura 22). Blair et al. (2010) encontraram variações inferiores do teor de ferro, de 80 mg/kg à 34 mg/Kg, e variações inferiores de zinco, de 46 mg/kg à 25 mg/Kg. Deste modo, é possível constatar que alguns genótipos pertencentes ao painel associativo apresentam teores elevados de ferro o zinco, o que os torna genótipos candidatos para obtenção de cultivares biofortificadas para estes dois micronutrientes.

Tabela 19. Teores de Ferro (Fe) e Zinco (Zn) nos 180 genótipos de feijão comum pertencentes ao painel associativo e um genótipo adicional (AND277), parental da população de mapeamento (Brinez et al., 2013).

Números de genótipos	Nomes dos genótipos	Teor de Ferro (Fe)	Teor de Zinco (Zn)
1	Frijol Negro	103,63	41,54
2	Feijão Suíço	93,98	42,95
3	Chileno/Branco	56,83	29,38
4	ECU-311	64,57	33,83
5	Vermelhinho	66,22	43,53
6	Bagajo	91,76	39,60
7	México-115	101,76	37,77
8	Bactão(30273)	90,11	40,90
9	Preto-208	93,51	46,04
10	Preto-184	71,34	35,72
11	Honduras-32	63,17	37,16
12	Guatemala-479	71,19	36,99
13	Jamapa(CNF-1671)	66,29	42,67
14	Mulatinho(VP-102)	87,55	47,12
15	Tupi	86,44	51,59

16	Rosinha G2	74,33	47,79
17	Preto do Pocrone	72,19	37,52
18	Porrillo-1	85,67	48,44
19	México-498	74,32	40,86
20	Small White 59 Preto	78,09	39,59
21	Perry Marron	67,81	41,97
22	Mortiño	76,83	46,38
23	Rosado-13	78,04	44,41
24	Porrillo Sintético	72,37	42,87
25	Puebla-152(CIAT)	71,80	40,37
26	Jalo-110	69,53	49,46
27	ARA-1	64,92	47,50
28	Caeté (preta)	56,66	39,73
29	IAC-Maravilha	89,35	49,24
30	FEB 179	90,56	46,45
31	Jamapa(CIAT)	82,48	47,36
32	Puebla-152(CNF-1807)	70,17	39,98
33	EMP-81	56,14	37,46
34	Jalo	51,03	42,89
35	ARC-3	67,39	45,58
36	ARC-4	89,35	57,16
37	LP-90-91 R.Bac.	71,91	43,10
38	EMP-407	76,32	44,45
39	FEB 180	88,80	59,37
40	Oito e Nove	91,68	41,85
41	Alemão	85,51	44,26
42	Bat-93	69,92	45,26
43	Pinto-114	81,28	42,60
44	Flor de Mayo	71,07	52,93
45	Mar-02.	61,94	50,68
46	Amendoim	80,96	38,83
47	G2333	84,83	44,94
48	Michelite	90,01	68,28
49	PI-165426	73,56	49,26
50	DOR-390	67,37	48,87
51	DOR-391	55,81	40,88
52	DOR-476	58,35	70,12
53	Turrialba-1	54,74	50,55
54	AND-279	87,19	52,90
55	RAZ-56	90,86	61,56
56	RAZ-49	80,72	63,25
57	RAZ-55	77,20	48,36
58	Batista Brilhante (CB)	67,45	52,86
59	82 PVBZ-1783	75,74	63,04
60	A-449	75,06	44,95
61	Aporé	74,11	50,79

62	Branquinho	68,22	44,46
63	BRS - Cometa	65,47	65,44
64	BRS - Horizonte	63,62	38,28
65	BRS - Pontal	67,36	58,28
66	BRS - Requite	80,83	46,55
67	BRSMG-Talismã	82,15	50,68
68	Campeão II	82,10	98,36
69	Caneludo	69,27	48,43
70	Carioca Comum	64,47	44,86
71	Carioca Lustroso	64,10	42,78
72	Carioca MG	77,95	54,35
73	Carioca Precoce	61,28	42,30
74	H96A28 - P4 - 1 - 1 - 1 - 1	85,05	50,79
75	H96A102-1-1-152	62,67	43,89
76	H96A31-P2-1-1-1-1	77,80	38,57
77	IAC - Alvorada	74,51	38,87
78	IAC-Apuã	62,28	33,62
79	IAC-AYSÓ	67,54	46,00
80	IAC-Carioca	72,90	44,42
81	IAC-Carioca Akytã	66,44	45,25
82	IAC-Carioca Aruã	55,91	37,56
83	IAC-Carioca Pyatã	66,65	38,76
84	IAC-Carioca Tybatã	75,04	48,03
85	IAC-Votuporanga	65,79	46,81
86	IAC-Ybaté	66,00	49,13
87	IAPAR - 81	65,84	48,81
88	IAPAR - 31	61,33	35,16
89	Pérola	68,10	36,82
90	TO	68,19	44,24
91	Gen05P3-1-6-1	72,21	40,13
92	Gen05P4-2-6-2	66,67	44,85
93	Gen05P5-3-8-1	61,85	42,50
94	Gen05P5-3-8-2	64,17	61,69
95	Gen05P5-4-8-2	65,17	48,70
96	Gen05Pr11-1-2-2	70,43	42,23
97	Gen05Pr11-1-7-1	67,93	38,36
98	Gen05Pr11-2-3-1	66,45	42,67
99	Gen05Pr11-2-13-1	50,54	38,25
100	Gen05Pr11-2-14-2	57,97	41,99
101	Gen05Pr11-3-5-1	62,76	46,47
102	Gen05Pr11-6-5-1	60,35	81,23
103	Gen05Pr11-6-12-2	71,36	50,94
104	Gen05PR12-2-5-1-2	84,38	41,15
105	Gen05PR12-2-2-1-1	66,10	47,10
106	Gen05PR12-2-4-1-2	70,00	34,50
107	Gen05PR13-1-8-1-2	70,13	41,84

108	Gen05PR13-1-8-1-1	73,36	39,47
109	Gen05PR13-1-6-1-2	71,64	52,79
110	Gen05PR13-2-2-1-2	83,28	36,60
111	Gen05PR13-2-1-1-2	66,33	47,03
112	Gen05C1-3-2-1-1	72,10	46,86
113	Gen05C1-3-3-1-1	53,60	47,56
114	Gen05C2-1-1-2-1	74,14	47,05
115	Gen05C2-1-6-1-1	84,35	43,09
116	Gen05C2-1-1-1-3	63,68	63,91
117	Gen05C2-1-1-1-1	98,09	41,64
118	Gen05C3-2-4-1-1	75,78	56,76
119	Gen05C3-2-4-1-7	74,79	52,09
120	Gen05C4-3-1-1-2	67,29	44,30
121	Gen05C4-3-1-1-1	64,16	51,77
122	Gen05C4-4-3-1-2	72,22	41,66
123	Gen05C4-6-2-1-2	70,31	42,37
124	Gen05C5-1-2-2-2	57,44	43,16
125	Gen05C5-1-2-1-1	69,80	42,71
126	Gen05C5-2-5-1-2	82,99	53,84
127	Gen05C5-2-10-1-1	68,21	48,52
128	Gen05C6-3-5-2-1	62,07	47,80
129	Gen05C6-4-5-1-2	62,57	48,67
130	Gen05C6-5-2-2-1	64,43	47,72
131	Branco Argentino	65,74	50,09
132	Gen05C6-5-7-1-2	61,72	38,25
133	Gen05C7-3-2-2-2	69,87	95,69
134	Gen05C7-4-1-1-1	62,47	44,86
135	UxC - 1.1	51,86	35,60
136	UxC - 2.20	76,48	45,50
137	UxC - 1.2	67,35	44,74
138	UxC - 1.19	62,19	38,51
139	UxC - 1.5	69,30	42,61
140	UxC - 3.9	79,83	43,50
141	UxC - 4.17	78,71	42,86
142	UxC - 9.2	64,04	41,58
143	UxC - 9.16	70,93	41,50
144	CxU - 1.3	73,39	39,00
145	CxU - 1.5	82,05	46,09
146	CxU - 1.7	73,89	60,43
147	CxU - 1.19	66,97	46,50
148	CxU - 2.11	64,41	42,45
149	CxU - 2.16	57,20	41,21
150	CxU - 7.8	57,95	37,65
151	UxC - 1.8	67,79	51,80
152	UxC - 1.10	68,66	37,70
153	UxC - 6.13	50,00	41,00

154	UxC - 2.18	90,91	44,79
155	UxC - 3.3	49,56	30,88
156	VAX 1	71,57	51,14
157	A 0774	75,25	40,80
158	BAT 447	65,19	39,35
159	SEA - 5	67,43	48,04
160	IAC-UNA	65,85	33,87
161	CAL-143	68,83	41,12
162	Sanilac	75,33	40,05
163	Red Kidney	62,12	41,83
164	FEB-176	84,30	44,02
165	FEB-177	64,77	37,11
166	J/39-2-3-1	67,25	43,00
167	J/54-5-1	55,14	49,23
168	J/61-5-3-1	61,83	37,74
169	J/43-5-1	82,51	41,07
170	J/43-1-1-1	60,58	35,70
171	J/39-1-3-2	64,64	35,27
172	M/100-4-3-1	80,91	38,41
173	F/19-6	104,08	51,67
174	F/19-3-1	99,11	38,69
175	E/20-2-1	92,44	38,38
176	D/15-3-1	94,63	45,67
177	C/11-2-2	90,75	39,96
178	1108 x Harmonia X 1108 x Boreal /Brese	84,00	50,70
179	29/24-6-1-1	77,96	35,93
180	22/16-1-3-2	77,88	48,44
181	AND-277	71,67	30,17

Foram realizados testes estatísticos para verificar se os dados do teor de ferro e de zinco estavam ou não normalizados. Para o teor de ferro o valor de Skewness foi de 0,17323843, o valor de Kurtosis foi de -0,0374604 e o valor de Shapiro-Wilk foi de 0,996206 (p -valor = 0,2349). Como mais de uma estatística não apresentou diferença significativa, os valores de LsMean para o teor de ferro, foram utilizados nas análises de mapeamento associativo. Para o teor de zinco, o Skewness foi de 1,62085627, o valor de Kurtosis foi de 14,299431 e o valor de Shapiro-Wilk foi de 0,836301 (p -valor < 0,0001).

O teor de zinco apresentou mais de um dos testes significativos. A partir do parâmetro lambda (λ), foi escolhido o modelo de normalização mais adequado a ser aplicado nos valores do teor de zinco dos 180 acesos de feijão comum (Figura 23). Histogramas do LsMean do teor de ferro e dos dados normalizados do teor de zinco foram obtidos no programa R (Figura 24).

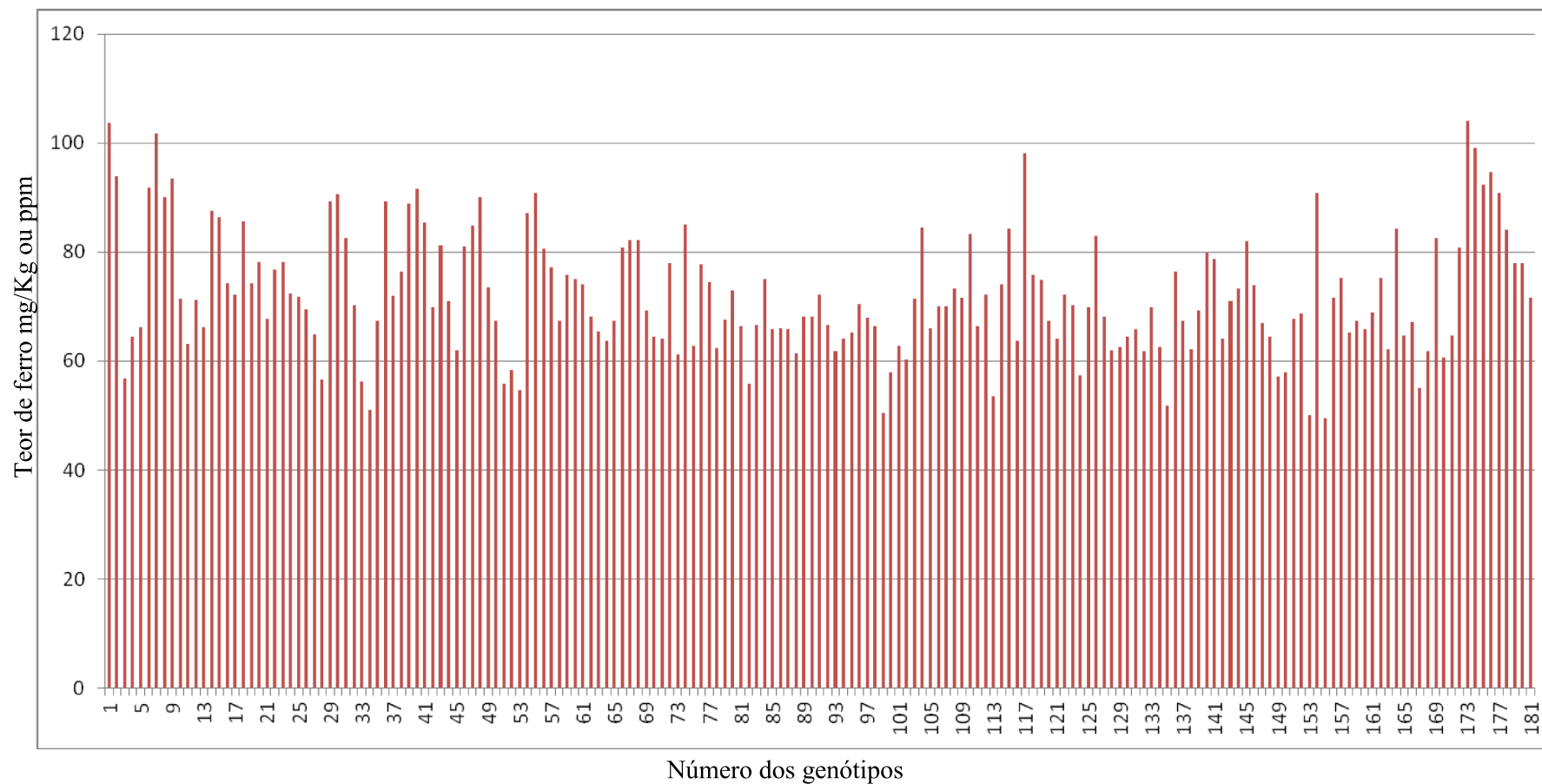


Figura 21. Variação no teor de ferro (Fe) dos 180 genótipos de feijão comum pertencentes ao painel associativo, além do genótipo AND-277. O eixo (x) representa o número dos genótipos do painel associativo, e o eixo (y) representa o teor de ferro em mg/Kg ou partes por milhão (ppm).

