

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Paula Rodrigues Oblessuc

**“Mapeamento genético da resistência à mancha angular em feijoeiro comum
(*Phaseolus vulgaris* L.)”**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de
Mestre em Genética e
Biologia Molecular, na área
de Genética Vegetal e
Melhoramento.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Paula Rodrigues
Oblessuc
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Luciana Lasry Benchimol

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Anete Pereira de Souza

Campinas, 2009

Luciana Lasry Benchimol
CPD de Rec Genéticos Vegetais
RS: 12.983.779 - 01
Pesquisadora Científica

Luciana Lasry Benchimol

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ob4c

Oblessuc, Paula Rodrigues
Mapeamento genético da resistência à mancha angular
em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) / Paula
Rodrigues Oblessuc. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Luciana Lasry Benchimol, Anete Pereira
de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Mapa genético. 3.
Microsatélites (Genética). 4. Mapeamento de QTL. 5.
Mancha angular. I. Benchimol, Luciana Lasry. II. Souza,
Anete Pereira de. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Genetic mapping of resistance to angular leaf spot in common bean
(*Phaseolus vulgaris* L.).

Palavras-chave em inglês: *Phaseolus vulgaris*; Genetic map; Microsatellites (Genetics); QTL
mapping; Angular leaf spot.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Luciana Lasry Benchimol, Monalisa Sampaio Carneiro, Marcos Antonio
Machado.

Data da defesa: 27/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 27 de janeiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). (Orientador(a)) Luciana Lasry Benchimol


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Monalisa Sampaio Carneiro


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marcos Antonio Machado


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Maria Imaculada Zucchi

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Sérgio Augusto Morais Carbonell

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do deste curso.

Agradeço à minha orientadora Dra. Luciana Lasry Benchimol, pela paciência, esforço e dedicação a mim e a este trabalho.

Agradeço aos melhoristas do Instituto Agronômico de Campinas Dr. Sérgio A. M. Carbonell e Dr. Alisson Fernando Chioratto, pelo auxílio prestado, explanando sempre seus pontos de vista.

Agradeço aos Drs. Marcos Antonio Machado e Marco Aurélio Takita pelo auxílio disponibilização do sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems) para as análises de genotipagem em Cordeirópolis.

Agradeço ao Dr. Antonio Augusto Franco Garcia pela enorme colaboração nas análises de mapeamento e identificação dos QTLs. Foi um grande mestre.

Agradeço à Dra. Anete Pereira de Souza pelo suporte e apoio sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço à FAPESP pela concessão de bolsa de estudo e financiamento do projeto.

Agradeço as colegas de laboratório Juliana M. K. Cardoso e Renata M. Baroni pela imensa ajuda, tanto durante as práticas de laboratório, como pelos conselhos e dicas.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica e técnicos que passaram pelo laboratório, essenciais para o andamento deste projeto.

Agradeço ao meu noivo pela compreensão durante as noites e finais de semana de trabalho e pelas discussões que sempre me ajudaram a enxergar a melhor saída.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram e tornaram possível a conclusão deste projeto.

“Se consegui enxergar mais longe, é porque me apoiei no ombro de gigantes”
Isaac Newton (1643 -1727).

ÍNDICE

Resumo	01
Abstract	03
Lista de Siglas	04
Introdução	06
Revisão Bibliográfica	11
1. Cultura do Feijoeiro	11
2. Marcadores Moleculares	14
2.1. Marcadores Microsatélites (SSRs)	17
3. Construção de Mapas Genéticos	19
3.1. Populações de Mapeamento	20
3.2. Análises de Mapeamento	22
4. Detecção de QTLs	29
5. Mapeamento com Marcadores Moleculares em Feijão	34
6. Mapeamento de Locos Associados à Resistência a Doenças em Feijão.....	37
6.1. Resistência à Mancha Angular	40
Objetivos do Trabalho	49
Material e Métodos	50
1. População de Mapeamento	50
2. Obtenção e Análise de SSRs	51
3. Extração e Quantificação de DNA	53
4. Caracterização dos <i>primers</i>	53
5. Gel de Poliacrilamida 6%	54

6. PCR-marcado por Fluorescência	55
7. Construção do Mapa Genético UC	56
8. Avaliação fenotípica de Resistência à Mancha Angular em Campo	57
9. Avaliação fenotípica de Resistência à Mancha Angular em Casa de Vegetação	58
10. Mapeamento de QTLs de Resistência à Mancha Angular	58
Resultados e Discussão	61
1. Mapa Genético UC	61
2. QTLs de Resistência à Mancha Angular	73
Conclusões	86
Referências	87
Anexo 1	103
Anexo 2	106
Anexo 3	111

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é o legume mais consumido em todo o mundo. O melhoramento do feijoeiro busca ferramentas robustas de transferência de genes de resistência à doenças para cultivares de interesse. A doença da mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, é responsável por grandes prejuízos aos produtores de feijão.

Novo mapa genético para feijão utilizando marcadores microssatélites foi desenvolvido a partir de uma população segregante de 380 linhagens endogâmicas. A população foi gerada pelo cruzamento entre a variedade 'IAC-UNA' (Mesoamericana/suscetível) e a linhagem 'CAL 143' (Andina/resistente). O mapa UC foi gerado com 198 microssatélites ligados, distribuídos nos onze grupos de ligação, usando LOD mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,40. O comprimento total de mapa encontrado foi de 1.864,2 cM. Os dados fenotípicos das linhagens da população UC quanto à resistência à mancha angular foram obtidos em condições naturais de infecção por *P. griseola*, em campo, e em condições controladas de casa de vegetação (raça 60.54).

Onze QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados à resistência a mancha angular foram mapeados por mapeamento por intervalo composto. Sete QTLs foram identificados a partir dos dados fenotípicos de campo e outros quatro QTLs, obtidos dos dados de casa de vegetação. Os efeitos dos QTLs foram quantificados. O total da variação fenotípica explicada foi de 34% no experimento de campo, no qual foi identificado o QTL de maior efeito sobre o fenótipo (9,1%). No experimento de casa de vegetação, foi possível explicar 18% do total da variação fenotípica, sendo obtido o segundo QTL de maior efeito, sendo de 7,2%. Os resultados obtidos neste trabalho indicam um padrão de herança poligênico de

resistência à mancha angular, sendo necessária a realização de experimentos fenotípicos com repetições para reduzir os efeitos ambientais e com isso, isolar melhor os efeitos genéticos.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most consuming legume worldwide. Common bean breeding is seeking alternatives to transfer resistance genes to cultivars of interest. The angular leaf spot disease caused by the fungus *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun is responsible for great losses for common bean producers.

A new genetic map for common bean using microsatellites was obtained from a segregating population of 380 endogamic lines. This population was generated from the 'TAC-UNA' (Mesoamerican/ susceptible) x 'CAL 143' (Andean/resistant) cross. The UC map was generated with 198 microsatellites assigned to eleven linkage groups, using a minimum LOD of 3.0 and a maximum recombinant ratio of 0.40. Total map length found was 1864.2 cM. The angular leaf spot resistance phenotypic data from UC lines was obtained under natural infection condition with *P. griseola*, on the field, and with controlling greenhouse conditions (race 60.54).

Eleven QTLs (Quantitative Trait Loci) were mapped for angular leaf spot resistance using composite interval mapping. Seven QTLs were identified from field condition and other four QTLs, obtained from greenhouse data. The QTL effects were quantified. Total phenotypic variance explained was 34% on field experiment, in which the major QTL involved on phenotype was identified (9.1%). On the greenhouse experiment it was possible to explain 18% of total phenotypic variance, with the second major QTL, being of 7.2%. The results obtained in this work indicate a polygenic inheritance for angular leaf spot resistance, and it is necessary to carry out new phenotypic experiments with repetitions in order to reduce the environmental effects and, thus, better isolate the genetic effects.

LISTA DE SIGLAS

ABA - Ácido Abscísico
ALS - *Angular Leaf Spot*
AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*
Avr - *Avirulence gene*
BJ - ‘BAT 93’ / ‘Jalo EEP558’
BIC - *Bean Improvement Cooperative*
cM - centiMorgans
CIM - Mapeamento por Intervalo Composto
COI1 - *Cytochrome Oxidase Subunit 1*
DG - ‘DOR364’ / ‘G19833’
DX - ‘Dorado’ / ‘XAN 176’
EST - *Expressed Sequence Tag*
FDR - *False Discovery Rate*
GL - Grupo de Ligação
HR – Reação Hipersensível
I - Interferência
LODscore - *Logarithm of Odds*
LRR - *Leucin Rich Repeat*
LRT - *Linkelihood Ratio Test*
MI - Mapeamento por Intervalo
MIM - Mapeamento por Múltiplos Intervalos
ML - Máxima Verossimilhança
mRNA - RNA mensageiro
NBS - *Nucleotide Binding Site*
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
QTL - *Quantitative Trait Loci*
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
RCD - *Rapid Chain Delineation*
RF2 - *Release Factor 2*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGA - *Resistance Gene Analog*

RGAP - *Resistance Gene Analog Polymorphism*

RILs - *Recombinant Inbred Lines*

SAM - Seleção Assistida por Marcadores

SARF - *Sum of Adjacent Recombination Fractions*

SALOD - *Sum of Adjacent Lod Scores*

SCAR - *Sequence Characterized Amplified Region*

SMA - Análise por Marcas Individuais

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR - *Simple Sequence Repeat*

Ta - Temperatura de anelamento

TAIR - *The Arabidopsis Information Resource*

TIF2 - *translation initiation factor 2*

TRAP - *Targeted Region Amplified Polymorphism*

UC - 'IAC-UNA' / 'CAL 143'

UTR - *Untranslated Regions*

ycf - *hypothetical chloroplast frame*

INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma leguminosa pertencente à subfamília Papilionoideae, que inclui a maioria das leguminosas de importância econômica, inclusive o gênero *Phaseolus*. Dentre as 50 espécies descritas para *Phaseolus*, cinco estão incluídas na alimentação humana. A espécie *P. vulgaris* (feijão comum) é a de maior produção, correspondendo a 75% do consumo no mundo (Broughton et al., 2003).

Neste contexto o Brasil destaca-se como maior consumidor e produtor mundial de feijão, com um consumo per capita superior a 17 kg/ano, e produção de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas na safra de 2007/08 (CONAB, Levantamento Maio/2008). Toda a produção nacional é utilizada no abastecimento do mercado interno, sendo ainda necessária à importação do produto.

A produção nacional de feijão ainda é inferior ao seu potencial, apresentando produtividade média equivalente a 898 kg/ha em 2008 (CONAB, Levantamento Maio/2008). A produtividade é influenciada por vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas de redução da produção. A doença da mancha angular, que afeta a cultura do feijoeiro, é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, e vem tendo sua importância aumentada nas últimas 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).

Desta forma, buscam-se ferramentas que agilizem a transferência de genes de resistência à doenças para cultivares de feijão. Objetiva-se assegurar o desempenho e estabilidade em campo dos cultivares, garantindo a aceitação dos produtores (Xu & Crouch,

2008). Para isso, o melhoramento genético de plantas tem se mostrado uma importante ferramenta.

Neste sentido, o uso de marcadores moleculares vem sendo cada vez mais empregado. Através deles, é possível realizar análises de diversidade genética, mapear genes e realizar programas de seleção assistida incorporando-se uma marca associada ao gene de interesse. Trabalhos vêm sendo publicados mostrando a eficiência deste processo (Miklas, 2002; Kelly et al., 2003; Alzate-Marin et al., 2005; Miklas(a) et al., 2006; Namayanja et al., 2006).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares, os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* - Tautz, 1989; Weber & May, 1989) tem se destacado por apresentar alto nível de polimorfismo, codominância, heterozigosidade e padrão de herança Mendeliana. Além disso, é possível ser analisado a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA para amplificação nas reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction* - Mullis & Faloona, 1987). A PCR é realizada a partir de oligonucleotídeos ancorados nas regiões flangeadoras às repetições, que são altamente conservadas e únicas.

Os SSRs são combinações de 1 a 6 bases repetidas em *tandem*. Apresentam grande variabilidade originada de mecanismos naturais de mutação (Oliveira et al., 2006), que levam a variação do número de cópias da unidade básica de repetição (Schlötterer & Tautz, 1992). O polimorfismo é detectado quando existe diferença no tamanho do produto amplificado. Há diferentes metodologias para a genotipagem dos indivíduos, em geral usa-se análise em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, mas o uso de sequenciador via técnica de PCR-marcado com fluorescência (Oetting et al., 1995; Schuelke, 2000) também é utilizado.

Os microssatélites têm sido cada vez mais usados para a análise genética em feijão comum. Estudos de análise de efeitos da seleção natural (Rodrigues & Santos, 2006), variabilidade genotípica (Blair(a) et al., 2006; Buso et al., 2006), e principalmente construção de mapas genéticos visando identificação QTLs (*Quantitative Trait Loci*), vem sendo realizados no intuito de auxiliar os programas de melhoramento da espécie.

Mapas genéticos para feijão continuam sendo produzidos na expectativa de identificar o maior número possível de QTLs de interesse agrônomo. A construção de mapas genéticos baseia-se na análise de ligação entre locos no genoma. O ponto central desta análise é a existência de desequilíbrio de ligação entre os locos. Através das frações de recombinação é possível verificar a existência do desequilíbrio de ligação (Liu, 1998; Carneiro & Vieira, 2002).

A fração de recombinação entre os locos é acessada através dos marcadores moleculares que mostram os genótipos de cada indivíduo utilizado no estudo de mapeamento. Esses indivíduos devem ser obtidos através de um cruzamento controlado entre variedades geneticamente divergentes, gerando uma população de mapeamento com alto nível de desequilíbrio de ligação.

Em feijão comum, a população de mapeamento mais utilizada é a ‘BAT 93’/‘Jalo EEP558’ (BJ), composta de 75 RILs (*Recombinant Inbred Lines*). Esta população foi utilizada na obtenção do mapa consenso de feijão (*Core Map*) por Freyre et al. (1998), onde mais de 500 marcadores moleculares foram mapeados. Trabalhos posteriores foram realizados no sentido de saturar este mapa através da integração dos novos marcadores moleculares, dentre SSRs (Yu et al., 2000; Grisi et al., 2007), RGAP (*Resistance Gene Analog Polymorphism* – Mutlu et al., 2006), ou ainda marcadores TRAP (*Targeted Region Amplified Polymorphism* – Miklas(b) et al., 2006), entre outras. O objetivo dos trabalhos de

mapeamento é identificar locos de interesse agrônômico, como fatores fisiológicos (Kwak et al., 2008), e principalmente de resistência a doenças (Tsai et al., 1998; Miklas(b) et al., 2006; Mutlu et al., 2006; Blair et al., 2007).

Contudo, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com diferentes populações de mapeamento, gerando diversos mapas genéticos aplicados à identificação dos mais variados QTLs (Miklas et al., 2003; Yan et al., 2004; Blair(a) et al., 2006; Hanai(a) et al., 2008, Tian et al., 2007; Checa et al., 2008).

Para resistência à mancha angular, López et al. (2003) identificaram locos ligados à resistência a *P. griseola* no mapa obtido partir da população 'DOR364'/'G9833' (DG) e marcadores RGAP. Esta população foi primeiramente descrita por Blair et al. (2003). Dois locos foram mapeados no grupo de ligação B4 e três locos no grupo de ligação B10, caracterizando herança poligênica.

Estes estudos estão sendo empregados em programas de melhoramento do feijoeiro principalmente através de Seleção Assistida por Marcadores (SAM – Namayanja et al., 2006; Balbi et al., 2006; Miklas(a) et al., 2006). Recentemente, Sanglard et al. (2008) obtiveram sucesso na piramidação de vários genes de resistência à mancha angular, introgridindo novos alelos ao cultivar 'Rudá'.

A resistência genética de plantas cultivadas vem sendo cada vez mais procurada, uma vez que é a mais apropriada, segura e eficiente estratégia de controle de doenças disponível para pequenos e grandes agricultores (Namayanja et al., 2006). A seleção de resistência baseado na presença de marcadores moleculares é rápida e confiável, já que não depende da interação com ambiente (Arus & Merono-González, 1993). Isso faz do uso da estratégia SAM, para a piramidação de genes de resistência, uma importante ferramenta para o melhorista. Além disso, o estudo de genes de resistência via marcadores moleculares

também possibilita um maior entendimento da relação entre patógeno-hospedeiro, acrescentando conhecimentos na busca por novas formas de resistência.

Desta forma, o presente estudo visou contribuir com o melhoramento da cultura do feijoeiro. Um novo mapa genético saturado com SSRs foi gerado a partir da população de mapeamento 'IAC-UNA' x 'CAL 143' (UC). Através deste novo mapa UC realizou-se o mapeamento de QTLs associados à resistência à mancha angular. A localização de novos marcadores ligados a genes de resistência à mancha angular torna mais fácil à realização de SAM. Mais informações quanto aos mecanismos de resistência do feijoeiro levam a uma maior compreensão da interação patógeno-hospedeiro, e dos tipos de interação entre os genes envolvidos neste processo de resposta a infecção por *P. griseola*. A identificação de marcas ligadas a estes genes possibilitará estudo futuros, com possível identificação e seqüenciamento desses genes por técnicas de mapeamento fino e clonagem posicional.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cultura do Feijoeiro

O feijoeiro (*P. vulgaris* L.) é uma planta cultivada a milhares de anos pelo homem. Diversas hipóteses tentam explicar a origem da planta e sua domesticação pelo homem. Algumas evidências levam à hipótese de que seu centro de origem e domesticação teria ocorrido na região da Mesoamérica, por volta de 7.000 anos a.C., uma vez que cultivares selvagens, similares a variedades crioulas, foram encontrados nessa região, mais especificamente no México. Supõe-se que a partir dessa região, a cultura teria sido disseminada para toda a América do Sul. Contudo, achados arqueológicos de 10.000 a.C. sustentam outra hipótese de origem e domesticação do feijão na América do Sul, mais especificamente no Peru, tendo, posteriormente, a sua cultura disseminada para a parte norte do continente (Singh, 2001).

Com base em padrões eletroforéticos de faseolina, uma proteína do feijão que possui pequenas diferenças de acordo com o cultivar do qual foi extraído, sugerem a existência de três centros de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como cultivadas. O primeiro centro é denominado Mesoamericano, se estendendo desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala. Nesta região, teriam surgido as variedades de grãos pequenos. O segundo centro é chamado Andino, abrangendo as regiões do Peru, Argentina, Colômbia e Venezuela, onde teriam sido originadas as variedades de sementes grandes. O terceiro centro de origem recebeu o nome de Meso-Andino, incluindo a região desde a Colômbia e Venezuela até o Norte do Peru. Nessa região, teriam sido originados cultivares com características intermediárias. Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros

centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (Gepts & Debouck, 1991; Singh, 2001).

Os grãos de feijão se destacam como importante fonte protéica na dieta humana desde a antiguidade, com registros de seu cultivo no Antigo Egito e na Grécia. Hoje se sabe que além de fonte de proteínas, o feijão também contém grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e isoflavonas (Vieira et al., 1998; Anderson et al., 1999), além de ser uma importante fonte de ferro, fósforo, magnésio e manganês e em menor escala de zinco, e cálcio (Broughton et al., 2003).

Assim, considerado o mais importante das 50 espécies de *Phaseolus* nativas das Américas, o feijão comum ocupa mais de 85% das áreas semeadas em todo do mundo, sendo a América Latina (47%) e África (10%) as regiões que concentram maior produção (Singh et al., 2005).

Neste contexto, o Brasil destaca-se como o maior produtor, correspondendo a 14,6% da produção (FAO, 2001). De acordo com dados do IBGE, a produção de feijão comum nas safras de 2007/08 foi de aproximadamente 2,8 milhões de toneladas. O cultivo dessa leguminosa tem se difundido muito em todo o território nacional, tanto no sistema de monocultura, como consorciado com outras espécies cultivadas. É reconhecida como cultura de subsistência em pequenas propriedades. Muito embora tenha havido, nos últimos 20 anos, crescente interesse de produtores de outras classes, com o uso de tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada. Dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas (safra das águas – setembro a novembro, safra seca ou “safrinha” – janeiro a março, safra inverno – maio a julho), de tal forma que sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno.

Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno. Mesmo com o aumento da produtividade, que chegou a 1,1 mil Kg/ha nas safras de 2007/08 (IBGE, 2008), ainda se observa uma produção insuficiente para atender a demanda interna, uma vez que o brasileiro também se destaca como maior consumidor da cultura, com 17 kg/hab/ano. As regiões brasileiras são bem definidas quanto à preferência do tipo de grão de feijão consumido. Algumas características como a cor, o tamanho e o brilho podem determinar o consumo ou não do grão, sendo os grãos tipo Carioca e Preto os mais importantes.

A produtividade pode ser influenciada por vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada um dos mais importantes. A cultura do feijoeiro é assolada por mais de 45 diferentes doenças que podem correr no Brasil (Borém, 1998), sendo a antracnose, ferrugem, mosaico comum e crestamento bacteriano comum, algumas das doenças de maior importância na cultura. Neste contexto, outra patologia de grande importância, que vem crescendo nas últimas duas décadas, é a mancha angular. Até o final da década de 80, a mancha angular era pouco considerada pelos produtores, uma vez que causava danos apenas no final do ciclo da cultura. Porém, com o plantio extensivo do feijoeiro, com variedades de base genética restrita de resistência a doença e o uso de irrigação nas lavouras, a mancha angular proliferou, e hoje é uma das doenças de maior impacto nas plantações de feijão (Paula-Junior & Zambolim, 1998). Atualmente, pode ser encontrada em mais de 60 países do mundo, inclusive no Brasil, levando à perdas de até 80% quando ocorrem severas condições de infecção (Schwartz et al., 1982; Jesus Júnior et al., 2001).

Com isso, o melhoramento do feijoeiro busca agregar características de resistência em cultivares de interesse econômico. Neste sentido, o uso de marcadores moleculares vem

sendo cada vez mais empregado. Através deles, é possível mapear genes de resistência realizando sua associação a uma marca genética e, assim, realizar programas de seleção assistida incorporando-se resistência em cultivares elite (Kelly et al., 2003; Miklas(a) et al., 2006; Namayanja et al., 2006).

2. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares traduzem as diferenças na sequência de DNA de diferentes genótipos de uma determinada espécie. Estas variações são chamadas de polimorfismos, sendo originadas por rearranjos cromossômicos, como inserções, duplicações, deleções, mutações entre outros (Griffiths et al., 2006). Existem muitos tipos de marcadores moleculares, que variam de acordo com a técnica de detecção do polimorfismo.

No início dos anos 80, descobriu-se a primeira classe de marcadores moleculares, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Botstein et al., 1980), que se baseia no polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos com o uso de enzimas de restrição. O polimorfismo é visualizado através da diferença no tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após digestão com diferentes enzimas. O marcador RFLP é robusto, porém é o mais custoso e trabalhoso dos atualmente disponíveis, uma vez que a técnica não é passível de ser automatizada (Garcia et al., 2004).

Outro marcador amplamente utilizado na década de 90 foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990), o qual faz uso de oligonucleotídeos com sequência arbitrária de bases para a amplificação de DNA genômico. Para que um fragmento seja amplificado, estas duas regiões têm que estar a uma distância de até 2.000 pares de bases. Este marcador apresenta algumas limitações, como a

baixa reprodutibilidade dos resultados e a natureza dominante, não permitindo a distinção entre os locos heterozigotos e homozigotos. Atualmente este marcador esta em desuso devido à sua baixa robustez (Garcia et al., 2004).

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Zabeau, 1993) foi outro marcador desenvolvido na década de 90, e tem sido amplamente utilizado na análise de plantas por possibilitar a obtenção de um grande número de marcas distribuídas no genoma. O ensaio de AFLP combina digestão do DNA por enzimas de restrição, com duas etapas de amplificação do DNA digerido através de adaptadores específicos que selecionam os fragmentos de maior interesse. Apesar de gerar um grande número de fragmentos, possibilitando a avaliação de muitos locos ao mesmo tempo, a técnica apresenta a desvantagem de levar a uma baixa informação genética por loco.

Com isso, novas técnicas de detecção de marcadores moleculares estão sendo desenvolvidas nesta última década. Os principais objetivos desses novos marcadores são possibilitar a análise de cada loco de forma específica, barata, rápida, e eficiente. Assim, foram identificados os marcadores do tipo microssatélites. Estes podem ser obtidos tanto de seqüências ESTs disponíveis em bancos de dados, sendo assim gene-específicos, como também podem ser derivados de bibliotecas enriquecidas para microssatélites, abrangendo todo o genoma das espécies em estudo. Sua principal vantagem estar em ser loco específico, com um par de *primers* para cada marca, e poder ser encontrado em todo genoma, com distribuição uniforme na grande maioria dos organismos, tanto procariotos quanto eucariotos (Oliveira et al., 2006).

Neste contexto estão também os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* – Syvanen, 2001), que representam o refinamento na análise de genomas, uma vez que identificam o polimorfismo entre dois alelos através da diferença entre uma

única base na sequência gênica (Vignal et al., 2002). Esta técnica possibilita identificar os alelos de maior interesse, não apenas a região em que estes se encontram no genoma. Os SNPs vêm sendo cada vez mais utilizados, principalmente em organismos que apresentam seu genoma sequenciado, já que uma grande dificuldade da técnica é exatamente obter as sequências dos genes de interesse para que possam ser comparadas e o polimorfismo identificado.

