

**ANA PAULA SIMPLÍCIO MOTA**

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES SSR E STS LIGADOS AO GENE  
*Co-4* DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO-COMUM**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

**Dr. Helton Santos Pereira**

Coorientador:

**Dr. Thiago Lívio P. O. de Souza**

Goiânia, GO – Brasil

2015

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Leidamar Simplício, que através do seu honesto e árduo trabalho, não mediu esforços para que meus sonhos fossem realizados, sem, no entanto, usufruir das mesmas oportunidades.

Com o amor de sempre, ofereço!

Ao meu avô Sebastião José Simplício (*in memoriam*).

Com muito carinho e saudades, dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me proporcionou, especialmente a força e proteção, que me permitiram alcançar tantos objetivos.

À minha mãe, Leidamar Simplício, pelo amor incondicional e por acreditar nas minhas escolhas. As palavras são incapazes de expressar minha gratidão por tudo o que ela fez para que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós, Ana Maria de Sousa e Sebastião Simplício, pelo amor que me proporcionaram e participação ativa na minha educação.

Ao meu namorado Rodrigo Branquinho, pelo carinho, companheirismo e incentivo. Adicionalmente, pelo auxílio em parte das análises estatísticas.

Aos meus amigos, José Henrique Tenório, Kelly Gonçalves e Mariana Elias, por estarem sempre presentes.

À Universidade Federal de Goiás, em particular à Escola de Agronomia e à Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Embrapa Arroz e Feijão, pela excelente infraestrutura e equipe, que possibilitaram o desenvolvimento desse estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, indispensável para a condução do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus orientadores, Dr. Helton Santos Pereira e Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza, pelos ensinamentos, paciência e importante contribuição na minha formação profissional.

Ao colega Jorge Cieslak, pelo trabalho dedicado que resultou no desenvolvimento dos marcadores moleculares utilizados nesta pesquisa.

À equipe de pesquisa do programa de melhoramento de feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão. Em especial aos funcionários: Antônio Cosmo, Marco Antônio de Ataídes, José Simião, Ronair Pereira, Lázaro Cunha e Luana Rodrigues, pelo apoio inestimável nos trabalhos conduzidos em laboratório e casa de vegetação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFG, por ministrarem tão dedicadamente as disciplinas do curso. Particularmente ao

Dr. Alexandre Coelho pelos valiosos ensinamentos acerca das análises estatísticas utilizadas nesse estudo.

Ao amigo e colega Haroldo Rodrigues pelo apoio na tradução do resumo.

Aos colegas do programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (UFG), pelos momentos de estudos e descontração compartilhados. De uma forma especial, ao Elias Emanuel Mota, Paulo Henrique Guimarães e Stela Cristina Valdo pelo fortalecimento nos laços de amizade.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	5
	<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1	A CULTURA DO FEJJOEIRO-COMUM.....	10
2.2	MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEJJOEIRO-COMUM.....	11
2.3	ANTRACNOSE.....	12
<b>2.3.1</b>	<b>Considerações gerais</b> .....	12
<b>2.3.2</b>	<b>Variabilidade patogênica e fontes de resistência</b> .....	13
2.4	MARCADORES MOLECULARES.....	17
2.5	MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE.....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1	MATERIAL GENÉTICO.....	26
3.2	INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	27
3.3	INOCULAÇÃO DO PATÓGENO E AVALIAÇÕES DA DOENÇA.....	28
<b>3.3.1</b>	<b>Preparação do inóculo</b> .....	28
<b>3.3.2</b>	<b>Inoculação e avaliações</b> .....	29
3.4	ANÁLISES MOLECULARES.....	30
<b>3.4.1</b>	<b>Extração e quantificação do DNA genômico</b> .....	32
<b>3.4.2</b>	<b>Análise de bulks segregantes</b> .....	33
<b>3.4.3</b>	<b>Genotipagem dos marcadores STS, SSR e SCAR dominantes</b> .....	33
<b>3.4.4</b>	<b>Genotipagem dos marcadores STS, SSR e SCAR codominantes</b> .....	34
<b>3.4.5</b>	<b>Análise de especificidade dos marcadores</b> .....	34
3.5	ANÁLISES GENÉTICO-ESTATÍSTICAS.....	35
<b>3.5.1</b>	<b>Teste de Qui-quadrado (<math>\chi^2</math>)</b> .....	35
<b>3.5.2</b>	<b>Análise de ligação, mapeamento físico e eficiência de seleção</b> .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
4.1	HERANÇA DA RESISTÊNCIA.....	38
4.2	CO-SEGREGAÇÃO ENTRE MARCADORES MOLECULARES E O ALELO <i>Co-4<sup>2</sup></i> .....	40
4.3	EFICIÊNCIA DE SELEÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES.....	46
4.4	ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES MOLECULARES.....	48
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52

## RESUMO

MOTA, A. P. S. **Validação de marcadores moleculares ligados ao gene *Co-4* de resistência à antracnose do feijoeiro-comum.** 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2015<sup>1</sup>.

O objetivo desse estudo foi validar marcadores moleculares ligados ao gene *Co-4*, em particular ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>, que confere ampla resistência à antracnose do feijoeiro-comum. Para isso, foram avaliados 261 indivíduos F<sub>2</sub> e 197 progênies F<sub>2:3</sub>, provenientes de cruzamentos entre SEL 1308 (portadora do alelo *Co-4*<sup>2</sup>) e BRS Cometa. Os estudos de herança dos dados fenotípicos demonstraram que a resistência de SEL 1308 à raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* é monogênica com dominância completa. Ao todo, foram analisados 15 marcadores, sendo dez STS (Sítios Marcados por Sequências) e dois SSR (Sequências simples repetidas), identificados por Cieslak (2014), e três SCAR (Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências) previamente relatados na literatura. Destes, 13 foram polimórficos entre os genitores e segregaram nas proporções esperadas para as populações analisadas (3:1 e 1:2:1). Dentre os marcadores ligados em fase de repulsão, seis STS (P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2 e P8286-V3) co-segregaram a uma distância de 2,64 cM do alelo *Co-4*<sup>2</sup> e a 0,0 cM entre si. No que se refere aos marcadores SCAR, constatou-se que todos estão ligados em fase de acoplamento ao *Co-4*<sup>2</sup> a distâncias que variaram de 2,93 cM (SAS13) a 6,42 cM (SH18). Dos marcadores codominantes, o STS P8286-V6 foi mapeado mais proximamente do alelo *Co-4*<sup>2</sup>, a uma distância de 2,58 cM. Dessa forma, os marcadores STS mencionados, P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3 e P8286-V6, constituem excelentes ferramentas para a seleção indireta de linhagens resistentes à antracnose, visto que apresentaram as maiores estimativas de eficiência de seleção e alto poder de detecção de plantas portadoras dos diferentes alelos do gene *Co-4*. Contudo, somente o SCAR SH18, desenvolvido por Awale & Kelly (2001), possibilitou a discriminação específica do alelo *Co-4*<sup>2</sup>, apesar de apresentar baixa eficiência de seleção (85%). Diante disso, recomenda-se a utilização combinada ou sequencial dos marcadores P8286-V6 e SH18 para seleção do *Co-4*<sup>2</sup> em detrimento dos demais alelos do gene *Co-4* que estejam segregando na população. Para populações nas quais somente o alelo *Co-4*<sup>2</sup> está presente, sugere-se a utilização apenas do marcador P8286-V6, que se destaca por ser codominante e fortemente associado ao alelo de resistência. Do ponto de vista prático, os marcadores moleculares validados neste estudo demonstraram grande potencial para utilização no desenvolvimento de linhagens-elite de feijoeiro-comum, por serem acessíveis a laboratórios com diferentes níveis de infraestrutura e altamente eficientes no monitoramento de genótipos portadores do loco *Co-4*.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris* L., doenças do feijoeiro-comum, análise de co-segregação.

---

<sup>1</sup> Orientador: Dr. Helton Santos Pereira; Coorientador: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Arroz e Feijão/ PPGMP -UFG.

## ABSTRACT

MOTA, A. P. S. **Validation of molecular markers linked to the *Co-4* resistance gene to anthracnose in common bean.** 2015. 67 f. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding). School of Agronomy, Federal University of Goiás, 2015<sup>2</sup>.

The aim of this study was to validate molecular markers linked to the *Co-4*, in particular the *Co-4*<sup>2</sup> allele that confers a broad resistance to anthracnose in common bean. For this, we evaluated 261 F<sub>2</sub> individuals and 197 F<sub>2:3</sub> progenies coming from crosses between SEL 1308 (carrier of the *Co-4*<sup>2</sup> allele) and BRS Cometa. The inheritance study showed that resistance SEL 1308 to race 73 is monogenic with complete dominance. We analyzed 15 markers, ten STS (Sequence-Tagged Sites) and two SSR (Simple Sequence Repeats), identified by Cieslak (2014), and three SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) previously reported in the literature. Of these, 13 were polymorphic between parents and segregated in the expected proportions for the populations analyzed (3:1 and 1:2:1). Among the markers linked in repulsion phase, six STS (P8283-V1, V1-P8284, P8285-V2, V1-P8286, P8286 and P8286-V2-V3) co-segregated at a distance of 2.64 cM from the *Co-4*<sup>2</sup> allele and 0,0 cM apart. In turn, the STS-P8286 V6, was the codominant marker most strongly bound to the *Co-4*<sup>2</sup> allele at a distance of 2.58 cM and 99% selection efficiency. As regards the SCAR markers, it was found that all are linked in the phase of coupling to the *Co-4*<sup>2</sup> at distances ranging from 2.93 cm (SAS13) at 6.42 cm (SH18). Thus, the mentioned STS markers, P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3 and P8286-V6, are excellent tools for indirect selection of lines resistant to anthracnose, since that presented highest selection efficiency estimates and high power of detection of plants carriers of different alleles of the *Co-4* gene. However, only the SCAR SH18, developed by Awale & Kelly (2001), has provided a specific discrimination of the *Co-4*<sup>2</sup> allele, despite low selection efficiency (85%). Therefore, it is recommended that the combined or sequential use of P8286-V6 and SH18 markers for selection *Co-4*<sup>2</sup> in detriment of other alleles of the *Co-4* gene that are segregating in the population. For populations in which only the *Co-4*<sup>2</sup> allele is present, it is suggested to use only the P8286-V6 marker, which stands out for being codominant and strongly associated with the resistance allele. From a practical point of view, the molecular markers validated in this study demonstrated great potential of use in the development of anthracnose resistant lines, being affordable to laboratories with different levels of infrastructure and highly efficient in monitoring of genotypes carriers of loco *Co-4*.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris* L., diseases of common bean, analysis of co-segregation.