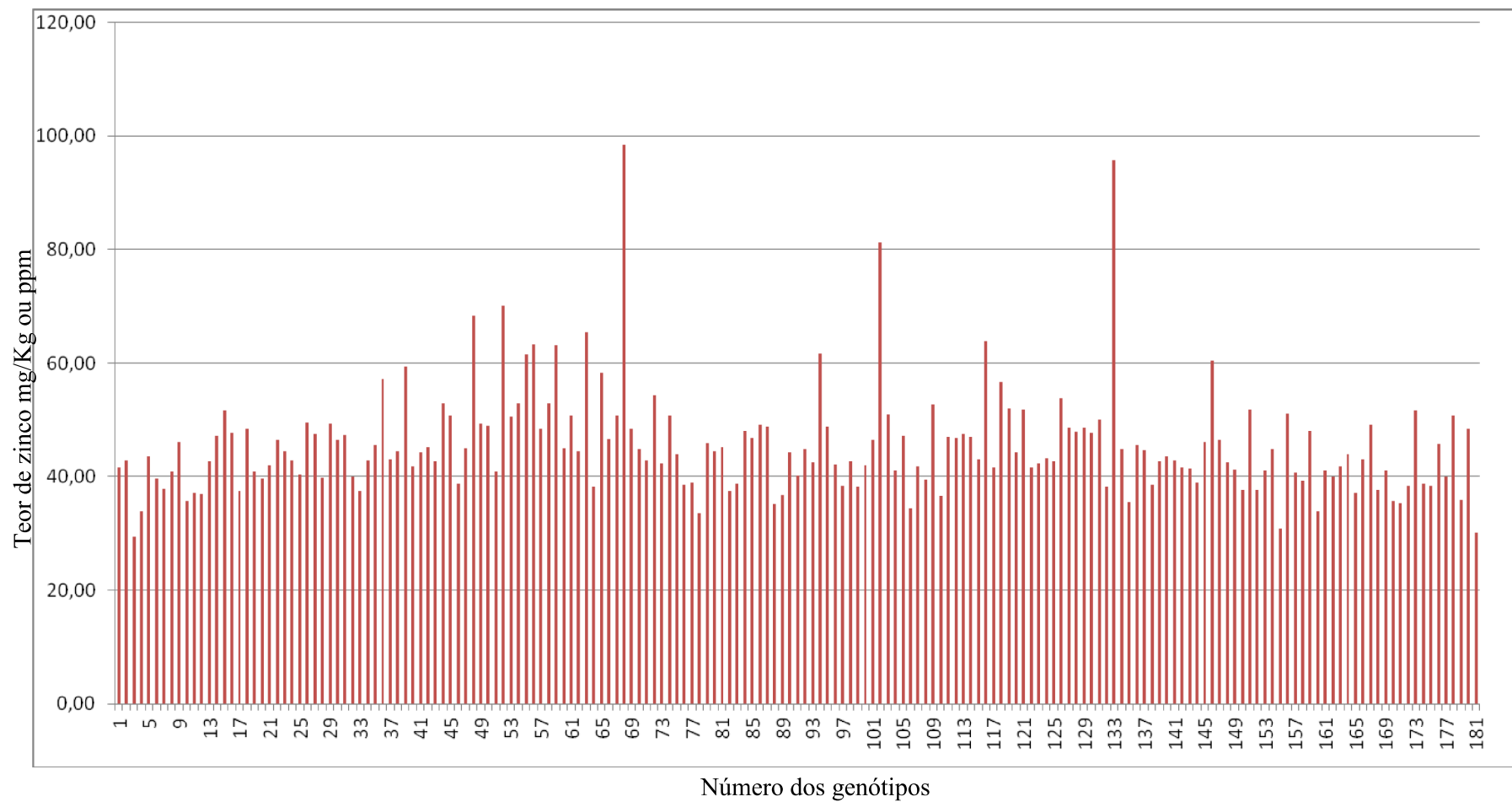


Figura 22. Variação no teor de zinco (Zn) dos 180 genótipos de feijão comum pertencentes ao painel associativo, além do genótipo AND-277. O eixo (x) representa o número dos genótipos do painel associativo, e o eixo (y) representa o teor de zinco em mg/Kg ou partes por milhão (ppm).

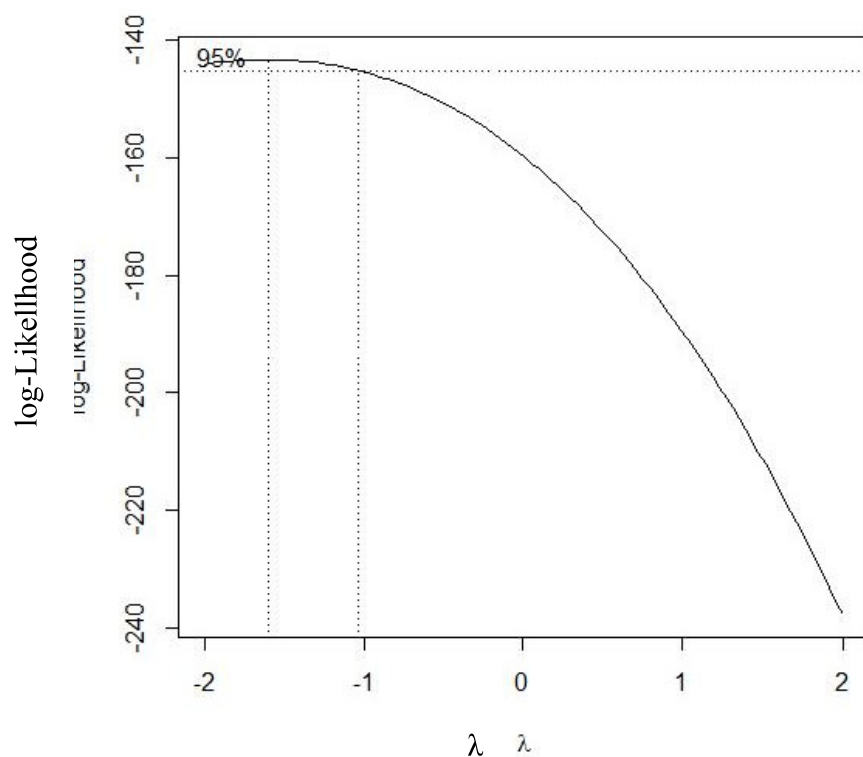


Figura 23. Curva de normalização do teor de zinco no experimento em casa de vegetação com os 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo.

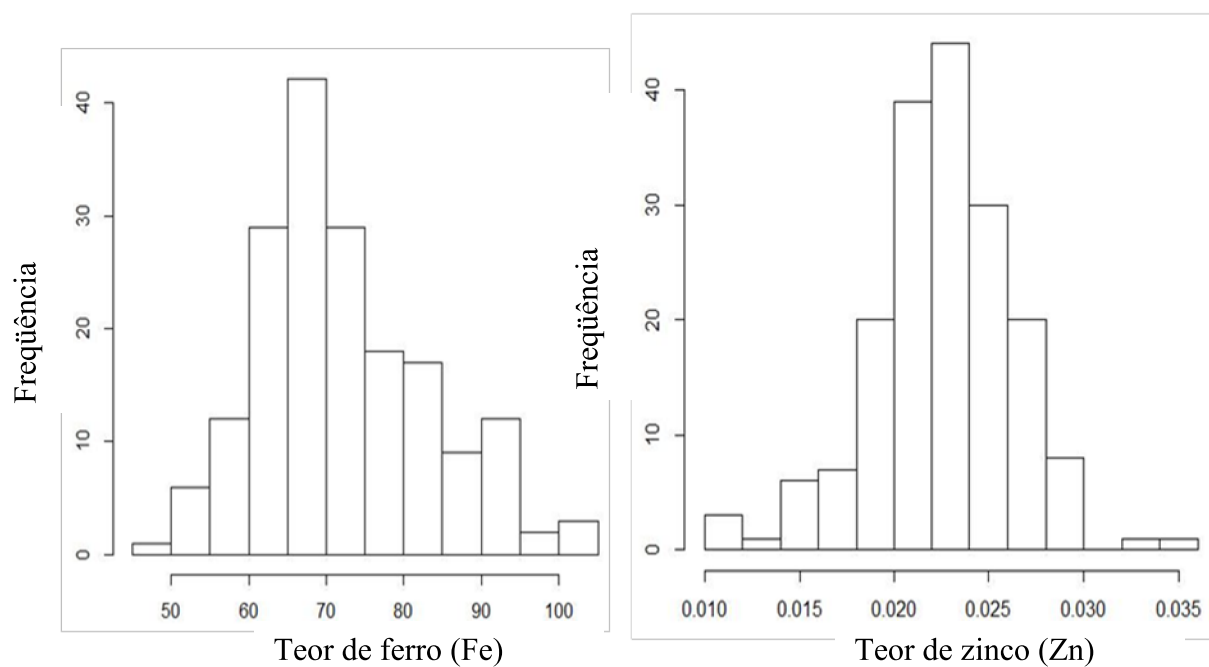


Figura 24. Histogramas dos teores de ferro e zinco, no experimento em casa de vegetação com os 180 genótipos de feijão comum que compõem o painel associativo.

Um total de 103 marcadores SSRs foi utilizado para fazer a associação com os teores de ferro e zinco. Dos 103 marcadores SSRs utilizados, 9 SSRs apresentaram associação com o teor de ferro (Tabela 20), e 7 SSRs apresentaram associação com o teor de zinco (Tabela 21). Para a associação com o teor de ferro, os marcadores PvM145, PvM21 e PvM13 foram os que apresentaram maior nível de significância entre o marcador e o fenótipo avaliado ($p \leq 0,01$). Para a associação com o teor de zinco, o marcador SSR-IAC20 foi o que apresentou maior nível de significância entre o marcador e o fenótipo avaliado ($p \leq 0,001$). O marcador PvM13 apresentou associação tanto com o teor de ferro quanto com o de zinco, o que sugere que este marcador possa ser utilizado para selecionar genótipos para estes dois micronutrientes em trabalhos de seleção assistida por marcadores.

A composição mineral dos grãos de feijão pode variar em função de diversos fatores, entre eles podem-se mencionar a constituição genética, as características edofoclimáticas dos locais de cultivo e a presença das interações dos genótipos com os ambientes (GxA) (Araújo et al., 2003; Ribeiro, 2010). A eficiência na absorção e mobilização de minerais para os grãos podem ser limitantes pela disponibilidade dos minerais no solo. Na identificação de germoplasma com alto teor de ferro e zinco nos grãos é pertinente observar as condições em que o cultivo foi realizado. As cultivares sob condições de campo com a aplicação de fertilizantes tendem a produzir grãos com maiores teores de minerais em relação àqueles sem o fornecimento de adubos. Similarmente, substratos especiais utilizados em estufas, casas de vegetação e soluções nutritivas utilizados em hidroponia disponibilizam maior quantidade de nutriente às plantas em relação à maioria dos solos (Ortíz-Monastério et al., 2007).

Tendo em vista que muitos fatores podem contribuir para a absorção diferenciada de ferro e zinco pela planta, é necessário realizar as medições dos teores destes micronutrientes em feijões que foram cultivados sob condições diferentes. Para avaliar se existem diferenças nos teores de ferro e zinco de acordo com o ambiente é necessário fazer a medição dos teores destes dois micronutrientes em mais ambientes, de modo que depois possa se fazer uma seleção de genótipos que apresentem teores elevados de ferro e de zinco, bem como ver se o marcador está associado a valores altos e baixos destes micronutrientes.

Tabela 20. Teste de associação entre os marcadores SSRs e o teor de ferro (Fe) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador^b
Pv1	3418307	PVEST233	0,0183*	0,0192
Pv3	5154298	PvM148	0,0218*	0,0231
Pv3	8866756	BMc215	0,0465*	0,013
Pv4	42281419	BMc255	0,034*	0,0543
Pv5	40339000	PVM145	0,0039**	0,0461
Pv6	24818184	PvM21	0,0052**	0,2642
Pv7	6202704	PvM40	0,0239*	0,07
Pv8	57978940	PvM04	0,0185*	0,12
Pv10	37468972	PvM02	0,0263*	0,0546
Pv10	4911084	PvM13	0,009**	0,0801

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2 _marcador foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 21. Teste de associação entre os marcadores SSRs e o teor de zinco (Zn) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo (Pv)	Posição (pb)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador^b
Pv2	18424165	SSR-IAC179	0,0047**	0,0435
Pv3	5154298	PvM148	0,0396**	0,018
Pv3	19092496	SSR-IAC20	0,000097958***	0,0559
Pv4	2335891	SSR-IAC66	0,01**	0,1729
Pv10	4911084	PvM13	0,0385*	0,1086
Pv10	3615084	SSR-IAC62	0,0496*	0,0743

Pv11	28334385	SSR-IAC127	0,0046**	0,0373
------	----------	------------	----------	--------

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Um total de 10 marcadores SNPs apresentaram associação com o teor de ferro (Tabela 22), enquanto que 6 marcadores SNPs apresentaram associação para o teor de zinco (Tabela 23). Os marcadores scaffold00023_355857 e scaffold00028_353326 foram os que apresentaram maior nível de significância para o teor de ferro ($p \leq 0,01$). O marcador scaffold00072_666446 foi o que apresentou maior nível de significância para o teor de zinco ($p \leq 0,01$).

Tabela 22. Teste de associação entre os marcadores SNPs com o teor de ferro (Fe) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do Marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv1	43610028	scaffold00131_211886	0,05*	0,0333
Pv1	49586687	scaffold00024_790403	0,05*	0,0352
Pv1	45006412	scaffold00058_738486	0,04*	0,0236
Pv3	35672281	scaffold00081_126639	0,05*	0,0433
Pv3	42546823	scaffold00023_355857	0,01**	0,0442
Pv3	45993057	scaffold00113_14469	0,05*	0,0423
Pv7	49815682	scaffold00028_353326	0,01**	0,0937
Pv8	570924	scaffold00006_1463824	0,03*	0,0275
Pv11	102810	scaffold00039_4981	0,04*	0,0378
Pv11	917632	scaffold00039_816774	0,03*	0,0270

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Tabela 23. Teste de associação entre os marcadores SNPs com o teor de zinco (Zn) utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Cromossomo				
(Pv)	Posição (pb)	Nome do Marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}}^b$
Pv2	41653884	scaffold00123_372795	0,05*	0,0365
Pv2	33035246	scaffold00106_43609	0,04*	0,0392
Pv4	9228247	scaffold00076_331846	0,04*	0,0377
Pv6	21986441	scaffold00072_666446	0,01**	0,0558
Pv7	1144163	scaffold00021_89379	0,05*	0,0395
Pv9	20930861	scaffold00087_16850	0,05*	0,0349

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Blair et al. (2010) encontraram 13 QTL para ferro e zinco ao realizar o mapeamento utilizando uma população do tipo RIL (G14519 x G4825). No grupo de ligação Pv02, os autores encontraram um QTL para zinco, no Pv03 encontraram um QTL para ferro e um QTL para zinco, no Pv04 um QTL para ferro, no Pv06 os autores identificaram 3 QTL para ferro e 3 QTL para zinco, em uma mesma região, e mais um QTL para cada micronutriente no mesmo grupo de ligação em mais de uma região. No Pv07 foram identificados dois QTL para ferro, enquanto que no Pv08 foram identificados dois QTL para zinco. No Pv11, dois QTL para ferro e dois QTL para zinco foram identificados em uma mesma região.