Os marcadores TRAP (*Targeted Region Amplified Polymorphism* – Miklas(b) et al., 2006), também vem sendo utilizados em plantas. Eles resultam da amplificação de regiões do genoma pelo uso de um *primer* fixo, desenhado a partir de sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) associadas com genes de interesse, ou a partir de sequências RGAs (*Resistance Gene Analogs*), presentes em bancos de dados. O outro *primer* deve ser randômico, possibilitando, assim, a visualização de locos polimórficos (Miklas(b) et al., 2006). Desta forma este tipo de marcador tem a grande vantagem de ser específico quanto à característica em estudo, porém não permite a amplificação de uma região restrita, não sendo loco específico.

A escolha do tipo de marcador molecular é de grande importância na produção de um mapa genético. O marcador influencia no método a ser adotado de genotipagem da população de mapeamento, e principalmente no tipo de informação gerada no mapa. Marcadores codominantes, que permitem a identificação do heterozigoto, favorecem estudos de interações gênicas, revelando interações aditivas e de dominância. Por outro lado, marcadores dominantes, que permitem a identificação apenas de homozigotos, revelam somente interações gênicas de aditividade (Liu et al., 1998).

Outro ponto é a capacidade de saturação de cada tipo de marcador. É importante verificar se as características do marcador escolhido realmente irão satisfazer a resolução

do mapa pré-estabelecida pelo número de genótipos identificados (Carneiro & Vieira, 2002). Outro fator, ainda, seria a reprodutibilidade de resultados. Devido à técnica utilizada para identificação de um determinado marcador, este pode ser pouco reprodutível em diferentes laboratórios, ou mesmo, em diferentes condições experimentais, tais como marcas de reagentes.

2.1. Marcadores Microssatélites (SSRs)

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats* - Tautz, 1989; Weber & May, 1989), são regiões repetitivas do DNA compostas de pequenos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*. Os SSRs são classificados de acordo com o tipo de repetição que apresentam como perfeitos [motivos não interrompidos, ex: (AT)₁₀], imperfeitos [apresentam bases não pertencentes ao motivo, ex: (TA)₆CG(TA)₈] e compostos [contém dois motivos adjacentes, ex: (AT)₇(GT)₁₃]. A grande variabilidade observada origina-se de mecanismos naturais de mutação como erros durante a meiose, *crossing-over* desigual ou deslizamento da DNA-polimerase durante a replicação do DNA (Oliverira, 2006). Estes eventos podem resultar em variação do número de cópias da unidade básica de repetição (Schlotterer & Tautz, 1992), resultando em diferentes alelos.

Este tipo de marcador apresenta alto nível de polimorfismo, codominância, heterozigosidade, mostrando padrão de herança Mendeliana. Além disso, é possível ser analisado a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA para detecção dos alelos via reação de polimerase em cadeia. A análise dos produtos da PCR pode ser feita em gel de poliacrilamida corado com prata, sendo ainda a metodologia mais utilizada hoje em dia. Esta técnica é muito eficiente, contudo demanda tempo, além de possibilitar erros de leitura

por não permitir automatização do processo (Missiaggia & Grattapaglia, 2006). Assim, utiliza-se também a técnica de PCR-marcado por fluorescência, primeiramente descrita por Oetting et al. (1995). Esta técnica baseia-se na detecção dos produtos de PCR marcados com um determinado fluoróforo, em seqüenciador automático. Através da utilização de diferentes cores de fluorescência, marcando diferentes produtos de PCR, possibilita a utilização de *multiplex* (Schuelke, 2000). Desta forma, as genotipagens tornam-se mais rápidas e confiáveis.

A princípio acreditava-se que os SSRs eram marcadores neutros, contudo estudos recentes mostram que, na verdade, os SSRs ocorrem freqüentemente dentro ou próximos de genes em plantas (Morgante et al., 2002). Estudos comparativos entre regiões codantes e não-codantes em diferentes espécies de plantas mostram que repetições de tri e hexa-nucleotídeos são mais comuns em íntrons, sendo os demais tipos encontrados em éxons (Tóth et al., 2000). Metzgar et al. (2000) e Morgante et al. (2002) mostraram haver uma pressão seletiva atuando sob as regiões 3' e 5' não traduzidas (UTR – *Untranslated Regions*) dos genes, favorecendo uma maior freqüência de SSRs nessas regiões que em todo o resto do genoma. A região 5'UTR apresenta maior número de repetições do tipo CT e CTT, e a região 3'UTR mostra-se rica em AG e AAG. Há, ainda, fortes evidências que os microssatélites podem ser encontrados *upstream* das regiões promotoras e reguladoras de genes, exercendo importante papel na regulação da expressão de vários genes (O'Donnell et al., 1994).

Devido às vantagens de marcadores tipo microssatélite, vários grupos de pesquisa vem buscando cada vez mais desenvolver esse tipo de marcador para feijão (Yu et al., 1999; 2000; Gaitán-Solís et al., 2002; Métais et al., 2002; Blair et al., 2003; Guerra-Sanz, 2004; Grisi et al., 2007; Blair et al., 2008). Inclusive, grupos nacionais têm se destacado

nesta busca (Caixeta et al., 2005; Buso et al., 2006, Hanai et al., 2007; de Campos et al., 2007; Benchimol et al., 2007; Grisi et al., 2007; Cardoso et al., 2008; Hanai(a), 2008).

Com isso, sua aplicação no estudo genético do feijão vem crescendo. Os SSRs são utilizados em análises de efeitos de seleção natural (Rodrigues & Santos, 2006), conhecimento da variabilidade genotípica (Blair(a) et al., 2006; Buso et al., 2006), e mapeamento de locos de resistência a doenças (Corrêa et al., 2001; Silva et al., 2003; Alzate-Marin et al., 2005; Miklas(a) et al., 2006; Blair et al., 2007), visando o melhoramento por seleção assistida.

3. Construção de Mapas Genéticos

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

A construção de mapas genéticos baseia-se na análise de ligação entre marcas no genoma. O ponto central desta análise é a existência de desequilíbrio de ligação entre essas marcas. O desequilíbrio de ligação é decorrente do processo de recombinação homóloga que ocorre entre cromátides irmãs durante a meiose, em geral de forma randômica ao longo dos cromossomos (Liu, 1998; Carneiro & Vieira, 2002). Genes que se encontram próximos tendem a segregarem juntos, porém, devido à recombinação homóloga, alguns genes passam a ter segregação independente, ou seja, apresentam desequilíbrio de ligação.

O desequilíbrio de ligação é estimado pela fração de recombinação (r) entre as marcas, que é a razão entre as quantidades de gametas recombinantes e o total de gametas.

Assim, se “r” for superior ou igual a 0,5, quer dizer que há mais gametas recombinantes que não recombinantes, indicando que as marcas estão em equilíbrio. Desta forma, podemos inferir que as marcas analisadas não estão ligadas, ou seja, apresentam segregação independente. É desta relação entre “r” e ligação física que surgem os mapas genéticos (Liu, 1998).

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

3.1. População de Mapeamento

O tipo de população de mapeamento deve ser cuidadosamente estudado, uma vez que critérios como tempo para geração de progênie, tipo reprodutivo da espécie (alógama ou autógena), objetivo do estudo, disponibilidade de variabilidade genética, entre outros, devem ser considerados. Abaixo estão relacionados os principais tipos de populações usadas em mapeamento:

- Populações F_2 : Obtidas por autofecundação de plantas F_1 , derivadas do cruzamento entre dois indivíduos homozigotos contrastantes. Caracterizadas por apresentarem informações dos três genótipos possíveis (AA, Aa e aa), o que aumenta a precisão das estimativas. Possibilitam, ainda, a identificação de interações gênicas do tipo dominante e aditiva. Outra vantagem é sua rápida obtenção, uma vez que apenas dois ciclos reprodutivos são necessários para obtenção dos genótipos de estudo. Porém não permitem estudos futuros, uma vez que F_3 irá apresentar características bem diferentes de F_2 (Schuster & Cruz, 2004).

- Populações de Retrocruzamento (RC): São obtidas a partir do cruzamento de plantas F_1 com um dos genitores originais, chamado de recorrente. O genitor recorrente apresenta o genótipo que se deseja recuperar, sendo que o genitor doador possui uma característica que se tem interesse em introgridir no genótipo recorrente (Fehr & Jessen, 1939). Sua principal vantagem é que este é um método comumente usado no melhoramento convencional de plantas e assim a população obtida não precisa ser específica para o mapeamento. Este tipo de população também homogeneiza o genoma das linhagens ao longo dos retrocruzamentos, mantendo apenas a região do loco de interesse em estado heterozigótico. Isso permite o mapeamento de QTLs seja realizado com maior confiabilidade, já que as diferenças fenotípicas observadas são devido, exclusivamente, a variabilidade da região heterozigota. A principal desvantagem deste tipo de população de mapeamento é exibir informações apenas sobre os genótipos AA e Aa, o que impede a estimativa de parâmetros associados ao grau de dominância entre os genes ((Schuster & Cruz, 2004).
- Linhagens Endogâmicas Recombinantes (RILs): Derivadas de sucessivas autofecundações (F_2 , F_3 , F_4 ,..., até F_n) de uma planta F_1 , gerando uma população extremamente endogâmica. Toda a variabilidade presente em F_2 estará representada por cada linha endogâmica. Por possibilitar a produção de grande número de sementes geneticamente iguais, este tipo de população tem a vantagem de permitir estudos futuros. É possível avaliar interação genótipo x ambiente, e realizar repetições experimentais. Permite, ainda, o estudo de diferentes características em uma mesma população. Porém, assim como em RC, têm-se apenas dois genótipos disponíveis (supondo um par de genes), agora AA e aa, o que também impede identificar relações de dominância entre os genes (Schuster & Cruz, 2004).

- População de *pseudo-testcross*: Obtidas através do cruzamento controlado entre dois indivíduos altamente heterozigotos, produzindo uma população F_1 com diferentes genótipos. Este tipo de população de mapeamento é usado apenas para espécies alógamas que sofrem alta depressão por endogamia. A segregação dos alelos em F_1 não é conhecida, podendo ser de 1:1, 1:2:1, 1:1:1:1, entre outros, dependendo do genótipo dos genitores. Assim, há necessidade do uso de algoritmos específicos na produção do mapa genético, que resulta em dois mapas, um para cada parental, dificultando a interpretação dos resultados. Porém, permitem o mapeamento em casos que a geração dos outros tipos de populações é impossível (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

3.2. Análises de Mapeamento

O conhecimento de diversas áreas da genética como o da genética Mendeliana, citogenética, genética molecular, genética quantitativa e genética de populações, é necessário em estudos de mapeamento genético. Além disso, informações sobre procedimentos estatísticos também são extremamente necessárias, uma vez que o mapa genético é resultado da interação entre as estimativas estatísticas com os dados biológicos.

Assim, para a construção do mapa genético os dados de genotipagem da população de mapeamento são submetidos a testes estatísticos através de programas desenvolvidos para este fim. Há muitos programas disponíveis, sendo o MapMaker/EXP (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992) e o JoinMap (Stam, 1993) os mais usados atualmente.

Tais programas irão dizer quais são os marcadores ligados, formando grupos de ligação; qual a ordem correta entre as marcas; e a distância em cM (centiMorgans) entre elas. Para isso, devem-se seguir os seguintes passos: (1) verificar se o marcador apresenta segregação Mendeliana esperada para o tipo de população de mapeamento escolhido,

chamado de teste de segregação; (2) realizar o teste de ligação, verificando a frequência de recombinação entre cada par de marcas, o que possibilita identificar os desequilíbrios de ligação e conseqüente formar os grupos de ligação, (3) empreender a ordenação das marcas a partir das distâncias entre elas e (4) e fazer a conversão das distâncias em centiMorgans.

O teste de segregação é feito via Qui-Quadrado (χ^2), pela equação: $\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$, em que: χ^2 = Qui-quadrado; f_o = frequência observada em cada uma das classes; f_e = frequência esperada em cada uma das classes (proporção Mendeliana do modelo genético adotado). Este valor é comparado com uma tabela de probabilidade, revelando se a hipótese nula (H_0) deve ser aceita ou não. Neste caso, a hipótese dita nula é a segregação Mendeliana do loco. Uma forma de verificar a significância (α) estatística do χ^2 é convertê-lo em seu respectivo *p-valor*, que pode ser definido como a probabilidade de se observar uma amostra fora do padrão, assumindo que a hipótese nula é verdadeira. Quanto menor o valor do *p-valor* mais forte é a evidência de rejeição de H_0 (Liu, 1998).

Porém, o fato de se realizar o χ^2 repetidas vezes no teste de segregação, uma para cada marca, gera um problema intrínseco deste tipo de análise: erros ditos do tipo I (Benjamini & Hochberg, 1995), ou seja, falsos positivos (Liu, 1998). A probabilidade de se obter um falso positivo é a mesma que seu nível de significância quando a distribuição do teste estatístico é usada para se obter o *p-valor*. Assim, α pode ser definido como a probabilidade da hipótese nula (H_0) ser rejeitada enquanto ela é verdadeira, ou seja, α é a proporção de valores estatísticos que caíram dentro da região de rejeição quando a hipótese nula é verdadeira e os testes são repetidos infinitamente (Liu, 1998).

Desta forma usa-se uma correção que elimina os erros do tipo I baseado em valores de significância dos testes de segregação derivados de cada marca. A mais usada é a

correção de Bonferroni (Lynch & Walsh, 1998), que assume uma significância individual (α), a partir da razão da significância total pelo número de teste: $\alpha = \frac{\alpha^*}{n}$, em que α^* = nível de significância global e n = número de testes independentes, que correspondem ao número de marcadores utilizados.

Contudo, deve-se ressaltar que esta correção é considerada conservativa, ou seja, reduz demasiadamente o valor estatístico de α , já que considera os testes como independentes, o que não é verdade quando estamos tratando de sistemas biológicos (genes), uma vez que a proximidade entre os locos leva a uma interferência nos resultados.

Há outros tipos de correções que podem ser aplicados, dependendo do objetivo do estudo. O *False Discovery Rate* (FDR) é uma alternativa para controlar erros do tipo I. O FDR foi desenvolvido para se avaliar um número muito grande de teste, por isso vem sendo cada vez mais usado em experimentos com microarranjos. Baseia-se na idéia de que dados os resultados significativos, deve-se determinar quantos deles (proporção/1-FDR) são verdadeiramente significativos (Benjamini & Yekutieli, 2001).

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

Após verificados os locos com desvio de segregação, faz-se a análise de ligação destas marcas. A ligação genética é definida como a associação de genes ligados em um mesmo cromossomo (Liu, 1998), ou seja, que segregam juntos durante a meiose. Por isso, a forma de se verificar a ligação entre duas marcas é através de sua fração de recombinação na divisão celular. Assim, um grupo de ligação (GL) é formado por marcadores genéticos que possuam menos de 50% de recombinação ($r < 0,5$) com pelo menos um dos marcadores do grupo (Schuster & Cruz, 2004). Isso, por que na formação dos GL utiliza-se a propriedade transitiva, ou seja, se o loco A está ligado ao loco B, e este está ligado ao loco C, então A está ligado a C, e conseqüentemente A, B e C pertencem ao mesmo GL.

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

Uma forma de verificar a significância deste teste é através da razão de máxima verossimilhança (ML). O propósito de se obter o ponto de ML é estimar um parâmetro desconhecido (θ) baseado em uma amostra randômica do experimento (Liu, 1998). Na análise de ligação faz-se uma relação entre os valores genotípicos obtidos da população de mapeamento com o valor de “ r ”. Diversos índices são usados para comparar as ML geradas a partir dos dados teóricos ($r \geq 0,5$; H_0 = não-ligados) e a partir dos dados observados ($r < 0,5$; H_1 = ligados), detectando assim quais marcas pertencem ao mesmo GL.

Um índice usado é o LRT (*Linkelihood Ratio Test*). O logaritmo da razão entre as ML observada (H_1) e esperada (H_0) é obtido (Equação 1), sendo convertido em seu *p-valor* para estimação do parâmetro “ r ”. Porém, o índice mais usado baseado na ML é conhecido como LODscore (*Logarithm of Odds* - Lynch & Walsh, 1998). O LODscore (Equação 2)

também é uma razão entre as funções de ML entre o valor esperado e os valores obtidos de “r”, contudo é multiplicado pelo logaritmo na base 10.

Equação 1:

$$LRT = 2 \log \frac{L(\hat{\theta})}{L(\theta)}$$

Equação 2:

$$LOD = \log_{10} \frac{L(\hat{\theta})}{L(\theta)}$$

Estes dois testes são correlacionados e o valor de LRT pode ser facilmente convertido em LODscore e vice-versa (Equação 3).

Equação 3:

$$LOD = 0,2172 LRT$$

Uma vez formados os grupos de ligação, devem-se ordenar as marcas, formando um arranjo linear. Estatisticamente, há apenas uma ordem para dois locos, sendo que três é o número mínimo a se ordenar. Biologicamente, o número de GLs devem corresponder ao número de cromossomos da espécie.

A melhor forma de se estabelecer a ordem dos locos é através do método de “Busca Exaustiva”, que como o nome sugere, verifica todas as ordens possíveis e dá como melhor aquela de menor comprimento. Assim, neste método se obtém uma matriz de fração de recombinação de Dois-Pontos similar a matriz de distância (Liu, 1998). Porém, este método apresenta uma limitação computacional, pois há um grande número de possíveis ordens quando um GL possui um grande número de locos ($N!/2$, sendo N igual ao número de marcas). Assim, os métodos computacionais e/ou algorítmicos para ordenação precisa das marcas são limitados a um pequeno número de locos por GL. Por exemplo, a ordenação de

15 marcas, por este método, levaria em um computador de alta tecnologia, aproximadamente 732 anos.

Sendo esta uma importante etapa na construção de um mapa genético, diversos métodos foram desenvolvidos buscando superar essa limitação. Alguns exemplos são o SARF (*Sum of Adjacent Recombination Fractions* – Wilson & Rao 1988), SALOD (*Sum of Adjacent Lod Scores* – Weeks & Lange, 1987), máxima verossimilhança (Lander et al., 1987), RCD (*Rapid Chain Deliniation*), entre muitos outros, sendo cada um usado de forma a melhor resolver cada tipo de conjunto de dados.

O teste de “Três-Pontos” é uma alternativa muito usada para GL grandes. Ele baseia-se na mesma idéia central do teste de Busca Exaustiva, porém ao invés de realizar os cálculos com todos os locos, dois a dois, a ordem é formada em pequenos grupos de três em três. Ou seja, o teste é feito a cada 3 marcas em seqüência, com sobreposição, montando-se assim a ordem final. Contudo, este método não é tão preciso, pois não checa todos os locos simultaneamente.

Por fim, após definir-se os GLs e a ordem em cada grupo deve-se verificar a distância entre cada loco ordenado. A distância é determinada pela fração de recombinação entre as marcas. O método mais indicado para se obter “r” neste estágio da construção do mapa é a análise Multiponto (Carneiro & Vieira, 2002), na qual as distâncias são calculadas considerando-se as frações de recombinação entre cada par de marcas simultaneamente. Assim, a estimativa da distância entre os locos A e B e entre os locos B e C são incluídos na estimativa da distância entre os locos A e C, considerando que a ordem entre os locos é ABC (Liu, 1998). Para isso a análise Multiponto utiliza-se do Processo Markoviano (Rabiner, 1989) e de algoritmos de ML.

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

Após Morgan, surgiu um grande número de funções de mapeamento, entre as quais, as mais utilizadas hoje em dia para o mapeamento genético de plantas são as funções de Haldane (1919) e Kosambi (1944). Estas funções foram desenvolvidas baseadas na realidade biológica do problema: as distâncias dadas em frequência de recombinação não são aditivas, uma vez que os genes apresentam maior probabilidade se segregarem juntos quanto mais próximos. A essa ausência de independência nas recombinações entre os locos adjacentes é dado o nome de interferência (I) (Schuster & Cruz, 2004). Na verdade, a fração recombinação entre dois locos A e B deve ser tida pela fórmula: $r_{AB} = r_A + r_B - 2Cr_Ar_B$, onde r_A é a recombinação do marcador A e r_B do marcador B, sendo C o valor de coincidência ($C = 1 - I$).

Haldane pressupõe total ausência de interferência. Assim, segundo Haldane, a distância entre os locos i e j deve ser dada por:

$$m_{ij} = -\frac{1}{2} \log(1 - 2r_{ij})$$

Kosambi admite diferentes graus de interferência dependendo da proximidade entre os locos. Desta forma, torna-se muito mais apropriado o uso desta função de mapeamento quando se trabalha com marcas distribuídas ao longo do genoma, como é o caso de marcadores moleculares:

- Se r_1 e r_2 são pequenas, $r_{12} = r_1 + r_2$ ($C = 0$)
- Se r_1 e r_2 são medianas, $r_{12} = r_1 + r_2 + r_1r_2$ ($C = 1/2$)

- Se r_1 e r_2 são grandes, $r_{12} = r_1 + r_2 - 2r_1r_2$ ($C = 1$)

$$m_{ij} = \frac{1}{4} \log \frac{1+2r_{ij}}{1-2r_{ij}}$$

Todos esses passos mostram a complexidade de se obter um mapa genético para uma determinada espécie, porém mostram também o quão flexíveis são os métodos utilizados. Por isso, torna-se extremamente necessário conhecer as mais diversas estratégias, a fim de escolher aquela que melhor se adapta aos seus dados e principalmente, aos objetivos de seu grupo de trabalho.

4. Detecção de QTLs

Através de mapas de ligação e da análise fenotípica de determinados caracteres é possível identificar regiões genômicas que estão envolvidas com características complexas, denominadas QTLs. Para isso os dados obtidos tanto do mapa genético quanto das análises fenotípicas, devem ser submetidos a testes estatísticos que irão fornecer as posições, a magnitude dos efeitos de cada região e discernir as interações gênicas entre elas. Dentre os programas mais utilizados para este fim estão QTLCartographer vs.2.5 – WinQTLCart (Wang et al., 2005) e QGENE 3.05 (Nelson, 1997).

As análises de detecção de QTLs vem avançando no sentido de aumentar a precisão dos testes estatísticos e com isso aumentar a confiabilidade nos resultados encontrados. Inicialmente, os QTLs eram identificados por uma relação direta entre o genótipo de marcadores dos indivíduos da população de mapeamento, com suas características fenotípicas. Este método é denominado Análise por Marcas Individuais (SMA), podendo ser baseado no método de máxima verossimilhança, ou ainda em análises de regressão linear. Neste caso, atribuem-se *scores* para o genótipo do marcador e se faz análise de

regressão simples (Equação 4) destes *scores* (variável independente) em relação ao valor fenotípico da característica (variável dependente). O efeito significativo da regressão linear poderá identificar a existência de associação entre o marcador e a característica (Schuster & Cruz, 2004).

Equação 4: $y_j = \mu + \beta x_j + \varepsilon_j$

$j = 1, 2, \dots, n$

y_j = valor fenotípico do indivíduo j

μ = intercepto

$x_j = \begin{cases} 1 & \text{se o indivíduo } j \text{ tem genótipo } M_i/M_i \\ 0 & \text{se o indivíduo } j \text{ tem genótipo } M_i/m_i \end{cases}$

β = coeficiente de regressão linear (efeitos genéticos)

ε_j = resíduo $\sim N(0, \sigma^2)$

Na SMA é possível estimar efeitos aditivos e de dominância, contudo é importante considerar que as variáveis “x” guardam certa redundância entre si. Por essa razão, são usados os métodos de seleção de variáveis *backward*, *forward* e *stepwise*, para que um modelo seja buscado até que se obtenha aquele em que sejam incluídas todas as variáveis x_j que sejam significativas pelo teste de t (Bearzoti, 2000). Além disso, a análise de marcas individuais apresenta caráter conservativo, ou seja, não se sabe ao certo o número de QTLs que influenciam o caráter, além do método não revelar a posição do QTL tendo seu efeito subestimado (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

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

O mapeamento por intervalo (MI) permite percorrer o genoma sistematicamente em busca de QTLs, usando a informação das marcas flanqueadoras ao intervalo, como fração de recombinação e posição genômica, para estimar a presença e magnitude de QTLs. Assim, também é possível fazer inferências sobre a posição dos QTLs identificados. A significância dessa análise pode ser verificada pela análise de regressão (Equação 5) ou pela função de máxima verossimilhança, sendo, neste segundo caso, avaliada pela sua razão, na forma de LODscore (Schuster & Cruz, 2004).

Equação 5:
$$y_j = \mu + \beta^* x_j^* + \varepsilon_j$$

$j = 1, 2, \dots, n$

y_j = valor fenotípico do indivíduo j

μ = intercepto

$$x_j^* = \begin{cases} 1 & \text{se o genótipo do QTL é QQ} \\ 0 & \text{se o genótipo do QTL é Qq} \end{cases}$$

β^* = efeito do possível QTL

ε_j = resíduo $\sim N(0, \sigma^2)$

Uma desvantagem deste método é que outros QTLs, fora do intervalo em questão, não são considerados, o que tem duas conseqüências. A primeira é que toda a variação genética, devido a estes outros QTLs, é residual, o que diminui a precisão das estimações e o poder do teste. A segunda é que, se dois QTLs estiverem ligados no intervalo considerado, isto pode levar a identificação de QTLs que não existem, conhecidos como QTLs fantasmas. Para evitar esses efeitos Jansen (1993) e Zeng (1993) propuseram, de forma independente, um método em que QTLs fora do intervalo em questão são considerados através do método de regressão múltipla (Bearzoti, 2000).

Em seguida, Zeng (1994) propôs o Mapeamento por Intervalo Composto (CIM). Nessa abordagem, os efeitos entre QTLs de outras regiões não influenciam na análise entre duas marcas. Isso ocorre pelo uso do método de regressão múltipla (Equação 6), o que reduz a variância residual entre os locos e aumenta, assim, o poder de detecção de cada QTL e a precisão na estimação de seus efeitos (Zeng, 1994; Jansen & Stam, 1994). Para minimizar os efeitos dos demais QTLs fora do intervalo em análise, estes são incluídos nela como cofatores, que são determinados previamente através do procedimento *stepwise* (Zeng, 1994).