---

<sup>2</sup> Advisers: Dr. Helton Santos Pereira and Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Rice and Bean/ PPGMP-UFG.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das espécies vegetais de maior importância agrônômica no mundo, em virtude de sua ampla utilização na alimentação humana, sobretudo em países da África e América Latina. A importância socioeconômica do feijoeiro-comum é inquestionável, pois seus grãos constituem fonte básica de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, considerados essenciais à dieta humana (Hefni et al., 2010). Entretanto, a produção dessa cultura é fortemente afetada por fatores bióticos e abióticos, com destaque ao ataque de patógenos. Como consequência da alta incidência de doenças, grandes reduções de produtividade e qualidade de grãos são reportadas em todo o mundo (Broughton et al., 2003; Gepts et al., 2008; Singh, 2010).

Dentre as 45 doenças relatadas para o feijoeiro-comum, a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), é uma das mais destrutivas que acometem a cultura. Até o momento, mais de 100 raças fisiológicas já foram identificadas em todo o mundo, sendo que aproximadamente 71 delas possuem ocorrência no Brasil (Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Talamini et al., 2004; Damasceno e Silva et al., 2007; Gonçalves-Vidigal et al., 2008b; Ishikawa et al., 2008; Bonett et al., 2008; Sansigolo et al., 2008; Abud et al., 2011; Felipein-Azevedo et al., 2014). Dada sua ampla distribuição e diversidade de patótipos, perdas significativas na produção são constatadas, sobretudo pela utilização de cultivares suscetíveis em regiões que favorecem o desenvolvimento fungo. Diante dessa situação, fica evidente que o controle desse patógeno deve ser realizado de forma integrada, empregando-se diferentes estratégias. Para o manejo integrado da antracnose, as medidas comumente utilizadas incluem a utilização de sementes sadias, rotação de culturas, aplicação de fungicidas e resistência genética. Dos métodos mencionados, a utilização de cultivares resistentes destaca-se pela sua eficiência, fácil utilização, baixo custo e menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana.

Atualmente, estão descritos 12 genes de resistência à antracnose do feijoeiro-comum, designados como *Co-* (*Co-1* a *Co-14*), de acordo com a nomenclatura proposta por Kelly & Young (1996). Ressalta-se dos genes de resistência descritos na literatura, o alelo



*Co-4*<sup>2</sup>, que tem recebido maior atenção da comunidade científica, por conferir resistência a um amplo espectro de raças incidentes no Brasil, incluindo as raças 73, mais amplamente distribuída, e 2047, que apresenta a maior virulência (Borges et al., 2012).

O desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose é um processo dinâmico, e, periodicamente, os genótipos precisam ser substituídos devido ao surgimento de novas raças. Assim, os programas de piramidação constituem estratégias muito recomendadas para introgridir vários alelos de resistência em um único genótipo, de modo a aumentar a durabilidade da resistência ao patógeno (Hittalmani et al., 2000; Costa, 2007).

Os métodos convencionais de melhoramento não têm sido eficiente nos programas de piramidação, principalmente em razão de interações epistáticas que comprometem o reconhecimento preciso dos genes de interesse e da alta demanda de inoculações. Em função disso, marcadores moleculares vêm sendo identificados para monitorar a piramidação de genes de resistência à doenças, reduzindo mão de obra e tempo necessários para a condução de programas de melhoramento (Bernado, 2008; Xu & Crouch, 2008). Quando fortemente ligados aos genes de resistência, esses marcadores apresentam alta eficiência de seleção e, assim, reduzem sobremaneira a quantidade de ações para a seleção de genótipos portadores das combinações alélicas mais promissoras.

Entre os marcadores moleculares disponíveis para o alelo *Co-4*<sup>2</sup>, destaca-se o marcador SCAR (Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências) SAS13, por ser amplamente utilizado em programas de melhoramento para monitorar genótipos resistentes à antracnose e descrito como mais proximamente ligado a *Co-4*<sup>2</sup> (Young et al., 1998; Garzón et al., 2008; Dongfang et al., 2008). Entretanto, é necessário esclarecer que, apesar deste marcador ser eficiente na seleção de genótipos superiores comparativamente aos demais, possui a desvantagem de ser dominante e não permitir a identificação de alelos específicos, por estar ligado a outros alelos do gene *Co-4*.

Recentemente, Cieslak (2014) caracterizou regiões genômicas que flanqueiam o gene *Co-4* e identificou novos marcadores candidatos, visando o desenvolvimento de ferramentas de SAM mais eficientes para o alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Assim, para obter diferentes classes de marcadores que atendam demandas de laboratórios com diferentes níveis de infraestrutura, foram identificados marcadores STS (Sítios marcados por sequências), SSR (Sequências Simples Repetidas) e SNP (Polimorfismos de base única).

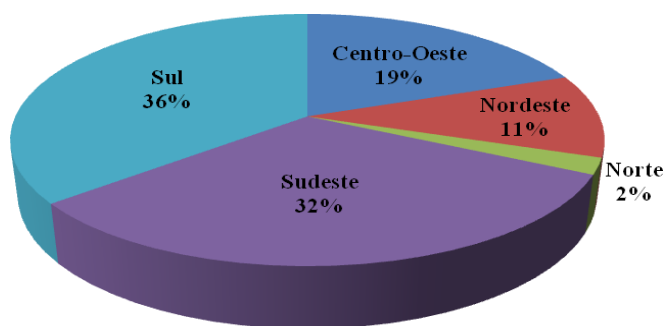
Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: (i) aferir a herança da resistência à antracnose (raça 73 de *C. lindemuthianum*) na variedade diferenciadora SEL 1308, portadora do alelo *Co-4*<sup>2</sup>, estudando populações segregantes F<sub>2</sub> e F<sub>2:3</sub> derivadas do cruzamento entre BRS Cometa e SEL 1308; e (ii) validar marcadores moleculares STS e SSR associados ao gene *Co-4* por meio de análises de co-segregação e ligação gênica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO-COMUM

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie da Família Fabaceae, amplamente utilizada para o consumo humano em virtude do elevado valor nutritivo dos grãos, que são fontes de vitaminas, fibras, proteínas e minerais (Montoya et al., 2010). Em países da África e da América Latina, o feijão representa a fonte de proteína mais acessível à população e, por isso, é a mais consumida diariamente (Broughton et al., 2003). No Brasil, o feijão contribui com cerca de 20% do total de proteínas consumidas. Esse é um dos motivos que explica o fato do país estar entre as nações que mais cultivam e consomem feijão (FAO, 2014).

Além da sua importância na alimentação, o cultivo do feijoeiro-comum tem um papel de destaque no agronegócio brasileiro. De acordo com estimativas da Embrapa Arroz e Feijão (2015), na safra de 2013 foram colhidas 2.564.790 toneladas do grão, com produtividade média de 1.353 kg ha<sup>-1</sup>, sendo as regiões Sul e Sudeste responsáveis por 68% da produção (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição da produção de feijão por região no Brasil em 2013. Fonte: Embrapa Arroz e Feijão (2015).

Apesar do Brasil ser um dos principais países produtores de feijão, ocupando papel de destaque no cenário mundial, a produtividade média nacional está muito aquém do potencial produtivo esperado, de 4.000 kg ha<sup>-1</sup> (Del Peloso & Melo, 2005). Os fatores

que mais contribuem para as baixas produtividades observadas incluem: alta incidência de doenças e pragas, baixa utilização de sementes certificadas, cultivos em condições climáticas adversas e deficiências nutricionais. Contudo, para minimizar os efeitos negativos de fatores bióticos que interferem na produção de feijão, grandes esforços têm sido dedicados, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de cultivares superiores para diversos caracteres agronômicos.

## 2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO-COMUM

Os objetivos que compõem os programas de melhoramento genético do feijoeiro-comum compreendem estudos que visam: escurecimento e endurecimento tardios de grãos (Alvares, 2015); biofortificação (Rios, 2009); tolerância a estresse hídrico (Aguiar et al., 2008; Beebe et al., 2013); eficiência na absorção de nutrientes (Fageria, 1998); e eficiência de fixação simbiótica de nitrogênio (Alcântara et al., 2009). Além disso, em função das exigências do mercado, produtividade de grãos e resistência a doenças ainda são considerados objetivos principais dos programas de melhoramento da cultura.