Fazendo a comparação entre os resultados obtidos do presente trabalho com as associações dos SSRs com os teores de ferro e zinco e os apresentados por Blair et al. (2010), as regiões relacionadas com os dois micronutrientes são semelhantes, pois os autores encontraram também QTL nos grupos de ligação Pv3, Pv4, Pv6 e Pv7 para o teor de ferro, e QTL nos grupos de ligação Pv2, Pv3 e Pv11 para o teor de zinco. O mesmo foi observado nas análises de associação para os teores de ferro e zinco, ou seja, os marcadores que apresentaram associação com estes micronutrientes estão de fato relacionados com os teores de ferro e zinco, podendo ser empregados em análises futuras de mapeamento associativo.

4.7 Comparação das análises de mapeamento associativo (SSRs e SNPs) com todas os caracteres avaliados nos acessos do painel associativo

Ao fazer a comparação entre todas as associações estabelecidas entre os marcadores SSRs e os caracteres fenotípicos avaliados nos genótipos do painel associativo, foi possível observar que muitos marcadores SSRs apresentaram associação para mais de uma característica fenotípica avaliada.

O marcador SSR-IAC127 apresentou associação para antracnose, para mancha angular e para o teor de zinco. Ao fazer o BLASTX no *Phytozome* (www.phytozome.net) com a sequência do marcador SSR-IAC127 foi possível verificar que este marcador está co-localizado em genes de proteínas do fotossistema I e com proteínas da clorofila P700. Como este marcador apresentou associação para o teor de zinco, a relação com proteínas do fotossistema I e com proteínas relacionadas com a clorofila é coerente, já que o zinco atua no crescimento das plantas pela sua participação na formação do ácido indol acético (AIA). O zinco é reconhecido como indispensável para a síntese do triptofano, que é o precursor do AIA. Também é identificado em numerosas enzimas que atuam na respiração e outros processos enzimáticos vinculados ao metabolismo de carboidratos e proteínas. Está envolvido na transformação de hidratos de carbono e no consumo de açúcares que proporciona energia para a síntese de clorofila, como também na fosforilação da glicose e, através dela, na produção de amido.

O marcador BMc215 apresentou associação para antracnose, área foliar (AF), peso de cem sementes (PCS), e para o teor de ferro. O BMc255 apresentou associação com a mancha angular e com o teor de ferro. O marcador PvM13 apresentou associação tanto para o teor de ferro quanto para o teor de zinco, sendo que este marcador está presente em um QTL de grande efeito para mancha angular que foi identificado por Oblessuc et al. (2012, 2013), um gene candidato que codifica para a fosfolipase C, estando localizado a 3,0Kb do marcador PvM13. Fosfolípidos são componentes estruturais da membrana celular envolvidas na sinalização da planta, particularmente em respostas imunes (Canonne et al, 2011).

O marcador PvM123 apresentou associação para antracnose, para massa fresca do caule (MFC) e para a temperatura da folha (TF). Ao fazer o BLASTX no *Phytozome* com a sequência do marcador SSR PvM13 foi possível verificar que este marcador está co-localizado em genes de fatores de transcrição (*Squamosa promoter binding protein-like 9*), e com genes que codificam proteínas relacionadas com a família SBP-Box (*SBP-Box gene family member*). As expressões

temporais e espaciais de alguns fatores de transcrição podem alterar a identidade das células ou tecidos através da regulação da expressão de genes específicos. O Squamosa (SQUA) é um promotor de ligação comum a genes (SPL) e representa uma família de fatores de transcrição específicos de plantas (Klein et al, 1996, Cardon et al, 1999). A característica comum de genes SPL é que as proteínas contêm um domínio de ligação ao DNA altamente conservadas (*SQUA promoter-binding protein*). Estes genes estão relacionados com resistência à doenças, o que indica que o marcador PvM123 pode estar relacionado com a resistência à antracnose, já que apresentou associação com esta doença e com proteínas relacionadas com a resistência à doenças. A função no desenvolvimento de apenas alguns poucos genes do SBP-Box foi determinado com base nos fenótipos mutantes, sendo que estes genes representam famílias de fatores de transcrição que podem estar relacionados, com o processo de floração, com a fertilidade da planta, sendo que alterações neste *Box* de proteínas podem estar relacionadas com situações em que a planta está submetida a algum tipo de estresse, como o estresse hídrico.

O SSR PvM93 associou-se tanto com a antracnose quanto para a área foliar (AF). Ao fazer o BLASTX no *Phytozome* com a sequência do marcador SSR PvM93, foi possível verificar que este marcador está co-localizado em genes que codificam proteínas que estão relacionadas com a coloração de grãos - antocianinas - (*Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 5*).

O marcador SSR-IAC167 associou tanto para antracnose quanto para a massa fresca da folha (MFF), enquanto que o marcador PvM14 apresentou associação para os mesmos dois caracteres que o marcador SSR-IAC167, e também apresentou associação com a área foliar (AF) e com o número de sementes por vagem (NSV). Ao fazer o BLASTX com a sequência do SSR-IAC167, foi possível verificar que este marcador está relacionado com o processo de florescimento precoce, já que apresentou homologia com sequências de fatores de transcrição do tipo *Jumonji* (*jumonji-class transcription factors*) – (Noh et al., 2004).

Ao fazer a comparação entre todas as associações estabelecidas entre os marcadores SNPs e os caracteres fenotípicos avaliados nos genótipos do painel associativo, foi possível observar que muitos marcadores SNPs apresentaram associação para mais de uma característica fenotípica avaliada (Tabela 24). Os marcadores scaffold00065_56887, scaffold00072_666446, scaffold00097_164240, scaffold00097_323110, scaffold00101_378095 e scaffold00039_4981 apresentaram associação com três caracteres fenotípicos avaliados.

Ao fazer o BLASTX do marcador scaffold00057_488370 que apresentou associação com a massa fresca do caule (MFC) e com a massa fresca da folha (MFF) foi possível verificar que este marcador está co-localizado em genes que codificam proteínas conjugadas de ubiquitina. Estas proteínas estão envolvidas com o nível de atividade das proteínas constituintes do ciclo celular, embriogênese, fotomorfogênese, ritmos circadianos, a sinalização hormonal, resistência a doenças e senescência.

O marcador scaffold00045_427055 apresentou associação com a temperatura da folha (TF) e com o teor de zinco (Zn). Ao realizar o BLAST da sequência deste SNP foi possível verificar que este marcador está relacionado com o hormônio vegetal auxina, que é importante para a organogênese da planta.

O marcador SNP scaffold00037_358238 apresentou associação tanto para a antracnose (ANT) quanto para número de sementes por vagem (NSV). Por meio do BLAST com a sequência deste marcador, foi possível verificar que este SNP está co-localizado com genes que codificam proteínas do tipo PL (*Pectin lyase-like superfamily protein*). Estas proteínas estão envolvidas em respostas a vários tipos de estresse, e estão relacionadas nos processos que envolvem o ácido salicílico e o ácido jasmônico.

O SNP scaffold00084_32192 apresentou associação com antracnose (ANT) e massa fresca da folha (MFF), ao fazer o BLAST deste SNP verificou-se que este marcador está co-localizado em genes de WRKY que codificam fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação de diversos processos biológicos. Estes genes, especialmente aqueles membros relacionados a respostas de estresse, são expressos exclusivamente em plantas.

O marcador scaffold00021_4449 apresentou associação com a área foliar (AF) e com a massa fresca da folha (MFF). O BLAST detectou que este marcador co-localizado em genes que codificam proteínas do tipo fosfatase, que estão relacionadas com o ácido abscísico (ABA). O hormônio ácido abscísico (ABA) está envolvido com várias respostas à estresse em plantas, tais como fechamento dos estômatos, manutenção da dormência das sementes, e a inibição do crescimento das plantas.

Tabela 24. Marcadores SNPs que apresentaram associação para mais de um fenótipo avaliado nos genótipos do painel associativo utilizando o método do modelo MLM (Modelo Linear Misto).

Característica	Cromossomo (Pv)	Nome do marcador	p^a	R^2 marcador^b
AF	Pv1	scaffold00026_358227	0,01**	0,0840
MFF	Pv1	scaffold00026_358227	0,04*	0,060
MFC	Pv2	scaffold00057_488370	0,03*	0,076
MFF	Pv2	scaffold00057_488370	0,04*	0,069
AF	Pv2	scaffold00065_56887	0,008**	0,100
MFC	Pv2	scaffold00065_56887	0,008**	0,103
MFF	Pv2	scaffold00065_56887	0,009**	0,100
TF	Pv3	scaffold00023_355857	0,01**	0,060
Fe	Pv3	scaffold00023_355857	0,01**	0,044
AF	Pv3	scaffold00045_427055	0,009**	0,099
MFF	Pv3	scaffold00045_427055	0,04**	0,068
NS	Pv3	scaffold00074_883356	0,02*	0,0551
NSV	Pv3	scaffold00074_883356	0,03*	0,0532
NS	Pv5	scaffold00064_659401	0,03*	0,0569
PCS	Pv5	scaffold00064_659401	0,01**	0,0709
AF	Pv6	scaffold00001_1947432	0,02*	0,080
MFC	Pv6	scaffold00001_1947432	0,05*	0,061
ALS	Pv6	scaffold00037_358238	0,05*	0,041
NSV	Pv6	scaffold00037_358238	0,03*	0,0797
AF	Pv6	scaffold00072_666446	0,02*	0,082
MFF	Pv6	scaffold00072_666446	0,01**	0,096
Zn	Pv6	scaffold00072_666446	0,009**	0,056
ANT	Pv6	scaffold00084_32192	0,02*	0,045
MFF	Pv6	scaffold00084_32192	0,05*	0,060
MFC	Pv7	scaffold00021_1189313	0,04*	0,065
MFF	Pv7	scaffold00021_1189313	0,05*	0,061
AF	Pv7	scaffold00021_378273	0,04*	0,043
MFF	Pv7	scaffold00021_378273	0,02*	0,051
AF	Pv7	scaffold00021_4449	0,04*	0,043
MFF	Pv7	scaffold00021_4449	0,02*	0,051
ANT	Pv7	scaffold00021_89379	0,03*	0,058
Zn	Pv7	scaffold00021_89379	0,04*	0,040
TF	Pv7	scaffold00028_353326	0,03*	0,080
Fe	Pv7	scaffold00028_353326	0,009**	0,094
MFC	Pv7	scaffold00126_153519	0,002**	0,135
MFF	Pv7	scaffold00126_153519	0,04*	0,065

AF	Pv8	scaffold00097_164240	0,04*	0,066
MFC	Pv8	scaffold00097_164240	0,01*	0,086
MFF	Pv8	scaffold00097_164240	0,05*	0,063
AF	Pv8	scaffold00097_323110	0,04*	0,067
MFC	Pv8	scaffold00097_323110	0,01*	0,087
MFF	Pv8	scaffold00097_323110	0,05*	0,062
ANT	Pv9	scaffold00101_378095	0,05*	0,022
MFF	Pv9	scaffold00101_378095	0,05*	0,041
PCS	Pv9	scaffold00101_378095	0,05*	0,0465
AF	Pv11	scaffold00019_65795	0,04*	0,040
MFF	Pv11	scaffold00019_65795	0,04*	0,041
MFC	Pv11	scaffold00039_4981	0,03*	0,074
Fe	Pv11	scaffold00039_4981	0,04*	0,038
NS	Pv11	scaffold00039_4981	0,05*	0,0708
TF	Pv11	scaffold00039_816774	0,03*	0,052
Fe	Pv11	scaffold00039_816774	0,03*	0,027

^(a) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$;