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

Equação 6:
$$y_j = \mu + \beta^* x_j^* + \sum_k \beta_k x_{jk} + \varepsilon_j$$

$j = 1, 2, \dots, n$

y_j = valor fenotípico do indivíduo j

μ = intercepto

$$x_j^* \begin{cases} 1 & \text{se o genótipo do QTL é QQ} \\ 0 & \text{se o genótipo do QTL é Qq} \end{cases}$$

β^* = efeito do possível QTL

x_{jk} = cofatores

ε_j = resíduo $\sim N(0, \sigma^2)$

Os efeitos genéticos dos QTLs têm alguns problemas em sua estimação. Eles podem apresentar viés dependendo do delineamento genético e experimental e dos modelos usados

para estimá-los. Os vieses são causados por deficiências de gametas recombinantes, interação genótipo-ambiente e sub-estimativa da epistasia, causados principalmente pelo tamanho pequeno das populações mapeadas. As soluções para esse impasse seriam aumentar o número de famílias que passariam para no mínimo 300, aumentar a densidade do mapa e analisar apenas fenótipos extremos (Lee, 1995).

Pensando nisso, Jiang & Zeng (1995) estenderam o conceito do CIM para mapear QTLs múltiplos detectados em diferentes ambientes, visando estudar a interação de pleiotropia entre os QTLs e genótipo-ambientes. Com isso, surgiu o método denominado Mapeamento por Múltiplos Intervalos (MIM), proposto por Kao et al. (1999), que incorpora a epistasia ao modelo e considera múltiplos intervalos simultaneamente.

O método baseia-se na seleção e comparação de modelos, através de quatro componentes: avaliação, procura, estimação e predição. Para isso é gerado um pré-modelo para cada análise através de regressão múltipla e seleção de cofatores, assim como na análise CIM. Contudo, agora o número de QTLs e as possíveis interações entre eles são considerados parâmetros da análise (Equação 7), o que permite eliminar os resultados não significativos. Assim, o modelo selecionado segue para efetiva análise dos QTLs com estes “novos” parâmetros, definidos de forma real pela análises dos dados. Este procedimento é repetido diversas vezes, até que não hajam QTLs pouco significativos para serem eliminados das análises. Desta forma, este método torna-se mais vantajoso por proporciona maior eficiência e precisão nas busca por QTLs e suas interações.

Equação 7:

$$y_j = \mu + \sum_{r=1}^m \beta_r x_{jr}^* + \sum_{r \neq s \in (1, \dots, m)}^t \beta_{rs} (x_{jr}^* x_{js}^*) + \varepsilon_j$$

$j = 1, 2, \dots, n$

y_j = valor fenotípico do indivíduo j

μ = intercepto

β_r = efeito marginal do possível QTL r

x_{jr}^* = variável indicadora do genótipo do possível QTL r

β_{rs} = efeito epistático entre os QTLs r e s

ϵ_j = resíduo $\sim N(0, \sigma^2)$

Atualmente, devido as suas vantagens, o método de MIM vem sendo mais indicado para busca de novos QTLs, principalmente por sua precisão estatística, que leva à resultados mais eficientes, inclusive no uso desses QTLs em estudos de seleção assistida. Contudo, o método mais utilizado em diversos trabalhos ainda é o CIM, que também vem servindo de maneira adequada aos interesses dos pesquisadores (Maxwell et al., 2007; Sabadin et al., 2008).

5. Mapeamento com Marcadores Moleculares em Feijão

O feijoeiro é uma leguminosa diplóide ($2n=22$) e apresenta um genoma pequeno, estimado em 637 Mb (Arumuganatham & Earle, 1991), representando aproximadamente 1.200 cM (Vallejos et al., 1992). Outros estudos mostram que 60% do genoma do feijão é composto por seqüências de cópia simples (Talbot et al., 1984). Essas características facilitam a detecção de marcadores moleculares distribuídos uniformemente por todos os cromossomos, o que aumenta a detecção dos locos associados às características quantitativas, pois é possível obter-se mapas genéticos altamente saturados.

Mapas de ligação têm sido desenvolvidos para feijão comum. O primeiro foi obtido por Lamprecht, em 1961, utilizando poucos marcadores morfológicos. Nas duas décadas seguintes, alguns novos marcadores morfológico e bioquímicos foram acrescentados a este mapa inicial. Posteriormente, Bassett (1991) publicou mapa usando marcadores morfológicos e isoenzimáticos pela revisão dos trabalhos anteriores. Apenas em 1992,

Vallejos et al. construíram mapa de ligação usando marcadores moleculares, principalmente RFLP. Este autores também desenvolveram a primeira população de mapeamento originada de genitores de *pools* gênicos divergentes. Além dos marcadores RFLPs, também foram usados marcadores morfológicos, isoenzimas e dois marcadores RAPDs (OPA-01 e OPA-10). Esse mapa cobriu 960 cM. No ano seguinte, um novo mapa foi construído por Nodari et al. (1993). Nesse trabalho, foram empregados diferentes tipos de marcadores, como RAPDs e RFLPs em uma população F₂, originada do cruzamento de duas linhagens, também, de centros de origens diferentes, sendo uma delas a Jalo EEP 558. Quinze grupos de ligação foram obtidos com 143 marcadores, com intervalo médio entre as marcas de 6,5 cM, em uma distância total de mapa de 827 cM.

Nos anos seguintes, com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares, estudos foram realizados no sentido de produzir novos mapas para feijão que incorporassem estas novas tecnologias. Tais trabalhos se valeram principalmente de marcadores RAPDs e AFLPs (Adam-Blondom, 1994; Jung et al., 1996; Bai et al., 1997; Ariyaratne et al., 1999).

Em 1998, Freyre et al. construíram o que veio a ser chamado do mapa consenso de ligação (*Core Map*) para feijão. Aproximadamente 550 marcadores moleculares compunham este mapa, dentre eles RFLPs e RAPDs, isoenzimas e marcadores morfológicos. O mapeamento foi realizado a partir de uma população de 75 RILs originadas do cruzamento entre ‘BAT93’ x ‘Jalo EEP558’, sendo a primeira linhagem de origem Andina e a segunda de origem Mesoamericana. Porém, algumas regiões não apresentaram saturação, havendo algumas discrepâncias com mapas anteriores. Assim, tem-se buscado a integração dos novos marcadores moleculares a este mapa consenso (Yu et al.,

2000; Blair et al., 2003; Mutlu et al., 2006; Blair(a) et al., 2006, Miklas(b) et al., 2006; Grisi et al., 2007).

O primeiro trabalho de saturação foi publicado por Yu et al. (2000), que ligaram 15 novos marcadores do tipo SSR, derivados de banco de dados gênicos (GeneBank), nos grupos de ligação B2, B3, B4, B5, B6, B9 e B11, demonstrando a ampla distribuição deste tipo de marcador no genoma do feijoeiro.

Outro trabalho de destaque que acrescentou marcadores SSRs ao mapa conseso foi realizado por Blair et al.(2003). Vinte e dois novos SSRs foram ligados neste mapa. Além disto, os autores também desenvolveram uma nova população de mapeamento, a partir do cruzamento entre as variedades contrastantes ‘DOR364’ x ‘G19833’ (DG), composta de 87 RILs. O mapa DG apresentou 246 marcas ligadas, sendo 78 SSRs, 102 RAPDs, 18 AFLPs e 48 RFLPs, distribuídas em 11 grupos de ligação, totalizando 1.720 cM.

Mais recentemente Grisi et al. (2007), adicionaram 199 novos marcadores SSRs ao *Core Map* de feijão, destribuídos em 13 grupos de ligação, cobrindo 1.358 cM, com distância mínima de 7,23 cM entre duas marcas. Além disso, este trabalho também gerou o primeiro mapa de feijão exclusivamente de microsatélites, com 106 marcas distribuídas em 606,8 cM, totalizando 12 grupos de ligação.

Outros tipos de marcadores também foram inseridos no mapa consenso, como no trabalho de Miklas et al. (2006b) em que 85 marcadores TRAPs foram ligados ao mapa BJ. Além disto, este trabalho também utilizou outra população de mapeamento com 79 RILs, derivada do cruzamento entre as variedades ‘Dorado’ e ‘XAN 176’ (DX), na qual mais 21 marcadores TRAPs foram ligados. Outro exemplo, são os 32 marcadores RGAPs obtidos através de seqüências consenso NBS-LRR, que foram inseridos nos grupos de ligação B10 e B11 do mapa consenso (Mutlu et al., 2006).

Contudo, como citado anteriormente, não apenas a população BJ é utilizada no mapeamento do feijão, uma vez que apresenta algumas limitações. A principal delas está no pequeno número de RILs geradas, o que torna a produção de um mapa altamente saturado impossível, uma vez que 1% de fração de recombinação, ou seja 1 cM, implica em 1 recombinante para cada 100 indivíduos. Além disso, os genitores não apresentam divergência para várias características de interesse da cultura, como resistência a estresses hídrico, salino, ou ainda para resistência a certas doenças como mofo branco, mancha angular, entre outras. Por isso é necessária à busca de novas fontes de diversidade, objetivando identificar variedades de feijão com genes que confirmem características de interesse, como as resistências a estresses bióticos e abióticos citadas, para obtenção de novas populações de mapeamento contrastantes para tais características.

6. Mapeamento de Locos Associados à Resistência a doenças em Feijão

O principal objetivo da produção de mapas genéticos é o mapeamento de locos no genoma que estejam associados com características de interesse. Para que este objetivo possa ser alcançado, os genitores da população utilizada na obtenção do mapa de ligação devem ser contrastantes para as características em estudo. Assim, muitos mapas de feijão foram produzidos, objetivando a identificação de diversos locos associados a essas características. Um resumo de algumas populações de mapeamento desenvolvidas para o estudo do feijoeiro pode ser visualizada na Tabela 2 adaptada de Kelly et al. (2003).

Como, na cultura do feijoeiro a principal problemática está nas muitas doenças que assolam a espécie, a maioria desses estudos envolvem a identificação de marcadores ligados a locos de resistência às doenças (Kelly et al., 2003; Miklas(a) et al., 2006). Genes que apresentam marcadores moleculares ligados são chamados de “genes marcados” ou

“*tagged genes*”. Mais de 30 genes marcados, e número similar de QTLs, relacionados com resistência a doenças já foram identificados em feijão (Gepts et al., 2008). O principal objetivo da identificação desses genes é o uso dos marcadores ligados à eles em estudos de seleção assistida por marcadores moleculares.

SAM, em feijão, foi primeiramente revisada por Kelly & Miklas (1998), que descrevem a importância de marcadores RAPDs neste tipo de trabalho. Inclusive, o primeiro gene marcado (*Ur-4*) foi identificado utilizando este tipo de marcador, sendo uma importante fonte de resistência à ferrugem do feijoeiro (Miklas et al., 1993). Desde então, muitos genes de resistência (genes R) vem sendo marcados, como por exemplo, genes de resistência à ferrugem (*Ur*), antracnose (*Co*), mancha angular (*Phg*), ao vírus do mosaico comum (*bc*), à *beet curly top virus* (*Bct*), ao vírus do mosaico amarelo (*bgm*), ao cretamento bacteriano comum (*Pse*), entre outros. É possível ver um resumo da obtenção desses genes nos artigos de Kelly et al. (2003), Caixeta et al. (2005) e Miklas et al. (2006a). Lista contendo não só os genes de resistência, mas também, aqueles ligados ao metabolismo e estrutura celular de feijão, pode ser encontrada no site da BIC (*Bean Improvement Cooperative*).

Tabela 2 – Populações utilizadas no mapeamento de QTLs em feijão. Estão listados diferentes trabalhos entre 1992 – 2003, que exemplificam os mais variados estudos de mapeamento de locos de interesse em feijão. Os genitores das populações e as características contrastantes utilizadas em cada trabalho estão explicitados.

População (geração) ¹	Caracteres segregantes	Fonte
XR235-1-1 x DIACOL Calima (RC)	Reação a <i>Xanthomonas axonopodis</i>	Vallejos et al. (1992)
BAT93 x Jalo EEP558 (F ₂)	Reação ao <i>bean common mosaic virus</i> (BCMV), <i>X. axonopodis</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Uromyces appendiculatus</i> , <i>Rhizobium</i> spp, cor do tegumento	Gepts et al. (1993), Nodari et al. (1993) e Freyre et al. (1998)
BAT93 x Jalo EEP558 (RI)		
Corel x EO2 (RC)	Reação ao <i>C. lindemuthianum</i> ,	Adam-Blondon et al. (1994)
Midas x G12873 (RI)	Síndromes de domesticação, hábito de crescimento, número de nós e vagens, peso de sementes e dormência	Koinange et al. (1996)
BAC6 x HT7719 (RI)	Reação ao crestamento bacteriano comum (CBB) e ferrugem	Jung et al. (1996)
Dorado x XAN176 (RI)	Reação ao BCMV, CBB, ferrugem	Miklas et al. (1996) e Miklas et al. (2000)
PC-50 x XAN159 (RI)	Reação ao CBB, cor do tegumento, peso sementes, ferrugem e mofo branco	Jung et al. (1997) e Park et al. (2000) e Park et al. (2001)
A55 x G122 (RI)	Performance nos cruzamentos andinos x mesoamericanos	Johnson et al. (1997) e Miklas et al. (2001a)
Belneb-RR-1 x A55 (RI)	Reação ao CBB, BCMV	Ariyaratne et al. (1999)
Carioca x Flor de Mayo (RI)	Peso de sementes, produtividade de grãos, reação ao oídio e à mancha angular e ciclo	Melo (2000)
BAT93 X Jalo EEP 558 (RI)	-	Yu et al. (2000)
Ouro Negro x US Pinto (F ₂)	Reação à ferrugem	Faleiro et al. (2000)
Benton x NY6020-4 (RI)	Reação ao mofo branco	Miklas et al (2001b)
Montcalm x FR266 (RI)	Reação à podridão radicular por <i>Fusarium</i>	Schneider et al. (2001)
OAC Seaforth x OAC-95-4	Reação ao CBB	Tar'an et al. (2002)
BAT93 x Jalo EEP 558 (RI)	Cor do grão	Mc Clean et al. (2002)
Montcalm x California DRK82 (RI)	Qualidade para enlatamento	Posa-Macalincag et al. (2002)
OAC Seaforth x OAC 95-4	Hábito de crescimento, dias para florescimento e para maturação, produtividade e peso de 100 sementes	Tar'an et al. (2002)
DOR364 x G19864 (RI)	-	Blair et al. (2003)
Belneb RR-1 x A55 (RI)	Reação a Mancha bacteriana marron (BBS)	Jung et al. (2003)
Ouro Negro x Rudá (RI)	Reação à ferrugem, mancha angular e antracnose	Faleiro et al. (2003a)
Ouro Negro x Rudá (RI)	Caracteres relacionados ao ciclo da planta e à produtividade	Faleiro et al. (2003b)
Bunsi x Newport (RI)	Reação ao Mofo branco	Kolkman & Kelly (2003)

1 – RI linhagens recombinantes, RC retrocruzamentos.

Fonte: Adaptada de Kelly et al., 2003; Teixeira, 2004.

Em adição aos genes R, muitos QTLs com efeito maior vem sendo mapeados para vírus do mosaico amarelo, murcha-de-fusarium, crestamento bacteriano comum, mofo branco, entre outros (Gepts et al., 2008). Nesta busca, as técnicas de TRAP e RAG têm

apresentado grande importância, uma vez que possibilitam a identificação direta de locos de resistência (Milkas et al., 2006). Inclusive, Kelly et al. (2003), em sua revisão, ressaltam a existência de *clusters* de genes R em feijão, uma vez que locos associados a diferentes doenças foram mapeadas em regiões próximas, como os *clusters* presentes nos grupos de ligação B1, B4, B7 e B11, onde foram identificados QTLs maiores para ferrugem, antracnose, mofo branco e crestamento bacteriano comum.

Todas essas informações juntas possibilitam o uso dos QTLs e/ou genes R marcados na SAM, principalmente para piramidação de genes de resistência. A SAM passa a ser mais eficiente quando a expressão desses QTLs se dá em múltiplos ambientes e em diferentes populações, o que indica um grande efeito do QTL sobre o fenótipo observado (Gepts et al., 2008). Assim, quanto mais se sabe sobre a interação genótipo-ambiente de cada loco/gene envolvido na resistência à doenças, e quais as interações gênicas entre eles, melhor será seu uso prático no melhoramento do feijoeiro.

6.1. Resistência à Mancha Angular

A 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, uso de sementes contaminadas e a base genética restrita de cultivares em contraste alta variabilidade do patógeno, são importantes fatores que agravam a incidência desta doença (Paula-Junior et al., 2004).

A principal problemática da doença está nas lesões necróticas que surgem nas folhas, caule, pecíolos e vagens do feijoeiro (Nietsche, 2000), levando a diminuição de produtividade, além da perda com 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 às nervuras foliares em formato angular (Figura 1). 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 (Corrêa et al., 2001; Amaro, 2006).

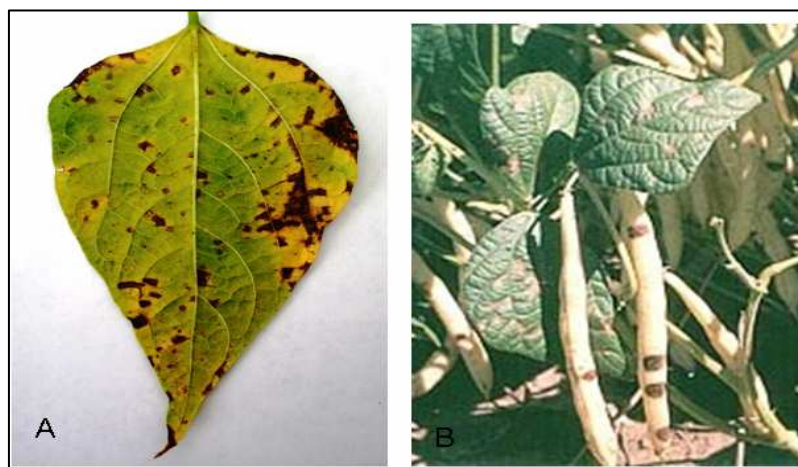


Figura 1 – Sintomas de infecção por mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em feijoeiro. A – folhas contaminadas: lesões necróticas, marrom ou cinza, em formato angular. B – vagens doentes: lesões epiteliais circulares vermelho-amarronsadas. Fonte: Romero, 2006.

A doença é causada pelo fungo *P. griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, previamente conhecido como *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (Crous et al., 2006). *P. griseola* é um fungo mitospórico da ordem Moniliales, família Stilbaceae (Stenglein et al., 2003). A infecção do feijoeiro se inicia com a germinação dos esporos, de 3 a 7 dias após a inoculação, dando origem aos tubos de germinação, que formam apressórios e penetram tanto através da epiderme como pelos estômatos foliares. No interior da folha, as hifas crescem na região intracelular, causando a plasmólise das células do hospedeiro. Em uma fase mais avançada de seu desenvolvimento, o fungo produz estromas que emergem na superfície foliar, dando origem os conidiósporos que liberam os conídios maduros, dando

continuidade ao ciclo (Monda et al., 2001). É classificado com hemi-biotrófico, tendo ação biotrófica nas fases iniciais do processo de infecção, convivendo com as células vivas das folhas do feijoeiro. Depois, passa a necrotrófico, levando a morte celular do hospedeiro, que resulta nas manchas necróticas angulares, típicas da infecção por *P. griseola* (Allorent & Savary, 2005).

Uma grande diversidade genética foi descrita para este fungo. Através de marcadores RAPD e 51 isolados do patógeno, Busogoro et al. (1999) identificaram divergência genética entre isolados fortemente virulentos e avirulentos. Pastor-Corrales et al. (1998) caracterizaram 433 isolados com marcadores RAPDs e/ou isoenzimas, o que possibilitou diferenciá-los em dois subgrupos genéticos principais: Andino e Mesoamericano. Mais recentemente, outros estudos confirmam a ocorrência desses dois grupos, tanto com marcadores RAPDs (Nietsche et al, 2002, Satorato & Alzate-Marin, 2004), como através de marcadores RFLPs (Wagara et al, 2004). Baseado nisso, foi proposto por Guzmán et al. (1999) o uso de *primers* específicos derivados do marcador RAPD OA11 como *fingerprint*, para diferenciar isolados de *P. griseola* do subgrupo Mesoamericano dos isolados do subgrupo Andino, uma vez que os fragmentos de aproximadamente 400 pb são encontrados apenas no *pool* Andino, em quanto os fragmentos de 700 pb são encontrados apenas no *pool* Mesoamericano.

Estes resultados são importantes à medida que corroboram com a hipótese de co-evolução entre patógeno-hospedeiro. Inclusive, Wagara et al. (2004) relaciona os subgrupos genéticos com a capacidade patogênica de cada isolado, ressaltando a maior variabilidade genética dentro dos isolados Mesoamericanos, uma vez que estes são capazes de infectar tanto cultivares de feijão Mesoamericanos, como Andinos; enquanto isolados do grupo Andino são capazes de infectar apenas feijoeiros de origem Andina. Esta é uma importante

informação a ser aplicada no melhoramento do feijoeiro, uma vez que genes de resistência do *pool* Mesoamericano são muito eficientes quando transferidos para feijoeiros do *pool* Andino, quando estes são cultivados em regiões que predominam isolados de *P.griseola* Andinos (Pastor-Corrales & Jará, 1995; Miklas(a) et al., 2006).

Desta forma, a busca por fontes de resistência à mancha angular, tanto Andinas como Mesoamericanas, é muito importante. Diversas fontes de resistência já foram identificadas (Schwartz et al., 1982; Ragagnin et al., 2003; Mahuku et al., 2003; Corrêa et al., 2004; Sartorato, 2006; Reis-Prado, 2006; Amaro, 2006; Melo et al., 2008). Dentre as linhagens de feijoeiro resistente a *P. griseola* de maior importância no melhoramento da cultura estão: ‘México 54’, ‘AND 277’, ‘Cornell 49-242’, ‘MAR 2’, ‘G 5685’, ‘BAT 332’ e ‘CAL 143’ (Nietsche et al., 2000; Sartorato, 2002; Caixeta, 2002; Oliveira et al., 2004; Aggarwal et al., 2004). Sendo o ‘CAL 143’ a primeira linhagem a ter sua resistência caracterizada em condições de campo, em diversos ambientes e contra um grande número de isolados do patógeno (Aggarwal et al., 2004), apresentando também resistência em condições controladas de casa de vegetação (Oliveira et al., 2004). Além disso, outros estudos mostram a importância dessa linhagem no melhoramento do feijoeiro uma vez que também é resistente a ferrugem, oídio, mancha-de-alternária (Vieira et al., 2002), cretamento bacteriano comum, antracnose, além de ser tolerante a estresses abióticos como fósforo, nitrogênio e p.H. (Kimani et al., 2007).

Na identificação de cultivares resistentes é muito importante determinar as raças fisiológicas do fitopatógeno (Corrêa, 1987; Sartorato, 1991; Pastor-Corrales & Jará, 1995; Sartorato, 2002; Orozco & Araya, 2004; Freire et al., 2006; Silva et al., 2008). As raças de *P. griseola* são comumente definidas por um grupo de 12 variedades hospedeiras naturais do patógeno (Figura 2), sendo 6 de origem Andina e 6 de origem Mesoamericana. O nome

de cada raça é determinado por um sistema binário de notas, de acordo com os fenótipos de susceptibilidade das variedades (Gepts, 1988).

Quadro 10 - Cultivares de feijão utilizados como diferenciadores para caracterizar raças de *Phaeoisariopsis griseola*

Cultivar diferenciador	Tamanho da semente ¹	Acervo genético	Valor binário quando suscetível ²
A. Don Timóteo	G	Andino	1
B. G11796	G	Andino	2
C. Bolón Bayo	G	Andino	4
D. Montcalm	G	Andino	8
E. Amendoim	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 os cultivares diferenciadores F (grupo andino, valor binário 32), G (grupo mesoamericano, 1) e K (grupo mesoamericano, 16), a raça denomina-se 32.17. Obtém-se o fenótipo de virulência da raça, somando-se os valores binários, primeiro os referentes aos acervos andinos e, posteriormente, aos mesoamericanos com reação de compatibilidade.
Fonte: Pastor-Corrales e Jara (1995) e Pastor-Corrales (informação pessoal).

Figura 2 – Lista dos 12 cultivares diferenciadores para identificação das raças fisiológicas de *Pseudocercospora griseola*, com seus respectivos valores, em sistema de notas binário. Fonte: Borém, 1998.

Além da busca por fontes de resistência, muitos grupos têm voltado seus esforços para o maior entendimento dos genes envolvidos nesta característica, assim como as possíveis interações entre eles. Carvalho et al. (1998) foram os primeiro a identificar um gene de resistência à mancha angular através de marcadores RADP. Neste trabalho a fonte de resistência ‘AND 277’ mostrou ter o marcador OPH13 ligado a 5,5 cM do gene de resistência, que recebeu o nome de *Phg-1*. Posteriormente, muitos estudos foram realizados ligando locos de resistência à *P. griseola* à marcadores RAPD (Ferreira et al., 2000; Sartorato et al., 2000; Neitsche et al., 2000; Corrêa et al., 2001; Caixeta et al., 2003; Faleiro

et al., 2003 – Tabela 3). 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.

Tabela 3 – Marcadores RAPDs ligados à locos de resistência à mancha angular. Os locos são derivados de diferentes linhagens de feijoeiro, resistentes à *Pseudocercospora griseola*. Os estudos revelam padrão de herança monogênico de resistência à mancha angular.