Estima-se que 45 doenças podem incidir em plantios de feijoeiro-comum, sendo que 15 delas são causadoras de danos severos (Costa, 2007). Dentre essas, a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), certamente merece destaque, por provocar grandes perdas em lavouras de todo o mundo. Perdas de até 100% têm sido reportadas, sobretudo quando são utilizadas sementes de cultivares suscetíveis em regiões que prevalecem temperaturas moderadas e umidades relativas altas (Singh & Schwartz, 2010).

As estratégias empregadas no controle de doenças incluem a utilização de sementes sadias, eliminação de restos culturais, rotação de culturas, controle químico e resistência genética. Contudo, a resistência genética destaca-se entre as demais táticas de controle integrado de doenças, por constituir a estratégia mais eficiente, que, além de não onerar despesas orçamentárias, não oferece riscos ao meio ambiente e à saúde pública. Assim, tal abordagem é particularmente interessante no controle de *C. lindemuthianum*, devido à sua ampla variabilidade de patótipos e disseminação em diversas áreas produtoras de feijão (Alzate-Marin et al., 2005; Chiorato et al., 2006).

## 2.3 ANTRACNOSE

### 2.3.1 Considerações gerais

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) pertence à classe dos Deuteromicetos, ordem Melanconiales e família Melanconiaceae (Kimati, 1980). Durante o processo reprodutivo do patógeno são observadas duas fases distintas, sendo uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita. Curiosamente, a fase perfeita correspondente à *Glomerella cingulata*, raramente se desenvolve em condições de campo, porém, é responsável por conferir alta variabilidade ao patógeno, devido às diferentes combinações alélicas, resultantes de mutações (Darben, 2010).

Segundo Markell et al. (2013), quando a infecção se manifesta, os sintomas são mais reconhecíveis nas folhas, onde aparecem lesões de cor marrom-escura que acompanham as nervuras (Figura 2A). Nas vagens, apresentam-se como cancos deprimidos e arredondados com cerca de 1/8 polegadas de diâmetro, com margens delimitadas por um fino anel marrom-avermelhado (Figura 2B). Em sementes infectadas, inicialmente aparecem sintomas de enrugamento, que evoluem para cancos pretos ou marrom-escuros (Figura 2C). Se forem infectadas no final do desenvolvimento das plantas, geralmente não são manifestados sintomas visíveis, e, por esta razão, as sementes sem lesões aparentes colhidas a partir de um campo com antracnose nunca devem utilizadas para plantio.



**Figura 2.** Sintomas de antracnose em feijoeiro-comum: A) folha; B) vagem; C) Semente. Fonte: Ricardo Balardin (2012).

As condições que favorecem a infecção pelo fungo compreendem temperaturas entre 13 e 17°C e período de molhamento foliar entre 18 e 14 horas. Esses dois aspectos

são importantes, no entanto, o molhamento foliar é considerado essencial, visto que o meio líquido promove a dissolução da camada mucilaginosa que envolve os conídios e os dissemina (Canteri et al., 1999). Portanto, chuvas moderadas sobre restos culturais contaminados, principalmente acompanhadas de ventos, proporcionam ampla disseminação do fungo (Pastor-Corrales & Tu, 1989). Em função da sua alta capacidade de transmissão, vários estudos evidenciam que, em condições favoráveis, o surgimento dos sintomas já ocorre no sexto dia após a infecção (Kimati et al., 1997).

Conforme salientam Markell et al. (2013), a principal forma de transmissão da antracnose acontece por meio de sementes contaminadas. Em decorrência disso, as práticas de controle mais adotadas são: i) utilização de sementes sadias (Schwartz et al., 1982); ii) rotação de culturas com plantas não hospedeiras do patógeno (Pádua, 2013); iii) tratamento químico de sementes; iv) aplicações foliares de fungicidas (Mohammed et al. 2013); e vi) utilização de cultivares resistentes (Alzate-Marin et al., 2005). Contudo, no que diz respeito ao manejo, é oportuno mencionar que a maioria dos pequenos produtores não utiliza sementes sadias para plantio e raramente faz o controle químico da doença. Por outro lado, embora a ampla variabilidade do fungo represente um desafio, a resistência genética, seguramente, é uma boa alternativa para minimizar tal problema, pois há uma ampla variabilidade de genes de resistência às principais raças de *C. lindemuthianum* no germoplasma de feijoeiro-comum (Chiorato et al., 2006).

### **2.3.2 Variabilidade patogênica e fontes de resistência**

No que diz respeito ao desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes à antracnose, grandes esforços têm sido dedicados por parte dos melhoristas de feijoeiro-comum de todo o mundo. No entanto, o sucesso do programa de melhoramento depende dos níveis de variabilidade das populações do fungo dentro e entre populações (Rodríguez-Guerra et al., 2003). Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na ampla diversidade de raças e patogenicidade de *C. lindemuthianum*, tais como anastomose de conídios, ciclo sexual e parasexual e mutações causadas por elementos transponíveis (*transposons*) (Nogueira et al., 2013).

Diversos estudos já foram realizados com a finalidade de identificar raças de antracnose. Os primeiros trabalhos que apontam existência de variabilidade em *C.*

*lindemuthianum* foram realizados nos Estados Unidos por Barrus (1911, 1918), nos quais foram identificadas as raças alfa e beta. Posteriormente, outros autores relataram a existência de várias raças em diferentes países (Burkholder, 1923; Schreiber, 1934; Yerkes, 1958). Até o momento, mais de 100 raças diferentes foram descritas para este patógeno.

No que concerne à identificação de raças, é fundamental dispor de estratégias eficientes, em virtude da alta variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum*. Até a década de 90, os estudos foram baseados na utilização de apenas três cultivares diferenciadoras (Michelite, Perry Marrow e Michigan Dark Red Kidney), tornando os resultados pouco confiáveis e, por conseguinte, os programas de melhoramento menos eficientes (Paradela Filho et al., 1991). Contudo, para padronizar a identificação e nomenclatura das raças, uma série diferenciadora foi proposta por Pastor-Corrales (1991). A série reúne 12 cultivares portadoras de um ou mais genes de resistência (Tabela 1).

**Tabela 1.** Série de variedades diferenciadoras para *Coletotrichum lindemuthianum* proposta por Pastor-Corrales (1991).

Cultivar diferenciadora	Genes do hospedeiro	Pool gênico	Nomenclatura binária
Michelite	-	MA <sup>1</sup>	1
Michigan Dark Red Kidney	<i>Co-1</i>	A <sup>2</sup>	2
Perry Marrow	<i>Co-1</i> <sup>3</sup>	A	4
Cornell 49242	<i>Co-2</i>	MA	8
Widusa	-	MA	16
Kaboon	<i>Co-1</i> <sup>2</sup>	A	32
Mexico 222	<i>Co-3</i>	MA	64
PI 207262	<i>Co-4</i> <sup>3</sup> , <i>Co-9</i>	MA	128
TO	<i>Co-4</i>	MA	256
TU	<i>Co-5</i>	MA	512
AB 136	<i>Co-6</i> , <i>Co-8</i>	MA	1024
G 2333	<i>Co-4</i> <sup>2</sup> , <i>Co-5</i> , <i>Co-7</i>	MA	2048

<sup>1</sup>Mesoamericano, <sup>2</sup>Andino.

Em decorrência das condições climáticas favoráveis ao agente causal da antracnose, no Brasil já foram identificadas 71 raças, sendo que as mais frequentes são a

65, 73 e 81 (Balardin et al., 1990; Damasceno et al., 2007). Estudos realizados por Alzate-Marín & Sartorato (2004) demonstraram que o Estado do Paraná contribui com a maior variabilidade de raças de *C. lindemuthianum* (29 raças), seguido por Goiás (17 raças), Santa Catarina (16 raças) e Rio Grande do Sul (14 raças).

Com relação ao tipo de herança, em feijoeiro-comum, a resistência à antracnose pode ser monogênica dominante, ou seja, controlada por genes de herança simples (Gonçalves-Vidigal & Kelly, 2006; Gonçalves-Vidigal et al., 2008a, 2009; Mendoza et al., 2001; Young & Kelly, 1996); oligogênica, governada por genes dominantes independentes (Campa et al., 2009); genes complementares com interação epistática (Alzate-Marín et al., 1997; Muhalet et al., 1981; Del Peloso et al., 1989); ou por múltiplos genes de efeito menor ou secundário (Vallejo & Kelly, 2009). Alzate-Marín et al., (1997) também relatam a existência de um gene recessivo de herança simples (*Co-8*) controlando a resistência a *C. lindemuthianum*. De forma geral, o que se observa é que a resistência à antracnose apresenta padrões de herança condicionados por poucos genes e pouco afetados pelo efeito ambiental, favorecendo sua transferência para cultivares-elite. Em contrapartida, sua variabilidade patogênica representa um grande desafio para o desenvolvimento de linhagens resistentes. Nesse sentido, a identificação de variadas fontes de resistência e compreensão dos padrões de herança são fatores imprescindíveis para definir estratégias de seleção de genótipos superiores.