^(b) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

5. CONCLUSÕES

- ✓ O painel associativo estabelecido apresenta uma grande diversidade genética, e pode ser explorado para realizar associações com outras características desejáveis;
- ✓ O desequilíbrio de ligação presente no painel associativo indica que o mapeamento associativo em feijão pode ser realizado utilizando a metodologia de *Whole Genome Scan*;
- ✓ Os marcadores SSRs e SNPs foram adequados para estimar o DL em feijão comum, contudo os marcadores SNPs geraram um padrão não esperado de DL, indicando que a escolha destes marcadores para calcular o DL deve ser realizada com base na ampla distribuição dos marcadores ao longo de todos os cromossomos;
- ✓ Os marcadores associados aos fenótipos avaliados e que apresentaram o maior nível de significância podem ser utilizados para viabilizar estudos futuros de mapeamento fino e de seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) do tipo SSRs e SNPs;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDURAKHMONOV, I.Y. and ABDUKARIMOV, A. Application of Association Mapping to Understanding the Genetic Diversity of Plant Germplasm Resources, *International Journal of Plant Genomics*, vol. 2008, Article ID 574927, 18 pages, 2008.
- AGGARWAL, V.D.; PASTOR-CORRALES, M.A.; CHIRW, R.M.A.; BURUCHARA, R.A. Andean beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with resistance to the angular leaf spot pathogen (*Phaeoisariopsis griseola*) in Southern and Eastern Africa. *Euphytica* 136:201-210, 2004.
- AGUIAR, S.R.; MODA-CIRINO, V.; FARIA, R.T.; VIDAL, L.H.I. Avaliação de linhagens promissoras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes ao déficit hídrico. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.29, n.1, p.1-14, 2008.
- AGRAMA, H.A.; EIZENGA, G.C. and YAN, W. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol Breeding*, 19:341, 2007.
- ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; ARRUDA, K.M.A.; SILVA, M.G.M.; CHAGAS, J.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Reação do cultivar de feijoeiro comum “vermelhinho” à ferrugem, antracnose e mancha-angular. *Revista Ceres*, v.56, n.306, p.164-170, 2006.
- AMARO, G.B. **Seleção recorrente fenotípica no feijoeiro visando à resistência à *Phaeoisariopsis griseola***. 90 p. Dissertação (Tese em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- ANGIOI, S.A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, V.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v.121, p.829-843, 2010.
- APARÍCIO, B.H.E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia** (Trabajo de Grado). Cali (Colombia): Universidad del Valle. 1998.
- ARAÚJO, R. et al. Genotype x environment interaction effects on the iron content of common beans grains. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3(4):269-274, 2003.
- ASFAW, A.; BLAIR, M.W.; ALMEKINDERS, C. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics*, v.120, p.1-12, 2009.
- ASFAW, A. & BLAIR, M.W. Quantitative trait loci for rooting pattern traits of common bean grown under drought stress versus non stress. *Molecular Breeding*, doi:10.1007/s11032-011-9654-y, 2012.
- BALARDIN, R.S. & KELLY, J.D. Interaction among races of *Colletotrichum lindemuthianum* and diversity in *Phaseolus vulgaris*. *J Am Soc Hort Sci* 123:1038–1047, 1998.
- BARAMPAMA, Z. & SIMARD, R.E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Burundi. *Food Chemistry*, Oxford, v. 47, n. 2, p. 157-167, 1993.
- BARONI, R.M. **Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia). Instituto Agrônomo – IAC, Campinas, 79p., 2010.
- BEATTIE, A.D.; LARSEN, J.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype. *Genome*, 46(3): 411-422, 2003.
- BEEBE, S.; GONZALEZ, A.V.; RENGIFO, J. Research on trace minerals in the common bean. *Food Nutr Bull*, 21:387–391, 2000.
- BENCHIMOL, L.L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATTO, A.F.; FORMIHIERI, E.F.; GOUVÊA, L.R.L.; SOUZA, A.P. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol*, v.54, 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 Series B*, 57:289-300, 1995.
- BITOCCHI, E.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; ROSSI, M.; GIARDINI, A.; ZEULI, P.S.; LOGOZZO, G.; STOUGAARD, J.; McCLEAN, P.; ATTENE, G.; PAPA, R. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *PNAS PLUS*, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108973109, 2012.
- 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.; 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, M.W.; BUENDÍA, H.F.; GIRALDO, M.C.; MÉTAIS, I.; PELTIER, D. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor Appl Genet.**, v.118, n.1, p.91-103, 2008.
- BLAIR, M.W.; ASTUDILLO, C.; GRUSAK, M.A.; GRAHAM, R.; BEEBE, S.E. Inheritance of seed iron and zinc concentration in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mol. Breeding**, 23:197-207, 2009.
- BLAIR, M.W.; KNEWTSON, S.J.B.; ASTUDILLO, C.; LI, CHEE-MING; FERNANDEZ, A.C.; GRUSAK, M.A. Variation and inheritance of iron reductase activity in the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and association with seed iron accumulation QTL. **BMC Plant Biology**, 10:215, 2010a.
- BLAIR M.W.; GALEANO, C.H.; TOVAR, E.; TORRES, M.C.M.; CASTRILLON, A.V.; BEEBE, S.E.; RAO, I.M. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross **Mol Breeding**, on line, 2010b.
- BLAIR, M.W.; PRIETO, S.; DÍAZ, L.M.; BUENDÍA, H.F.; CARDONA, C.R. Leisneakrcha agrticle disequilibrium at the APA insecticidal seed protein locus of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, 10:79, 2010c.
- BLAIR, M.W.; ASTUDILLO, C.; RENGIFO, J.; BEEBE, S.E.; GRAHAM, R. QTL analyses for seed iron and zinc concentrations in an intra-genepool population of Andean common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), **Theor Appl Genet**, 122:511-521, 2011a.
- BLAIR, M.W.; HURTADO, N.; CHAVARRO, C.M.; MUÑOZ-TORRES, M.C.; GIRALDO, M.C.; PEDRAZA, F.; TOMKINS, J.; WING, R. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMc series. **BMC Plant Biology**, 11:50, 2011b.
- BLAIR, M.W. & IZQUIERDO, P. Use of the advanced backcross-QTL method to transfer seed mineral accumulation nutrition traits from wild to Andean cultivated common beans, **Theor Appl Genet**, 125:1015-1031, 2012.
- BRESEGUELLO, F.; SORRELLS, M.E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics**, 172:1165-1177, 2006.
- BRÍÑEZ, B.; BLAIR, M.W.; KILIAN, A.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATO, A.F.; RUBIANO, L.B. Development of a DArT platform for the analysis of genetic diversity in common beans. **Molecular Breeding**, Doi:10.1007/s11032-011-9609-3, 2011.
- BRÍÑEZ, B.; ROSA, J.S.; BLAIR, M.W.; CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; VIANELLO, R.; BENCHIMOL-REIS, L.L. Mapping QTL for drought tolerance in common beans, 2013 - artigo em elaboração.
- BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P. & VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v.252, p.55–128, 2003.
- BUDIC, M.; SABOTI, J.; MEGLI, V.; KOS, J.; KIDRI, M. Characterization of two novel subtilases from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their responses to drought. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.62, p.79-87, 2013.
- BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.801-813, 2010.
- 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 Notes**, v.6, p.252–254, 2006.
- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. Associação Brasileira de Estatística – ABE, 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, SP, 1990.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. 180p., 2002.
- CAMPOS, T.; BENCHIMOL, L.L.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGUIERI, E.F.; SOUZA, A.P. Microsatellites for genetic studies and breeding programs in common bean. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.42, n.4, p.401-408, 2007.
- CAMPOS, T.; OBLESSUC, P.R.; SFORÇA, D.A.; CARDOSO, J.M.K.; BARONI, R.M.; BENCHIMOL, L.L.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Development of new linkage map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on microsatellite markers. **Molecular Biology**, v 27: 4, 549-560, 2011.
- CANONNE, J.; MARINO, D.; JAUNEAU, A.; POUZET, C.; BRIERE, C.; ROBY, D.; RIVA, S.S. The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor AtMYB30 to suppress plant defence. **The Plant Cell**, 2011.
- CARBONELL, S.A.M.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F.G.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A.L.L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de linhagens e cultivares de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 24:60-65, 1999.

CARDON G., HOHMANN S., KLEIN J., NETTESHEIM K., SAEDLER H., HUIJSER P. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. **Gene**, v. 237, p.91–104. doi: 10.1016/S03781119(99)00308-X, 1999.

CARDOSO, J.M.K.; OBLESSUC, P.R.; CAMPOS, T.; SFORCA, 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. **Pesq. Agrop. Brasil**, 2008.

CHECA, O.E. & BLAIR, M.W. Mapping QTL climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mol Breed**, 22:201–215, 2008.

CHEN, J.; ZHANG, X.; JING, R.; BLAIR, M.W.; MAO, X.; WANG, S. Cloning and genetic diversity analysis of a new *P5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor Appl Genet**, 120:1393–1404, 2010.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; DIAS, A.L.A.S.D.; MOURA, R.R.; CHIAVEGATO, M.B.; COLOMBO, C.A. Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) duplicates using agromorphological and molecular data. **Genetics and Molecular Biology**, 29(1): 105–111, 2006.

CHOUDHURY, A.K.; KARIM, A.; HAQUE, M.; KHALIQ, Q.A.; AHMED, J.U.; HOSSAIN, M. Genotypic variability in plant water status of French bean under drought stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 14: 1, 17–24, 2011.

CIAMPI, A.Y.; VINSON, C.C.; GAIOTTO, F.A. **Estimativa da diversidade genética em arbóreas nativas tropicais utilizando microssatélites**. In: NASS, L.L. (ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 421–440, 2007.

CICHY, K.A.; FORSTER, S.; GRAFTON, K.F.; HOSWELD, G.L. Inheritance of seed zinc accumulation in navy bean. **Crop Sci**, 45:864–870, 2005.

COELHO, A.S.G. Programa BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software). Universidade Federal de Goiânia, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, Goiânia, Goiás, 2002.

CONAB – **Centro Nacional de Abastecimento**, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 14.Dez.2012.

CÓRDOBA, J. M.; CHAVARRO, C.; SCHLUETER, J. A.; JACKSON, S.A.; BLAIR, M.W. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. **BMC Genomics**, 11:436, 2010.

CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD-GOD, P.I.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; DE BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 3:804–807, 2000.

CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.V.; OLIVEIRA, M.L.P.; NIETSCH, S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27–32, 2001.

CORREA-VICTORIA, F.J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola*** ISacc.1 Ferr. 1987. 164 f. Thesis IPHD) - Michigan State University, East Lansing.

CORTÉS, A.J.; CHAVARRO, M.C.; BLAIR, M.W. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.123, p.827–845, 2011.

COSTA, M.R.; TANURE, J.P.M.; ARRUDA, K.M.A.; CARNEIRO, J.E.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Development and characterization of common black bean lines resistant to anthracnose, rust and angular leaf spot in Brazil. **Euphytica**, 176:149–156, 2010.

CRESTE, S.; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299–306, 2001.

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.

DAVID, P.; FRANCS-SMALL, C.C.; SEVIGNAC, M.; THAREAU, V.; MACADRE, C.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*. **Theor Appl Genet**, 121:87–103, 2010.

DEBOUK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* in northwestern South America. **Econ. Bot.**, v. 47, p. 408–423, 1993.

DIDONET, A.D. & SILVA, S.C. Elementos climáticos e produtividade do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, EPAMIG, Belo Horizonte, v.25, n.223, p.13–19, 2004.

- DOORENBOS, J. & KASSAM, A.H. **Yield response to water**. Roma: FAO, 193p. (Irrigation and Drainage Paper, 33), 1979.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecology** 14:2611–2620, 2005.
- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. **Common bean and cowpea**. In: FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. Growth and mineral nutrition of field crops. New York: Maecel Dekker, p. 280-318, 1991.
- FERREIRA, J.J.; CAMPA, A.; PÉREZ-VEJA, E.; RODRÍGUES-SUÁREZ, C.; GIRALDEZ, E. Introgression and pyramiding into common bean market class fabada of genes conferring resistance to anthracnose and potyvirus. **Theor Appl Genet**, 124:777-788, 2012.
- FERREIRA, M.E. & GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220 p, 1998.
- FISHER, R.A. The logic of inductive inference. **Journal of the Royal Statistical Society** 98: 39-82, 1935.
- FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annu Rev Plant Bio** 54:357-374, 2003.
- FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA, P.A.; TSAI, S.M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theor Appl Genet.**, v97, p.847-856, 1998.
- FREIRE, C.N.S.; SILVA, K.J.D.; SOUZA, E.A. **Compatibilidade vegetativa entre raças de *Phaseolusariopsis griseola***. 52º Congresso Brasileiro de Genética – SBG, 2006.
- 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.
- GAITÁN-SOLÍS, E.; CHOI, I.Y.; QUIGLEY, C.; CREGAN, P., TOHME, J. Single nucleotide polymorphisms in common bean: their discovery and genotyping using a multiplex detection system. **Plant Genome**, 1:125-134, 2008.
- GALEANO, C.H.; CORTÉS, J.A.; FERNÁNDEZ, A.C.; SOLER, A.; FRANCO-HERRERA, N.; MAKUNDE, G.; VANDERLEYDEN, J.; BLAIR, M.W. Gene-based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean. **BMC Genetics**, 13:48, 2012.
- GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience** 33:1124-1130, 1998.
- GEPTS, P.; BEAVIS, W.D.; BRUMMER, E.C.; SHOEMAKER, R.C.; STALKER, H.T.; WEEDEN, N.F.; YOUNG, N.D. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed. Report of the Cross-legume Advances Through Genomics conference. **Plant Phys** 137, 1228-1235, 2005.
- GEPTS, P. & LIN, D. Development of PHASEOLUSGENES, a Genome database for marker discovery and candidate gene identification in common bean. **BIC**, pg 30-31, 2010.
- GODOY, C.V.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; IAMAUTI, M.T.; DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R.D. **Diagrammatic scales for foliar diseases of beans: development and validation**. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 104, p. 336-345, 1997
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; CRUZ, A.S.; GARCIA, A.; KAMI, J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; McCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-14* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. **Theor Appl Genet**, 122:893-903, 2011.
- GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. **Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia**. *Maydica* 28:169-187, 1983.
- GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SHIGEMOTO, N.; TOKI, S.; TAKAIWA, F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nature Biotechnology**, 17:282-286, 1999.
- GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; De OLIVEIRA, J.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; THOQUET, P.; GEPTS, P.; LNGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microb. Interact**, v. 12, p. 774-782, 1999.
- 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. **Genet. Mol. Res.** v.6, n.3, p.691-706, 2007.
- GEFFROY V, SÉVIGNAC M, DE OLIVEIRA JCF, FOUILLOUX G, SKROCH PW, 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. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 13:287-296, 2000.
- GONÇALVES, JGR. **Identificação de linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes à seca**. Tese de doutorado, Instituto Agrônomo de Campinas, 93p., 2013.
- GUERRA-SANZ. New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. **Plant Breeding**, 123:87-89, 2004.
- GUIMARÃES, C.M. **Características morfo-fisiológicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) relacionadas com a resistência à seca**. 131 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, 1992.
- GUIMARÃES, C.M.; STONE, L.F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.1, p.70-75, 2006.
- GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80(13):1874-1881, 2000.
- 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**, v.50, p.266-277, 2007.
- HAO, C.Y.; ZHANG, X.Y.; WANG, L.F.; DONG, Y.S.; SHANG, X.W.; JIA, J.Z. Genetic diversity and core collection evaluations in common wheat germplasm from northwestern spring wheat region in China. **Molecular breeding**, v.17, p.69-77, 2006.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X. SPAGeDi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Mol. Ecol. Notes**, v. 2, p. 618–620, 2002.
- HASENEYER, G.; PIEPHO, H.P.; SAUER, S.; STRACKE, S.; GEIGER, H.H.; GRANER, A. DNA polymorphisms and haplotype patterns of transcription factors involved in barley endosperm development are associated with key agronomic traits. **BMC Plant Biology**, 10:5, 2010.
- HENRY, R.J. **The DNA Fingerprinting of Plants**. (Ed): Plant Genotyping. Wallingford: CABI Publishing; 2001.
- HESLOP-HARRISON, J.S. The molecular cytogenetics of plants. **Journal of Cell Science** 100: 15-21, 1991.
- HILL, W.G.; ROBERTSON A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics** 38: 226-231, 1968.
- HIRSCHI, K. D. Nutrient biofortification of food crops. **Annu.Rev. Nutr**, 29, 401, 2009.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT **Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico DF: CIMMYT, 1994.
- HOUSE, W.A.; WELCH, R.M.; BEEBE, S.; CHENG, Z. Potential for increasing the amounts of bioavailable zinc in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through plant breeding. **J. Sci. Food Agric.**, 82-1452-1457.
- HYTEN, D.L.; SONG, O.; FICKUS, E.W.; QUIGLEY, C.V.; LIM, J.S.; CHOI, I.Y.; HWANG, E.Y.; PASTOR-CORRALES, M.; CREGAN, P.B. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. **BMC Genomics**, 11:475, 2010.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201007_7.shtm Acesso em: 20 dez. 2012.
- JESUS Jr, W.C.; VALE, F.X.R.; MARTINEZ, C.A.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L.C.; COELHO, R.R.; HAU, B. Efeito da mancha angular e da ferrugem sobre a troca gasosa e produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, supl., p.450, 2001.
- KAMI, J.; VELÁSQUEZ, V.B.; DEBOUCK, D.G.; GEPTS, P. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:1101-1104, 1995.
- 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 Crops Research**, v.82, p.135–154, 2003.