Genótipos	Marcador molecular RAPD	Distância do gene de resistência (cM)	Fonte
AND 277	OPH13	5,5	Carvalho et al, 1998
MAR-2	OPE04	5,8	Ferreira et al., 2000
México 54	OPN02	5,9	Sartorato et al., 2000
	OPAC14	6,6	
	OPE04	11,8	
Cornell 49-242	OPN02	3,2	Nietsche et al., 2000
	OPE04	12,5	
Ouro Negro	OAA19	10,0	Corrêa et al., 2001
	OM2	5,6	Faleiro et al., 2003
	OBA16	10,4	
	OAD9	13,9	
BAT 332	OPAO12	5,8	Caixeta et al., 2003

Nestes trabalhos, o padrão de herança de resistência à doença foi apresentado como monogênico, dominante ou recessivo. Porém, é importante ressaltar que tais conclusões foram tiradas com fenotipagens realizadas em condições de casa de vegetação, sendo apenas uma ou poucas raças utilizadas, além das análises serem feitas em padrão de R (resistente), com notas entre 1 e 3 e S (susceptível), com notas entre 4 e 9. Este sistema de notas, sugerido pelo CIAT (1995), é utilizado na avaliação dos sintomas da doença e apresenta uma escala de graduações entre 1-9, onde 1 indica ausência de sintomas,

passando pelos diferentes níveis de necrose foliar e chegando a nota 9 que indica mais de 80% da folha com lesões sintomáticas.

Buscando verificar se os monogenes identificados nos estudos anteriores eram os mesmos, ou se compunham diferentes formas de resistência a doença, Caixeta (2002) realizou testes de alelismo utilizando cinco variedades consideradas fontes de resistência. Foram observados diferentes genes com seus alelos (Tabela 4), revelando maior complexidade de herança em relação aos estudos anteriores.

Tabela 4 – Teste de alelismo com cinco variedades de feijoeiro resistentes à mancha angular. Seis locos independentes foram associados à resistência à mancha angular. Mais de um loco de resistência por cultivar foi identificado. O estudo revelou padrão de herança poligênico de resistência à doença.

Fonte de resistência	Locos	Genes (alelos)
Comell 49-242	A	<i>Phg-3</i>
México 54	B, D, E	<i>Phg-2, Phg-5, Phg-6</i>
MAR-2	C, D	<i>Phg-4, Phg-5²</i>
BAT 332	E	<i>Phg-6²</i>
AND 277	A, B, C	<i>Phg-1^a, Phg-2², Phg-3², Phg-4²</i>

^a Gene detectado por CARVALHO et al., 1998

Fonte: Caixeta, 2002.

Posteriormente, López et al. (2003) realizaram estudo de mapeamento de QTLs para resistência à mancha angular, através da população de mapeamento DG e marcadores gerados a partir de RGAs. O trabalho revelou 2 QTLs localizados no grupo de ligação B4 e 3 QTLs no grupo de ligação B10, caracterizando herança poligênica. Todos os 5 QTLs foram mapeados próximos dos RGAs, o que indica que apresentam estrutura similar a genes R e provavelmente residem em *clusters* de resistência. Três dos QTLs co-localizaram

com genes de resistência a antracnose. O mesmo pode ser dito em relação ao gene *Phg-2*, que foi mapeado no grupo de ligação B8 próximo ao gene de resistência à ferrugem, Ur-13 (Miklas(a) et al., 2006).

Estudos de resistência à mancha angular são essenciais em programas de melhoramento. O objetivo é o de unir os diferentes genes de resistência em uma única variedade (piramidação), caracterizando uma resistência horizontal, efetiva para todas as raças de um patógeno. Amaro et al. (2007) utilizaram a linhagem ‘CAL 143’ em cruzamentos biparentais, buscando inserir resistência à mancha angular via seleção fenotípica. Contudo, concluíram que 5 ciclos de seleção ainda não haviam sido suficientes, revelando a problemática da estratégia de seleção fenotípica.

Outros trabalhos vêm sendo feitos com a técnica de SAM, principalmente com o uso de marcadores tipo RAPD e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*). Alzate-Marin et al. (2005) realizaram a introgressão do gene *Phg-1* na cultivar ‘Rudá’, por cruzamento como doador ‘AND 277’ e seleção assistida com OPH13. Neste trabalho também foi realizada a piramidação de outros genes de resistência, utilizando como doadores as variedades ‘MAR 2’ e ‘Cornell 49-242’, através dos RAPDs OPE4, OPN2 e OPE4, respectivamente. No mesmo ano, Olivera et al. (2005) utilizaram estratégia parecida, porém os doadores foram as variedades ‘Mexico 54’, ‘MAR 2’ e ‘BAT 332’. Mais recentemente, Sanglard et al. (2008) obtiveram sucesso na piramidação de genes de resistência à mancha angular, entre outras doenças de feijão, utilizando também a técnica de SAM, através de marcadores RAPD e SCAR, introgregando novos alelos (*Phg-1*, *Phg-4* e/ou *Phg-5*², *Phg-2* e/ou *Pgh-5* e/ou *Phg-6*, *Phg-6*²) vindos de diferentes fontes de resistência, também ao cultivar ‘Rudá’.

A resistência genética de plantas cultivadas vem sendo cada vez mais procurada, uma vez que é a mais barata, segura e eficiente estratégia de controle de doenças disponível para pequenos e grandes agricultores (Namayanja et al., 2006). A seleção de resistência baseado na presença de marcadores moleculares é rápida e confiável, já que não depende da interação com ambiente (Arus & Merono-González, 1993). Isso possibilita o uso de estratégias como SAM, para a piramidação de genes de resistência, garantido a resistência genética horizontal almejada.

OBJETIVOS DO TRABALHO

Objetivos gerais:

- o Construção do mapa genético ‘IAC-UNA’/‘CAL 143’ (UC) para feijão comum (*P. vulgaris*), baseado em marcadores microssatélites.
- o Mapeamento de QTLs associados à resistência à mancha angular (*P. griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun).

Objetivos específicos:

- o Avaliação do polimorfismo dos marcadores microssatélites através da genotipagem das linhagens ‘IAC-UNA’ e ‘CAL 143’.
- o Genotipagem das 380 RILs da população de mapeamento com os microssatélites polimórficos.
- o Construção do mapa genético, com o auxílio do programa MapMaker/Exp.
- o Avaliação dos fenótipos de resistência/suscetibilidade à *P. griseola* da população de mapeamento em campo e casa de vegetação.
- o Identificação do número e a localização cromossômica dos QTLs de resistência à *P. griseola* utilizando os marcadores SSRs do mapa genético, através do programa QTLCartographer.
- o Identificação de efeitos pleiotrópicos entre os QTLs, bem como o tipo e magnitude dos efeitos dos genes envolvidos na resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

1. População de Mapeamento

A população de mapeamento utilizada neste trabalho foi produzida pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto Agronômico de Campinas (PMF – IAC), sob responsabilidade do Dr. Sérgio A. M. Carbonell e Dr. Alisson Fernando Chioratto, pesquisadores do Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Fazenda Santa Elisa).

Dentre as linhagens presentes no Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas, foram escolhidas como genitores da população de mapeamento, ‘IAC-UNA’ e ‘CAL 143’, por serem de grupos gênicos divergentes. A variedade ‘IAC-UNA’, tem sementes pretas, é suscetível à mancha angular e tem origem Mesoamericana. A linhagem ‘CAL 143’ possui sementes rajadas de vermelho (fundo bege) tipo calima, é resistente à mancha angular e de origem Andina.

Em Dezembro de 2001, iniciou-se a obtenção dos primeiros cruzamentos que deram origem a esta população. Conforme está esquematizado (Anexo 1), sementes genéticas das variedades ‘IAC-UNA’ e ‘CAL 143’ foram plantadas para obtenção de plantas endogâmicas, que, após a primeira autofecundação, geraram gametas para a produção da população de mapeamento. Dois cruzamentos foram realizados, um no qual a planta de ‘IAC-UNA’ foi doadora de pólen (‘IAC-UNA x CAL 143’), e outro no qual a planta de ‘CAL 143’ é que doou os gametas masculinos para fertilização da planta ‘IAC-UNA’ (‘CAL 143 x IAC-UNA’). Esta individualização foi apenas para acompanhar possíveis efeitos maternos ao longo das gerações.

O primeiro cruzamento originou nove vagens, com um total de 723 sementes. O segundo gerou 18 vagens, totalizando 790 sementes. Três sementes F_1 , representantes de cada vagem, foram plantadas em 27 vasos separados, que por autofecundação geraram as sementes F_2 . Essas sementes foram todas colhidas e plantadas em 9 vasos, sendo sempre 3 sementes por vaso, separadas de acordo com a planta da qual foram geradas. Assim, 729 sementes foram plantadas, por ciclo reprodutivo de autofecundação, ou seja, a cada geração F_3 , F_4 , F_5 , F_6 , até F_7 , as sementes eram colhidas em conjunto (método de *Bulk*), por vaso, das quais outras 3 eram plantadas em mais 9 vasos, e assim por diante, mantendo os 243 vasos.

Na geração F_8 , foram abertas às linhas endogâmicas. Agora as sementes foram colhidas individualmente por planta e mantidas individualizadas nos plantios seguintes, sendo uma semente por vaso. Este procedimento foi mantido até F_{10} , que gerou as sementes F_{11} usadas para os estudos fenotípicos.

Ao todo, foram obtidas 540 linhagens endogâmicas F_{10} tiveram suas folhas coletadas, individualmente, para posterior extração de DNA. Objetivando diminuir o número de indivíduos para a genotipagem foram escolhidos 380 indivíduos, representantes dos dois cruzamentos e das 27 vagens obtidas em F_1 , para compor a população de mapeamento RIL modificada, que é a base deste projeto de mapeamento.

2. Obtenção e Análise de SSRs

Novos SSRs foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, através de duas bibliotecas enriquecidas para microssatélite. As bibliotecas foram geradas a partir do material genômico das variedades 'IAC-UNA' (Campos et al., 2007; Benchimol et al., 2007) e 'CAL 143' (Cardoso et al., 2008). O sequenciamento dessas bibliotecas foi feito em

seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems). O programa Microsat (Billotte *et al.*, 1999) foi utilizado para analisar as seqüências, encontrar os adaptadores e os possíveis sítios de enzima *RsaI* dos clones que apresentaram regiões com microssatélites. A cada lote de seqüências os “reads” gerados foram processados pelo programa Phred versão 0.000925c. (www.phrap.org - Ewing *et al.*, 1998) sendo retiradas as seqüências de vetor, cauda poli-A e adaptadores nesta análise. A clusterização foi feita com o programa CAP3 com os parâmetros *default* (Huang & Madan, 1999). A identificação das seqüências repetitivas, características de SSRs, foi feita com o auxílio do programa WEBTROLL (*Tandem Repeat Occurrence Locator* – <http://wsmatins.net/webtroll/troll.html>; Castelo *et al.*, 2002).

Uma vez obtida a região da seqüência que está o microssatélite, os *primers* complementares às seqüências flanqueadoras dos microssatélites foram desenhados através do programa Primer Select, vs.5.0 (DNASTAR, 2001), obedecendo aos seguintes critérios: (1) o tamanho dos *primers* não deve ultrapassar 22 pb para reduzir os custos de síntese, (2) máximo de 2°C de diferença entre as temperaturas de anelamento (*T_a*) do par de *primers*, (3) conteúdo de CG entre 40% a 60%, (4) ausência de complementaridade entre os *primers*, (5) *T_a* não deve ser abaixo de 46°C e com uma concentração de sal de 50 mM, para assegurar a amplificação específica e abrangente, (6) produtos de PCR entre 100 e 300 pb para garantir uma mais fácil diferenciação dos alelos.

Outros 285 microssatélites foram obtidos de literatura, sendo 44 da série “Pv” (Yu *et al.*, 2000; Caixeta *et al.*, 2005), 71 da série “PVBR” (Buso *et al.*, 2006; Grisi *et al.*, 2007), 46 da série “BM” (Gaitán-Solís, *et al.*, 2002), 2 de Murray *et al.* (2002), 49 da série “BMd” (Blair *et al.*, 2003), 18 de Guerra-Sanz (2004), 40 da série “PvM” (Hanai *et al.*, 2007), e outros 15 obtidos de demais publicações (Yaish and Perez de la Vega, 2003; Frei *et al.*, 2005).

Os SSRs derivados de bancos genômicos presentes nos QTLs mapeados foram submetido a análise de similaridade de sequência via BALSTX. As sequências de nucleotídeos dos SSRs depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram comparadas com o bancos de dados nr (Non-redundant protein sequences) do *GeneBank*. A constatação de similaridade entre as sequências foi verificada pelos valores de *e-value* gerados.

3. Extração e Quantificação de DNA

Amostras de folhas de cada uma das 380 linhagens recombinantes F₁₀ e dos genitores ‘IAC-UNA’ e ‘CAL 143’ foram coletadas. Depois de congeladas em nitrogênio líquido, estas foram liofilizadas e moídas. Em seguida, fez-se a extração do DNA de acordo com a metodologia do CTAB descrita por Hoisington et al. (1994).

A quantificação a concentração de DNA final das 380 linhagens foi feita em gel de agarose 1%, por comparação de intensidade das bandas com o padrão de fago λ (Invitrogen®). Foram utilizadas concentrações de 25ug a 300ug do padrão, somando-se 25ug a cada poço de aplicação. Os padrões foram seguidos de amostras do DNA das 380 linhagens, sendo que cada amostra foi colocada duas vezes, diferindo na diluição do DNA concentrado, sendo $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração original.

4. Caracterização dos *primers*

Cada par de *primer* desenhado foi caracterizado quanto à temperatura ideal de anelamento para PCR. As reações de amplificação foram realizadas com 30ng de DNA, 1U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,15mM de cada dNTP,

0,8pmol/μl de cada *primer* (direto e reverso) e 1x de tampão da enzima, num volume total de 15μl.

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

Após etapa de amplificação, os microssatélites foram visualizados em gel de agarose 3%, onde foi possível definir a Ta ideal para cada um. Em seguida o produto de PCR que apresentou maior especificidade, com padrão nítido de banda única, foi visualizado em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata (Creste et al., 2001), ou em sequenciador por técnica de pcr-marcado por fluorescência (Schuelke, 2000).

5. Gel de Poliacrilamida 6%

Os géis de acrilamida 6% foram feitos a partir de solução de acrilamida 6% (150ml de acrilamida 40%, 420g de uréia, 200ml de TBE 5X, volume completo para 1L) filtrada e polimerizada por aproximadamente 2h com 960μl de PSA (Persulato de Amônio) e 50μl TEMED. Após aquecimento do gel em cuba de eletroforese (*Nucleic Acid Sequencing Systems - Scientific Company, INC*) por 1h à 200W, 5ul de cada um dos 380 materiais foram aplicados nos poços, preparados a partir de 10ul de produto de PCR com 5ul de formamida, em 8 entradas de 48 amostras por vez. A corrida foi de aproximadamente 5h à 50W e 800V-900V.

6. PCR-marcado por Fluorescência

Para a técnica de PCR-marcado com fluorescência foi feita a adição de uma cauda na região 5' do *primer* direto dos SSRs, correspondente a sequência do *primer* universal M13 (Schuelke, 2000).

O *primer* M13, contendo 18 pb (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'), foi marcado com duas cores de fluorescência: HEX (verde) e 6-FAM (azul), o que permitiu a realização de *multiplex* na aplicação de duas amostras diferentes, simultaneamente, em seqüenciador de DNA.

As reações de amplificação foram estabelecidas com 30ng de DNA, 1U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,15mM de cada dNTP, 1x de tampão da enzima, 0,8pmol/μl dos *primers* reverso e M13-marcado e 0,2pmol/μl do *primer* direto, num volume total de 15μl. Os ciclos de PCR utilizados foram: 1) 94°C, 1 min; 2) 94°C 1 min; 3) Ta específica para cada SSR, por 1 min.; 4) 72°C 1 min, 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 94°C, 1 min; 7) 53°C, 1 min; 8) 72°C, 1 min; 9) volta ao passo 6 por 8 vezes; 10) 72°C por 10 min.; 11) 15°C, incubação final. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 3%.

As amostras foram preparadas para sequenciamento a partir da recomendação da Applied Biosystems, com variações quanto à quantidade de produto de PCR e do padrão GeneScan™ 500 (Applied Biosystems), sendo 1,5μl de produto de cada PCR, 9μl de formamida e 0,5μl do padrão.

A genotipagem dos 380 materiais foi feita em cooperação com Dr. Marcos Antonio Machado e Dr. Marco Aurélio Takita, do Centro de Citricultura – IAC (Cordeirópolis, SP). As amostras foram carregadas em seqüenciador 3730 *DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

A leitura dos picos de fluorescência foi realizada como auxílio do *software* GeneMapper® v3.7 (Applied Biosystems).

7. Construção do Mapa Genético UC

Os marcadores SSRs utilizados na genotipagem das 380 linhas endogâmicas foram submetidos ao teste de segregação (*p*-valor) e correção de Bonferroni, com auxílio do programa “R” (version 2.5.1 – *The R Foundation for Statistical Computing*, 2007). Todos os marcadores foram usados na construção do mapa genético com o auxílio de programa MAPMAKER/EXP v. 3.0b (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992).

Os marcadores já publicados foram usados como base para formação dos 11 grupos de ligação esperados para feijão, sendo ancorados através do comando “*anchor*”, aos seus respectivos GL. Em seguida, foi realizada a análise de Dois-Pontos, com o uso de comando “*two-point*”, para ligação dos demais SSRs nos grupos de ligação. Para rodar as análises foram fixados os parâmetros de LODscore em 3,0 e distância mínima de 37,5 cM, através da função de mapeamento de Kosambi.

Os marcadores não inseridos em algum grupo de ligação foram listados pelo comando “*list status*”, que revela as marcas que apresentavam conflito. Em seguida foi verificada manualmente a ligação dessas marcas através do comando “*links*”, que revela os valores de LOD entre cada par de marcas possivelmente ligadas. As marcas com conflito foram, então, inseridas em seus respectivos GL pelo comando “*attach*”.

O próximo passo foi a ordenação das marcas em seus grupos de ligação. Primeiro foi realizada a ordenação de um subgrupo de nove SSRs por pelo algoritmo de “Busca Exaustiva”, com o comando “*compare*”. No MapMaker, a melhor ordem é aquela que

apresenta LOD igual a zero, uma vez que a estatística LOD usada pelo programa é uma razão entre o valor da melhor ordem pelos valores obtidos para cada ordem.

A melhor ordem de cada GL foi utilizada na ordenação dos demais SSRs, que foram inseridos um a um pelo comando “*try*”, checando a posição mais favorável a cada inserção de uma nova marca. No sentido de refinar as análises, primeiro foram testados os marcadores mais informativos (“*Informativeness Criteria: min Distance 2.0, min #Individuals 280*”), que não apresentaram desvio de segregação. Posteriormente, foram testados os SSRs menos informativos e/ou com desvio de segregação. As seqüências finais foram verificadas pelo comando “*ripple*”, com janela de 6 marcas.

Por fim, a distância entre cada dois SSRs foi determinada usando análise “Multiponto”, pelo comando “*map*”, definindo o *framework* de cada GL. O desenho do mapa de ligação foi feito através do programa MapChart 2.2 (Voorrips, 2002), com auxílio do Adobe Photoshop 7.0 (Microsoft).

8. Avaliação fenotípica de Resistência à Mancha Angular em Campo

Os testes fenotípicos de resistência/susceptibilidade ao *P. griseola*, em condições naturais de infecção em campo, foram conduzido durante o inverno, época de maior ocorrência da doença, com plantio das linhagens em junho/2008 na Fazenda Santa Elisa, em Campinas. O experimento foi realizado em linhas com 5 repetições de cada linhagem, sendo os sintomas avaliados três semanas após germinação, de acordo com a escala de notas do CIAT (1995).

9. Avaliação fenotípica de Resistência à Mancha Angular em Casa de Vegetação

Novos patótipos de *P. griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun foram isolados a partir de amostras retiradas de plantações de feijão, contaminadas com mancha angular, espalhadas por todo o Estado de São Paulo, pelos Drs. Sérgio A. M. Carbonell e Alisson Fernando Chioratto do Centro de Grãos e Fibras – IAC (Campinas, SP). Culturas monospóricas foram geradas a partir de fungos foliares em estágio de esporulação. O cultivo foi feito em meio de suco de vegetais V8 (Oliveira, 2004), durante aproximadamente 10 dias, para reprodução do fungo.

Após este processo, os inóculos do fitopatógeno foram reproduzidos em placas de Petri contendo também meio V8, mantidos a 24°C, durante 10 a 12 dias. A inoculação por pulverização em ambas as superfícies foliares (concentração 10^4 esporos/ml) foi realizada nas folhas primárias expandidas, destacadas de plântula estágio V3 (Ragagnin et al., 2005), sendo mantidas em condições estáveis de temperatura (24°C) e umidade (95-100%, nas primeiras 48h), com fotoperíodo de 12h, ideais para o crescimento do fungo (Monda *et al.*, 2001; Sartorato, 2004; Vital, 2006).

Os testes fenotípicos foram realizados em duplicata, tanto com as 380 linhas edogâmicas da população de mapeamento, assim como com as 12 variedades diferenciadoras. Desta forma, foi possível definir a raça do inóculo utilizado. A avaliação da severidade foi efetuada após 18 dias, pela escala de notas do CIAT (1995).

10. Mapeamento de QTLs de Resistência à Mancha Angular

A partir do mapa genético UC gerado no MapMaker/EXP e dos dados fenotípicos da população de mapeamento, as análises para identificação dos locos ligados a resistência

à mancha angular foram realizadas pelo programa QTL Cartographer vs.1.17 (Basten et al., 2005).

Os dados fenotípicos, tanto do experimento de campo como do experimento de casa de vegetação, tiveram seus valores normalizados com o auxílio de programa “R”. Os dados foram inseridos na forma de vetor, gerando uma curva de padronização pelo pacote “MASS”, disponível no programa. O pico da curva (λ) foi utilizado na normalização dos dados, sendo $\text{dadosn} = \text{dados}^\lambda$ (dadosn são os valores das notas normalizados; dados são os valores brutos).

As notas normalizadas foram colocadas em um único arquivo, para análises dos dois *traits* simultaneamente. O arquivo de dados juntamente com o arquivo de mapa gerado pelo MapMaker foram convertidos à arquivos de leitura do QTLCartographer pelos programas Rcross e Rmap, respectivamente.

Em seguida foi realizada a análise de mapeamento pelo método CIM (modelo 6 – Zmapqtl). O modelo baseia-se na hipótese de que um QTL envolvido em uma característica esta localizado em um intervalo entre dois marcadores adjacentes a este QTL. As marcas ligadas à QTLs putativos, fora do intervalo em análise, foram tomadas como covariáveis do modelo. A evidência de QTLs foi verificada a cada intervalos de 1 cM e janela de 10 cM, através de estatísticas de ML, convertidas em seus respectivos LODs. Os cofatores utilizados na análise de CIM foram obtidos através do método de regressão múltipla (*stepwise*), com valor de significância de 5%.

Devido a realização de múltiplos testes, o valor de significância para detecção dos QTLs foi verificado realizando as análises com 1000 permutações (Churchill & Doerge, 1994). As variações fenotípicas (R^2) explicadas por cada QTL e seus efeitos aditivos foram identificados através da conversão dos valores à unidade original dos dados. Os efeitos de

valor positivo são relativos ao incremento gerado pelo alelo do parental 'CAL 143', e os valores negativos relativos ao genitor 'IAC-UNA'.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Mapa Genético UC

Um grande número de novos SSRs foram obtidos pelo grupo de pesquisa, somando 488 locos dentre as bibliotecas de ‘CAL 143’ e ‘IAC-UNA’ (Benchimol et al., 2007; Hanai et al., 2007; Campos et al., 2007; Cardoso et al., 2008). O polimorfismo observado nos genitores da população de mapeamento foi de 34% (165 SSRs polimórficos). Dos 260 obtidos de literatura, 99 (38%) mostraram polimorfismo entre nossos genitores da população de mapeamento.

No total foram testados 748 marcas, sendo encontrado 264 SSRs polimórficos, totalizando 35,3% de SSRs com grande potencial de uso na construção do mapa genético. Este nível de polimorfismo identificado na população UC foi um pouco inferior aos obtidos em demais trabalhos com populações derivadas de cruzamento entre variedades de feijão oriundas de *pools* gênicos divergentes. Considerando a população BJ, Yu et al. (2000), Blair et al. (2003) e Grisi et al. (2007) detectaram 43%, 55,7% e 42,8% de polimorfismo, respectivamente. A população DG, desenvolvida por Blair et al. (2003), também apresentou maior polimorfismo, 84 SSRs dentre os 150 testados (56%). Contudo, esses estudos não envolveram um número tão grande de SSRs quanto o presente trabalho. O número de marcadores analisadas foi de 264, dentre SSRs gênicos e genômicos por Grisi et al. (2007), em contraste com os 748 SSRs analisados no neste estudo.

Dos 264 locos polimórficos utilizados na genotipagem das 380 linhagens endogâmicas, 247 apresentam padrão nítido de bandas, revelando 93,5% de aproveitamento. Assim, foram utilizados nas análises de mapeamento 99 SSRs obtidos de literatura, sendo 15 da série “Pv” (Yu et al., 2000; Caixeta et al., 2005), 38 da série

“PVBR” (Buso et al., 2006; Grisi et al., 2007), 15 da série “BM” (Gaitán-Solís, et al., 2002), 1 em Murray et al. (2002), 17 da série “BMd” (Blair et al., 2003), 3 em Guerra-Sanz (2004), e 11 da série “PVm” (Hanai et al., 2007). Os outros 148 SSRs foram produzidos por nosso grupo, dos quais 83 já foram publicados (Benchimol et al., 2007, Campos et al., 2007; Cardoso et al., 2008) e 65 são inéditos (Anexo 2).