A resistência do feijoeiro-comum à antracnose é relacionada com a presença de genes multialélicos, que em grande parte dos casos apresentam herança dominante. Atualmente, 12 genes foram caracterizados e descritos na BIC (Bean Improvement Cooperative), dos quais quatro possuem série alélica: *Co-1*, *Co-1<sup>2</sup>*, *Co-1<sup>3</sup>*, *Co-1<sup>4</sup>* e *Co-1<sup>5</sup>* (Melotto & Kelly, 2000; Alzate-Marín et al., 2003a; Gonçalves-Vidigal & Kelly, 2006); *Co-2* (Mastenbroek, 1960); *Co-3*, *Co-3<sup>2</sup>*, *Co-3<sup>3</sup>*, *Co-3<sup>4</sup>* (Bannerot, 1965; Rodríguez-Suárez et al., 2004; Mendez-Vigo et al., 2005; Gonçalves-Vidigal et al., 2013); *Co-4*, *Co-4<sup>2</sup>*, *Co-4<sup>3</sup>* (Young et al., 1998; Alzate-Marín et al., 2002); *Co-5*, *Co-5<sup>2</sup>* (Fouilloy, 1978; Vallejo & Kelly, 2009); *Co-6* (Schwartz et al., 1982); *Co-7* (Young et al., 1998); *Co-8* (Alzate-Marín et al., 1997); *Co-11* (Gonçalves-Vidigal et al., 2007); *Co-12* (Gonçalves-Vidigal et al., 2008a); *Co-13* (Gonçalves-Vidigal et al., 2009) e *Co-14* (Gonçalves-Vidigal et al., 2012).



Dentre os alelos já identificados, *Co-3<sup>4</sup>* (*Co-10*), *Co-4<sup>2</sup>*, *Co-5* e *Co-6* certamente merecem destaque (Rava et al., 1994; Pereira et al., 2004; Silva et al., 2007a; Beraldo, 2007, Gonçalves-Vidigal 2013). No entanto, Silva et al. (2007a) e Pereira et al. (2004) asseguram que genótipos portadores do alelo *Co-4<sup>2</sup>* são considerados mais promissores para utilização em programas de melhoramento de feijão, por conferir resistência a todas as raças identificadas no Brasil. De fato, até o momento não se têm relatos de que a resistência conferida por este alelo tenha sido quebrada. Balardin & Kelly (1998) demonstraram que SEL 1308 (portadora do *Co-4<sup>2</sup>*) confere resistência a diversas raças do patógeno, incluindo os patótipos 73 e 2047, que são descritos como o mais amplamente distribuído e mais virulento, respectivamente. É oportuno salientar que a interação entre o alelo *Co-4<sup>2</sup>* e a raça 73 resulta na formação de lesões necróticas no tecido foliar do feijoeiro, o que caracteriza uma reação de hipersensibilidade e resposta imune contra *C. lindemuthianum* (Oblessuc et al., 2012). Essa interação é conhecida como gene-para-gene.

Para Ragagnin et al. (2003), a introgressão de vários genes de resistência conjuntamente em uma cultivar-elite (piramidação) é a estratégia mais recomendada para obtenção de cultivares resistentes à antracnose, pois considera a ampla variabilidade do fungo, viabilizando o programa de melhoramento. A principal dificuldade na condução de um programa de piramidação consiste na identificação dos genes de resistência para cada genótipo. Esta etapa envolve inúmeras inoculações e pode inviabilizar o programa devido à alta demanda de tempo e recursos financeiros. Além disso, enfrenta-se o problema da possibilidade de expressões de genes específicos serem mascaradas por interações epistáticas, que acontecem devido à existência de inúmeros genes controlando a expressão de um fenótipo (Ferreira et al., 2011).

Assim, marcadores moleculares constituem técnicas eficazes para obtenção de ganhos genéticos expressivos no processo de introgressão conjunta de genes de interesse. A incorporação deste método permite o monitoramento da piramidação com maior eficiência e menores custos, por promover reduções nas quantidades de inoculações de patógenos. Ademais, convém ressaltar, que grande parte das classes de marcadores é pouco afetada por fatores ambientais e possíveis interações gênicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Dadas as questões apresentadas, a adoção de ferramentas moleculares tem se

tornado cada vez mais útil e presente no melhoramento do feijoeiro-comum, principalmente no que diz respeito à obtenção de cultivares resistentes a doenças.

## 2.4 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares constituem um conjunto de técnicas para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise genética em plantas. São sequências de DNA provenientes de genes expressos, como as isoenzimas, entretanto, estas marcas também podem estar relacionadas a regiões não expressas do genoma. Adicionalmente, quando se verifica que o seu comportamento está de acordo com as leis básicas da herança mendeliana, um marcador molecular também pode ser denominado de marcador genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os polimorfismos referentes aos marcadores podem ocorrer devido a rearranjos de segmentos, deleções, inserções, inversões ou translocações ocorridas nas fitas de DNA. Entretanto, é a forma de detecção do polimorfismo que caracteriza e diferencia os tipos de marcadores moleculares (Hanai, 2008; Borém & Caixeta, 2009).

As principais vantagens do uso de marcadores moleculares são: i) obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; ii) baixa influência de variações ambientais; e iii) utilização em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Além desses aspectos, quando os marcadores são codominantes há possibilidade de gerar maior informação por marcador polimórfico, o que os tornam adequados para diversos tipos de análise genética, incluindo estudos relativos à divergência e diversidade genética, construção de mapas de ligação, testes de paternidade e seleção assistida por marcadores (Faleiro, 2007). Neste sentido, os marcadores atuam como ferramentas úteis nas diversas etapas do desenvolvimento de genótipos superiores de feijoeiro-comum, pois oportunizam a seleção de genitores contrastantes para os genes de interesse (pré-melhoramento), fornecem maior poder na discriminação de linhagens (melhoramento) e certificam a pureza genética das cultivares, após seu registro e lançamento (pós-melhoramento) (Alzate-Marin et al., 2005).

Diversos marcadores, ligados a genes de resistência a antracnose, têm sido identificados. As classes de marcadores com destaque para esta finalidade são os RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso - Williams et al., 1990), SCAR (Regiões

amplificadas caracterizadas por sequências – Paran & Michelmore, 1993), SSR (Sequências simples repetidas – Litt & Luty, 1989) e STS (Sítios marcados por sequências). Com relação aos SNP (Polimorfismos de base única), em geral, observa-se baixa disponibilidade de marcadores representativos dessa classe descritos como ligados a genes de resistência à antracnose em feijoeiro-comum.

Os marcadores RAPD foram desenvolvidos após a descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) e se baseiam na amplificação de segmentos arbitrários de DNA ao longo do genoma através de *primers* curtos (10 pb). O polimorfismo gerado pode ter origem em mutações de ponto, e mesmo inserções ou deleções no sítio de pareamento do *primer*. Em função de sua natureza, a escolha pela utilização de *loci* RAPD elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos que foram amplificados, possibilitando a iniciação de estudos em espécies pouco conhecidas do ponto de vista genético (Williams et al., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Borém & Caixeta, 2009). A literatura é rica em estudos que reportam a identificação e validação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à antracnose do feijoeiro-comum (Young & Kelly, 1996; Young & Kelly, 1997; Young et al., 1998; Alzate-Marin et al., 1999; Alzate-Marin et al., 2000; Arruda et al., 2000; Faleiro et al., 2000; Alzate-Marin et al., 2001; Silva & Santos, 2001; Kelly, 2004). Contudo, por serem marcadores dominantes, o nível de informação obtido por marcador polimórfico é baixo, o que limita sua utilização. Adicionalmente tais marcadores possuem baixa reprodutibilidade experimental (Hanai, 2008).

A fim de transpor limitações referentes aos marcadores RAPD, Paran & Michelmore (1993) desenvolveram os SCARs. Estes marcadores são obtidos por clonagem, sequenciamento e síntese de dois *primers* (15 a 30 pb) a partir de bandas RAPD pouco específicas. A principal vantagem desta técnica reside na possibilidade de reconstituição das marcas, uma vez que marcadores SCARs são altamente reprodutíveis, facilitando trabalhos relativos à SAM (Beraldo et al., 2009; Ferreira et al., 2012; Boersma et al., 2013). No entanto, fatores como expressão dominante em alguns *loci* e complexidade da técnica envolvida na obtenção desses marcadores limitam sua utilização.

Semelhantemente aos SCAR, os marcadores STS também são desenvolvidos por meio de sequências já caracterizadas, neste caso, a partir de marcadores RFLP (Paran & Michelmore, 1993). A diferença entre os marcadores STS e SCAR é que o primeiro

pode amplificar DNA com sequências repetitivas e o segundo apenas DNA de cópia simples (Borém & Caixeta, 2009). Ademais, essa técnica é vantajosa pela simplicidade (baseados em PCR), expressão codominante e alta frequência em regiões do genoma ricas em genes.

Já os marcadores microssatélites, também denominados de SSR (Sequências simples repetidas) ou STR (Sequências curtas em tandem), são baseados na amplificação de unidades repetitivas de DNA. Desse modo, o polimorfismo é gerado pela diferença no número de repetições em série em sequências variam de um a seis pares de bases, conhecidas por motivos. Adicionalmente, os motivos são flanqueados por regiões altamente conservadas, que são distribuídas ao longo de todo o genoma de espécies eucariotas (Litt & Luty, 1989; Hanai, 2008).

De acordo com Brondani et al. (2003), as vantagens que fazem os SSRs se destacarem dos demais marcadores consistem em: i) alta frequência em genomas de plantas; ii) codominantes, apresentando altos níveis de informatividade; iii) multialélicos, detectando múltiplas formas alélicas por marcador; e iv) tecnologia semiautomatizada, possibilitando maior confiança no processamento de geração dos dados. No que se refere ao último aspecto, a escolha do procedimento de análise deve pautar aspectos como infraestrutura laboratorial e mão de obra especializada disponíveis.