- KELLY, J.D.; VALLEJO, A. V. A comprehensive review of the major genes conditions resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, Alexandria, v, 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004.
- KLEIN, J.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P.A. new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. **Mol. Genet. Genomics** 250, 7–16. doi: 10.1007/s004380050046, 1996.
- KONIECZNY, A. & AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific markers. **Plant Journal**, v.4, p.403-410, 1993.
- LARSEN, R.C.; KUROWSKI, C.J.; MIKLAS, P.N. Two Independent Quantitative Trait Loci Are Responsible for Novel Resistance to Beet curly top virus in Common Bean Landrace G122. **Phytopathology**, 100:10, 972 - 978, 2010.
- LIU, S.Y.; YU, K.; HUFFNER, M.; PARK, S.J.; BANIK, M.; PAULS, K.P.; CROSBY, W. Construction of a BAC library and a physical map of a major QTL for CBB resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Genetica** 138:709-716, 2010.
- MACIEL, F.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; GERALD, L.T.S.; GRAZZIOTIN, F.B. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genet Res Crop Evol** 50:887–893, 2003.
- MAGALHÃES, A.A.; MILLAR, A.A. Efeito do déficit de água no período reprodutivo sobre a produção de feijão. **Pesquisada Agropecuária Brasileira**, v.13, p.55-60, 1978.
- MAHUKU, G.; MONTOYA, C.; HENRIQUEZ, M.A.; JARA, C.; TERAN, H.; BEEBE, S. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. **Crop Science**, 44:1817-1824, 2004.
- MAHUKU, G.S.; HENRIQUEZ, M.A.; MONTOYA, C.; JARA, C.; TERAN, H.; BEEBE, S. Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. **Mol Breeding**, on line, 2010.
- MARAS, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; JAVORNIK, B.; MEGLIC, V. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Agriculturae Slovenica**, v.91, n.1, p.87-96, 2008.
- McCONNELL, M.; MAMIDI, S.; LEE, R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M.; PAPA, R.; McCLEAN, P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Theor Appl Genet**, 121:1103–1116, 2010.
- MENSACK, M.M.; FITZGERALD, V.K.; RYAN, E.P.; LEWIS, M.R.; THOMPSON, H.J.; BRICK, M.A. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using 'omics' technologies. **BMC Genomics**, v.11, p.1-33, 2010.
- METAIS, 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.
- MIKLAS, P.N.; LARSEN, R.C.; RILEY, R.; KELLY, J.D. Potential marker-assisted selection for *bc-12* resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. **Euphytica**, 116:211–219, 2000.
- 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**, 147(1-2):105-131, 2006.
- MIKLAS, P.N.; SINGH, S.P.; TERÁN, H.; KELLY, J.D.; SMITH, J.R. Registration of Common Bacterial Blight Resistant Cranberry Dry Bean Germplasm Line USCR-CBB-20. **Journal of Plant Registrations**, 5:98-102, 2011.
- MONDA, E.O.; SANDERS, F.E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, v.50, p.103-110, 2001.
- MOREIRA, J.A.A.; AZEVEDO, J.A.; STONE, L.F.; CAIXETA, T.J. IRRIGAÇÃO. IN: ZIMMERMANN, M.I.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, p.317-340, 1988.
- MORAES, M.F. et al. Práticas agronômicas para aumentar o fornecimento de nutrientes e vitaminas nos produtos agrícolas alimentares. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL, 1., Viçosa, MG: UFV, p.299-312, 2009.
- NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos & Melhoramento** – Plantas. FUNDAÇÃO MT, 1183p., 2001.
- NESTEL, P. et. al. Biofortification of staple food groups. **Journal of Nutrition**, 136(4):1064-1067, 2006.
- NEUMANN, K.; KOBILJSKI, B.; DENCIC, S.; VARSHNEY, R.K.; BÖRNER, A. Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Mol Breeding**, 2010.

- NEWELL-MCGLOUGHLIN, M. Nutritionally Improved Agricultural Crops. Editor's Choice Series on the Next Generation of Biotech Crops. **Plant Physiology**, 147: 939-953, 2008.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; ROCHA, C., PAULA, T. J.J r.; de BARROS E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, 2:117:121, 2000.
- NOH, B.; LEE, S-H.; KIM, H-J.; YI, G.; SHIN E-A.; LEE, M.; JUNG, K-J; DOYLE, M.R.; AMASINO, R.M.; NOH, Y-S. Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji/Zinc-Finger–Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of Arabidopsis Flowering Time. **The Plant Cell**, 16: 2601-2613, 2004.
- NORMAN, M.J.T.; PEARSON, C.J.; SEARLE, P.G.E. **Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. In: Norman, M.J.T.; Pearson, C.J.; Searle, P.G.E. (Eds.). The ecology of tropical food crops. Cambridge: CAMBRIDGE University Press, p.208-224, 1995.
- OBLESSUC, P.R. Construção do Mapa Genético IAC-UNA X CAL-143 e mapeamento de locos ligados à resistência a mancha angular em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando marcadores microssatélites. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- OBLESSUC, P.R.; BARONI, R.M.; GARCIA, A.A.F.; CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; CAMARGO, L.E.A.; BENCHIMOL, L.L. Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. **BMC Genetics**, 13:50, 2012.
- OBLESSUC, P.R.; PERSEGUINI, J.M.K.C.; BARONI, R.M.; CHIORATO, A.F.; CARBONEL, S.A.M.; MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CAMARGO, L.E.A.; BENCHIMOL-REIS, L.L. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, DOI 10.1007/s00122-013-2146-1, 2013.
- OBLESSUC, P.R.; BARONI, R.M.; CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BRÍÑEZ, B.; PEREIRA, G.S.; GARCIA, A.A.F.; KELLY, J.; BENCHIMOL-REIS, L.L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) QTL mapping for resistance to three *Colletotrichum lindemuthianum* races. 2013 - artigo em preparação.
- OLIVEIRA, E.J. de; ALZATE-MARIN, A.L.; BORÉM, A.; MELO, C.L.P.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.220-223, 2004.
- OLIVEIRA A. D.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D. Condutância Estomática como Indicador de Estresse Hídrico em Feijão. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n.1, p.86-95, 2005.
- OLIVEIRA, M.F.; NELSON, R.L.; GERALDI, I.O.; CRUZ, C.D.; DE TOLEDO, J.F.F. Establishing a soybean germplasm core collection. *Field Crops Research*, 119: 277–289, 2010.
- ORAGUZIE, N.C.; RIKKERINK, E.H.A.; GARDINER, S.E.; SILVA, H.N. **Association mapping in plants**. New York: Springer, 277p., 2007.
- ORTIZ-MONASTERIO, J.I. et al. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. **Journal of Cereal Science**, 46(3):293-307, 2007.
- OSBORNE, J.W. Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, v.15, n.12, 9p, 2010.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de Phaeoisariopsis griseola com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**. Palmira. v. 19, n. 1, p. 15- 22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M.A.; JARA, C.; SINGH, S. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, 103: 161–171, 1998.
- PAULA-JÚNIOR, T.J. de; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.25, n.223, p.99-112, 2004.
- PÉREZ-PÉREZ, J.M.; ESTEVE-BRUNA, D.; MICOL, J.L. QTL analysis of leaf architecture. **J Plant Res**, 123:15-23, 2010.
- PÉREZ-VEGA, E.; PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Mapping of QTLs for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor Appl Genet**, 120:1367–1380, 2010.
- PETES, T.D.; GREENWELL, P.W.; DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequence by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.146, p. 491-498, 1997.
- PIMENTEL, C.; PEREZ, A. J. C. Estabelecimento de Parâmetros para Avaliação de Tolerância à Seca, em Genótipos de Feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.1, p.31-39, 2000.
- POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

- PROSSER, J. Detecting single-base mutations. **Trends Biotechnol.**, v.11, p.238–246, 1993.
- QUEIROZ, V.T.; de SOUSA, C.S.; COSTA, M.R. SANGIAD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; de SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR Markers Linked to Common Bean Angular Leaf Spot Resistance Genes, **BIC Annual Reports** (<http://www.css.msu.edu/bic/Reports.cfm>), 2004.
- RAMIREZ-VALLEJO, P. & KELLY, J.D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, v.9, p.126-127, 1998.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. **Curr Opin Plant Biol**, v.5, p.94-100, 2002.
- RAGAGNIN, V.A.; DE SOUZA, T.L.P.O.; SANGIAD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; COSTA, M.R.; ALZATE-MARIN, A.L.; CARNEIRO, J.E. DE S.; 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**, 128(2):156- 163, 2009.
- REDDY, O.U.K.; PEPPER, A.E.; ABDURAKHMONOV, I.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; BROOKS, T.; BOLEK, Y.; EL-ZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Journal of Cotton Science**, v.5, p.103-113, 2001.
- RIBEIRO, N.D. et al. Composição de micronutrientes em cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. **Bragantia**, Campinas, 67(2):267-273, 2008.
- RIBEIRO, N.D. Potencial de aumento da qualidade nutricional do feijão por melhoramento genético. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v.31, p.1367-1376, 2010.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1., New York, USA, 2000.
- ROSSI, M.; BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; NANNI, L.; RAU, D.; ATTENE, G.; PAPA, R. Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. **Evol Appl** 1-19, 2009.
- SANDBERG, A.S. Bioavailability of minerals in legumes. **Brit. J. Nutr.**, v.88, Suppl. 3. S281-s285, 2002.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; MENTEN, J. O. M.; BERGAMIN FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris* L. a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, n. 1. p. 43-46, 1991.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. SCAR markers linked to angular leaf spot resistance gene in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative** 42:21-22. 1999.
- SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha angular. **Fitopatol. Bras.**, v. 31, n. 2, 2006 .
- SARTORATO, A. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five States of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 27:78-81. 2002.
- SAS INSTITUTE INC., SAS/Stat User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 1, Cary, Nc: Sas Institute Inc., 1989. 943 Pp.
- SCHNEIDER, S. & EXCOFFIER, L. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, v.152, p.1079-1089, 1999.
- SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 31: 741-754, 1982.
- SEATTLER, A.W. & CORREA-VICTORIA, F.J. Angular leaf spot in seed fields of Michigan red kidney beans. **Michigan Dry Bean Dig** 8:2-3, 1983.
- SHI, C.; NAVABI, A; YU, K. Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations. **BMC Plant Biology**, 11:52, 2011.
- SHIN, J.H.; BLAY, S; MCNENEY, B.; GRAHAM, J. LDheatmap: An R Function for Graphical Display of Pairwise Linkage Disequilibria between Single Nucleotide Polymorphisms. **Journal of Statistical Software** 16: 1-10, 2006.
- SILVA, G.F.; SANTOS, J.B.; MAGNO, A.P.R. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology** 26(4):459-463, 2003.
- SINGH, S.P.; GEPTS, P. AND DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabriceae) **Economic Botany**, v.45, p.379-396, 1991.
- SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars : A review. **Crop Science**, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

- SLATKIN, M. Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Reviews Genetics** 9: 477-485, 2008.
- SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A. C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. **Recursos Genéticos e melhoramento**. Fundação MT, p.939-965, 2001.
- SOUZA, T.L.P.O.; BARROS, E.G.; BELLATO, C.M.; HWANG, E.Y; CREGAN, P.B.; PASTOR-CORRALES, M.A. Single nucleotide polymorphism discovery in common bean. **Molecular Breeding**, v.30, p.419-428, 2012.
- STENGLEIN, S.; PLOPER, L. D.; VIZGARRA, O.; BALATTI, P. Angular leaf spot: A disease caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**. London. v. 52, p. 209-243, 2003.
- SYVÄNEN, A.C. Toward genome-wide SNP genotyping. **Nature Genetics** v.37, S5 - S10 doi:10.1038/ng1558, 2005.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia do Estresse**. In: Fisiologia Vegetal. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TIVANG, J.G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theor Appl Genet**, 89:259-264, 1994.
- VIANELLO et al (em elaboração). QTL for drought tolerance in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population Bat477 x Pérola.
- VITAL, W.M. *Phaeoisariopsis griseola*: **Physiological characterization, resistance sources and reaction of dry bean**. Campinas, SP: IAC, 2006. 49p. (Dissertação de Mestrado de Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, 2006.
- WANG, D.G.; FAN, J.B.; SIAO, C.J; BERNO, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.; MITTMANN, M.; MORRIS, M.S.; SHEN, N.; KILBURN, D.; RIOUX, J.; NUSBAUM, C.; ROZEN, S.; HUDSON, T.J.; LIPSHUTZ, R.; CHEE, M.; ERIC S. LANDER, E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v.280, p.1077-82. 1998.
- WEIR, B.S. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1996.
- WELCH, RM; HOUSE, W.A.; BEEBE,S.; CHENG, Z. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3576-3580, 2000.
- WELCH, R.M. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. **Plant Soil**, v 247, p.83-90, 2002.
- WELCH, R.M. Linkages between trace elements in food crops and human health. In: ALLOWAY, B.J. (Ed.). Micronutrient deficiencies in global crop production. New York: Springer, p.287-309, 2008.
- WIMMER, V.; ALBRECHT, T.; AUINGER, H.J.; SCHÖN, C.C. Synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R. **Bioinformatics** 28: 2086-2087, 2012.
- YU, M. A. & BLISS, F. A. Seed proteins of common bean. **Crop Science**, v.18, p.431-437, 1978.
- 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.
- YU, K.; HAFNE, M.; PARK, S.J. Construction and characterization of a common bean BAC library. **Ann Rep Bean Improv Coop** 49:61-63, 2006.
- ZHANG, X.; BLAIR, M.W.; WANG, S. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, p.629-640, 2008.
- ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **Plant Genome**, 1:5-20, 2008.

ANEXO – (artigo científico submetido para a BMC Plant Biology)

Associative mapping to anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean breeding population

Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini^{1,2}, Gliciane Micaele Borges Silva², João Ricardo Bachega Feijó Rosa³, Rodrigo Gazaffi³, Jéssica Fernanda Marçal², Antonio Augusto Franco Garcia³, Sérgio Augusto Moraes Carbonell², Alisson Fernando Chioratto², Maria Imaculada Zucchi², Luciana Lasry Benchimol-Reis^{2*}

¹Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083 - 970, Brasil.

²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo 13001-970, Brasil.

³Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo (USP-ESALq/USP), Piracicaba, São Paulo 13418-900, Brasil.

*corresponding author

Prof. Dr. Luciana Lasry Benchimol-Reis

The Agronomy Institute (IAC)

Department of Plant Genetic Resources

Campinas, SP, Brazil , Zip Code:13001-970

PO: 28

e-mail: llasry@iac.sp.gov.br

Phone: (+55-19-3202-1799); FAX: (+55-19)-3202-1722

Email addresses:

JMKCP: julinamorini@hotmail.com

GMBS: ciwind@gmail.com

JRBFR: jrbachega@gmail.com

RG: rgazaffi@gmail.com

JFM: jessica_marcal@yahoo.com.br

AAFG: aafgarci@esalq.usp.br

SAMC: carbonel@iac.sp.gov.br

AFC: afchiorato@iac.sp.gov.br

MIZ: mizucchi@gmail.com

LLBR: llasry@iac.sp.gov.br

ABSTRACT

Background: The common bean is a species with the primary center of genetic diversity in the Middle American and South American. Due to the continuous introduction of germplasm from abroad, some collections have a high number of accessions, making it difficult to explore all of the existing genetic variability present in a given germplasm bank for conservation and breeding purposes. Given that there is no consistent methodology for establishing a genetic diversity panel for associative mapping studies, this work proposes a consistent approach for choosing and assembling an informative associative panel for the common bean that can be used in other associative mapping studies, and this is confirmed by the analysis of associative mapping with anthracnose and angular leaf spot resistance *loci*.