O processo de genotipagem foi realizado em duas etapas. A grande maioria dos locos (208) foram genotipados em gel de poliacrilamida 6% corado pela técnica de nitrato de prata (Figura 3). Os 380 genótipos foram colocados em ordem crescente, com 48 amostras por linha, sendo feitas oito aplicações por gel, para visualização de toda a população em um único gel. A utilização de várias entradas foi extremamente importante na aceleração do tempo gasto por SSR, além de facilitar a leitura dos géis e baratear o processo. Posteriormente foi utilizada a técnica de PCR-marcado por fluorescência, com genotipagem de 39 locos em seqüenciador automático (figura 4). Este método mostrou-se ainda mais rápido e eficiente, uma vez que as análises foram realizadas em *multiplex*, de forma automatizada.

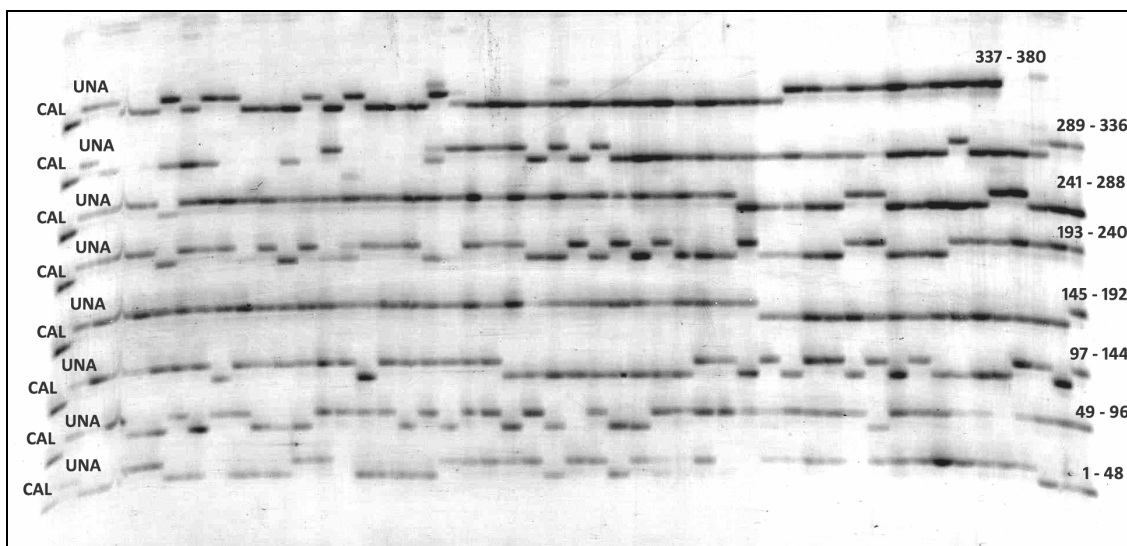


Figura 3 – Genotipagem das 380 linhagens da população de mapeamento UC, loco SSR-IAC132. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata com 8 aplicações. Cada linha contém 50 amostras, sendo a primeira referente ao genitor ‘CAL 143’ e a segunda ao genitor ‘IAC-UNA’, seguidos de 48 amostras da população de mapeamento.

Os marcadores foram, então, submetidos ao teste de segregação via p -valor e Bonferroni com auxílio do programa “R”. O desvio global considerado foi de $\alpha^* = 0,05$. Considerando um total de 247 testes realizados, o valor da correção de Bonferroni para cada teste foi de $\alpha = 2,0242e-4$. No total, 155 marcas apresentaram segregação Mendeliana esperada de 1:1.

Desta forma, foram identificados 38% de locos com desvio de segregação. Do total de SSRs com desvio de segregação, 40% apresentaram desvio para o alelo do genitor Andino, ‘CAL 143’. Em quanto 59% dos SSRs apresentaram desvio de segregação para o alelo do genitor Mesoamericano, ‘IAC-UNA’. Freyre et al. (1998) também encontraram locos com desvio de segregação, sendo encontrados *clusters* de distorção para o alelo do genitor Andino no grupo B1, assim como no presente trabalho. Blair et al. (2003) encontram o mesmo resultado, além de observar *cluster* de distorção para o alelo do genitor Mesoamericano no grupo B5, também visto no mapa UC. Contudo, Freyre et al. (1998)

encontram preferência de transmissão do alelo do genitor Mesoamericano no GL B2, resultado não observado por Blair et al. (2003), porém presente no mapa UC.

Como não se sabe ao certo o que leva a ocorrência destas distorções de segregação, e uma vez que foi provado que poucos locos com desvio podem levar a distorção de uma grande região adjacente a esses locos ao longo do cromossomo (Xu, 2008), todas as marcas foram utilizadas na produção do mapa genético UC. Além disso, sendo o desvio de segregação Mendeliana um evento randômico (por volta de 44%), juntamente com um grande número de marcadores utilizados na obtenção do mapa, constatou-se que a presença deste tipo de loco traz benefícios na identificação de QTLs de efeito aditivo (Xu, 2008).

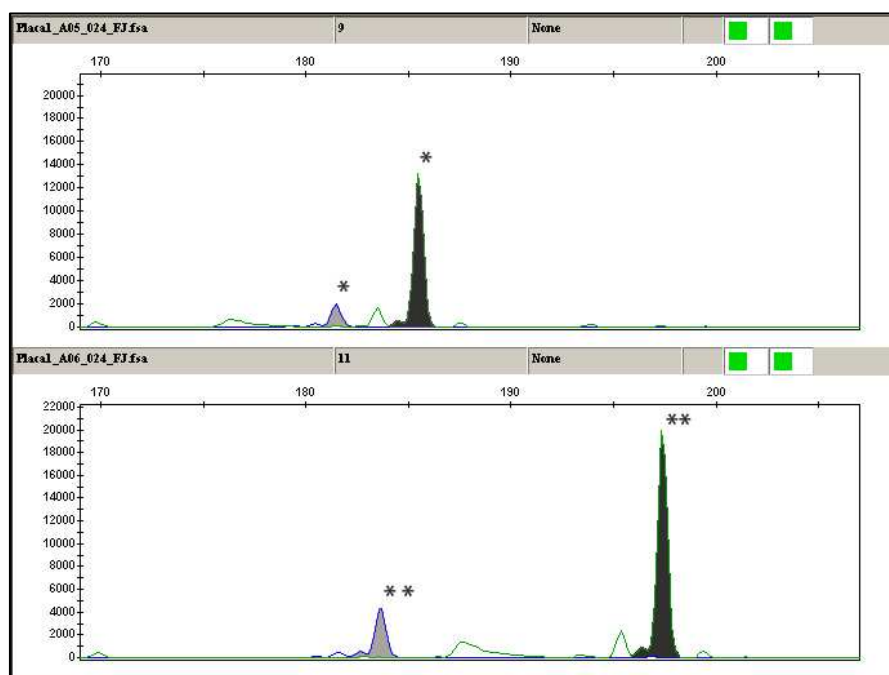


Figura 4 – Picos de fluorescência dos alelos de duas linhagens diferentes, em *multiplex*. Picos em cinza referem-se ao loco SSR-IAC245. Picos em preto referem-se ao loco SSR-IAC244. (*) alelos oriundos do genitor ‘CAL 143’; (**) alelos oriundos do genitor ‘IAC-UNA’.

Os 247 marcadores foram usados nas análises de mapeamento. Após a ancoragem dos 75 SSRs anteriormente mapeados, 88 marcas puderam ser ligadas aos onze GL formados, pela análise de Dois-Pontos. As 74 marcas em conflito foram analisadas uma a uma, através dos valores de LODscore de ligação com outras marcas, sendo também inseridas em seus respectivos GL, considerando o maior LODscore como o correto. Os onze GL que compõe o genoma do feijão foram obtidos (Figura 5). Os GL apresentaram entre cinco marcas ligadas, no grupo B11, e 37 locos ligados no grupo B2. Apenas 10 SSRs não foram ligados a qualquer GL pela análise de Dois-Pontos.

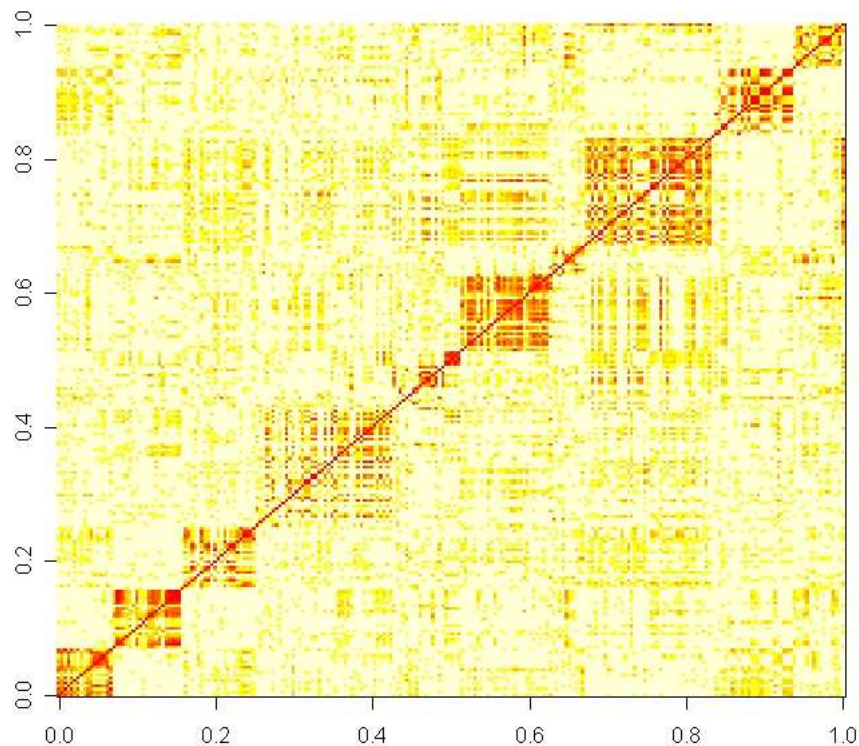


Figura 5 – As frações de recombinação entre cada par de SSR analisado para obtenção do mapa genético estão representadas com graduação de cores. Do mais claro (branco), passando pelo amarelo, ao mais escuro (vermelho), indica a ligação entre as marcas. Quanto mais forte a cor (vermelho), menor é a fração de recombinação, ou seja, mais fortemente os SSRs encontram-se ligados. É possível visualizar os 11 GL identificados na análise de Dois-Pontos.

Os grupos de ligação B1, B6, B10 e B11 foram facilmente ordenados como descrito em “Material e Métodos”. Contudo, durante a ordenação dos locos nos GL B2, B3, B4, B5, B7, B8 e B9 foram encontradas distâncias superiores as 37,5 cM entre duas marcas. Este valor foi estabelecido como critério de ligação, e teoricamente estes locos não estariam ligados. Uma nova metodologia para ordenação desses grupos foi estabelecida, que se iniciou com a constatação da formação de um único grupo entre as marcas não ancoradas. Este procedimento foi estabelecido uma vez que os *gaps* foram mais freqüentes entre as marcas ligadas por análise de Dois-Pontos e aquelas previamente ancoradas. Os locos ancorados foram, momentaneamente, retirados das análises, e o restante foi submetido ao comando *group*. Os grupos B2, B7, B5 e B9 apresentaram um único grupo, com todas as marcas ligadas entre si. Já os grupos B3 e B8 se dividiram em dois subgrupos. Por fim, o GL B4 revelou três subgrupos.

Os grupos que não apresentaram subdivisões foram re-ordenados, com os locos ancorados inseridos ao final da ordenação. Desta forma, foram obtidos grupos concisos, uma vez que foi possível retirar com confiança locos que não apresentaram nível de ligação satisfatório ($LOD \geq 3,0$). A identificação deste tipo de loco indica a necessidade de uma maior saturação dos grupos de ligação, uma vez que a marca se encontra ligada ao grupo, contudo não possui um loco próximo o suficiente para posicioná-la com confiança em relação às demais marcas.

Contudo, mesmo apresentando distância superior a 37,5 cM entre dois pares de marcas, os grupos B2 e B9 puderam ter seus “subgrupos” mantidos ligados, uma vez que o LOD para estas posições foi bastante significativo, sendo de 8,34 entre SSR-IAC251 e SSR-IAC166 (B2) e 13,10 entre BM141 e FJ48 (B9). Outro fator favorável a junção destes “subgrupos” é a existência dos locos ancorados, que possibilitaram checar, por comparação

com outros mapas já produzidos, a ordem das marcas presentes nesses grupos. Com isso, foi possível afirmar a direção dos “subgrupos” encontrados em nossas análises. Este fato levou a inversão do posicionamento do grupo de marcas entre IAC166 e PVBR243, no grupo de ligação B2, de forma a tornar a ordem das marcas dentro deste grupo coerente com a ordem estabelecida em trabalhos anteriores.

Já os GL B3, B8 e B4 tiveram seus subgrupos analisados separadamente, sempre ordenando primeiro os locos não ancorados e, em seguida, posicionando os locos ancorados. Desta forma, foi possível confirmar a suposição anterior de que os “subgrupos” estavam ligados pelos locos ancorados, uma vez que os SSRs ancorados sempre se posicionavam nas pontas dos subgrupos. Assim, o subgrupo maior, de cada GL, foi usado como base para o posicionamento das demais marcas. O grupo B4 também apresentou distância superior 37,5 cM, mas o grupo foi mantido unido uma vez que a ordem foi estabelecida por *compare*. Este comando realiza análise por busca exaustiva, que é a forma mais precisa de se realizar o posicionamento entre locos. Diferente do grupo B8, que foi subdividido em B8a e B8b, pois durante integração dos “subgrupos” não houve marca que os ligasse. Isso pode ser explicado pela origem dos locos “Pv” presentes neste GL, sendo todos oriundos de um clone BAC (Caixeta et al., 2005). Com isso, estes SSRs encontram-se fortemente ligados pela proximidade física das marcas, formando um pequeno grupo, que precisaria de um maior número de locos para ligá-lo ao restante do cromossomo. Contudo, é importante ressaltar que, ainda sim, duas novas marcas (SSR-IAC228 e SSR-IAC280) puderam ser posicionadas próximas a este grupo de locos, o que indica que o número de marcas necessárias à integração dos subgrupos B8a e B8b pode não ser tão grande.

De forma geral, o mapa genético UC gerado (Figura 6) mostrou-se robusto, sendo mantidas apenas as marcas com alto grau de confiabilidade em relação ao grupo de ligação

e posição de mapa. Com isso, obtivemos um total 198 marcadores microssatélites distribuídos em 11 grupos de ligação, totalizando 1864,2 cM, com densidade média de mapa de 9,4 cM entre marcas (Tabela 5). Do total de marcadores mapeados, apenas 5,6 SSRs/GL, em média, foram ancorados, indicando uma boa distribuição dos marcadores que não haviam sido mapeados anteriormente, tanto produzidos por nosso grupo como os obtidos de literatura. Este estudo adicionou nova informação aos estudos de identificação de QTLs, fornecendo informação de mapa para 134 marcadores microssatélites nunca mapeados anteriormente.

O grupo que apresentou maior saturação foi o B2, com 37 marcas ligadas. Este resultado era esperado, uma vez que este também foi o maior grupo encontrado nas análises do mapa consenso de feijão (Freyre et al., 1998). Posteriormente, Grisi et al. (2007), também identificaram o grupo B2 como sendo o maior, com 26 marcadores ligados, dentre eles 15 SSRs, totalizando 224,3 cM para este GL, valor próximos dos 275,2 cM encontrados no mapa UC. Conseqüentemente, este também foi o grupo com maior número de locos ancorados (12 SSRs) para obtenção do mapa UC.

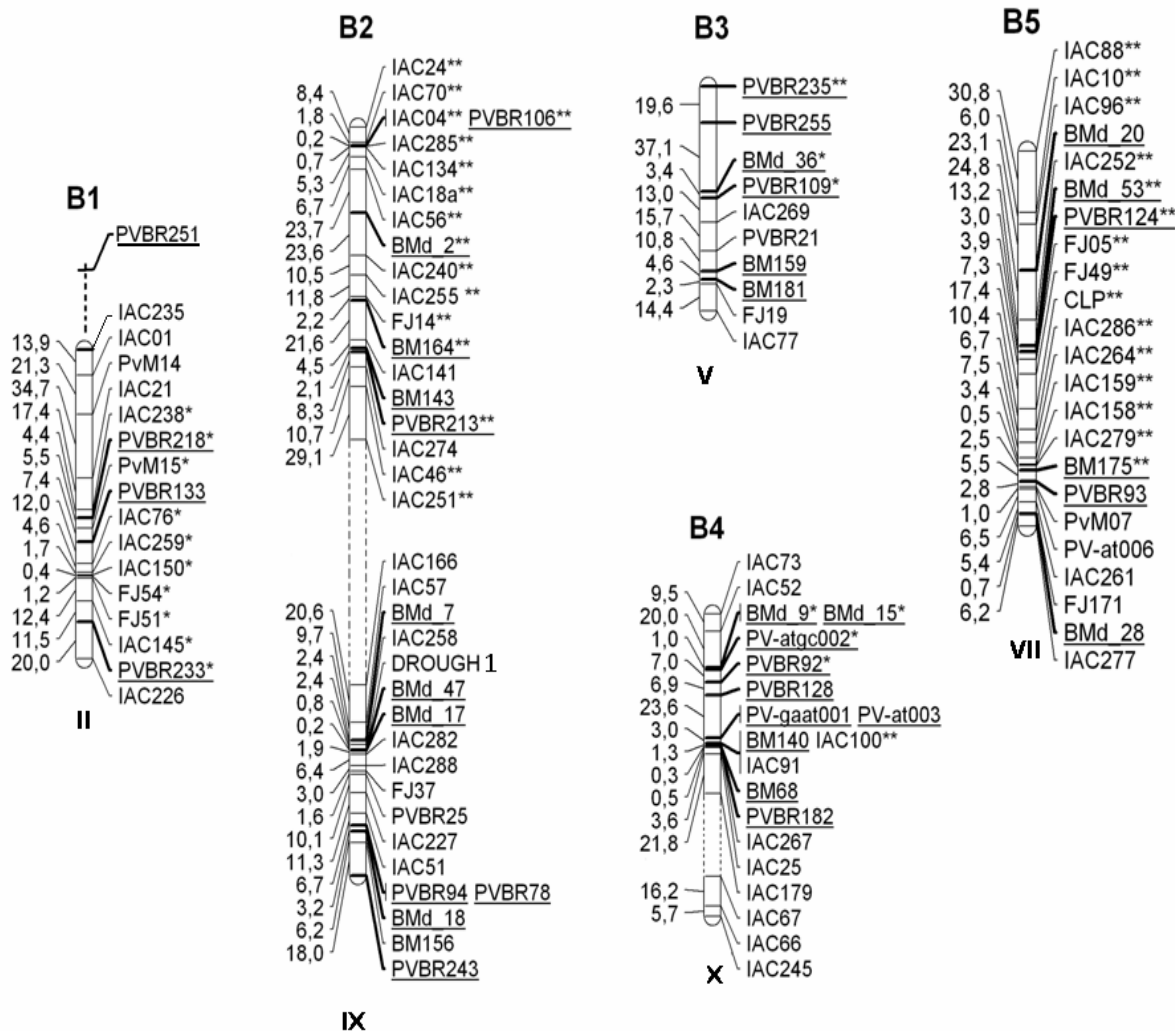


Figura 6 – Mapa genético para feijão comum, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante ‘IAC-UNA’ / ‘CAL 143’ (UC). Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados em seus respectivos grupos de ligação para a análise de Dois-Pontos ($LOD \geq 3,0$ e $r \leq 0,40$) encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível de significância de 5%.

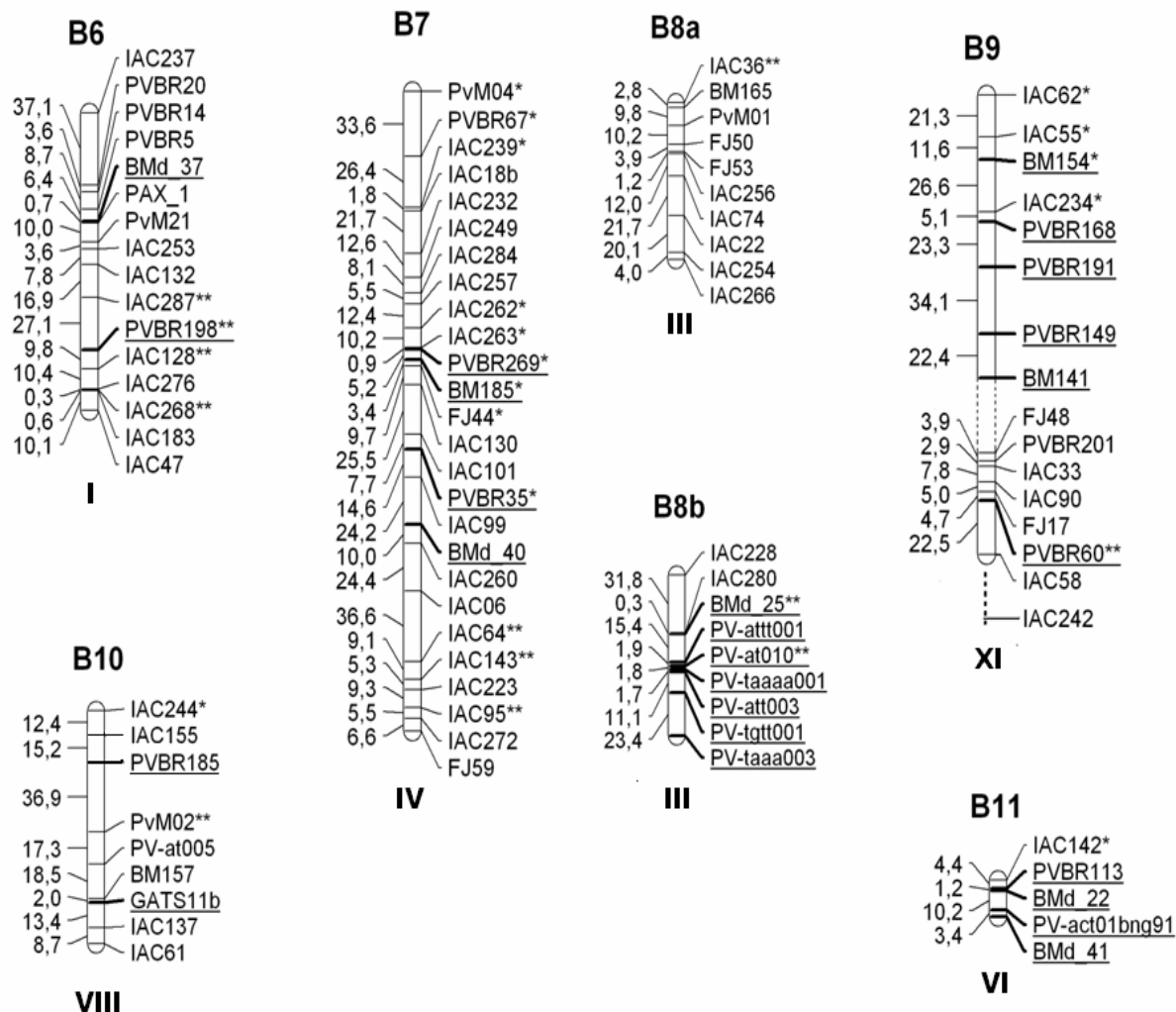


Figura 6 – Mapa genético para feijão comum, derivado das análises de ligação entre marcadores microssatélites genotipados na população segregante ‘IAC-UNA’ / ‘CAL 143’ (UC). Os locos previamente mapeados em outras populações e ancorados em seus respectivos grupos de ligação para a análise de Dois-Pontos ($LOD \geq 3,0$ e $r \leq 0,40$) encontram-se sublinhados. (*) locos com desvio de segregação para o alelo do genitor Andino (‘CAL 143’). (**) locos com desvio de segregação para o genitor Mesoamericano (‘IAC-UNA’). Nível de significância de 5%.

Mesmo o grupo B2 apresentando um grande número de marcas ligadas, a ordem entre elas foi mantida ao longo do cromossomo se comparado com trabalhos anteriores (Blair et al., 2003; Grisi et al., 2007). Apenas uma pequena inversão foi identificada na ponta deste GL entre os locos BM156 e PVBR243, em relação ao mapa BJ de Grisi et al.

(2007). Contudo as distâncias foram similares: 18 cM no mapa UC, e 14,1 cM no mapa BJ. Esta não-proximidade entre esses locos em ambos os mapas indica a necessidade de uma maior saturação entre eles para que se possa definir a real posição relativa. Neste grupo, também foi mapeado o loco FJ37, resultado também encontrado por Hanai (2008a), em sua tese sobre mapeamento com a população BJ e SSRs derivados de ETSs advindos do BEST (<http://lgm.esalq.usp.br/BEST>; Melotto et al., 2005).

Tabela 5 – Distribuição dos SSRs, mapeados nos 11 grupos de ligação de feijão comum, no mapa genético desenvolvido a partir da população ‘IAC-UNA’ / ‘CAL 143’ (UC). A saturação, comprimento de distância média entre os SSRs para cada grupo de ligação é descrita.