Em relação aos métodos de análise, os marcadores SSRs são amplificados via PCR, utilizando pares de *primers* flanqueadores de sequências repetidas, que são posteriormente genotipados via eletroforese em matriz de agarose, poliacrilamida ou com auxílio de analisadores semiautomáticos de DNA (Alzate-Marin et al., 2005). A utilização de *primers* fluorescentes promove a visualização dos fragmentos amplificados de forma mais precisa e reduz o tempo necessário para genotipar grandes quantidades de indivíduos. Nesse sentido, a eletroforese capilar, seguida da genotipagem semiautomatizada, oferece a oportunidade de que vários SSR sejam analisados simultaneamente e permite a transferência direta dos dados para aplicativos computacionais, a fim de se determinar estimativas genéticas (Brondani, 2006; Oliveira, 2009).

Dada a grande eficácia dos marcadores SSRs, diversos trabalhos, envolvendo finalidades variadas, já foram publicados. Alzate-Marin et al. (2005) identificaram marcadores SSR com grande potencial de utilização em programas de seleção assistida

visando resistência da soja ao nematóide do cisto. Couto et al. (2010) identificaram SSRs ligados a um QTL responsável por escurecimento de grãos em feijoeiro-comum. Blair et al. (2003) desenvolveram 150 SSRs para integração de mapas genéticos de feijoeiro. Persegini et al. (2011) utilizaram microssatélites para estimar a diversidade e divergência genética em cultivares de feijão carioca. Esses trabalhos demonstram as várias possibilidades de aplicação dos SSRs, o que justifica a importância desses marcadores em programas de melhoramento de diversas culturas. Em estudos de co-segregação, a utilização de tais marcadores é particularmente interessante, devido à sua alta frequência em genomas de organismos eucariotos e elevado poder informativo (Varshney et al., 2005).

Outra classe de marcadores, que vem ganhando crescente aplicação no melhoramento de plantas, é o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Hayashi et al., 2004). Na literatura, existem muitas definições para SNP. Embora semelhantes, as concepções nem sempre são concordantes. Dentre as abordagens conceituais mais aceitas, Brookes (1999) enfatiza que SNPs são variações de nucleotídeos em sequências de DNA provocadas por alterações em um único par de bases. Entretanto, para que uma alteração de base seja considerada marcador SNP, é necessário que o alelo menos frequente de um determinado gene tenha abundância de 1% ou mais na população. Essa frequência mínima impede que polimorfismos sejam confundidos com raras mutações pontuais – inserções/deleções (InDels) e erros de incorporação de bases que ocorrem durante a PCR (Jehan & Lakhanpaul, 2006; Silva, 2009).

Os SNPs são considerados vantajosos pela comunidade científica em comparação a outros marcadores, principalmente por constituírem os tipos de variações mais frequentes encontradas no DNA, sendo que em plantas ocorre 1 SNP a cada 100-300 pb em média (Gupta et al., 2001). Em feijoeiro-comum, Souza et al. (2012) identificaram 677 marcadores SNP, a uma frequência de 5,16 SNPs kb<sup>-1</sup> via ressequenciamento de sítios STS previamente desenvolvidos para soja. Por sua vez, Ebana et al. (2010), utilizando sequenciamento de Sanger, observaram um total de 4.357 marcadores a uma frequência de 4,87 SNPs kb<sup>-1</sup> ao longo do genoma de arroz. Portanto, a elevada frequência de SNPs nos genomas de espécies cultivadas tem feito desses marcadores ferramentas poderosas para identificação de fontes de variabilidade a serem exploradas em programas de melhoramento.

Várias metodologias já foram desenvolvidas para identificação de marcadores SNP, sendo que cada uma utiliza estratégias diferentes para comparar regiões específicas do DNA de diversos indivíduos simultaneamente. Contudo, a escolha dessas estratégias depende de vários fatores, entre os quais se incluem os custos operacionais, disponibilidade de equipamentos laboratoriais para genotipagem, capacidade para processar grandes volumes de dados e particularidades da espécie vegetal a ser estudada (Borém & Caixeta, 2009). A identificação desses marcadores também depende da frequência da variabilidade genética e presença de regiões duplicadas (*transposons*) no genoma da espécie (Choi et al., 2007). Segundo Gepts et al. (2008), o feijoeiro-comum possui altos níveis de diversidade genética, quando comparado a outras espécies autógamas. Entretanto, grande parte do genoma (41%) é composta por elementos transponíveis (Phytozome, 2014), o que pode dificultar a busca por SNPs. Assim, um planejamento criterioso deve ser realizado antes de definir a estratégia mais adequada para identificação de marcadores SNP, a fim de tornar o processo menos complexo e mais viável financeiramente.

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE

O processo de piramidação de genes de resistência à antracnose em feijoeiro-comum tem sido realizado com o auxílio de diversas classes de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores. A estratégia da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é baseada na possibilidade de detectar genótipos resistentes através de uma determinada marca genética estreitamente ligada ao gene de interesse. Caso a marca esteja distante do gene, a possibilidade de que ambos sejam transmitidas para as progênes é reduzida devido à ocorrência de mutações. Portanto, para que marcadores moleculares possam ser utilizados em estudos de piramidação, é necessário que as marcas estejam fortemente ligadas aos genes (Arruda, 2009).

Até a década de 90, poucas eram as informações publicadas com relação a marcadores moleculares ligados a genes de resistência à *C. lindemuthianum*. Inicialmente, os marcadores RAPD e RFLP foram os mais utilizados em análises genéticas e SAM. Posteriormente, por problemas relativos à reprodutibilidade de resultados, marcadores SCAR foram desenvolvidos a partir de marcadores RAPD previamente identificados.

Desde então, diversos grupos de pesquisa de melhoramento de feijoeiro-comum estão dedicando grandes esforços na validação de marcadores para utilização em SAM. Dos marcadores disponíveis na literatura, 13 encontram-se ligados ao alelo ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2.** Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*).

Marcador	Classe	Distância (cM)	Gene de resistência	Referência
OPF10 <sub>530</sub>	RAPD	12,3	<i>Co-1</i>	Young & Kelly (1997)
ECAG/MACC-1	AFLP	17,3	<i>Co-1</i>	Mendonza et al. (2001)
EACA/MAGA-2	AFLP	2,7	<i>Co-1</i>	Mendonza et al. (2001)
EAGG/MAAC-8	AFLP	24,4	<i>Co-1</i>	Mendonza et al. (2001)
SE <sub>ACT</sub> M <sub>CCA</sub>	STS	9,9	<i>Co-1</i> <sup>2</sup>	Vallejo & Kelly (2008)
CV542014 <sub>450</sub>	STS	40,27	<i>Co-1</i> <sup>4</sup>	McClellan et al. (2010)
TGA1.1 <sub>570</sub>	STS	1,3	<i>Co-1</i> <sup>4</sup>	McClellan et al. (2010)
OPA18 <sub>1500</sub>	RAPD	1,2	<i>Co-1</i> <sup>5</sup>	Gonçalves-Vidigal & Kelly (2006)
OAL8 <sub>1500</sub>	RAPD	1,2	<i>Co-1</i> <sup>5</sup>	Gonçalves-Vidigal & Kelly (2004)
SQ4 <sub>1440</sub>	RAPD	5,5	<i>Co-2</i>	Young & Kelly (1996)
SCAreoli	SCAR	0,0	<i>Co-2</i>	Geffroy et al. (1998)
OPH20 <sub>450</sub>	RAPD	0,5	<i>Co-2</i>	Adam-Blondon et al. (1994)
BM161	SSR	191,3	<i>Co-3</i>	Gaitán-Solís et al. (2002)
SAH18 <sub>1100</sub>	SCAR	5,0	<i>Co-3</i>	Méndez-Vigo et al. (2005)
SB12 <sub>350c</sub>	SCAR	2,8	<i>Co-3</i>	Méndez-Vigo et al. (2005)
PV <sub>ctt001</sub>	SSR	190,8	<i>Co-3</i>	Rodríguez-Suárez et al. (2008)
SB12	SCAR	2,9	<i>Co-3</i> <sup>3</sup>	Méndez-Vigo et al., 2002
OB12 <sub>350cm</sub>	SCAR	3,4	<i>Co-3</i> <sup>3</sup>	Méndez Vigo et al. (2005)
OY17 <sub>1100</sub>	SCAR	1,6	<i>Co-3</i> <sup>3</sup>	Méndez Vigo et al. (2005)
SCARF10	SCAR	6,0	<i>Co-3</i> <sup>4</sup>	Corrêa et al. (2000)
OX11 <sub>630</sub>	RAPD	5,8	<i>Co-3</i> <sup>4</sup>	Faleiro et al. (2000)
OF10 <sub>1050</sub>	RAPD	7,7	<i>Co-3</i> <sup>4</sup>	Faleiro et al. (2000)
OAL9740	RAPD	3,9	<i>Co-4</i>	Young et al. (1998)