Results: This study was to quantify and analyze the structure of the genetic variability among 500 accessions from the common bean germplasm bank of the Agronomic Institute (Instituto Agronômico, IAC, Campinas, S.P., Brazil) and to select 180 accessions to compose a diversity panel containing a wide range of genetic diversity and relevant agronomical traits. The 500 accessions were clustered in 15 distinct groups by structure analysis, and we found a strong correspondence with the dendrogram groups. The diversity panel was obtained by the selection of active cultivars based on agronomical traits of interest to the IAC common bean breeding program and by the genetic diversity measures estimated by microsatellites. The most divergent accessions presented 97.5% of the observed genetic variability observed in the original base collection, assuring that the selection criteria were efficient. A total of 103 SSRs were genotyped in 180 accessions and used to perform association analysis. MLM (Mixed Linear Model)

analysis, including population structure and kinship, was used to discover marker-trait associations; 17 associations were established between SSRs and anthracnose (ANT) race 4 and 6 associations with angular leaf spot (ALS) race 0-39 resistance *loci*. The SSR-IAC127 marker, allocated on Pv11, was associated both to anthracnose and angular leaf spot, indicating that this marker could be used in future marker assisted selection (MAS) studies in common bean breeding programs.

Conclusions: The criteria established for selecting the 180 diversity panel was efficient for providing high resolute LD estimate and potentially useful for associating SSR markers with ANT and ALS resistance *loci*.

Keywords: Molecular markers, Diversity panel, Genetic structure, Microsatellites, *Phaseolus vulgaris* L.

Background

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a species of great agronomic interest, as it is an important grain legume for human consumption worldwide [1], especially in underdeveloped and developing countries [2]. It is an annual species, diploid ($2n = 2x = 22$) and autogamous, with an estimated outcrossing rate of approximately 5% [3].

This species was domesticated by Middle American and South American Andean cultures [4,5] and was progressively dispersed worldwide from these two regions [1,6]. According to Bitocchi et al. [7], the common bean has a probable Mesoamerican origin. This study, based on the nucleotide diversity at five gene *loci*, supports the hypothesis that both of the gene pools from South America originated through different migration events from the Mesoamerican populations. However, this is still controversial as most of the studies using molecular markers to access the genetic diversity in common beans refer them to cluster in the two gene pool criteria.

The narrow genetic base of modern crop cultivars is a serious obstacle to sustaining and improving crop productivity due to the vulnerability of genetically uniform cultivars by potentially new biotic and abiotic stresses [8]. Plant germplasm resources worldwide, including

wild plant species, modern cultivars, and their wild crop relatives, are important reservoirs of natural genetic variations, and the efficient exploitation of these *ex situ* conserved genetic diversities is important to overcome future problems associated with the narrowness of the genetic base of modern cultivars. With the intensification of selection and breeding using crosses between close varieties over the last decades, a very complex genetic structure formed in the Brazilian Southeast and South elite common bean germplasm. The common bean germplasm bank of the Agronomic Institute (IAC, Campinas, S.P. Brazil) holds more than 1500 accessions, representing the two principal centers of origin (Andean and Mesoamerican) of the species as well as ecotypes from different South American countries and a large number of lines from both Brazilian and international genetic improvement programs, most of which were obtained by germplasm interchange [9]. However, knowledge of the diversity content present in a germplasm bank is essential to establishing diversity panels adequate for association mapping approaches for the crop.

Aside from yield, the main target traits in common bean breeding are seed type and size, which are measurements of grain quality. Pathogen resistance and drought tolerance also play important roles in bean breeding scenarios. The final Brazilian cultivar should also have better technological and nutritional qualities that meet market demands, as rice and beans is the main dish of the Brazilian culinary. The diversity levels and organization of the genetic diversity may be estimated, and the wider the array of molecular markers, the better. Microsatellites (Simple Sequence Repeats) [10] are PCR-based markers characterized by a high level of polymorphism, which allows the discrimination of cultivars and even among closely related common bean breeding lines, providing a reliable and efficient tool for germplasm characterization, conservation, and management [11,12,13,14,15].

Genetic mapping can be performed primarily in two ways: (1) using experimental populations (also referred to as “biparental” mapping populations) in a method called linkage mapping or genetic mapping, and (2) using diverse lines from natural populations or germplasm collections, known as LD-mapping or association mapping.

Association mapping aims to link phenotypic variation to common sequence polymorphisms in panels of unrelated genotypes. Compared to linkage mapping, association mapping offers several

advantages; however, the two major ones are that a much larger and more representative genepool can be surveyed, thus by-passing the expense and time of mapping studies by conducting crossings to generate a segregant population, distant from the bean breeders needs. The samples may represent a group of individuals from a natural population or a germplasm collection that is as variable as possible. Collections of lines have great potential for the application of association mapping studies because they are routinely evaluated in breeding programs and regional trials to assess their local adaptations or responses to biotic and/or abiotic stresses [16].

Association mapping previous report for the common bean [17,18], however, until now do not report associative mapping analysis with anthracnose and angular leaf spot resistance *loci*. From several diseases that affect the common bean crop, anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, and angular leaf spot, caused by *Pseudocercospora griseola*, deserve special attention because of the damage they cause and because of the high pathogenic variability of the pathogens [19].

The choice of germplasm is a critical step to the success of association analyses [20,21]. Genetic diversity, the extent of genome-wide LD, and relatedness within the population determine the mapping resolution, marker density, statistical methods, and mapping power. Alternatively, populations could be classified according to the source of materials, germplasm bank collections, synthetic populations, and elite germplasm [22,23]. Usually, the selection of a group of individuals from a natural population or a germplasm collection with a high level of genetic diversity is preferred.

The genetic diversity within the Brazilian common bean collection, as assessed with microsatellites, was reported by Burle et al. [3]. In this work, the authors reported that Brazil detains a secondary center of common bean diversity. According to Gepts [24], in Brazil, the common bean most likely came from at least two different routes, as indicated by the occurrence of both small and large beans. Mesoamerican beans are represented by small seeded beans, black, brown and pale ‘mulatinhos’ [4]. Andean common beans include large beans of various types, such as Jalo, and others. However, in Brazil, Mesoamerican beans are preferred by most of the population, and this preference is shown by the ‘carioca’ and black bean types. Andean cultivars,

due to their seed size, have limited acceptability in the market, hindering the work of breeders as this limited acceptability often reduces the number of parents for crosses [15].

Some factors should be considered for the improvement of a future association mapping, such as: a) the selection of a group of individuals (in accordance with the objective of each study) from the original germplasm base collection with coverage of a high level of genetic diversity; b) the size of the desired panel, as small sample sizes strongly inflate the comparisons of different allele frequencies across *loci* and the appropriate LD measures; c) the characterization of the genetic structure of the original collection and division of the collection into distinct groups; and d) allocating entries into each group to form the diversity panel, keeping the same proportion in the final panel [8,25]. After the panel formation, it is necessary to validate whether it actually represents the variability available in the original collection using comparative methods [26]. However, the number of genotypes and markers used in association mapping results in large variations, indicating that there is no well-established consensus for the formation of a diversity panel for associative mapping purposes [13, 17, 18].

Evaluations of the genetic diversity present in the Brazilian germplasm banks using molecular makers are limited, and because of this, the present study aimed to characterize the genetic diversity of the Agronomic Institute (IAC) germplasm bank to generate a diversity panel that would be useful for associative mapping studies. In this context, the aim of the present work was to access the diversity level and genetic organization present among 500 accessions from the common bean germplasm bank of the IAC and select 180 accessions that represent the variability of the entire collection in order to use this panel for association mapping studies. Given that there is no consistent methodology for establishing a genetic diversity panel for associative mapping studies, this paper proposes a consistent approach for choosing and assembling an informative associative panel for common bean that could be used in any other associative mapping studies, and this approach proved effective in associating microsatellite markers with anthracnose and angular leaf spot resistance *loci*.

Results and Discussion

The 500 common beans were genotyped with 58 microsatellite markers. After evaluating the genetic structure of the initial set of genotypes, we reduced the number of genotypes to form an associative mapping panel. The reduction of the panel was performed to remove possible identical genotypes within the germplasm bank and to remove non desirable descriptors for an associative mapping. The analysis of the genetic structure of the 500 bean genotypes (Additional file 1) clustered them into 15 distinct groups. From these, 36% reduction in the number of individuals of each group was performed to achieve a representative 180 common bean genotype associative panel. In order to select the 180 common bean genotypes (Additional file 2) that composed the diversity panel the following criteria was used: (i) the same percentage of each Structure group was selected to integrate the diversity panel; (ii) selection of 105 accessions, homogeneously picked up from each structure group, regarding the greatest genetic distance between accesses within each group according to the genetic distance matrix and the dendrogram (Additional file 3); (iii) maintenance of 75 ‘carioca’ tegument cultivars, widely cultivated at the state of São Paulo (Brazil), under the leadership of the Agronomic Institute (IAC).

This strategy was used to develop the diversity panel, and a similar approach was reported by Blair et al. [13]. This procedure is similar to the formation of a core collection, which is performed by selecting a small percentage of the original collection that represents most of the total genetic variation with a minimum of redundancy [25]. The accessions chosen to integrate the diversity panel should also preserve as much of the genetic variability as possible. To ensure the adequacy and usefulness of the chosen accessions for associative mapping, it was necessary to assess whether the characteristics and variability of the entire collection have been maintained. The boxplot chart (Figure 1) revealed that a coefficient of variation (CV) of 10% was obtained for an approximate number of 33 markers, indicating that the number of microsatellites used in this study was sufficient to explain the genetic diversity content with good genome coverage.

The diversity panel dendrogram divided the 180 accessions into clusters similar to those observed in the previous dendrogram generated for the 500 accessions. The genetic distances varied in a similar magnitude from 0.13 to 0.88 (Addition file 4), suggesting that the genetic variability was maintained and that it was still quite extensive among the diversity panel.

The best K value obtained by the Bayesian analysis (Figure 2) divided the 180 accessions into 4 different groups (Figure 3), in agreement with the Andean and Mesoamerican gene pool division

pattern and related to the breeding program institution (Table 1). There were also accessions grouped by grain size.

The uppermost hierarchical level of the population structure identified using the ΔK [27] suggested that the 180 genotypes were divided into four groups; however, when $K=2$ was considered (Additional file 5), the samples were divided into two main genetic groups. A shared profile of alleles between the Andean and Mesoamerican genotypes was observed, most likely because some of the genotypes present in both parental crosses have both Andean and Mesoamerican origins (Additional file 5). This mix is a result of the process adopted by the institutions that performed bean breeding in Brazil. The two main clusters observed with the Structure analysis reflect the previous knowledge of the occurrence of two major wild gene pools of *P. vulgaris* [13, 28].

There are different methods for estimating the structure of a diversity panel. In our study, structure analysis using the ΔK criterion, as suggested by Evanno et al. [27], provided a reliable way of selecting the most suitable number of ancestral groups to be used in associative approaches.

An analysis of molecular variance (AMOVA) between the original collection and the diversity panel was performed, and it was observed that 97% of the genetic variability from the original collection was preserved within the diversity panel (Table 2).

Regarding to LD analysis, based on the FDR threshold ($P = 4 \times 10^{-6}$), it was observed that non-random associations extended up to 100 cM from the bean panel and then declined rapidly from that distance (Figure 4). Few associations were obtained and plotted above 100 cM so that a higher LD could have been observed. However, the results are in agreement with other studies [29, 28, 30] in which a large extent (approximately 100 cM) of LD was found. The first indirect analysis of LD decay in the common bean indicated that its extent was large [31, 32], and this has also been observed in other autogamous species, such as soybean [33], barley [34] and rice [35].

In a more detailed analysis, Rossi et al. [28] observed that the level of LD in the common bean was much greater in domesticated than wild populations. The authors argued that these patterns could be explained by the sole effect of drift (i.e., bottleneck effect).

Moreover, we believe that population mating could also have a strong influence on LD patterns in the common bean. In plants, the mating system may occur based on autogamous (inbreeding) or allogamous (out-breeding) species. Generally, there is a lower decline in LD in selfing species

compared to out-breeding species [36], which could be partially explained by reduced recombination events or selection effects in the selfing species [20]. In this sense, LD tends to remain over tens to hundreds of kilobases in predominantly selfing species, such as rice, soybean or the common bean, showing that population mating could result in high proportions of LD in the common bean.

The diversity panels for association mapping should unite samples of mixed and/or admixed individuals from the most different genetic backgrounds. The presence of several genetic origins within the panels in different and unknown proportions induces linkage disequilibrium between unlinked *loci* and may increase the rate of false positives that are statistically associated with the analyzed trait without actually being involved in its phenotypic variation [37].

According to Abdurakhmonov and Abdukarimov [8], there are different approaches to the assembly of diversity panels; however, the performance of a future association mapping study should include: (1) selection of a germplasm collection with high level of genetic diversity; (2) recording or measuring the phenotypic characteristics (yield, quality, tolerance, or resistance) of the selected population groups; (3) genotyping the individuals with available molecular markers; (4) quantification of the LD extent of the genome of a chosen population using molecular markers; (5) assessment of the level of genetic differentiation among groups within the sampled individuals and the coefficient of relatedness between pairs of individuals within a sample (kinship); and (6) taking the information gained through the quantification of LD and population structure into account for the correlation of phenotypic and genotypic/haplotypic data with the application of an appropriate statistical approach that reveals “marker tags” positioned within close proximity of the targeted trait of interest.

For the proper use of genetic resources of a germplasm bank, it is essential to know the genetic diversity among the accessions available. The greater the genetic diversity among the available accessions, and the probability of finding alleles of interest. Knowledge of genetic diversity also allows the selection of the appropriate genotype and the selection methods to be used, depending on the resources available and the genetic distance between the genotypes to be recombined, according to the objectives of the breeding program [38].

For phenotypic evaluation with anthracnose race 4, statistical tests were performed to check whether or not they were normalized for associative mapping purposes. The tests used for this review were the Skewness, Kurtosis and Shapiro-Wilk. The values obtained were: 0.28 for

Skewness and 4.19 for Kurtosis and the Shapiro-Wilk test resulted in 0.93 ($p < 0.0001$) value. The significant values were subjected to Box-Cox transformation [39] using the statistical program R. The purpose of this normalization is that the expected values of transformed observations are described by a model of simple structure, the variance is constant and the observations are normally distributed. The non-significant values were kept because they were already normalized.

From the parameter lambda (λ), was chosen the model more appropriate normalization to be applied on the values of the phenotypic data. As the curve of λ positioned close to the value 0 (zero), and the values for the anthracnose race 4 were transformed making logarithm of the average repetitions of each block.

The normalized data were then used to make the associative mapping analysis. Of the 103 SSRs used, 17 SSRs markers were associated with anthracnose (race 4), PvM153 and IAC254 markers were the most significant one ($p \leq 0.001$). The associations with SSRs were observed in almost all chromosomes of common bean (Table 3).