Grupos de ligação ¹	Cromossomos ²	Nº loci ligados	Nº loci ancorados/ligados	Comprimento (cM)	Distância (cM) entre loci ³
B1	II	17	3	168,3	9,9
B2	IX	37	12	275,2	7,4
B3	V	10	6	121,0	12,1
B4	X	20	10	120,6	6,0
B5	VII	23	6	189,4	8,2
B6	I	16	2	152,9	9,5
B7	IV	26	4	330,4	12,7
B8a	III	10	0	86,1	8,6
B8b	III	9	7	87,9	9,7
B9	XI	16	6	191,2	11,9
B10	VIII	9	2	124,5	13,8
B11	VI	5	4	16,7	3,3
Média ³		18	5,6	169,5	9,4
Total		198	62	1864,2	

¹ Ordenação dos grupos de ligação de acordo com o *Core Map* (Freyre et al., 1998).

² Ordenação dos cromossomos de acordo com PEDROSA et al., 2008. ³ Média Aritmética.

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

Marcadores podem ser encontrados no mapa UC discriminando *clusters* gênicos, através dos SSRs derivados de ESTs. No GL B4, os locos BMd_9, BMd_15 e PV-atgc002 pertencem à família de genes que codificam para fitohemaglutinina (PHA). Mesmo tendo sido desenvolvidos independentemente, os dois primeiros por Blair et al. (2003) e o terceiro por Yu et al. (2000), encontram-se no mapa UC a distâncias inferiores a 1 cM. Além disso, todos apresentam desvio de segregação para o alelo do genitor ‘CAL 143’. Neste mesmo cromossomo, os locos PV-gaat001 e PV-at003 estão co-localizados, indicando uma grande proximidade física, confirmada pelo fato de que ambos constituem a subunidade pequena da ribose 1,5-bifosfato carboxilase / oxigenase (Rbcs), como já havia sido descrito por Yu et al. (2000). De acordo com informações publicadas em outros trabalhos (Yu et al., 2000; Blair et al., 2003), estes dois *clusters* gênicos encontram-se co-posicionados, um em relação ao outro.

Em trabalho de tese, Hanai (2008a) mapeou na população *core* (BJ) locos “FJ” e “PvM” (Campos et al., 2007; Hanai et al., 2007), e encontrou resultados que reforçam a

robustez do mapa UC. No mapeamento dos locos “FJ”, Hanai (2008a) encontra SSRs ligados nos mesmos grupos em que foram mapeados neste trabalho. No grupo B1, estão os locos PvM15 e FJ51; no grupo B2, os mapas têm em comum o loco FJ37; enquanto os marcadores IAC10 e PvM07 foram ligados no B5; os locos PvM01 e FJ53, no GL B8, e no grupo B10 o SSR PvM02 foi ligado em ambos os mapas.

A co-localização dos marcadores em comparação com outros mapas de feijão, inclusive em relação à suas respectivas posições mantidas nos 11 grupos de ligação mapeados, relevam a robustez e confiabilidade do mapa genético UC gerado neste trabalho. Isso faz com que as marcas mapeadas tornem-se importantes alvos em trabalhos de melhoramento, uma vez que, independente da população de mapeamento utilizada, ou seja, independente do genótipo analisado para construção dos mapas de ligação, essas marcas representam locos bem caracterizados e conservados na espécie.

Além disso, foi possível ligar um grande número de novos locos, o que não somente possibilita maior saturação dos mapas já desenvolvidos, como também disponibiliza uma nova ferramenta para o mapeamento de características agronomicamente importantes, úteis em estudos de seleção assistida, ou ainda estudos de mapeamento fino e clonagem posicional.

2. QTLs de resistência à mancha angular

A avaliação fenotípica de resistência/suscetibilidade das 380 linhagens recombinantes foi feita na escala de 1-9 (CIAT, 1995), tanto para o experimento de campo com para o experimento de casa de vegetação. O genitor resistente apresentou nota mínima (1) em ambos os testes, revelando o máximo de resistência da linhagem ‘CAL 143’, tanto

em condições naturais de infecção (campo) por *P. griseola* como em condições controladas de infecção (em casa de vegetação) por uma única raça do fungo.

Os inóculos monospóricos extraídos de folhas infectadas com *P. griseola*, derivadas de campos de feijão contaminados, região de Capão Bonito – SP, foram testados quanto a infecção diferencial nos genitores da população de mapeamento. A raça utilizada foi identificada no próprio experimento de fenotipagem da população, uma vez que folhas relativas às 12 linhagens diferenciadoras foram utilizadas no experimento. O resultado de avaliação dos sintomas de mancha angular revelou a raça 60.54.

Os dados fenotípicos das 380 linhagens foram normalizados (Figura 7), com o auxílio do programa estatístico R, para a sua utilização nas análises de mapeamento de QTL. O objetivo foi reduzir erros de imprecisão na avaliação visual dos sintomas foliares, uma vez que as notas atribuídas aos diversos níveis de infecção são em escala linear. Os dados de campo foram elevados a $\frac{1}{2}$, e os dados de casa de vegetação foram mantidos, já que $\lambda = 1$, revelando a não necessidade de normalização neste conjunto específico de dados.

O mapeamento dos QTLs foi realizado separadamente para cada experimento. Os valores de *threshold* obtidos pelas análises de permutação foram próximos ao LOD 3,0, sendo este o valor estabelecido para identificação dos QTLs (Anexo 3). No total, sete QTLs foram obtidos para o experimento em campo, e quatro QTLs para o experimento em casa de vegetação, totalizando 11 QTLs relativos a resistência à mancha angular, nomeados de ALS1 à ALS11 (Tabela 6).

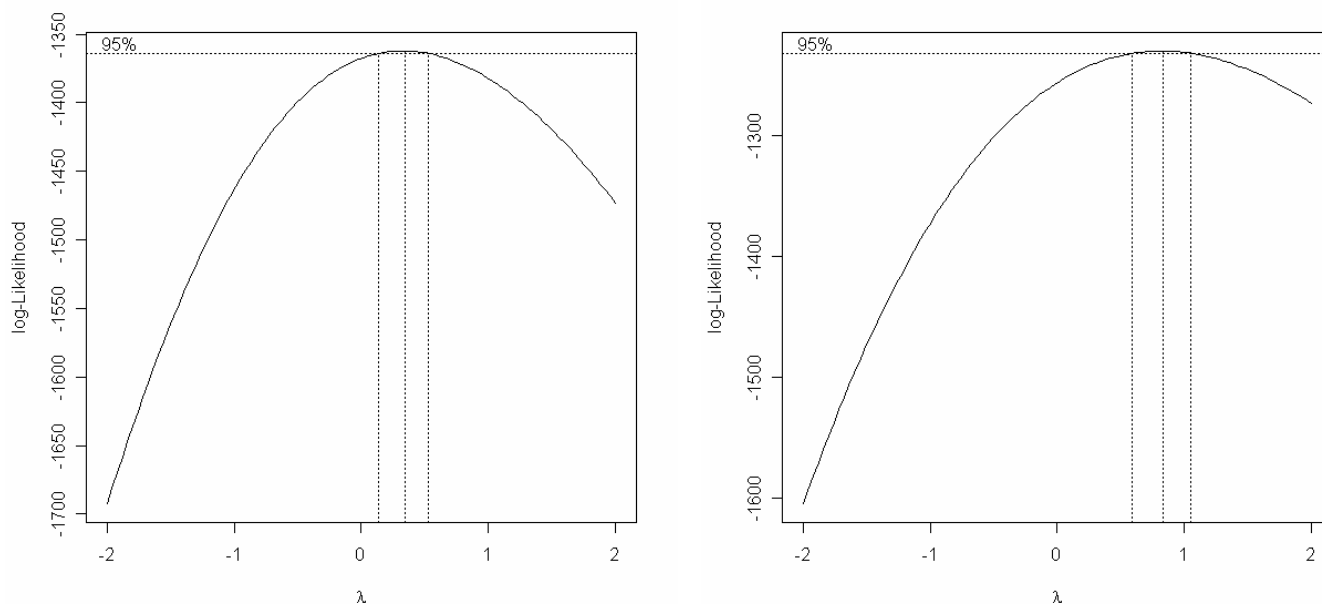


Figura 7 – Curvas de normalização dos dados fenotípicos de resistência/susceptibilidade à *Pseudocercospora griseola*, das 380 linhagens recombinantes da população segregante ‘IAC-UNA’ / ‘CAL 143’ (UC). A curva da esquerda foi obtida com os dados de campo ($\lambda = 1/2$). A curva a direita é derivada dos dados de fenotipagem em casa de vegetação ($\lambda = 1$).

A variação fenotípica explicada variou de 2,4%, com o ALS11, localizado no grupo B11, a 9,1%, com o ALS6, localizado no GL B5. Sendo que os QTLs de menor efeito em campo (ALS11) e em casa de vegetação (ALS2) explicaram 2,4% e 2,6% da variação fenotípica, respectivamente. Os QTLs de maior efeito no experimento de campo (ALS6) e no de casa de vegetação (ALS8) explicaram 9,1% e 7,2% da variação fenotípica, respectivamente. Desta forma, foi possível explicar 33,9% do fenótipo de resistência com os QTLs encontrados em campo, em quanto os QTLs obtidos no experimento de casa de vegetação explicaram 17,7% da resistência. Nenhum loco de efeito maior foi identificado. Estes resultados ressaltam o caráter quantitativo envolvido na resistência a mancha angular, revelando QTLs de menor efeito, porém fortemente envolvidos no fenótipo de resistência (Poland et al., 2008).

Contudo, genes de efeito maior são comumente encontrados em resistência de plantas (Young, 1996). López et al. (2003) identificaram QTL de efeito maior (63,9%) em suas análises, através da inoculação de quatro raças diferentes de *P. griseola* em condições controladas de casa de vegetação, em 87 RIL derivadas do cruzamento entre as variedades ‘DOR364’ (Mesoamericana/susceptível) e ‘G19833’ (Andina/resistente). A importância do loco encontrado no grupo B10 é ressaltada. Sua proximidade ao RGA7 indica uma região de genes R para resistência a mancha angular. Além deste QTL, López et al. (2003) também encontraram outros quatro QTLs, distribuídos no grupos de ligação B4 e B10.

Tabela 6 – Descrição dos QTLs para resistência à mancha angular, encontrados via análise de Mapeamento por Intervalo Composto (CIM), utilizando o mapa genético UC. Os QTLs identificados foram nomeados de ALS1 à ALS11. É descrita a condição experimental, o intervalo no mapa UC e a posição (cM) do pico dos gráficos de cada QTL, em seus respectivos grupos de ligação. O LOD de cada pico, efeitos aditivos e efeitos na variância fenotípica (R^2) de cada QTL também é revelada.

Grupo de Ligação	QTL	Experimento	Intervalo	Posição (cM)	LOD	Efeito aditivo	R^2 (%) ²
B1	ALS1	Campo	IAC21 – PVBR218	142,9	4,04	0,024	4,5
	ALS2	Campo	IAC76 – FJ54	179,2	3,78	0,029	2,6
B2	ALS3	Campo	IAC24 – IAC56	9,8	6,39	-0,032	4,9
	ALS4	CV ¹	PVBR213 – IAC46	132,0	3,97	0,590	3,5
B3	ALS5	Campo	PVBR21 – IAC77	101,6	7,65	0,043	6,7
B5	ALS6	Campo	IAC252 – CLP	105,7	11,0	-0,046	9,1
B7	ALS7	Campo	IAC18b – IAC249	83,5	3,96	-0,017	3,7
	ALS8	CV ¹	IAC257 – PVBR269	258,1	9,45	0,731	7,2
B8	ALS9	CV ¹	IAC22 – IAC266	85,2	4,61	-0,593	4,0
B9	ALS10	CV ¹	IAC55 – IAC234	190,1	3,75	-0,465	3,0
B11	ALS11	Campo	IAC142 – BMd_41	0,1	3,43	0,012	2,4

¹CV = Casa de Vegetação. ²Coeficiente de determinação fenotípica.

Apesar da variação fenotípica explicada pelos QTLs obtidos neste trabalho ter sido pequena, o número encontrado de locos envolvidos na resistência foi maior até o momento. Além disso, foi possível identificar o loco ALS6 com grande confiabilidade (LOD 11), entre os marcadores IAC252 e CLP no grupo B5. Este parece ser um QTL muito interessante uma vez que explica 9,1% fenótipo de resistência, e contém os microssatélites BMd_53 e CLP que estão contidos dentro da região codificante do gene *translation initiation factor 2* (TIF2 - Blair et al., 2003; Guerra-Sanz, 2004). Apesar de ser um gene de ação basal na célula, atuando no cloroplasto, este fator de iniciação de tradução apresenta resposta a fatores de estresse biótico e abiótico. Em *Arabidopsis thaliana* o TIF2 é reprimido em condições de estresse por baixo nível de oxigênio (Vayda & Webster, 1998) e em altas concentrações de ABA (ácido abscísico). Em condições naturais, o ABA é super-expresso também em condições de anóxia. Este fato é interessante, pois o *P. griseola* invade o hospedeiro através dos estômatos foliares o que leva a uma diminuição das trocas gasosas, e conseqüentemente, a um processo de anóxia na folha contaminada (Jesus Junior et al., 2001). Desta forma podemos supor o envolvimento do TIF2 na resposta da planta a invasão pelo fungo.

Além disso, o TIF2 responde a infecção por *Botrytis cinerea* em *Arabidopsis*, tendo sua expressão reduzida quase pela metade (0,61), em quanto praticamente não sofre alteração de expressão à infecção por *Erysiphe orontii* (0,94), em resultados de experimento com microarranjos (TAIR - <http://www.arabidopsis.org/>). O *B. cinerea* é um fungo necrotrófico, em quanto o *E. orontii* é um fungo biotrófico. Sabe-se que as respostas de defesa das plantas variam em relação a estes dois tipos de fungo (Glazebrook, 2005). Os fungos biotróficos, por infectarem células vivas, levam a uma resposta hiper-sensível (HR), ativada via interação de genes R (NBS-LRR) com proteínas *Avr* e pela via do ácido

salicílico (Jones & Dangl, 2006). Em contraste com os fungos necrotróficos, que se beneficiariam da morte celular, a resposta de defesa da planta é ativada pela sinalização dos hormônios ácido jasmônico e etileno. O *P. griseola* é um fungo hemi-biotrófico, assim, na fase inicial de infecção é biotrófico, passando a necrotrófico, em fase sintomática, posterior.

Estes fatos explicariam os resultados encontrados em trabalhos anteriores de resistência a mancha angular, com presença de QTL maior ligado a loco RGA (López et al., 2003), em contrapartida com os resultados obtidos neste trabalho, com QTLs de efeito menor, ligados a locos independentes de genes R. Os trabalhos com *P. griseola* são comumente feitos em condições controladas de laboratório. As plantas em mesmo estágio de desenvolvimento (V3) são pulverizadas com inóculo raça-específico, em condições ideais de temperatura e umidade. Os esporos tendem a germinar uniformemente, iniciando a infecção as folhas ao mesmo tempo. Com isso, a resposta hiper-sensível ativada pela interação gene-a-gene seria eficiente, levando a morte das células do hospedeiro, enquanto o fungo ainda esta em seu estágio biotrófico, resultando na resistência da planta. Por outro lado, em condições de campo, onde o gene TIF2 foi identificado (ALS6), os esporos de diferentes raças do fungo estão constantemente chegando às folhas das plantas, encontrando condições diversas para germinação. Desta forma, as plantas não conseguem matar o fungo por reação HR, uma vez que para diferentes raças do fungo seriam necessários diferentes genes R atuando simultaneamente. Com isso, a planta ativa resposta via ácido jasmônico e etileno, atuando contra o fungo em sua fase necrotrófica, mantendo sua resistência.

Somando-se a isso, a resposta ao ácido jasmônico ocorre principalmente por ação do gene COI1 (Glazebrook, 2005), que atua como protease, coerente com a redução da expressão do gene TIF2, citada anteriormente. Além disso, também é observada a repressão

do gene TIF2 na presença de etileno, enquanto não há alteração da expressão na presença de ácido salicílico (TAIR - <http://www.arabidopsis.org/>). Ou seja, o TIF2 responde aos hormônios ativados durante a resposta à fungo necrotróficos, mas não responde ao ácido salicílico, envolvido na ação de resistência à fungos biotróficos, indicando sua atuação na resposta metabólica da planta exclusivamente contra fungos que levam a morte celular.

Outro QTL interessante identificado é o ALS8, sendo o segundo QTL de maior efeito na variação fenotípica, obtido em casa de vegetação (7,2%). Este engloba o SSR IAC-262, que tem alta similaridade com a proteína hipotética RF2 (*Release Factor 2*), de *P. vulgaris*. Esta proteína foi identificada por Guo et al. (2007), em seu trabalho de evolução do genoma de cloroplasto de feijão, sendo codificada a partir do *ycf2* (*hypotetical chloroplast frame 2*). Dentre os muitos *ycfs*, o *ycf2* parece ser essencial para realização de funções celulares em dicotiledônias, não estando relacionado com fotossíntese, porém especula-se estar envolvido no metabolismo celular ou ter parte estrutural no plastídio (Drescher et al., 2000).

Em 2001, Liu et al. demonstraram que RF2 contém função de aldeído desidrogenase, através de estudos de complementação gênica, onde *E. coli* mutante com deficiência em aldeído desidrogenase recuperou o fenótipo selvagem com a inserção do gene *rf2*, além do RF2 recombinante apresentar atividade de aldeído desidrogenase. Somando-se a tudo isso, a aldeído desidrogenase mitocondrial mostrou restabelecer a fertilidade em milho macho estéril (Cui et al., 1996), sendo que o mutante na função da proteína RF2 é incapaz de restabelecer a fertilidade (Liu et al., 2001).

Interessantemente, dois trabalhos de resistência de plantas à fungos não identificaram gene R como sendo essenciais na resistência, mas sim seqüências que apresentaram alta similaridade com aldeído desidrogenase (RF2). No primeiro estudo, foi

observado um aumento significativo na expressão de mRNA, denominado FIS1, em *Linum usitatissimum* infectado com fungo biotrófico *Melampsora lini*. O FIS1 apresenta grande homologia com domínios de aldeído desidrogenase (Roberts & Pryor, 1995). Mais recentemente, também em estudo de expressão de mRNA, em condições iniciais de infecção de pimenta (*Capsicum annuum*) pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, foi identificada alta homologia do clone ddP1 com aldeído desidrogenases, em especial com RF2 de milho, sugerindo, também, um importante papel dessa proteína na resistência ao fungo (Boung-Jun Oh et al., 2003).

Outra função atrelada ao RF2 em cloroplasto é de regulação na estabilidade de mRNA e na síntese de proteínas, principalmente através de sua interação com seqüências UGA, levando a uma alteração no quadro de leitura nessa região (Meurer et al., 2002). Interessantemente, o loco que envolve o QTL ALS8, também apresenta SSR com similaridade ao gene que influencia na regulação gênica pós-transcricional (TIF2), com atuação no cloroplasto. Isto sugere que a regulação gênica pós-transcricional, ao nível de síntese protéica no cloroplasto, deve ser um tipo importante de regulação na resistência do feijoeiro à *P. griseola*.

Neste trabalho, foram identificados QTLs em todos os grupos de ligação, exceto nos grupos B4, B6 e B10 (Figura 8). Os microssatélites presentes nestes QTLs foram submetidos ao BLASTX contra banco de dados nr (non-redundant database) do *GeneBank*, sendo que os SSRs que apresentaram significância de similaridade com seqüências gênicas foram descritos (Tabela 7). Apesar de não ter sido encontrados QTLs no grupo B4 e B10, como citado anteriormente, é importante considerar que as fontes de resistência utilizadas nos dois trabalhos são distintas, mesmo pertencendo ao mesmo grupo de origem Andino, sugerindo fontes divergentes de resistência a *P. griseola*. Contudo, trabalhos de

divergência genética e testes de alelismo entre essas duas variedades precisariam ser realizados para confirmar tal hipótese.

Tabela 7 – Microssatélites ligados aos QTLs que apresentaram similaridade com proteínas do banco de dados nr do BLASTX. A análise de similaridade foi realizada com todos os SSRs presentes nas regiões dos QTLs de resistência identificados. Apenas os locos BMd_53 e CLP não participaram das análises de BLASTX, por terem sido desenvolvidos a partir da sequência do gene TIF2 de feijão.

SSR	Grupo de Ligação	QTL	E Value	Descrição
IAC76	B1	ALS2	2e-15	Amino acid/polyamine transporter I
IAC274	B2	ALS4	2e-05	PAA1 (metal-transporting P-type ATPase 1)
BM181	B3	ALS5	1e-19	hydrophobic protein, putative / low temperature response protein
IAC77	B3	ALS5	2e-21	MADS-box protein
BMd_53*	B5	ALS6	-	Translation initiation factor 2 (TIF2)
CLP**	B5	ALS6	-	Translation initiation factor 2 (TIF2)
IAC263	B7	ALS8	1e-14	RNA-directed DNA polymerase (Reverse transcriptase)
IAC262	B7	ALS8	2e-07	hypothetical protein RF2
IAC22	B8	ALS9	1e-16	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
IAC254	B8	ALS9	4e-26	phox (PX) domain-containing protein
IAC266	B8	ALS9	2e-07	fructose-6-phosphate 2-kinase
IAC55	B9	ALS10	8e-35	hypothetical protein RF2
BMd_22*	B11	ALS11	-	Cyclophilin

*Fonte: Blair et al., 2003.**Fonte:Guerra-Sanz, 2004

Com isso, novos locos de resistência a *P. griseola* puderam ser identificados, revelando novas fontes para estudos genéticos e de seleção assistida. No grupo B8, já havia sido identificado um loco de resistência à mancha angular, através do mapeamento do marcador SCAR SN02 na população BJ (Miklas(a) et al., 2006). O gene *Phg-2* se encontra ligado ao SN02, sendo derivado da variedade ‘México 54’ (Caixeta, 2002). Apesar do gene *Phg-2* já ter sido caracterizado na linhagem ‘AND 277’ (Caixeta, 2002), da qual a linhagem ‘CAL 143’ foi derivada, não há maiores evidências de que o ALS9 contém o gene *Phg-2*. Mais recentemente, no grupo B2 foi mapeado QTL de resistência à *P. griseola* na população ‘Carioca’/‘Flor de Maio’ (Hanai(b) et al., 2008). Este resultado é interessante uma vez que neste grupo já foram encontrados genes/QTLs de resistência para diversos patógenos de feijão, confirmando a existência de *clusters* contendo genes R.

Era esperado que os genes de resistência à mancha angular também fossem encontrados nestes *clusters* de genes de resistência, uma vez que são muito comuns em plantas e estão cada vez mais sendo verificados em feijão (Miklas(a,b) et al., 2006). No mapa consenso, é possível verificar este fato, sendo encontrados em todos os grupos de ligação (BIC - <http://www.css.msu.edu/bic/>). Desta forma, a identificação desses novos locos de resistência à mancha angular, distribuídos pelo genoma do feijão, corroboram com esta idéia. Inclusive, nos GL B2 e B7 foram encontrados QTLs tanto no experimento de campo, como em casa de vegetação, sugerindo uma ativação diferencial dos genes presentes nestes *clusters*, dependendo das condições de infecção pelo patógeno. Isto também pôde ser confirmado pelas condições de identificação dos SSRs similares aos genes TIF2 e RF2, citados anteriormente.

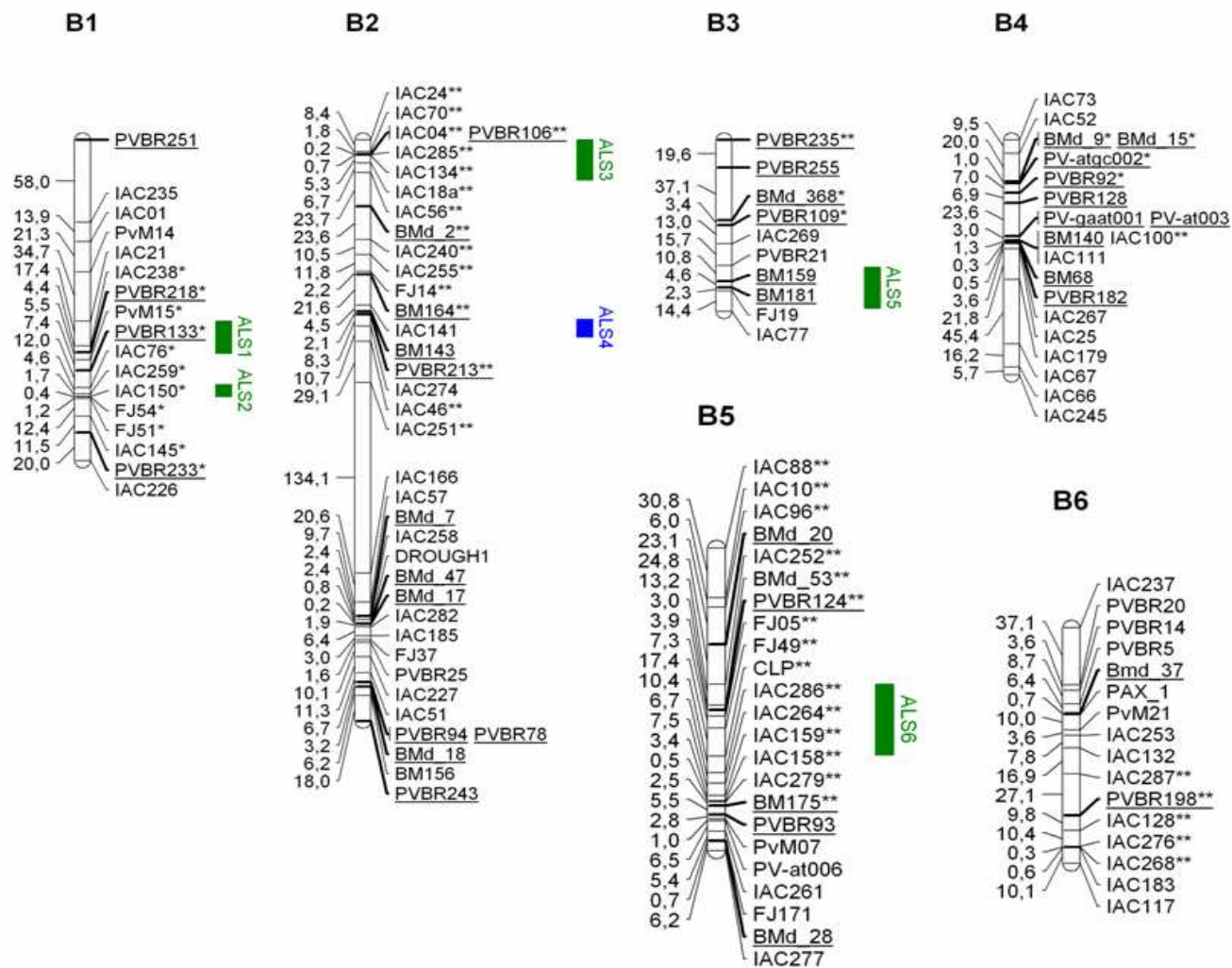


Figura 8 – Mapa genético UC mostrando a localização dos onze QTLs (ALS1 a ALS 11) encontrados para resistência à mancha angular. Os QTLs em verde (ALS1, ALS2, ALS3, ALS5, ALS6, ALS7, ALS11) são derivados do experimento de campo. Os QTLs em azul (ALS4, ALS8, ALS9, ALS10) são derivados dos experimentos em casa de vegetação (raça 60.54).