**Tabela 2.** Continuação.

Marcador	Classe	Distância (cM)	Gene de resistência	Referência
OAK20890	RAPD	7,3	<i>Co-6</i>	Young & Kelly (1997)
OPAZ4 <sub>560</sub>	RAPD	8,5	<i>Co-6</i>	Alzate-Marin et al. (2000)
OPAZ9 <sub>950</sub>	RAPD	20,4	<i>Co-6</i>	Alzate-Marin et al. (2000)
SZ20	SCAR	7,1	<i>Co-6</i>	Kelly et al. (2003)
SBA8 <sub>530</sub>	SCAR	18	<i>Co-10</i>	Corrêa et al. (2000)
SF10 <sub>1072</sub>	SCAR	12,3	<i>Co-10</i>	Corrêa et al. (2000)
OPV20 <sub>680c</sub>	RAPD	1,8	<i>Co-13</i>	Lacanallos et al. (2010)
OPY20830C	RAPD	0,0	<i>Co-4</i>	Arruda et al. (2000)
OPI16850C	RAPD	14,3	<i>Co-4</i>	Arruda et al. (2000)
OJ11380	RAPD	18,1	<i>Co-4</i>	Arruda et al. (2000)
SY20	SCAR	0,0	<i>Co-4</i>	Kelly et al. (2003)
SAS13	SCAR	0,4	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Young et al. (1998)
SW13	SCAR	5,0	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Melotto & Kelly (1998)
OAL <sub>740</sub>	RAPD	3,9	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Young et al. (1998)
OAS13 <sub>950</sub>	RAPD	0,0	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Young et al. (1998)
OH18 <sub>830</sub>	RAPD	9,2	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Alzate-Marin et al. (1999)
PvTA25	SSR	1,4	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Oblessuc et al. (2015)
PVSNPCok-4	SNP	2,8	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Oblessuc et al. (2015)
SH18 <sub>1150</sub>	SCAR	4,2	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Awale & Kelly (2001)
SBB14 <sub>1050</sub>	SCAR	5,9	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Awale & Kelly (2001)
OPL04	RAPD	0,0	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Silva & Santos (2001)
OPAS13 <sub>950</sub>	RAPD	11,2	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Alzate-Marin et al. (2001)
OPH18 <sub>1200</sub>	RAPD	5,6	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Alzate-Marin et al. (2001)
Cok-4	CAPS	0,0	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Melotto and Kelly (2001)
OPAS13950c	RAPD	3,5	<i>Co-43</i>	Silva et al. (2007c)
SAB3	SCAR	5,9	<i>Co-5</i>	Vallejo & Kelly (2001)
OAH1780	RAPD	12,3	<i>Co-6</i>	Young & Kelly (1997)



Young et al. (1998) avaliaram populações  $F_2$  derivadas de cruzamentos entre SEL 1308 e G 2333 (portadoras do alelo  $Co-4^2$ ) e as cultivares MDRK, Blackhawk, Mex 222, TO, TU e SEL 1360, e identificaram os marcadores OAS13<sub>950</sub> e OAL<sub>740</sub> ligados por acoplamento a 0,0 cM e 3,9 cM do alelo  $Co-4^2$ , respectivamente. Os autores observaram que, apesar do marcador OAS13<sub>950</sub> co-segregar sem recombinação com o  $Co-4^2$ , apresentou baixa reprodutibilidade e precisão na interpretação das bandas. Tais fatos prejudicaram sensivelmente a qualidade dos resultados e, por isso, o RAPD OAS13<sub>950</sub> foi convertido em um marcador SCAR, atualmente conhecido como SAS13.

Por sua vez, o marcador SAS13 está posicionado a 0,39 cM do alelo de resistência, e se destaca por ser amplamente utilizado em programas de SAM para resistência à antracnose (Beraldo et al., 2009; Melotto & Kelly, 2001). Parrella et al. (2008) relatam a eficiência do marcador SAS13 na seleção de famílias resistentes à antracnose, provenientes de cruzamentos entre CNFC 10706, B1 (portadora do alelo  $Co-4$ ) e H147 (portadora do alelo  $Co-5$ ). Todavia, os autores salientam que esse marcador amplifica todos os alelos do gene  $Co-4$  e, em função disso, não permite a identificação de alelos específicos, como o  $Co-4^2$ . Marcondes et al. (2010) reportaram resultados similares.

Awale & Kelly (2001), a partir de progênies obtidas do cruzamento entre SEL 1308 e Magia Negra, converteram bandas RAPD (OH18 e OBB14) em marcadores SCAR, o que resultou no desenvolvimento dos marcadores SH18 e SBB14, localizados a 2,9 e 5,9 cM do alelo  $Co-4^2$ , respectivamente. Por sua vez, Arruda (2009), com o objetivo de piramidar genes de resistência à antracnose ( $Co-10$ ,  $Co-6$ ,  $Co-5$  e  $Co-4^2$ ), ferrugem ( $Ur-ON$ ) e mancha angular ( $Phg-1$ ) em linhagens-elite previamente desenvolvidas pelo programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV, utilizaram marcadores SCAR no processo de SAM desses genes de interesse. Para monitoramento do alelo  $Co-4^2$ , foram utilizados os marcadores SH18 e SBB14. Entretanto, tais marcadores não foram eficientes na identificação de linhagens portadoras desse alelo, com exceção da cultivar G 2333.

Semelhantemente, Beraldo et al. (2009) empregaram o marcador SH18 na avaliação de 42 genitores e 76 linhagens de feijoeiro-comum desenvolvidas no Programa de Melhoramento do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Os autores demonstraram que esse marcador foi pouco eficiente na seleção de plantas portadoras do alelo  $Co-4^2$ . Isso permite inferir que não é possível fazer a distinção de genótipos portadores do alelo apenas

por meio de análises moleculares com os marcadores SH18 e SBB14, havendo, portanto, a necessidade de inoculações.

Melotto & Kelly (1998) identificaram o marcador SCAR SW13, em populações segregantes não mencionadas, como ligado ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>, a uma distância variando de 1 a 5 cM, em função do cruzamento e do patótipos avaliados. Adicionalmente, foi verificado que tal marcador está ligado simultaneamente a genes de resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV) e ferrugem (*Uromyces appendiculatus*).

Por sua vez, Alzate-Marin et al. (2001), utilizando progênes do cruzamento entre as cultivares G2333 e Rudá, identificaram os marcadores OPH18<sub>1200</sub> e OPAS13<sub>950</sub> posicionados a 5,6 e 11,2 cM, respectivamente, do alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Arruda (2009) também utilizou o marcador OPH18<sub>1200</sub> para identificar linhagens resistentes a *Co-4*<sup>2</sup>. Contudo, apesar do referido marcador mostrar-se ligado a uma pequena distância do gene de interesse, não foi eficiente na detecção de genótipos resistentes, o que provavelmente aconteceu devido a uma mutação no sítio de ligação do *primer*.

Silva & Santos (2001), objetivando identificar marcadores RAPD associados aos alelos *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-5* e *Co-7*, desenvolveram o marcador OPL04, fortemente associado ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Mediante análises de co-segregação, a partir de famílias F<sub>1</sub>RC<sub>1</sub> provenientes de retrocruzamentos entre os genótipos G 2333 x ESAL 696, os autores constataram que o marcador está ligado sem recombinação ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>, constituindo uma excelente opção para seleção de plantas portadoras desse alelo.

De um modo geral, os marcadores mencionados têm possibilitado a utilização rotineira de SAM em programas de melhoramento do feijoeiro-comum. Contudo, grande parte dos marcadores moleculares já identificados é de natureza dominante e apresenta baixa reprodutibilidade e capacidade de automatização. Ademais, observa-se também que, esses marcadores não são eficientes na detecção de alelos específicos, a exemplo do *Co-4*<sup>2</sup>. Tais constatações reforçam a importância da identificação de marcadores moleculares eficientes no monitoramento de alelos específicos e que oportunizem a genotipagem de grandes quantidades de plantas simultaneamente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL GENÉTICO

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos de uma população  $F_2$ , derivada de cruzamentos biparentais entre os genótipos BRS Cometa e SEL 1308, conduzidos na Embrapa Arroz e Feijão, no município de Santo Antônio de Goiás - GO. A cultivar BRS Cometa (genitor feminino) apresenta suscetibilidade à raça 73 de *C. lindemuthianum*. Por outro lado, possui resistência à antracnose em campo e diversos outros caracteres agronômicos desejáveis, incluindo grãos do tipo carioca, precocidade, bom desempenho produtivo e porte ereto (Faria et al., 2008). Esta cultivar foi desenvolvida a partir do cruzamento A 769 /4/ EMP 250 /// A429 / XAN 252 // C 8025 / G4449 /// WAF 2 A55/GN 31 / XAN 170, realizado em 1991 no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia). Em 1994, a Embrapa Arroz e Feijão recebeu famílias provenientes deste cruzamento, e, a partir do método de seleção massal, selecionou a melhor linhagem (CNFC 9435), que em 2007 foi registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) recebendo a denominação BRS Cometa.

Por sua vez, a linhagem SEL 1308 (genitor masculino) foi desenvolvida pelo CIAT a partir do cruzamento entre Talamanca e G 2333, e se caracteriza por ser portadora do alelo  $Co-4^2$ , conferindo maior espectro de resistência no Brasil e em outras regiões do mundo. Adicionalmente, Trabanco et al. (2015) relataram que, além do alelo  $Co-4^2$ , essa cultivar também é portadora de dois genes de resistência às raças 3 e 7 de *C. lindemuthianum*.

Os cruzamentos artificiais foram realizados em casa de vegetação com sistema de climatização por nebulização. A natureza híbrida das plantas  $F_1$  foi confirmada por meio de descritores morfológicos, particularmente pelas características cor de flor e hipocótilo. Posteriormente, os híbridos foram submetidos a duas autofecundações sucessivas, obtendo-se as populações  $F_2$  e  $F_{2,3}$ , que foram submetidas às análises fenotípicas e moleculares.

Ao todo, 300 plantas  $F_2$  e 197 progênies  $F_{2,3}$  foram utilizadas nas avaliações fenotípicas e genotípicas. Como testemunha, além dos genitores, utilizou-se a cultivar

Rosinha G2 (grupo comercial rosinha), suscetível à raça 73 de *C. lindemuthianum*. As sementes foram provenientes da coleção de trabalho do programa de melhoramento de feijoeiro-comum da Embrapa Arroz e Feijão.