QTL associated with resistance to anthracnose was previously mapped to linkage group Pv02 population using the BAT 93 x Jalo EEP558 (BJ) [40], the same group where *Co* resistance locus was bound [41], although they appear to be apart from each other [42]. The QTL mapped in Pv02 by Geffroy et al. [40] was associated to the cellulose gene. In that paper, the authors refer to anthracnose as in a quantitative perspective, giving importance not only to the specific gene to gene interaction [43] but also to for partial resistance against anthracnose. The comparison of the position of anthracnose quantitative trait *loci* (QTL) involved in the partial control of the different anthracnose strains revealed that some QTL co-localize with cloned defense genes, resistance gene analogs (RGAs), and anthracnose-specific resistance genes.

For angular leaf spot (race 0-39), statistical tests were also performed to check whether or not they were normalized for associative mapping. The tests used were the Skewness, Kurtosis and Shapiro-Wilk. The value of Skewness was 0.18, the Kurtosis value was 0.41 and the Shapiro-Wilk test resulted in 0.99 ($p < 0.09$) value. LSMeans (Least Square Means - LSMeans) obtained from SAS analysis of variance was used to verify the data distribution.

Out of the 103 SSR markers used, 6 SSRs (Table 4) were associated with ALS race 0-39. The SSR-IAC52 and BMC225 markers were the most significant ($p \leq 0.01$) ones. The SSR IAC127 marker allocated on chromosome 11 was associated both to anthracnose and angular leaf spot. At

the end of Pv11 of the core map, the *Are* gene was mapped (originally group P1 of the Paris map)[44] and five different race specific genes from Cornell 49242 protecting against races 6, 38, 39, 65 and 357 were also mapped as a cluster (Campa et al., unpublished results). The ANT 11.1 QTL observed in response to anthracnose race 4 was positioned on the distal part of Pv11 too (Oblessuc et al., unpublished results).

Oblessuc et al. [45] identified seven QTLs with angular leaf spot (race 0-39). By comparing the results obtained by Oblessuc et al. [45] with associations established for angular leaf spot (race 0-39) in this study, it is possible to verify that associations in similar regions were found on chromosomes 3, 4, and 10.

Although the LD is high in the bean breeding lines and generally high in the species, there will likely be regions where the LD is much reduced. Therefore, it was really important to estimate the LD across the diversity panel. When LD is moderate to high, a whole genome scan can be more appropriate than candidate gene approach [17], and therefore, it was properly used in this study. The application of association mapping in QTL discovery using plant breeding populations could help to integrate the process of QTL discovery with plant breeding, addressing concerns that the treatment of QTL discovery and cultivar development as separate processes may have limited the impact of marker assisted selection in plant breeding. QTL mapping strategies based on association mapping can use the populations that are routinely developed by the breeders for QTL discovery and cultivar development impact of MAS in plant breeding. Since the QTL of interest is present in multiple genetic backgrounds within the breeding population, through associative mapping approach, it is possible to identify QTL that are much more effective and stable across a range of backgrounds.

Conclusions

This study was efficient in the approach used for generating a diversity panel for associative mapping purposes in common bean. It demonstrated that association mapping using a reasonable number of microsatellite markers, distributed across the common bean genome and with application of plant materials that are routinely developed in a plant breeding program can detect significant association between marker and disease resistance *loci* such as anthracnose and

angular leaf spot and it could be used in breeding program large screenings, reducing the expenses in crossings for generating superior cultivars.

METHODS

1. Plant material and DNA extraction

Five hundred genotypes from the common bean germplasm bank of the Agronomic Institute (IAC, Campinas, S.P., Brazil) were used. Among the agronomical traits explored were the sources of resistance to major common bean diseases (anthracnose, angular leaf spot, rust, fusarium wilt, bacterial blight, and gold mosaic virus), sources of drought tolerance, morphological diversity such as differences in grain size and tegument color. The total genomic DNA was extracted from powdered, lyophilized young leaf tissues using the CTAB method [46].

2. SSR analysis

A total of 103 microsatellites were amplified. From these, 45 were EST-SSRs [47], while the others were genomic-SSRs [48]. The amplifications were performed in a 25 μ L final volume containing 50 ng DNA, 1X buffer, 0.2 μ M forward primer, 0.2 μ M reverse primer, and 100 μ M of each dNTP, 2.0 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, and 0.5 U of *Taq*-DNA polymerase. The following conditions were used for amplification: 1 min at 94 °C, then 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at the specific annealing temperature for each SSR and 1 min at 72 °C, with a final extension of 5 min at 72 °C. The PCR products were checked on a 3% agarose gel and separated using 6% silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis gels.

3. Data analysis

The molecular sizes of the DNA fragments were estimated by comparison with a standard 10-bp DNA ladder (Invitrogen). A binary matrix was constructed from the gel patterns, where the individuals were genotypically characterized for the presence (1) or absence (0) of the bands. The percentage of polymorphisms obtained by each primer was calculated from this matrix. The genetic distances (GDs) were calculated from the SSR and EST-SSR data for all of the possible inbred pairs using Modified Roger's genetic distance [49] with the TFPGA program, version 1.3 [50] Cluster analyses were performed using UPGMA, with the NTSYS-pc computer package

[51], version 2.1. The clustering stability was tested using the Bootstrap procedure, based on 10,000 re-samplings using the BooD program [52].

An analysis of molecular variance (AMOVA) was used to partition the total genetic variance into components due to differences between populations, among individuals within populations, and among individuals within each stock. Arlequin 3.5 software [53] was used.

Bootstrapping [54] was used to determine whether the number of polymorphic SSRs, used for genetic similarity estimation, was large enough to supply a precise estimation of the molecular markers among the 500 genotypes [55]. The polymorphic markers were submitted to sampling with the replacement of markers to create new samples from the original data. The genetic similarities for each of these subsets were calculated by obtaining 1000 bootstrap estimates of the SSRs for each of these combinations. The variation coefficients (CV) were used to construct box plots for each sample size. These analyses were calculated using R software, which is a language and environmental asset for statistical computing (R, www.r-project.org). For each marker system, the exponential function was adjusted to estimate the number of *loci* needed to obtain a 10% CV. The median and maximum coefficient of variation values were used to evaluate the accuracy of the genetic distance estimates because although the mean coefficient of variation is often used in the literature, caution is needed when dealing with molecular marker data for which there is no assurance that the CV values are distributed symmetrically.

The genetic structure of the sample was investigated using the Bayesian clustering algorithm implemented by STRUCTURE v.2.2 [56]. The Admixture model was used on the whole dataset with no previous population information and the “no-correlated allele frequencies between populations” option. Ten runs were applied with a burn-in of 200,000 iterations and a run length of 500,000 iterations performed for a number of clusters varying from K=2 to K=20. To determine the most probable number of clusters, the ad hoc statistic ΔK defined by Evanno et al. [27] was used. The mean of the absolute values of $L'(K)$ was divided by the standard deviation, where $L(K)$ stands for the mean likelihood plotted over ten runs for each K. A hierarchical analysis of variance was carried out to test the significance of the differentiation among the populations and clusters as defined by Structure software.

4. Linkage disequilibrium (LD)

To detect non-random associations among alleles at different *loci* in the population (180 out of 500 genotypes), Fisher's Exact Test [57] was performed for each possible pair of markers from the 90 SSRs. To avoid false positives due to the multiple tests (i.e., markers in *linkage equilibrium*), Bonferroni [58] and False Discovery Rate (FDR) [59] were used. FDR was applied because Bonferroni is a very conservative method for type I error control. Furthermore, to determine the suitable marker density (or resolution) for association mapping, we also analyzed the extent of LD against the genetic distance was used, considering only the Fisher's Exact Tests between the mapped and linked SSRs, based on two the previously published genetic linkage maps[60,48]. All of the analyses were carried out by R software.

5. Anthracnose evaluation

The 180 common beans seeds were germinated on germination paper in BOD (Biochemical Oxygen Demand) at 25 °C for three days and planted in boxes with autoclaved vermiculite. Plants were maintained in greenhouse during seven days, when the seedlings were inoculated with a race 4 suspension of *C. lindemuthianum*. Each pathogen strain were cultured in separated petri dishes containing PDA media (200 g L⁻¹ potato, 30 g L⁻¹ dextrose and 30 g L⁻¹ agar); spores were collected (10⁶ conidia/ml) and sprayed onto the plants with the aid of a DeVilbiss apparatus. Immediately after inoculation, plants were maintained at 95 - 100% relative humidity, with 12 hour light treatment and temperature of 23°C, during 48 hour, to promote spore germination and infection.

Each *C. lindemuthianum* race inoculation constituted of one replicate of the whole experiment; the plots were completely randomized and were composed by four individual plants each. Disease severity evaluation was performed from seven to ten days after inoculation, using a diagrammatic score scale of 1–9 [61] such as used in CIAT (Cali, Colômbia).

6. Angular leaf spot evaluation

The seeds were sown in plastic boxes (29.5 cm x 46.5 cm x 12.5 cm) with Dystrophic Red Latosol type soil, fertilized with NPK 04-14-08 (400 kg/ha), each containing 3 RILs sown in rows at a distance of approximately 4 cm, containing six plants each. The experimental design was also made up of completely randomized blocks with four replicates. The IAC-UNA and CAL 143 parents and the Carioca Comum cultivar were included among the treatments as controls.

Plants were inoculated 2 to 3 weeks after planting, when the plants were at the V3 development stage (first expanded trifoliate), by spraying both leaf surfaces with a 10^4 conidia/ml suspension prepared from *P. griseola* monosporic colonies grown in V8 medium [62]. The isolate used (14259-2) was classified as belonging to the 0-39 race based on the reaction of the differential cultivars according to Pastor-Corrales et al. [61]. After inoculation, the RILs were kept for 48 hours at room temperature between 22 to 24° C, relative humidity between 95 to 100% and photoperiod of 12h [62]. After this period, plants were transferred to the greenhouse. The severity evaluation was made 17 days after inoculation, as described above.

7. Association mapping analysis

Marker's sequences available on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or PhaseolusGenes (<http://phaseolusgenes.bioinformatics.ucdavis.edu/>) databases were used to localize the SSRs in the *P. vulgaris* chromosomes using the native Phytozome's BLAST and default algorithm parameters (<http://www.phytozome.net/>). The criteria used to assign putative chromosomes to the markers included E-values $\leq 1 \times 10^{-15}$ and a minimum identity of 70% between query and database sequences.

Association mapping analyses were carried out with TASSEL 3.0 software (http://www.maizegenetics.net/index.php?option=com_content&task=view&id=89&Itemid=119). The MLM analyses were performed using a kinship - K matrix and population structure Q matrix. The K matrix was generated based on 103 SSRs using kinship matrix function in TASSEL. Population structure consisted of a Q matrix that describes the percent subpopulation parentage for each line in the analysis. These percentages were calculated by STRUCTURE 2.3.3 software, (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>), using the best K (K=4).

Authors' Contributions

JMKCP conceived of the study, designed and carried out the experiments and data analysis, and drafted the manuscript. GMB and JFM conceived of this study, carried out the experiments and data analysis. RG, JRBFR, AAFG, SAMC, AFC, MIZ conceived of the study, carried out the data analysis. LLBR conceived and coordinated the study, and helped in the manuscript elaboration. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments: This research was supported by grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP) - process numbers 2009/05284-1 and 2009/02502-8) and CNPq (process number 477239/2010-2).

References

1. Angioi SA, Rau D, Lanni L, Bellucci E, Papa R, Attene G: **The genetic make-up of the European landraces of the common bean.** *Plant Genetic Resources* 2010, **9**:197-201.
2. Mesquita FR, Corrêa AD, Abreu CMP, Lima RAZ, ABREU AFB: **Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica.** *Ciência e Agrotecnologia* 2007, **31**:1114-1121.
3. Burle ML, Fonseca JR, Kami JA, Gepts P: **Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity.** *Theor Appl Genet* 2010, **121**:801-813.
4. Gepts P, Osborne TC, Rashka K, Bliss FA: **Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication.** *Econ Bot* 1986, **40**:451-468.
5. Gepts P: **Origin and evolution of common bean: past events and recent trends.** *HortScience* 1998, **33**:1124-1130.
6. Asfaw A, Blair M, Almekinders C: **Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands.** *Theor Appl Genet* 2009, **120**:1-12.
7. Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, Rossi M, Giardini A, Zeuli PS, Logozzo G, Stougaard J, McClean P, Attene G, Papa R: **Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data.** *PNAS PLUS* 2012, **109**:788-796.

8. Abdurakhmonov IY, Abdukarimov A: **Application of Association Mapping to Understanding the Genetic Diversity of Plant Germplasm Resources.** *Int J Plant Genomics* 2008, 574927, doi: 10.1155/2008/574927.
9. Chiorato AF, Carbonell SAM, Dias LAS, Moura RR, Chiavegato MB, Carlos Augusto Colombo CA: **Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) duplicates using agromorphological and molecular data.** *Genetics and Molecular Biology* 2006, **29**:105-111.
10. Chin ECL, Senior ML, Shu H: **Maize simple repetitive DNA sequences: Abundance and allele variation.** *Genome* 1996, **39**:866-873.
11. Blair MW, 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.** *Theor Appl Genet* 2006, **112**:1149-1163.
12. Blair MW, Diaz JM, Hidalgo R, Diaz LM, Duque MC: **Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Theor Appl Genet* 2007, **116**:29-43.
13. Blair MW, Díaz LM, Buendía HF, Duque MC: **Genetic Diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Theor Appl Genet* 2009, **119**:955-972.
14. Benchimol LL, Campos T, Carbonell SAM, Colombo CA, Chiorato AF, Formighieri EF, Souza AP: **Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers.** *Genetic Resources and Crop Evolution* 2007, **54**:1747-1762.
15. Perseguini JMKC, Chiorato AF, Zucchi MI, Colombo CA, Carbonell SAM, Mondego JMC, Gazaffi R, Garcia AAF, Campos T, Souza AP, Rubiano LB: **Genetic diversity in cultivated**

carioca common bean based on molecular marker analysis. *Genetics and Molecular Biology* 2011, **34**:88-102.

16. Oraguzie NC, Rikkerink EHA, Gardiner SE, Silva HND: *Association mapping in plants*. New York, Springer 1-9p, 2007.

17. Shi C, Navabi A, Yu K: **Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations.** *BMC Plant Biology* 2011, **11**:52.

18. Galeano CH, Cortés JA, Fernández AC, Soler A, Franco-Herrera N, Makunde G, Vanderleyden J, Blair MW: **Gene-based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean.** *BMC Genetics* 2012, **13**:48.

19. Paula-Júnior TJ de, Vieira RF, Zambolim L: **Manejo integrado de doenças do feijoeiro.** *Informe Agropecuário* 2004, **25**:99-112.

20. Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES: **Structure of linkage disequilibrium in plants.** *Annu Rev Plant Bio* 2003, **54**:357-374.

21. Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh BI, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB: **A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness.** *Nature Genetics* 2006, **38**:203-208.