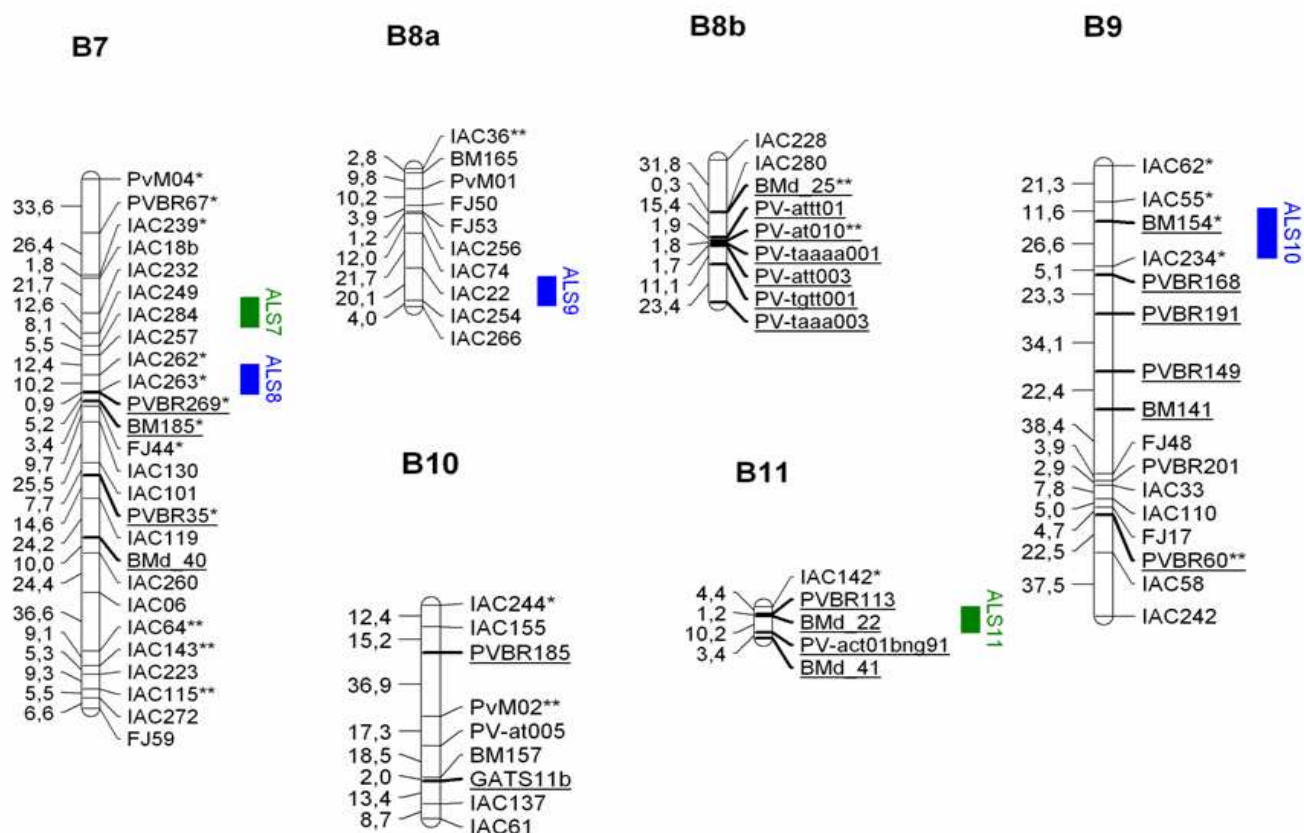


Figura 8 – Mapa genético UC mostrando a localização dos onze QTLs (ALS1 a ALS 11) encontrados para resistência à mancha angular. Os QTLs em verde (ALS1, ALS2, ALS3, ALS5, ALS6, ALS7, ALS11) são derivados do experimento de campo. Os QTLs em azul (ALS4, ALS8, ALS9, ALS10) são derivados dos experimentos em casa de vegetação (raça 60.54).

Estudos de identificação de genes de resistência são muito importantes no melhoramento de plantas, principalmente no caso do feijoeiro, no qual a incidência de doenças é um fator de grandes perdas na produtividade e qualidade dos grãos. Desta forma, o presente estudo irá contribuir para o melhoramento da cultura do feijoeiro, disponibilizando um maior número de marcadores moleculares ligados a genes de

resistência à mancha angular. Além disso, o presente trabalho também poderá contribuir para um maior entendimento das relações patógeno-hospedeiro, revelando um maior número de locos envolvidos na resistência à *P. griseola* até o momento, confirmando o caráter quantitativo da resistência.

CONCLUSÕES

- o A nova população de mapeamento ‘IAC-UNA’/‘CAL-143’ (UC) foi considerada representativa para a realização dos estudos de mapeamento de resistência à mancha angular. Sua utilização em estudos de outras características contrastantes, como antracnose e ferrugem também será possível.
- o Os marcadores microssatélites mostraram-se úteis na obtenção de mapas genéticos. O bom nível de polimorfismo e distribuição por todo o genoma, citada em outros trabalhos, foi confirmada. Desta forma, foi possível obter um mapa altamente saturado com poucos *gaps*.
- o Este estudo apresentou uma importante contribuição para o melhoramento e estudo do genoma do feijoeiro, praticamente dobrando o número de marcadores microssatélites com posição de mapa conhecida.
- o Um maior número de QTLs para resistência à mancha angular foi mapeado, confirmando padrão de herança poligênia de resistência para esta doença. Sendo um carácter quantitativo, a resistência à mancha angular sofre influencia do ambiente, o que pode ter levado à identificação de QTLs de pequeno efeito.
- o Apenas parte da variação fenotípica observada foi explicada, em ambos os experimentos fenotípicos. Outros QTLs, não encontrados neste trabalho, ainda devem ser identificados para que se explique toda a variação fenotípica.
- o Em função do carácter poligênico encontrado, há necessidade de novos experimentos de fenotipagem da resistência à mancha angular com repetições, que possibilitem isolar os efeitos ambientais dos efeitos genéticos, e melhorar a detecção do efeito genético para cada QTL detectado.

REFERÊNCIAS

- Adam-Blondon A., Sévignac M., Dron M. (1994) A Genetic Map of Common Bean to Localize Specific Resistance Genes Against Anthracnose. **Genome** 37:915-924.
- Aggarwal V.D., Pastor-Corrales M.A., Chirw R.M.A., Buruchara R.A. (2004) Andean beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with resistance to the angular leaf spot pathogen (*Phaeoisariopsis griseola*) in Southern and Eastern Africa. **Euphytica** 136:201-210.
- Alzate-Marin A.L., de Barros E.G., Moreira M.A. (1999) Co-evolution model of *Colletotrichum lindemuthianum* (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. **Genetics and Molecular Biology** 22:115-118.
- Alzate-Marin A.L., Cervigni G.D.L., Moreira M.A., Barros E.G. (2005) Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira** 30:333-342.
- Allorent D., Savary S. (2005) Epidemiological characteristics of angular leaf spot of bean: a systems analysis. **European Journal of Plant Pathology** 113(4): 329-341.
- Amaro G.B. (2006) Seleção recorrente fenotípica no feijoeiro visando à resistência a *Phaeoisariopsis griseola*. Tese de doutorado – Biblioteca Central da UFLA, Lavras.
- Amaro G.B., Abreu Â.F.B., Ramalho M.A.P., Silva F.B. (2007) Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains. **Genetics and Molecular Biology** 30(3):584-588.
- Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. (1999) Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **American Journal of Clinical Nutrition** 70: 464-474.
- Ariyaratne H.M., Coyne D.P., Jung G., Skroch P.W., Vidaver J.R., Steadman A.K., Miklas P.N., Basset M.J. (1999). Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. **Journal of the American Society of Horticultural Science** 124:654-662.
- Arumuganatham K. & Earle E.D. (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry **Plant Molecular Biology Report** 9(3):229-241.
- Arus P. & Moreno-González J. (1993) Marker-assisted selection. Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds) Plant breeding: Principles and Prospects. Plant breeding series, Chapman and Hall, Vol 1, pp 314–331
- Bai Y., Michaels T.E., Pauls K.P. (1997). Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Genome** 40:544-551.

Balbi B.P., Sanglard D.A., Damasceno J.D., Barros E.G., Moreira M.A. (2006) Seleção Assistida por Marcadores Moleculares na Obtenção de Genótipos de Feijoeiro Resistentes à Mancha Angular. **52º Congresso Brasileiro de Genética – SBG**.
Basset M.J. (1991). A revised linkage map of common bean. **HortScience** 26:834-836.

Basten C.J., Weir B.S., Zeng Z.B. (2005) QTL cartographer version 1.17: a reference manual and tutorial for QTL mapping. Raleigh, USA: North Carolina State University.

Bearzoti, E. (2000) Mapeamento de QTL. Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, pp. 340

Benchimol L.L., Campos T., Carbonell S.A.M., Colombo C., Chioratto A.F., Formighieri E.F., Gouvêa L.R.L., Souza A.P. (2007). 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** 3:1747-1762

Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society** 7(1):289-300.

Benjamini Y. & Yekutieli D. (2001) The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **Annual Report of Statistic** 29(4):1165-1188.

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

Billotte N., Lagoda P.J.L., Risterucci A.M., Baurens F.C. (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54:277-288.

Blair M.W., Pedraza F., Buedia H.F., Gaitán-Solís E., Beebe S.E., Gepts P., Tohme J. (2003) Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 107:1362-1374.

Blair(a) M.W., Giraldo M.C., Buendía H.F., Tovar E., Duque M.C., Beebe S.E. (2006) Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 113:100–109.

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

Blair M.W., Rodriguez P.L.M., Pedraza F., Morales F., Beebe S. (2007) Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 114(2): 261-271.

Blair M. W., Buendía H. F., Giraldo M. C., Métais I., Peltier D. (2008) Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 118:91–103.

Broughton W.J., Hernández G., Blair M.W., Beebe S. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant Soil** 252: 55-128.

Boung-Jun Oh, Ko M.K., Kim K.S., Kim Y.S., Lee H.H., Jeon W.B., Im K.H. (2003) Isolation of defense-related genes differentially expressed in the resistance interaction between pepper fruits and the anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecules and Cells** 15(3):349-355.

Borém, A. (1998) Melhoria de plantas. 2.ed. Viçosa: UFV, 453p.

Buso G.S.C., AMARAL Z.P.S., BRONDANI R.P.V., FERREIRA M.E. (2006) Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes** 6:252-254.

Busogoro J.P., Jijakli M.H., Lepoivre P. (1999) Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology** 105(6):559-569.

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics** 32:314-331.

Castelo A., Martins W., Gao G. (2002) TROLL - Tandem Repeat Occurrence Locator, Bioinformatics Journal.

Caixeta E.T. (2002) Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélite para regiões específicas do genoma do feijoeiro. Tese de Doutorado – UFV, Viçosa, pp.90

Caixeta E.T., Borém A., Fagundes S.A., Niestche S., Barros E.G., Moreira M.A. (2003) Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica** 134(3):297-303.

Caixeta E.T., Borém A., Kelly J.D. (2005) Development of microsatellite markers based on BAC common bean clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 5:125-133.

Campos T., Benchimol L.L., Carbonell S.A.M., Chioratto A.F., Formighieri E.F., Souza A. P. (2007) Microssatélites para estudos genéticos e programas de melhoria em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42(4):589-592.

Cardoso J.M.K., Oblessuc P.R., de Campos T., Sforça D.A., Carbonell S.A.M., Chioratto A.F., Formighieri E.F., Souza A. P., Benchimol L. L. (2008) New microsatellite markers

developed from an enriched microsatellite common bean library. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43(7):929-936.

Carneiro M.S. & Vieira M.L.C. (2002) Mapas genéticos em plantas. **Bragantia** 61(2):89-100.

Carvalho G.A., Paula T.J., Alzate-Marin A.L., Nietsche S., Barros E.G., Moreira M.A. (1998) Inheritance of resistance to angular leaf spot of common bean in AND 277 to race 63-23 of *Phaeoisariopsis griseola* and identification of a RAPD marker linked to the resistance gene. **Phytopathology Brazil** 23:482-485.

Checa O. E. & Blair M. W. (2008) Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biomedical and Life Sciences** 22(2):201-215.

Creste S., Tulmann A., Figueira A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter** 19:299-306.

Corrêa V. (1987) Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaseolus vulgaris* (Sacc.) Ferr. East Lansing. Tese de Doutorado, Michigan state University, Michigan, pp.102

Corrêa R.X., Pedro I.V., Oliveira, M.L.P., Nietsche S., Moreira M., Barros E. G. (2001) Herança da resistência a mancha angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira** 26(1):27-32.

Crous P.W., Liebenberg M.M., Braun U., Groenewald J.Z. (2006) Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology** 55: 163–173.

Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. (1996) The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. **Science** 272:1334-1336.

David L.S., Scott L.S., Stephen C. R. (1993). An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. **BioTechniques** 15(4):580-582.

Drescher A., Ruf S., Calsa T., Carrer H., Bock R. (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. **Plant Journal** 22:97-104.

Embrapa Arroz e Feijão - <http://www.cnpaf.embrapa.br>

Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** 8:175-185.

Falconer D.S. & Macka, T.F.C. (1996). Introduction to Quantitative Genetics. London: Longman Scientific e Technical, pp. 464.

Faleiro F.G., Ragagnin V.A., Schuster I., Corrêa R.X., Good-God P.I., Brommonshenkel S.H., Moreira M.A., Barros E.G. (2003) Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 28:59-66.

Faleiro F.G., Ragagnin V.A., Moreira M.A., Barros E.G. (2004) Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica** 138:213-218.

Ferreira M.E. & Grattapaglia, D. (1995) Introdução ao uso de marcadores RAPD, RFLP em análise genética. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN, pp. 220.

Ferreira M. E. & Grattapaglia D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp. 220.

Ferreira C.F., Borém A., Carvalho G.A., Nietsche S., Paula T.J., Barros E.G., Moreira M.A. (2000) Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science** 40:1130-1133.

Flint-Garcia S.A. & Thornsberry J.M. (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Reviews in Plant Biology** 54:357-374.

Frei A., Blair M.W., Cardona C., Beebe S.E., Gu H., Dorn S. (2005) QTL mapping of resistance to *Thrips palmi* Karny in common bean. **Crop Science** 45:379-387.

Freire C.N.S., Silva K.J.D., Souza E.A. (2006) Compatibilidade vegetativa entre raças de *Phaseolisariopsis griseola*. 52º Congresso Brasileiro de Genética – SBG.

Freyre C.I., Skroch P., Geffroy V., Adam-Blondon A.F., Shirmohamadali A., Johnson W., Llac V., Nodari R., Pereira P., Tsai S.M., Tohme J., Dron M., Nienhuis J., Vallejos C., Gepts P. (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics** 97:847-856.

Gaitán-Solís E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002) Microsatellite in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in - *Phaseolus* ssp. **Crop Science** 42: 2128-2136.

Garcia AAF, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO, Souza Jr. CL, Souza AP (2004) Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology** 27:579-588.

Gepts P. (1988). Phaseolin as an evolutionary markers. Genetics Resources Domestication and Evolution of *Phaseolus* beans. Kluwer, Dordrecht, pp.320.

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

Gepts P, Moore P.H., Ming R., Delmer D.P. (2008) Genomics of tropical crop plants. Cap: Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the Tropics, vol.1, pp. 581.

Glazebrook J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 43:205-27.

Grattapaglia D. & Sederoff R. (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics** 137: 1121-1137.

Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. (2006). An introduction to genetic analysis. New York: W. H. Freeman, pp. 720

Grisi M.C.M., Blair M.W., Gepts P., Brondani C., Pereira P.A.A., Brondani R.P.V. (2007) Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Research** 6(3):691-706.

Guerra-Sanz, J.M. (2004). New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. **Plant Breeding** 123:87-89.

Glazebrook J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 43:205–27

Guo X., Castillo-Ramírez S., González V., Bustos P., Fernández-Vázquez J.L., Santamaría R.I., Arellano J., Cevallos M.A., Dávila G. (2007) Rapid evolutionary change of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) plastome, and the genomic diversification of legume chloroplasts. **Genomics** 8:228-304.

Guzmán P., Gepts P., Temple S., Mkandawire A.B.C., Gilbertson R.L. (1999) Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease** 83:37-42.

Haldane J.B.S. (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics** 8:299-309.

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., Tsai S.M., Vieira M.L.C. (2007) Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome** 50(3):266-277.

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

Hanai(b) L.R., Santini L., Melo L.C., Santos J.B., Camargo L.E.A., Vieira, M.L.C. (2008) Mapeamento de QTL Aassociados à Mancha Angular e ao Oídio em Feijão com Base em um Mapa de Ligação Enriquecido com Marcadores RGA. **Resumos do IX Conafe** - Congresso Nacional de Feijão, Campinas, SP.

Hoisington D., Khairallah M., González-de-León D. (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Huang X. & Madan A. (1999) CAP3: A DNA assembly program. **Genome Research** 868-877.

Jansen R.C. (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics** 135:205-211.

Jansen R.C. & Stam P. High (1994) Resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics** 136:1447-1455.

Jesus Júnior W.C., Vale F.X.R., Coelho R.R., Hau B., Zambolin L., Costa L.C., Bergamin Filho A. (2001) Effects of angular spot and rust on yield loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology** 92(11):1045-1053.

Jiang C. & Zeng Z.B. (1995) Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics** 140:1111-1127.

Jones J.D.G. & Dangl J.L. (2006) The plant immune system. **Nature** 444:323-329.

Jung G., Coyne D.P., Skroch P., Nienhuis J., Bokosi J.M., Steadman J.R. (1996) RAPD marker linked to a gene for specific rust resistance in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative** 39:59-60.

Kao C.H., Zeng Z.-B., Teasdale R. (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics** 152:1203-1216.

Kelly J.D. & Miklas P.N. (1998) The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding** 4(1): 1-11.

Kelly J.D., Gepts P., Miklas P.N., Coyne D.P. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crop Research** 82(2-3):135-154.

Kimani J.M., Kimani P.M., Githiri S.M., Kimenju J.W. (2007) Mode of inheritance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) traits for tolerance to low soil. **Euphytica** 115: 225-234.

Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distances from recombinant values. **Annals of Eugenics** 12:172-175.

Kwak M., Velasco D., Gepts P. (2008) Mapping Homologous Sequences for Determinacy and Photoperiod Sensitivity in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Heredity** 99(3):283-291.

Landegren U., Nilsson M., Kwok P.Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. **Genome Research** 8:769–776.

Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. (1987) Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics** 1:174-181.

Lander E.S. & Botstein D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121:185-199.

Lee M. (1995) DNA markers and plant breeding program. *Advances in Agronomy*, New York, pp. 450.

Lincoln S.E., Daly M.J., Lander E.S. (1992) **Constructing genetic maps with Mapmaker Exp 3.0**. Cambridge: Whitehead Institute for Biometrical Research, 230p.

Liu B. H. (1998) **Statistical Genomics**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.630.

Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H., Schnable P.S. (2001) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. **Plant Cell** 13:1063-1078.

Lynch M. & Walsh B. (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 980.

López C.E., Acosta I.F., Jara C., Pedraza F., Gaitán-Solís E., Gallego G., Beebe S., Tohme J. (2003) Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology** 93:88-95.

Mahuku G.S., Jara C., Cajiao C., Beebe S. (2003) Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection. **Euphytica** 130(3):303-313.

Maxwell J.J., Brick M.A., Byrne P.F., Schwartz H.F., Shan X., Ogg J.B., Hensen R.A. (2007) Quantitative Trait Loci Linked to White Mold Resistance in Common Bean. **Crop Breeding & Genetics** 47:2285-2294.

Melo C.L.P., Ragagnin V.A., Arruda K.M.A., Barros E.G., Carneiro P.C.S., T.J. Paula-Júnior, Moreira M.A., Carneiro J.E.S. (2008) Caracterização fenotípica e molecular de genitores de feijão tipo carioca quanto à resistência a patógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43(4):495-504.

Melotto M. & Kelly J.D. (2001) Fine mapping of the *Co-4* locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics** 103(4):508-517.

Melotto M., Monteiro-Vitorello C.B., Bruschi A.G., Camargo L.E.A. (2005) Comparative bioinformatic analysis of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome** 48:562-570.

Métais I., Hamon B., Jalouzot R., Peltier D. (2002) Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics** 104:1346-1352.

Metzgar M., Bytof J., Wills C. (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research** 10:72-80.

Meurer J., Lezhneva L., Amann K., Gödel M., Bezhani S., Sherameti I., Oelmüller R. (2002) A peptide chain release factor 2 affects the stability of UGA-containing transcripts in *Arabidopsis* chloroplasts. **The Plant Cell** 14:3255-3269.

Miklas P.N., Stavely J.R., Kelly J.D. (1993) Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics** 85(6):745-749.

Miklas P.N. (2002). Marker assisted selection for disease resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 2002:1-3.

Miklas P.N., Coyne D.P., Grafton K.F., Mutlu N., Reiser J., Lindgren D.T., Singh S.P. (2003) A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana **Euphytica** 131(1):137-146.

Miklas(a) P.N. , Kelly J.D. , Beebe S.E., Blair M.W. (2006) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica** 147(1-2):105-131.

Miklas(b) P.N., Hu J., Grunwald N.J., Larsen K.M. (2006) Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science** 46:910-916.

Missiaggia A.A. & Grattapaglia D. (2006) Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research** 5(1):72-78.

Monda E.O., Sanders F.E., Hick A. (2001) Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology** 50:103-110.

Morgante M., Hanafey M., Powell W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics** 30:194-200.

Mullis K. & Fallona F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology** 55:335-350.

Murray J., Larsen J., Michaels T.E., Schaafsma A., Vallejos C.E., Pauls K.P. (2002) Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. **Genome** 45:1013–1024.

Murphy R.W., Sites J.W.Jr., Buth D.G., Haufler C.H. (1990) Proteins I: isozyme electrophoresis. Molecular Systematics. Sunderland: Sinauer Associates, 45-126p.

Mutlu N., Miklas P.N., Coyne D.P. (2006) Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. **Molecular Breeding** 17(2):127-135.

Namayanja A., Buruchara R., Mahuku G., Rubaihayo P., Kimani P., Mayanja S., Eyedu H. (2006). Enheritance of resistance to angular leaf spot in common bean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection outside the mapping population. **Euphytica** 151(3):361-369.

Nelson J. C. (1997) QGENE: Software for marker-based genome analysis and breeding. **Molecular Breeding** 3:239-245.

Nietsche, S. (2000) Mancha-angular do feijoeiro-comum: variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de resistência. Tese de Doutorado – Biblioteca Central da UFV, Viçosa, pp. 98

Nietsche S., Borem A., Alzate-Marin A.L., Costa M., Cipriano R.R., Teixeira E.C., Gonçalves E.B., Alves M.M. (2002) Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa phytopatológica** 28(4):331-335.

Nodari R.O., Tsai S.M., Gilbertson R.L., Gepts P. (1993) Towards an integrated map of common bean-2: development of a RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics** 85:513-520.

O'Donnell K.H., Chen C.T., Wensink C. (1994) Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha1 tubulin gene. **Molecular and Cell Biology** 14:6398-6408.

Oetting W.S., Lee H.K., Flanders D.J., Wiesner G.L. (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics** 30:450-458.

Oliveira E. J., Alzate-Marin A.L., Borém A., Melo C.L.P., Barros E. G., Moreira M.A. (2004) Reações de Cultivares de Feijão Comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 29(2):220-223.

Oliveira E.J., Alzate-Marin A.L., Borem A., Azeredo Fagundes S., Barros E.G., Moreira M.A. (2005) Molecular marker-assisted selection for development of common bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding** 124:572-575.

Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I.; Vencovsky R., Vieira M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 29(2):294-307.

Orozco C. S., Fernández A.C.M. (2004) Pathogenic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Costa Rica. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative** 47:233-234.

Pastor-Corrales M.A. & Jará C.E. (1995) La evolución de *Phaseolus vulgaris* con el frijol común en America Latina. **Fitopatologia Colombiana** 19:15-24.

Pastor-Corrales M.A., Jara C.E., Singh S. (1998) Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica** 103(2):161-171.

Paula-Junior T. J. & Zambolim L. (1998) **Feijão**: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa: Editora UFV, pp. 520

Paula-Junior T. J., Vieira R. F., Zambolim L. (2004) Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário** 25(223):99-112.