### 3.2 INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO

Um total de 300 sementes  $F_2$ , derivadas do cruzamento entre SEL 1308 e BRS Cometa, bem como dez sementes de cada genitor e da testemunha suscetível (Rosinha G2) foram pré-germinadas em laboratório para obtenção de um estande final desejável e maior uniformidade nos estádios de desenvolvimento das plantas. Para isso, as sementes foram distribuídas em folhas de papel *germitest*, umedecidas com água destilada autoclavada e, posteriormente, mantidas em um germinador (Mangelsdorf) a temperatura constante de 25°C e umidade de 27%, por três dias (Figura 3).



**Figura 3.** Sementes  $F_2$  provenientes do cruzamento BRS Cometa x SEL 1308, pré-germinadas no Laboratório de Sementes da Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás).

O plantio foi realizado em copos descartáveis de poliestireno com volume de 500 mL, contendo cerca de 300 g de substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Em cada copo foi mantida uma planta  $F_2$ , devidamente identificada, até o momento das avaliações dos sintomas ocasionados pela raça 73 de *C. lindemuthianum* (Figura 4).



**Figura 4.** Plantas F<sub>2</sub> (BRS Cometa x SEL 1308) em estágio V<sub>2</sub>, cultivadas para realização de estudo de co-segregação entre o alelo *Co-4<sup>2</sup>* e marcadores moleculares.

### 3.3 INOCULAÇÃO DO PATÓGENO E AVALIAÇÕES DA DOENÇA

#### 3.3.1 Preparo do inóculo

O isolado da raça 73 de *C. lindemuthianum* utilizado neste estudo, identificado como CL1869, foi obtido a partir da coleção de fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão. Esse isolado foi selecionado com base em um teste preliminar, por incitar reações contrastantes entre BRS Cometa e SEL 1308 (resistente).

Primeiramente foi realizada a multiplicação do isolado, seguida pela produção de inóculo. Para a esporulação, o isolado foi repicado em vagens de feijoeiro-comum esterilizadas, parcialmente imersas em 2,0 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, os tubos foram incubados por um período de oito dias sob temperatura de 20±2°C em câmara BOD (Figura 5).

Decorridos oito dias do período de incubação, os tubos foram agitados manualmente, após a adição de 5,0 a 10,0 mL de água destilada autoclavada. Esse procedimento foi realizado para que os esporos se desprenderem das vagens, com a finalidade de obter a solução somente com o inóculo. Em seguida, a solução foi filtrada através de uma camada dupla de gaze para retirada de impurezas e fragmentos de vagem. Por fim, foi determinada a concentração inicial do inóculo com auxílio de uma câmara de Neubauer-Preciss (hematocitômetro) e a concentração final foi ajustada para 1,2 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup> de água destilada autoclavada contendo 0,03% de espalhante Tween 20 (0,03 mL de Tween 20 + 100 mL de água destilada).



**Figura 5.** Vagens de feijão esterilizadas, mantidas em tubos de ensaio para a multiplicação do isolado CL1869 (raça 73) de *Colletotrichum lindemuthianum*.

### 3.3.2 Inoculação e avaliações

As plantas foram inoculadas aos sete dias após o plantio, no estágio V<sub>2</sub> (folhas primárias completamente desenvolvidas). A solução de inóculo foi aplicada sobre as faces abaxiais e adaxiais das folhas primárias, evitando seu escorrimento, com o auxílio de um pulverizador manual (De Vilbiss).

Após a inoculação, as plantas foram incubadas em câmara de nevoeiro com temperatura ajustada para 23°C, umidade relativa próxima de 95% e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, onde permaneceram até o momento da avaliação da doença. Os sintomas foram avaliados aos oito dias após a inoculação, por dois avaliadores, com base em uma escala de notas contendo nove graus de reação (Tabela 3). As plantas que apresentaram notas variando de 1,0 a 3,0 foram consideradas resistentes e as demais suscetíveis (Pastor-Corrales et al., 1995; Balardin et al., 1997).

Após as avaliações, as plantas resistentes, que receberam notas de 1 a 3, foram transplantadas para vasos de polietileno com volume de 5 litros, contendo aproximadamente 4,5 kg de uma mistura de solo, areia e adubo. Em cada vaso foram cultivadas duas plantas F<sub>2</sub>, mantidas em casa de vegetação até produzirem, por autofecundação, sementes F<sub>2:3</sub>.

**Tabela 3.** Escala descritiva de notas para avaliação dos sintomas de antracnose (*C. lindemuthianum*) em feijoeiro-comum.

Grau	Descrições
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis, apenas na face abaxial das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas foliares descritos anteriormente, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis, em ambas as faces das folhas.
5	Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, presença de algumas lesões nos caules, ramos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente. Presença de abundantes lesões nos caules, ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas. Lesões muito abundantes nos caules, ramos e pecíolos.
9	Plantas mortas.

Fonte: Pastor-Corrales & Tu (1989).

As famílias  $F_{2,3}$  foram submetidas também a inoculação e posterior análise de segregação fenotípica da resistência, avaliando-se cerca de 16 plantas  $F_{2,3}$  provenientes de cada planta  $F_2$  resistente. Dessa forma, foi possível definir se as plantas  $F_2$  resistentes eram homozigotas ou heterozigotas.

### 3.4 ANÁLISES MOLECULARES

Um conjunto de 15 marcadores moleculares candidatos, potencialmente ligados ao alelo *Co-4<sup>2</sup>*, foi analisado neste estudo. Estes marcadores foram previamente desenvolvidos por Cieslak (2014), em trabalhos de pesquisa conduzidos na Embrapa Arroz e Feijão (Tabela 4).

**Tabela 4.** Descrição dos marcadores STS e SSR e SCAR utilizados no estudo de co-segregação com o alelo *Co-4*<sup>2</sup> de resistência à antracnose em feijoeiro-comum.

Marcador	Primer (5' – 3')	Gene-alvo	Produto (pb)
P8283-V1	F <sup>2</sup> : GAAGATTCCAACCCGACCTT R <sup>3</sup> : TTTGCTTCTGCTTTGGCATA	GRAF 2	734
P8284-V1	F: CACTGTCGGAAACAAGGACA R: TTTTGGCTCCATTTGGTCAT	GRAF 3	754
P8285-V1	F: ATCGGATAAGCCACCAACAG R: TTCCTTGTTGAACGCTTCC	GRAF 4	624
P8285-V2	F: AAGCAAGCAAGGTGTCACAA R: CATAAAACGTGATCCCTGCAC	GRAF 4	750
P8286-V1	F: TTGCATGAGAGGGTTGAAGA R: CCCTACCCAAACAGAACTGG	GRAF 5	754
P8286-V2	F: GGTCGTGCTTCACTTTGACA R: GGCTGCGTTTTCTTCTTACG	GRAF 5	738
P8286-V3	F: ATGGAGCATGGTGTCAAAAA R: CTCATTTTCGTGGTTGCTGA	GRAF 5	754
P8286-V4	F: CAGCATGATGGTGTCTCTGA R: AAACACTTGCCAACAATCTGG	GRAF 5	730
P8286-V6	F: TTGTGTGCAGGAGGATGTTT R: TGCCTTAAAAACGACCAAGTG	GRAF 5	629
P8286-V7	F: CTCTCCACTGTCCCTGTGTG R: AGGGTTGCATCACCTTAAA	GRAF 5	741
MSAS4	F: TCGTCAAGTTTGTGTTTGGT R: GCCTTCAAATGCATTGGTCT	-	430 – 450
MSAB3	F: TAGAGGTAACACCAAGCCCCT R: CATTCTTCTGTGCTTCATCG	-	470 – 525
SAS13 <sup>1</sup>	F: CACGGACCGAATAAGCCACCAACA R: CACGGACCGAGGATACAGTGAAAG	-	950
SBB14 <sup>1</sup>	F: GTGGGACCTGTTCAAGAATAATAC R: GTGGGACCTGGGTAGTGTAGAAAT	-	1.050 – 1.150
SH18 <sup>1</sup>	F: CAGAAGGAGCTGATAGTACTCCACAAC R: GTAGGCACACTGATGAATCTCATGTTGGG	-	1.100

<sup>1</sup>Marcadores SCAR desenvolvidos por Young et al. (1998) e Awale & Kelly (2001); <sup>2</sup>Sequência *forward*; <sup>3</sup>Sequência *reverse*.



Os marcadores SSR (MSAS4 e MSAB3) foram obtidos a partir de regiões intergênicas, próximas de genes-alvo. Para isso, as sequências *forward* e *reverse* do marcador SCAR SAS13, fortemente ligado ao gene *Co-4*, foram alinhadas contra os genomas de referência de feijoeiro-comum, disponíveis nas bases de dados CYTED e PHYTOZOME. Por sua vez, os marcadores STS e SNP foram desenvolvidos a partir do sequenciamento de fragmentos amplificados com o marcador SAS13, a partir de 12 genótipos de feijoeiro-comum: AB136, BAT93, BRS Cometa, BRS Ametista, BRS Executivo, BRS Horizonte, BRS Pontal, BRS Realce, Ouro Negro, Pérola, PI207262, Rosinha G2, SEL 1308, TO e TU (Cieslak, 2014). Após os processos de amplificação e sequenciamento (Sanger), as *reads* foram submetidas a um corte de qualidade (critério *Phred*) e alinhadas com as sequências de cinco genes putativos.

Ao todo, 17 pares de iniciadores foram construídos. Destes, dez foram reportados como polimórficos entre os genótipos SEL 1308 e BRS Cometa e, por isso, foram selecionados para esse estudo. Adicionalmente, outros três marcadores SCAR (SAS 13, SBB14 e SH18), previamente relatados como ligados ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> (Young et al., 1998; Awale & Kelly, 2001), também foram analisados.