22. Breseghello F, Sorrells ME: **Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants.** *Crop Sci* 2006a, **46**:1323-1330.

23. Breseghello F, Sorrells ME: **Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars.** *Genetics* 2006b, **172**:1165–1177.

24. Gepts P: **Origin and evolution of common bean: past events and recent trends.** *HortScience* 1998, **33**:1124-1130.

25. Oliveira MF, Nelson RL, Geraldi IO, Cruz CD, de Toledo JFF: **Establishing a soybean germplasm core collection.** *Field Crops Research* 2010, **119**:277-289.
26. Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC: *Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas*. Fundação MT, 1183p, 2001.
27. Evanno G, Regnaut S, Goudet J: **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** *Mol Ecology* 2005, **14**:2611–2620.
28. Rossi M, Bitocchi E, Bellucci E, Nanni L, Rau D, Attene G, Papa R: **Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L.** *Evol Appl* 2009, **1**-19.
29. Kwak M, Gepts P: **Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L, Fabaceae).** *Theoretical and Applied Genetics* 2009, **118**:979-992.
30. Blair MW, Prieto S, Diaz L M; Buendia HF; Cardona C: **Linkage disequilibrium at the APA insecticidal seed protein locus of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** *BMC Plant Biology* 2010, **10**:79.
31. Papa R, Acosta J, Delgado-Salinas A, Gepts P: **A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica.** *Theoretical and Applied Genetics* 2005, **111**:1147-1158.
32. Papa R, Bellucci E, Rossi M, Leonardi S, Rau D, Gepts P, Nanni L, Attene G: **Tagging the Signatures of Domestication in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) by Means of Pooled DNA Samples.** *Annals Botany* 2007, **100**:1039-1051.

33. Hyten DL, Choi IJ, Song Q, Shoemaker RC, Nelson RL, Costa JM, Specht JE et al.: **Highly variable patterns of linkage disequilibrium in multiple soybean populations.** *Genetics* 2007, **175**:1937-1944.
34. Caldwell KSJ, Russel J, Landrige P and Powell W: **Extreme population dependent linkage disequilibrium detected in a imbreeding plant sciences, *Hordeum vulgare*.** *Genetics* 2006, **172**:557-567.
35. Zhu Q, Zheng X, Luo J, Gaut BS and Song E: **Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: severe bottleneck during domestication of rice.** *Molecular Biology and Evolution* 2007, **24**:875-888.
36. Nordborg M: **Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: an ancestral recombination graph with partial self-fertilization.** *Genetics* 2000, **154**: 923-929.
37. Mezmouk S, Dubreuil P, Bosio M, De'cousset L, Charcosset A, Praud S, Mangin B: **Effect of population structure corrections on the results of association mapping tests in complex maize diversity panels.** *Theor Appl Genet* 2011, **122**:1149-1160.
38. Singh SP: **Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review.** *Crop Science* 2001, **41**:1659-1675.
39. Osborne JW: **Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation.** *Practical Assessment, Research & Evaluation* 2010, v.15, n.12, 9p.
40. Geffroy V, Seignac M, de Oliveira JCF, 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.** *Mol Plant Microbe Interact* 2000, **13**:287-296.

41. Kelly JD, Gepts P, Miklas PN, Coyne DP: **Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea.** *Field Crops Research* 2003, **82**:135-154.
42. Kelly JD, Vallejo AV: **A comprehensive review of the major genes conditions resistance to anthracnose in common bean.** *HortScience* 2004, **39**:1196-1207.
43. Flor HH: **Current status of the gene-for-gene concept.** *Annu. Rev. Phytopathol* 1971, **9**:275-296.
44. Adam-Blondon AF, Sévignac M, Dron M, Bannerot H.: **A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose.** *Genome* 1994, **37**:915-924.
45. Oblessuc PR, Baroni RM, Garcia AAF, Chioratto AF, Carbonell SAM, Camargo LEA, Benchimol LL: **Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments.** *BMC Genetics* 2012, **13**:50.
46. Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez-De-Leon D: *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory.* Mexico DF: CIMMYT, 1994.
47. Hanai LL, Campos T, Camargo LEA, Benchimol LL, Souza AP, Melotto M, Carbonell SAM, Chioratto AF, Consoli L, Formighieri EF, Siqueira MVBM, Tsai TM, Vieira MLC: **Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources.** *Genome* 2007, **50**:266-277.
48. Campos T, Oblessuc PR, Sforça DA, Cardoso JMK, Baroni RM, Sousa ACB, Carbonell SAM, Chioratto AF, Rubiano, LLB, Souza, AP: **Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Mol Breeding* 2011, **27**: 549-560.

49. Goodman MM and Stuber CW: **Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia.** *Maydica* 1983, **28**:169-187.
50. Miller M: *TFPGA - Tools for population genetic analyses, version 1.3*, Northern Arizona University, 1997.
51. Rohlf FJ: *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*, Version 2.1., New York, USA, 2000.
52. Coelho ASG: *Programa BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software)*. Universidade Federal de Goiânia, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, Goiânia, Goiás, 2002.
53. Excoffier L, Lischer HEL: Arlequin suite ver 3.5: **A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** *Mol Ecol Resour* 2010, **10**:564-567.
54. Efron B, Tibshirani RJ: *An Introduction to the Bootstrap*. v. 57 of *Monographs on Statistics and Applied Probability*. Chapman and Hall, New York, 1993.
55. Tivang JG, Nienhuis J, Smith OS. **Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure.** *Theor Appl Genet* 1994, **89**:259-264.
56. Pritchard JKP, Stephens, Donnelly P: **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics* 2000, **155**:945-959.
57. Fisher RA: (1935) **The logic of inductive inference.** *Journal of the Royal Statistical Society Series A* 1935, **98**:39-54.
58. Weir BS: *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1996.

59. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 1995, **57**:289-300.
60. Hanai LL, Santini L, Camargo LEA, Fungaro MHP, Gepts P, Tsai SM, Vieira MLC: **Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers.** *Mol Breeding* 2010, **25**:25-45.
61. Pastor-Corrales MA, Jará CE: **La evolución de *Phaseolus vulgaris* con el frijol común en América Latina.** *Fitopatología Colombiana* 1995, **19**:15-24.
62. Monda EO, Sanders FE, Hick A: **Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*.** *Plant Pathol* 2001, **50**:103-110.

Table 1. The 180 accessions clustered into the four groups generated by the Structure analysis and their respective traits.

Group	Accessions	Principals characteristics
1	Feijão Suíço, Chileno/Branco, Vermelhinho, Bagajo, Jalo-110, Jalo, Amendoim, Gen05C6-4-5-1-2, Branco Argentino, UxC-1.1, UxC-2.20, UxC-1.2, UxC-1.19, UxC-1.5, UxC-3.9, UxC-4.17, UxC-9.2, UxC-9.16, CxU-1.3, CxU-1.5, CxU-1.7, CxU-1.19, CxU-2.11, CxU-2.16, CxU-7.8, UxC-1.8, UxC-1.10, UxC-6.13, UxC-2.18, UxC-3.3, CAL-143, Red Kidney	Grain size (typically Andean).
2	Flor de Mayo, 2-Mar, Michelite, DOR-390, DOR-391, DOR-476, Turrialba-1, AND-279, RAZ-56, RAZ-49, Carioca Comum, Carioca Lustroso, Carioca MG, Carioca Precoce, H96A28-P4-1-1-1-1, H96A102-1-1-152, H96A31-P2-1-1-1-1, IAC-Alvorada, IAC-Apuã, IAC-AYSÓ, IAC-Carioca, IAC-Carioca Akytã, IAC-Carioca Aruã, IAC-Carioca Pyatã, IAC-Carioca Tybatã, IAC-Votuporanga, IAC-Ybaté, IAPAR-81, IAPAR-31, Pérola, Gen05C5-2-5-1-2, Gen05C5-2-10-1-1, Gen05C6-3-5-2-1, Gen05C6-5-2-2-1, Gen05C6-5-7-1-2, Gen05C7-4-1-1-1, VAX1, A0774, BAT447, SEA-5, IAC-UNA, Sanilac, FEB-176, FEB-177, J/39-2-3-1, J/61-5-3-1, J/43-5-1, J/43-1-1-1, J/39-1-3-2, M/100-4-3-1, F/19-6, F/19-3-1, E/20-2-1, D/15-3-1, C/11-2-2, (1108xHarmonia)x(1108xBoreal/Brese), 29/24-6-1-1, 22/16-1-3-2	Most have ‘carioca grain type’ with great importance to IAC and IAPAR breeding programs.
3	TO, Gen05P3-1-6-1, Gen05P4-2-6-2, Gen05P5-3-8-1, Gen05P5-3-8-2, Gen05P5-4-8-2, Gen05Pr11-1-2-2, Gen05Pr11-1-7-1, Gen05Pr11-2-3-1, Gen05Pr11-2-13-1, Gen05Pr11-2-14-2, Gen05Pr11-3-5-1, Gen05Pr11-6-5-1, Gen05Pr11-6-12-2, Gen05PR12-2-5-1-2, Gen05PR12-2-2-1-1, Gen05PR12-2-4-1-2, Gen05PR13-1-8-1-2, Gen05PR13-1-8-1-1, Gen05PR13-1-6-1-2, Gen05PR13-2-2-1-2, Gen05PR13-2-1-1-2, Gen05C1-3-2-1-1, Gen05C1-3-3-1-1, Gen05C2-1-1-2-1, Gen05C2-1-6-1-1, Gen05C2-1-1-1-3, Gen05C2-1-1-1-1, Gen05C3-2-4-1-1, Gen05C3-2-4-1-7, Gen05C4-3-1-1-2, Gen05C4-3-1-1-1, Gen05C4-4-3-1-2, Gen05C4-6-2-1-2, Gen05C5-1-2-2-2, Gen05C5-1-2-1-1	Recent crossings performed at the IAC breeding program.
4	Frijol Negro, ECU-311, México-115, Baetão (30273), Preto-208, Preto-184, Honduras-32, Guatemala-479, Jamapa (CNF-1671), Mulatinho (VP-102), Tupi, Rosinha G2, Preto do Pocrone, Porrillo-1, México-498, Small White 59 Preto, Perry Marron, Mortinho, Rosado-13, Porrillo Sintético, Puebla-152 (CIAT), ARA-1, Caeté (preta), IAC-Maravilha, FEB179, Jamapa (CIAT), Puebla-152 (CNF-1807), EMP-81, ARC-3, ARC-4, LP-90-91R.Bac., EMP-407, FEB180, Oito e Nove, Alemão, Bat-93, Pinto-114, G2333, PI-165426, RAZ-55, Batista Brilhante (CB), 82 PVBZ-1783, A-449, Aporé, Branquinho, BRS-Cometa, BRS-Horizonte, BRS-Pontal, BRS-Requinte, BRSMG-Talismã, CampeãoII, Caneludo, Gen05C7-3-2-2-2, J/54-5-1	Most are from CIAT and EMBRAPA.

Table 2. Analysis of variance considering the original collection of 500 accessions and the diversity panel containing 180 accessions derived from the original collection.

Sources of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation	<i>p</i> -value
Among populations	213.355	0.40356	2.75377	< 0.001
Within populations	18416.941	14.25113	97.24623	< 0.001
Total	18630.296	14.65469		

Table 3. Testing of association between marker *loci* and Anthracnose (race 4) severity using unified MLM (Mixed Linear Model) method.

Anthracnose race 4 -				
ANT	Chromosome	SSR name	<i>p</i> ^a	<i>R</i> ² _marker
ANT	1	PvM123	0.0216*	0.0253
ANT	1	PvM15	0.0031**	0.0752
ANT	1	PVEST233	0.0479*	0.0243
ANT	2	SSR-IAC156	0.0455*	0.0144
ANT	2	PvM93	0.0148*	0.0459
ANT	2	PvM153	0.000018084***	0.0858
ANT	3	PvM126	0.0024**	0.0637
ANT	3	SSR-IAC167	0.0109*	0.0427
ANT	3	PvM95	0.0246*	0.0253
ANT	3	PVEST236	0.0388*	0.0429
ANT	5	PvM07	0.0332*	0.0476
ANT	6	PvM14	0.0232*	0.0465
ANT	8	SSR-IAC254	0.001***	0.0541
ANT	8	SSR-IAC240	0.0059**	0.0515
ANT	11	PvM98	0.00085827***	0.0651
ANT	11	SSR-IAC127	0.0132*	0.0297
ANT	11	PvM56	0.0065**	0.0404

^a *, $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

^b R^2_{marker} was calculated as the proportion of sum square due to marker after accounting for all other effects in model.

Table 4. Testing of association between marker *loci* and angular leaf spot (race 0-39) severity using unified MLM (Mixed Linear Model) method.

Angular leaf spot race				
0-39 – ALS)	Chromosome	SSR name	p^a	$R^2_{\text{Marker}}^b$
ALS	1	PvM97	0.0108*	0.037
ALS	3	BMc215	0.0283*	0.0293
ALS	4	SSR-IAC52	0.0063**	0.0928
ALS	4	BMc225	0.01**	0.0721
ALS	10	BMc273	0.02*	0.0663
ALS	11	SSR-IAC127	0.0483*	0.0185

^a *, $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

^b R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Figures

Figure. 1 Boxplot graph obtained by Bootstrap analysis of the data generated by genotyping 500 common bean accessions with 58 microsatellites.

Figure. 2 Graphical representation of the optimal number of groups in the program Structure inferred using the criterion of Evanno et al. (2005). The analysis was based on data obtained from 58 microsatellite *loci* in 180 bean genotypes evaluated for genetic diversity.

Figure. 3 Representation of 180 common bean genotypes according to the Bayesian analysis of the program Structure. The accessions evaluated were divided into four groups (K=4). The names of the genotypes are given in Supplementary Table S1.

Figure. 4 Linkage disequilibrium due to the genetic distance in cM. The thresholds corresponding to Bonferroni corrections and FDR are shown on a logarithmic scale with significant associations (in LD) and non-significant vectors above and below, respectively.

Supplementary Material

Additional file 1. Representation of 500 common bean genotypes according to the Bayesian analysis of the Structure program. The accessions evaluated were divided into four groups (K=15). The names of the genotypes are given in Additional file 2.

Additional file 2. Common bean genotypes selected to compose the panel for future association mapping.

Additional file 3. UPGMA cluster analysis of the modified Roger's genetic distances based on data from 58 SSRs used in the evaluation of the 500 common bean samples. The Bootstrap node supports are represented in percentages. The numbers in parentheses in front of each genotype correspond to their location in the clusters generated by Structure (K = 15).

Additional file 4. UPGMA cluster analysis of the modified Roger's genetic distances based on data from 58 SSRs used in the evaluation of the 180 common bean samples. The Bootstrap node supports are represented in percentages. The names of the genotypes are given in Additional file 2.

Additional file 5. Representation of 180 common bean genotypes according to the Bayesian analysis of the Structure program. The accessions evaluated were divided into two groups (K=2). The names of the genotypes are given in Additional file 2.