Poland J.A., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J., Pratt R.C., Nelson R.J. (2008) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Review. **Trends in Plant Science**.

Rabiner L.R. (1989) A tutorial on hidden Markov models and selected applications inspeech recognition. Proceedings of the IEEE, pp. 340.

Ragagnin V.A., Alzate-Marin A.L., Souza T.L.P.O., Arruda K.M.A., Morreira M.A., Barros E.G. (2003) Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 28(6):591-596.

Reis-Prado F.G. (2006) Reaction of common bean cultivars to angular leaf spot in the greenhouse. **Fitopatologia Brasileira** 31(3):306-309.

Remington D.L., Thornsberry J.M., Matsuoka Y., Wilson L.M., Whitt S.R., Doebley J., Kresovich S., Goodman M.M., Buckler E.S. (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **The National Academy of Sciences** 98(20):11479-11484.

Richards A.J. (1997). Plant Breeding Systems. London: Stanley Thornes Pub, 529p.

Roberts J.K., Pryor A. (1995) Isolation of a flax (*Linum usitatissimum*) gene induced during susceptible infection by flax rust. **The Plant Journal** 8(1):1-8.

Rodrigues T.B. & Santos J.B. (2006). Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. **Genetics and Molecular Biology** 29(2):345-352

Sabadin P.K., Souza Júnior C.L., Souza A.P., Garcia A.A.F. (2008) QTL mapping for yield components in a tropical maize population using microsatellite markers. **Hereditas** 145:194-203.

Sanglard D.A., Robeiro C.A.G., Balbi B.P., Sanglard N.A., Barros E.G., Moreira M.A. (2008) Piramidação de genes de resistência à mancha angular em feijão tipo carioca com auxílio de marcadores moleculares. **Resumos do IX Conafe** - Congresso Nacional de Feijão, Campinas, SP.

Sartorato A., Rava C.A., Menten J.M., Bergamin Filho A. (1991) Resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isoriopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 16:43-46.

Sartorato A., Nietsche S., Barros E. G., Moreira M. A. (1999) SCAR marker linked to angular leaf spot resistance gene in common bean. **Bean Improvement Cooperative Annual Report** 42:22-24.

Sartorato A., Nietsche S., Barros E. G., Moreira M. A. (2000) RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira** 25:637-642.

Sartorato A. (2002) Identification of *Phaeoisariopsis griseola* Pathotypes in five States in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 27(1): 78-81.

Sartorato A. (2004) Pathogenic Variability and Genetic Diversity of *Phaeoisariopsis griseola* Isolates from Two Counties in the State of Goiás, Brazil. **Journal of Phytopathology** 152:385.

Sartorato A. & Alzate-Marin A.L. (2004) Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 47:235-237.

Sartorato A. (2006) New sources of resistance to angular leaf spot on common bean **Fitopatologia Brasileira** 31(2): 92-194.

Seattler A.W. & Correa-Victoria, F.J. (1983). Angular leaf spot in seed fields of Michigan red kidney beans. **Michigan Dry Bean Dig** 8:2-3.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18:233-234.

Schlötterer C. & Tautz D. (1992). Slippage synthesis of sample sequence DNA. **Nucleic Acids Research** 20:211-215.

Schuster I. & Cruz C.D. (2004) Estatística genômica – Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados. Universidade Federal de Viçosa, pp. 568.

Schwartz H.F., Pastor-Corrales M.A., Singh S.P. (1982). New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica** 31:741-754.

Silva G.F., Santos J.B., Magno A.P.R. (2003) 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.

Silva K.J.D., Souza E.A., Sartorato A., C.N.S. Freire (2008) Pathogenic Variability of Isolates of *Pseudocercospora griseola*, the Cause of Common Bean Angular. **Journal of Phytopathology** 156(10):602-606.

Singh SP (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. **Crop Science** 41(6):1659-1675.

Singh R.J. (2005) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: grain legumes. Cap: Landmark research in grain legumes, pp. 390.

Syvanen A.C. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Review Genetics** 2:930–942

Stam P. (1993) Construction of integrated genetic maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal** 3:739-744.

Stenglein S., Ploper L.D., Vizgarra O., Balatti P. (2003). Angular Leaf Spot: A Disease Caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 52, pp. 414.

TAIR - *The Arabidopsis Information Resource*. <http://www.arabidopsis.org/>

Talbot D.R., Adang M.J., Slighton J.L., Hall T.C. (1984) Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular and General Genetic** 198:42-49.

Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research** 17:6463-6471.

Teixeira F.F. (2004) Mapeamento de QTLs para Caracteres do Feijoeiro por meio de Microsatélites. Tese de Doutorado – Biblioteca Central UFLA, Lavras.

Tian J., Venkatachalam P., Liao H., Yan X., Raghothama K. (2007) Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biomedical and Life Sciences** 227(1): 151-165.

Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research** 10:967-981.

Tsai S.M., Nodari R.O., Moon D.H., Camargo L.E.A., Vencovsky R., Gepts P. (1998) QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil** 204(1): 135-145.

Vallejos C.E., Sakiyama N.S., Chase C.D. (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics** 131:733-740.

Vayda M.E. & Webster C. (1998) A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. Cap: Translational regulation during periods of environmental stress, pp.180.

Vieira R.F., Cardoso C., Mosquim E.J.B.N. (1998) Foliar application of Molybdenum in common bean: II. nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of low fertility. **Journal of Plant Nutrition** 21(10):2141-2151.

Vieira R.F., Vieira C., Pinto C.M.F., Rodrigues O.L. (2002) Comportamento de cultivares de feijão tipo manteigão em Minas Gerais – III. **Ceres** 49(281):29-39.

Vignal A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics and Selective Evolution** 34:275-305

Voorrips R.E. (2002). MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **The Journal of Heredity** 93:77-78.

Xu Y & Crouch JH (2008) Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. **Crop Science** 48:391-407.

Xu S. (2008) Quantitative Trait Locus Mapping Can Benefit From Segregation Distortion. **Genetics** 180:2201-2208.

Yamanaka N., Watanabe S., Toda K., Hayashi M., Fuchigami H., Takahashi R., Harada K. (2005) Fine mapping of the FT1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line. **Theoretical and Applied Genetics** 110: 634–639.

Wang S., Basten C.J., Zeng Z.B. (2005). Windows QTL Cartographer ver. 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Wagara N., Mwang'ombe A.W., Kimenju J.W., Buruchara R.A., Jamnadass R., Majiwa O. (2004) Genetic Diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as Revealed by AFLP and Group-specific Primers. **Journal of Phytopathology** 152(4):235–242.

Weber R.D. & May P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetics** 44:388-396.

Weeks D.E. & Lange K. (1987) Preliminary ranking procedures for multilocus ordering. **Genomics** 1(3):236-42.

Welsh J. & McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers **Nucleic Acids Research** 18:(24)7213-7218.

Williams J.K.F., Kubelik A.R., Livak K.G., Rafalki J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18:6531-6535.

Wilson S.R. & Rao D.C. (1988) A major simplification in the preliminary ordering of linked loci. **Genetic Epidemiology** 5(2):75-80.

Yan X., Liao H., Beebe S. E., Blair M. W., Lynch J. P. (2004) QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. **Plant and Soil** 265(1):17-29.

Yaish & Perez de la Vega (2003) Isolation of (GA)_n Microsatellite Sequences and Description of a Predicted MADS-box Sequence Isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Biology** 26(3):337-342.

Young N. D. (1996) QTL Mapping and Quantitative Disease Resistance in Plants. **Annual Review of Phytopathology** 34: 479-501 .

Yu K., Park S.J., Poysa V. (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vigna*). **Genome** 42:27-34.

Yu K., Park S.J., Poysa V., Gepts P. (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity** 91:429-434.

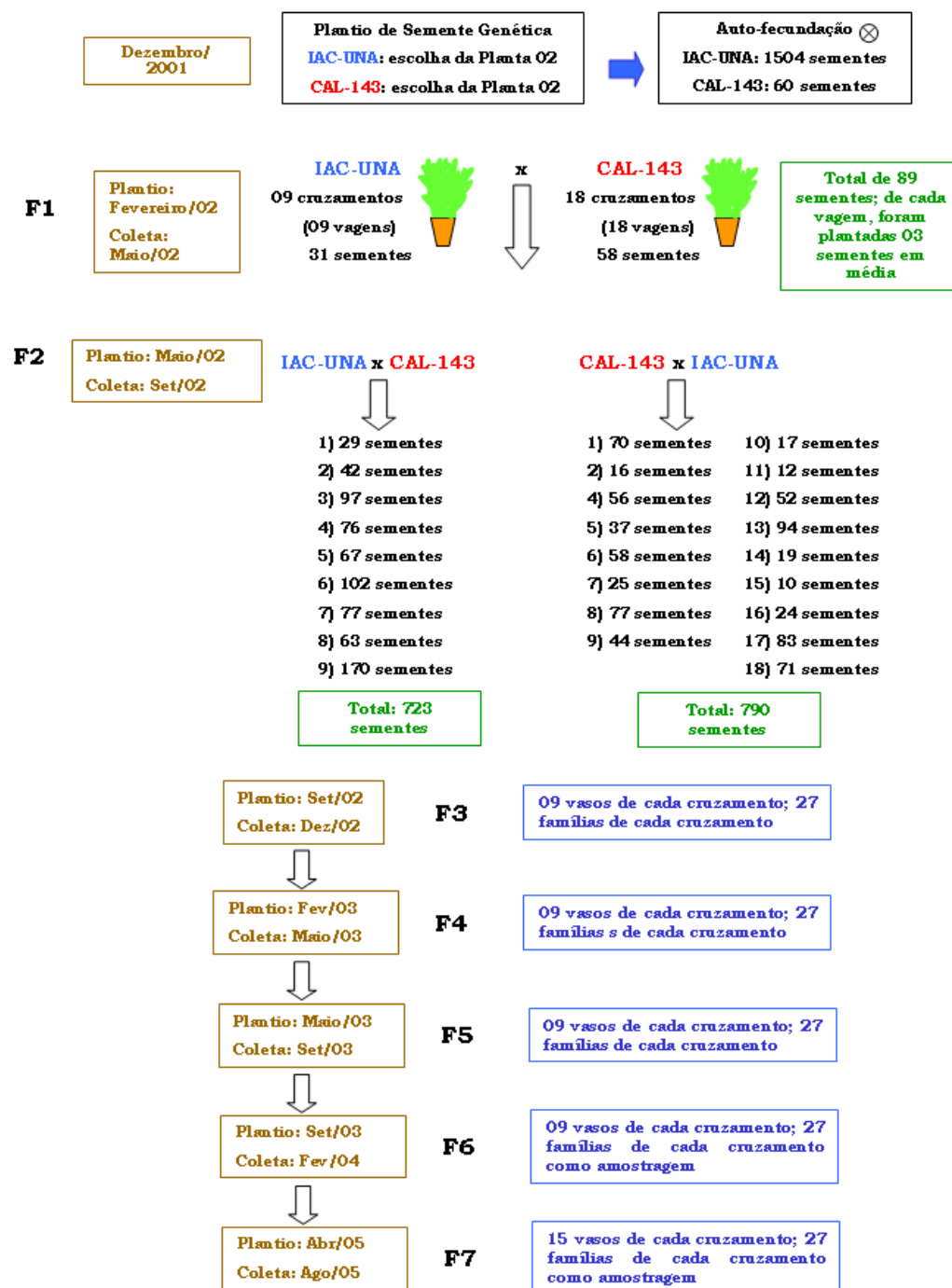
Zabeau M., Vos P. (1993) Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Office Munich**, Germany

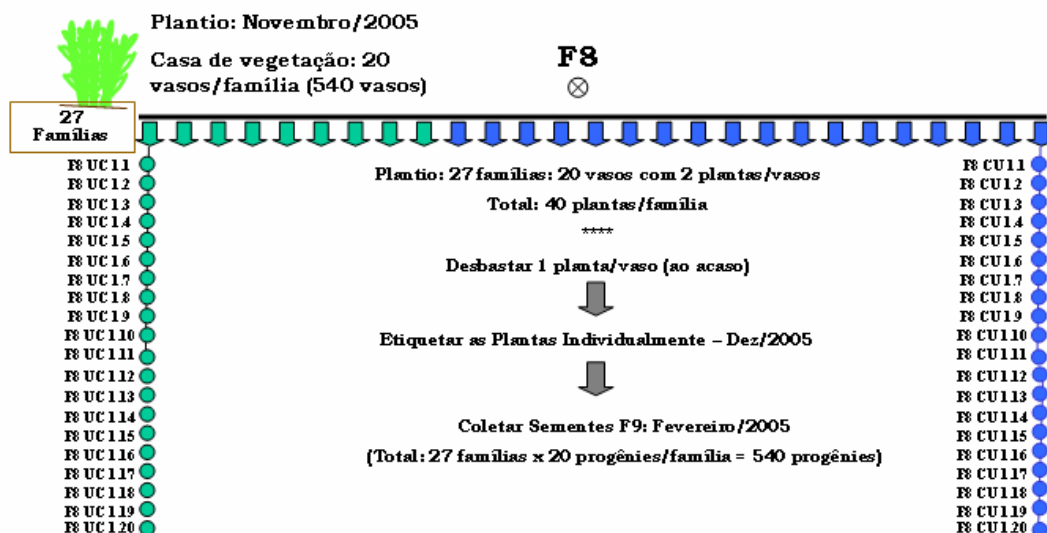
Zeng Z.B. (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 90(23):10972-10976.

Zeng Z.B. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** 136:1457-1466.

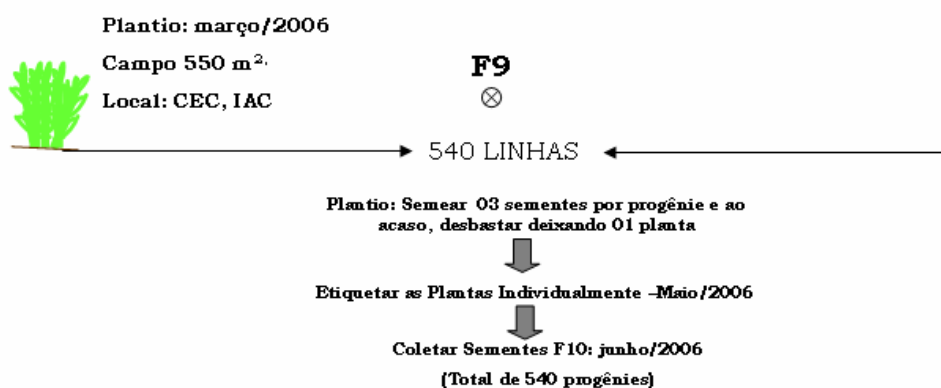
Zeng Z.B., Kao C.H., Basten C.J. (1999) Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **General Research** 74:279-289.

ANEXO 1 – Esquema de obtenção da população de mapeamento segregante ‘IAC-UNA’ / ‘CAL 143’





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





Plantio: Junho/2006

Campo: 270 m² - 1 linha de 4
m por 0,5 m por progênie

F10



540 LINHAS

Plantio: Semear 15 sementes por progênie em 1 metro
Deixar somente 10 plantas/progênie ou linha : Julho/2006

H0 UC11
H0 UC12
H0 UC13
H0 UC14
H0 UC15
H0 UC16
H0 UC17
H0 UC18
H0 UC19
H0 UC110

15
sementes

Coletar folhas destas 10 plantas por linha em *Bulk* - Agosto/2006

Coletar sementes de todas as plantas de cada progênie F10 em

Bulk: Setembro/2006

Sementes F11

H0 CU11
H0 CU12
H0 CU13
H0 CU14
H0 CU15
H0 CU16
H0 CU17
H0 CU18
H0 CU19
H0 CU110

15
sementes

F11



SEMENTES PARA ENSAIOS FENOTÍPICOS

EM CÂMARA DE INOCULAÇÃO, DE PRODUÇÃO, COLETA DE
FOLHAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA, ETC

ANEXO 2 – Tabela dos 65 SSRs não publicados, utilizados na produção do mapa genético UC.

Nome SSR	Seqüências dos <i>primers</i> (Direto/Reverso)	Ta	Motivo	Tamanho do produto (pb)
SSR-IAC223	GTGGCACCTGGAATAAGACAAC ACAAATGCTCACTCACCAAATC	TD	(AG)15	214
SSR-IAC224	ATTATGGATTTAGGGTAGGTGA GCTTGACAATTGGAAGTGG	TD	(TC)13	116
SSR-IAC226	TTTTTCTCGTTTTACTTTTATCTG TACTGATTTATTTCTTCCACTTC	60	(TG)8	150
SSR-IAC227	GGATCTGTGCCTTCTCTGTG TTCCATATCCCCAAAACCTT	45	(AG)18	135
SSR-IAC228	CAAATTTTTGCTTGAAGTAT TTCTCTCCTCAAATGTAACCTAAC	60	(CA)6	203
SSR-IAC229	CCTAAGGATGAACCACTCTAATA ACCCTTGCATGTGTTGTTT	60	(CA)7	198
SSR-IAC230	GGATTCGGCATTGATAGAC AGAGAAGAAATTAGGGAGAACAG	60	(CT)6	188
SSR-IAC231	TGCATTTTGAAAGGACAGAT ACCAGGCATAGGTAGGACA	60	(TA)7A(AG)16	246
SSR-IAC232	GGTTTGCATTCTTCATTTATTT ACCCATTCCCAGACTTCC	60	(TG)6(TA)5	241
SSR-IAC233	GGCAACTCTAAGGCAATCC CGAAGAATGTCAGAGAAATAAAC	60	(GT)9(TA)7	271
SSR-IAC234	GACCGTTAAAATGGAATCAGTT TGCCTATGTTTATGTGCTTGTT	60	(TC)5	258
SSR-IAC235	TTCAGCATGCATATTCAAGTGT GGCTCCCAGGCATAGTTCT	60	(TA)10	253
SSR-IAC236	TCTTCCTCTTCCTCTTCCTCTA TCTGATGTGGCAACGATAAAAT	60	(CT)12	170
SSR-IAC237	TGAAAGGCCACAACGACAAGT GCACCCAATCTCCCACAAA	60	(GT)2AT (TG)5	155

SSR-IAC238	GAGATAGATCATAGACCCCAA CTTTCAATTTTAACTCATCCTC	60	(AG)18	233
SSR-IAC239	AAAGAAAAAGTGGGGAAAGA GCTCATGCAAAAATAGACTCA	60	(AG)15	247
SSR-IAC240	TGAATGTATGAGATTTTCGTAGTTA ATTTTATTAGTGGCATTGTCCT	60	(CT)10	213
SSR-IAC241	AATGTGGCTATGATGGAAGAGG AAGAGAATGGGGGAAAAGGAG	60	(TC)8	151
SSR-IAC242	ATGAGATGCGAGGATTTTTTAT GGATGGGTAAGAAGGCTGAA	60	(CA)5	242
SSR-IAC243	GCTGGTGAGGCTTGTTGA AATTGACCTTGATCTTCTTAG	60	(AT)2(GT)3	145
SSR-IAC244	CGCGTTGTATTGCAGTAAAGAA AACTCCGTGGAACCCTGTGAT	60	(TC)9	192
SSR-IAC245	TAGGCCATCATCATTCAAGTTTG GGTTGCCCTCATAGTCATCAC	60	(AT)2(GT)3	185
SSR-IAC246	TTCCCTTCATGGTCAACA CAGTAACTACAGATCAGCACAC	60	(AG)10	225
SSR-IAC247	TGGATGAGACGGCTTTT CTAGATACATTCTTGTCTTCAGT	TD	(AT)3(GT)3AT (GT)4	210
SSR-IAC248	TTATAAGTTTACATCAGTTTGGTT AGAATCAGGCCTTGCTTGT	TD	(GT)2GC(GT)4	286
SSR-IAC249	TTTATGAGTGGTCGAAGTGAAC AAGGGGAGGGTATTAGACAGT	60	(AG)9	227
SSR-IAC250	TATCTAGATCTTTGCCCTTGAA CATTGCCTGTATTGTTTGAA	60	(GT)4AT(GT)3	238
SSR-IAC251	AAGTCTTGCCCTTTTTGTTTAT TTTTTGGCTAAGTTGGTCC	45	(AC)11 (AT)12	278
SSR-IAC252	AATGAATTCGCAACTGTC GTGGCTAAGATGAAGAACAT	60	(GA)5	303

SSR-IAC253	GTTCGGTCGGGGATGGA TTAGACGGCTACTGGCAAAGAG	60	(GA)10	218
SSR-IAC254	TTGGGTTTTATGTTTTCTGTGA CCATATCTTGTTGTGCCTTGAC	60	(TG)6	245
SSR-IAC255	TTACAATTCACAACAACAGAGA TTAAGAGAAAATGAAGGATGAG	60	(AG)23	148
SSR-IAC256	TATTTTATTAGTGGCATTGTCC TGAGAGATCCTGTAGAAGTAGTAGT	60	(GA)9	156
SSR-IAC257	GCAACTGAAAGGCTAAGATT TATTGGAAAATATGGGAGAA	60	(GT)8	300
SSR-IAC258	CATTGTCGGTGTCTGGAGAAGTC CCCACGCTCTTGTTGCTGTC	60	(GT)7	175
SSR-IAC259	TATATGCCTGCACCACTGTAAC GAAAATCCGGAAACTCAAGAA	45	(TC)11	241
SSR-IAC260	TGAACAGTGCAGCAGTAACAA CACCAGACACCAATCATCAA	60	(AG)9	119
SSR-IAC261	TTCCCAAACACCACACCTAAGT TCACCGCGCACGAGATAA	60	(AC)8	260
SSR-IAC262	ATATCGTTTGATATCCTTACACA CAAACACTGGTTCACATCTCAC	60	(GT)9	243
SSR-IAC263	TGCAATTGACAAAAAGTTCGTA TGTATGATAGGCCTCCACCA	60	(AC)9	156
SSR-IAC264	TGGGATCTGTGCCTTCTC TTCCATATCCCCAAAACCTT	45	(GA)15	125
SSR-IAC265	GTAGGTTTGTGTGCGTGC GGAAAGAAAGTTAAGATTGAGT	60	(TG)5	245
SSR-IAC266	TTGAGGATGTAGATTATTTTGGT CATCATTTGTGCAGTTACCAG	60	(TA)5(TG)8	269
SSR-IAC267	TGAGTGAACCAGCATAATCTAA CACCCGGTTGAAAATACA	51,4	(CT)15	139

SSR-IAC268	ATGTAGATCTGGTAAGGAGTGAA AATTAGATTAGTCAAGAAACAAAAC	60	(TC)9	190
SSR-IAC269	TGCGCCACTGTTTCGTATT ACCCAACCCAGGACTTCAC	60	(AC)6	145
SSR-IAC270	ATGTGTTTAGCAAGGATGGTCT GCTGATTGCTGTAACGAAC	60	(TG)6	214
SSR-IAC271	GATTTTCTTTTCTTCCCTCAA TGCTTCCATTCCATCAA	49	(CA)7	227
SSR-IAC272	TAACTGAACAGGCTAAAAGAAC TGATGAGACTAAAAATGACACTT	60	(CA)6	210
SSR-IAC274	TCTACACATAACTGCCCTGAAC AACACTGCCACAATAAAGAAA	60	(TG)7	200
SSR-IAC275	AGCAACTCATAGCACTTCTG TGAGTAATTCATTGTCTGTCCT	56	(TA)3G (AC)6	255
SSR-IAC276	AAGCCCAAGCCCAAACCG CACCACCAAGACCCGATTGAG	60	(GAA)4AND (GT)7	249
SSR-IAC277	ATGGAAGGCTGCAATACATCAG CAGCGACGGTGCTTACTGG	60	(AGAAAA)2 A(AC)6	286
SSR-IAC278	TCTGTCAGTTTAGCTTCGTCAC CCGTTGGAGGGTCGTTAC	60	(CT)2TT(CT)3 GT(CT)10	191
SSR-IAC279	CAATACCACAAAACGCAA CATTATGATTAAATTCTGGTGT	56	(TG)6	220
SSR-IAC280	ACTCCTGGCAAAAATCTCG GCAAAACCTCCATGAAGACAG	56	(TTGA)3	141
SSR-IAC281	AGTCCAGGCAGAGCAAGCAAG CGCATTTCATCTCATCCATTATCC	56	(GT)9T(ATGC A)2	189
SSR-IAC282	CTCTTGGTACGCGTGGACTAC CGCCTATGTTGGGTTGAGATG	56	(CCT)2T(CAA) 2T(CA)3	234
SSR-IAC283	GAACTCATTCCCCTCTCC GCAGCTCCTCCATTCTAC	60	(TTA)7	208

SSR-IAC284	AAGGAGAAAATAAAAATCACAGTC GTTTCGAGGTTATTGGGGA	54	(CT)3TT(CT)5 AND(CT)13	240
SSR-IAC285	ACCTAGATGGATTTGTGACC GTCTAGTTTTACGCATTCATTC	56	(AT)11(TG)11 (TA)6(AG)7	204
SSR-IAC286	TTGTTCTGAGGACTGGATGTAT TCGGTTGATTTTTCGTTTTA	60	(TC)18TTAAA AACTG(TTTG A)2	181
SSR-IAC287	ACAACGTTAGAAAGGGAAGG GAAAAAAGCGAGAAAAAGAGT	56	(GA)13	179
SSR-IAC288	TCCCGTGAGTTACAAATAG ATCACCACCTCCTCTCCAG	56	(ATTT)4	182

ANEXO 3 – Gráficos dos valores de LOD encontrados pela análise de CIM para identificação dos QTLs de resistência à mancha angular, para todos os grupos de ligação do mapa UC.