### **3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico**

Para o isolamento do DNA genômico, foi coletada uma folha cotiledonar de cada genótipo das fontes de resistência à antracnose, testemunhas suscetíveis, genitores e plantas F<sub>2</sub> da população BRS Cometa x SEL 1308. As amostras de tecido foliar coletadas foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas à temperatura de -20°C, no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO). A extração foi realizada com base no protocolo CTAB, descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

A concentração do DNA extraído foi estimada por espectrometria em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Waltham/EUA). A integridade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR Green (Life Technologies<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). O resultado foi fotodocumentado por fotografia sob luz UV, utilizando equipamento transiluminador (Geldoc – Bio-Rad) e programa computacional QuantityOne. Após os procedimentos de quantificação e verificação de

integridade, duas alíquotas de DNA foram preparadas, uma para a utilização na amplificação dos marcadores SSR, STS e SCAR ( $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) e outra para as análises com os marcadores SNP ( $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).

### 3.4.2 Análise de *bulks* segregantes

A análise de *bulks* segregantes (*Bulked Segregant Analysis* - BSA) foi empregada com a finalidade de selecionar marcadores potencialmente ligados ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>. A construção dos *bulks* foi realizada conforme a metodologia proposta por Michelmore et al. (1991). Inicialmente, amostras de DNA dos genitores e da testemunha suscetível foram submetidas a testes de polimorfismo com os marcadores candidatos. Na sequência, 20 plantas F<sub>2</sub>, sendo dez resistentes e dez suscetíveis, foram genotipadas com os marcadores polimórficos entre os genitores. O *bulk* resistente foi composto somente por plantas que receberam nota 1; ou seja, sem manifestação de sintomas. Por sua vez, no *bulk* de plantas suscetíveis foram incluídas somente plantas que receberam notas 8 e 9 de severidade. Convém ressaltar que os indivíduos foram analisados separadamente, sem mistura equimolar de DNA para formação dos *bulks*. Por fim, os marcadores co-segregantes com o alelo *Co-4*<sup>2</sup> foram selecionados para amplificação dos demais indivíduos da população F<sub>2</sub>.

### 3.4.3 Genotipagem dos marcadores STS, SSR e SCAR dominantes

Para a amplificação dos dez marcadores dominantes (P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3, P8286-V4, MSAS4, SAS13 e SH18), foi utilizado o produto comercial Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit), conforme as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Cada reação foi constituída por 30 ng de DNA, 5,0  $\mu\text{L}$  de Master Mix, 0,5  $\mu\text{L}$  de Q-solution, além de 1,0  $\mu\text{L}$  de cada *primer* específico (*reverse* e *foward*) na concentração de 10,0  $\mu\text{M}$ .

As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System, modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando-se as seguintes condições: i) uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos; ii) ligação do *primer* ao DNA molde (variando de 62°C a 68°C) por 90 segundos; iii) primeira etapa de extensão a 72°C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, foi realizada a segunda etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos resultantes do processo de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3%), corados com brometo de etídeo (10 mg mL<sup>-1</sup>). O resultado foi fotodocumentado por meio de luz UV, utilizando equipamento transiluminador (Geldoc – Bio-Rad) e programa computacional QuantityOne. Por fim, a genotipagem foi realizada quanto à presença (+) ou ausência (-) de bandas, por comparação com padrões de DNA *ladder* 100 pb (Ludwig™).

#### **3.4.4 Genotipagem dos marcadores STS, SSR e SCAR codominantes**

Os cinco marcadores STS e SSR codominantes (MSAB3, P8285-V1, P8286-V6, P8286-V7 e SBB14) foram marcados com fluorescências (6-FAM™, NED™, PET™ e VIC™) e analisados via eletroforese capilar, para obtenção de dados mais precisos. Os cinco pares de *primers* foram combinados em um único painel de genotipagem multiloco semiautomatizada, de forma que não ocorressem sobreposições de fragmentos. As reações foram preparadas seguindo o mesmo protocolo já descrito, diferente apenas quanto às condições de amplificação, que compreenderam as seguintes etapas: um ciclo a 95°C, por 15 minutos (desnaturação inicial); 40 ciclos a 94°C, por 30 segundos (desnaturação); 40 ciclos de 90 segundos, a 56°C (anelamento); e um ciclo a 72°C, com duração de 10 minutos (extensão final).

Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese capilar, conduzida na plataforma ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando filtro “D” para detecção das fluorescências. Para cada reação submetida ao analisador de fragmentos, foi preparada uma solução constituída por 0,5 µL do produto de PCR (diluído em 50 µL de água ultrapura); 9,40 µL de formamida HiDi® e 0,10 µL de marcador de massa molecular GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems® - Foster City/EUA). Os dados foram processados com o programa *Foundation Data Collection* v.2.0 (Applied Biosystems) e, em seguida, genotipados com o programa GeneMapper v.3.5 (Applied Biosystems).

#### **3.4.5 Análise de especificidade dos marcadores**

Para verificar a especificidade dos marcadores moleculares em relação ao gene *Co-4* e ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>, bem como a outros genes/alelos de resistência à antracnose, foi

realizada a caracterização do perfil molecular de 12 linhagens de feijoeiro-comum, fontes de resistência à antracnose, com 15 marcadores SCAR, SSR e STS. Dos 12 genótipos utilizados, dois são testemunhas suscetíveis (Pérola e Rosinha G2) e os demais são fontes dos genes de resistência à antracnose *Co-3*<sup>4</sup>, *Co-4*, *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-4*<sup>3</sup>, *Co-5*, e *Co-6*, além de fontes de genes de resistência ainda não caracterizados (Tabela 5).

**Tabela 5.** Genótipos utilizados na análise de especificidade dos 15 marcadores STS, SSR e SCAR associados ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> de resistência à antracnose do feijoeiro-comum.

Genótipo	Tipo de grãos	Pool gênico	Reação à antracnose	GL <sup>3</sup>	Gene/alelo de resistência
AB136	Especial	Mesoamericano	R <sup>1</sup>	B7 e ND	<i>Co-6</i>
BRS Cometa	Carioca	Mesoamericano	R	-	<i>Co-?</i>
BRS Horizonte	Carioca	Mesoamericano	R	-	<i>Co-?</i>
BRSMG Realce	Rajado	Andino	R	-	<i>Co-?</i>
G 2333	Preto	Mesoamericano	R	B7, B8 e ND	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>
Ouro Negro	Preto	Mesoamericano	R	B4	<i>Co-3</i> <sup>4</sup>
Pérola	Carioca	Mesoamericano	S <sup>2</sup>	-	-
PI 207262	Especial	Mesoamericano	R	B8 e B4	<i>Co-3</i> <sup>4</sup> / <i>Co-4</i> <sup>3</sup>
Rosinha G2	Rosinha	Mesoamericano	S	-	-
SEL 1308	Preto	Mesoamericano	R	B8	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>
TO	Especial	Mesoamericano	R	B8	<i>Co-4</i>
TU	Preto	Mesoamericano	R	B7	<i>Co-5</i>

<sup>1</sup>Genótipo resistente ou moderadamente resistente; <sup>2</sup>Genótipo suscetível ou moderadamente suscetível; <sup>3</sup>Grupo de ligação/cromossomo e <sup>4</sup>Gene/alelo de resistência indeterminado.

### 3.5 ANÁLISES GENÉTICO-ESTATÍSTICAS

#### 3.5.1 Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ )

Os dados fenotípicos e moleculares foram submetidos ao teste de qui-quadrado, com a finalidade de testar a segregação do gene *Co-4*<sup>2</sup> e dos marcadores avaliados nas populações F<sub>2</sub> e F<sub>2:3</sub> do cruzamento BRS Cometa x SEL 1308, além da co-

segregação entre estes. Para os dados fenotípicos da população  $F_2$  e marcadores dominantes, foi empregada a proporção esperada foi de 3R:1S (3:1). Já para os dados obtidos por meio de avaliações fenotípicas das progênes  $F_{2:3}$  e marcadores codominantes, a segregação esperada foi de 1RR:2Rr:1rr (1:2:1). Os testes foram realizados adotando-se um nível de significância  $\alpha=5\%$ , com auxílio do *software* R.

### 3.5.2 Análises de ligação, mapeamento físico e eficiência de seleção

As análises de ligação foram realizadas com o auxílio do *software* R, por meio do pacote OneMap (Margarido et al., 2007). Somente foram utilizados os 13 marcadores identificados como polimórficos entre os genitores e que segregaram conforme o padrão esperado nas populações analisadas. As distâncias genéticas entre cada marcador molecular e o alelo  $Co-4^2$  foram estimadas separadamente. Inicialmente, foram empregadas análises de dois-pontos para estabelecer o grupo de ligação, utilizando  $LOD=3,0$  e frequência de recombinação máxima ( $FR_{m\acute{a}x.}$ ) de 0,50. O processo de ordenamento de cada marcador em relação ao gene  $Co-4$  foi realizado com o algoritmo *Rapid Chain Delineation* (RCD) (Doerge, 1996). Em seguida, as frequências de recombinação foram convertidas em distância genética (cM), utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944). O ordenamento final dos marcadores para a construção do mapa de ligação foi estabelecido com base na ordem crescente das distâncias genéticas em relação ao alelo  $Co-4^2$ . Por fim, o diagrama do grupo de ligação com os referidos marcadores e o  $Co-4^2$  foi gerado com o auxílio do programa MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

Para aferir a consistência do ordenamento obtido a partir da análise de ligação, foi realizado o mapeamento físico dos marcadores. As sequências *forward* e *reverse* de cada marcador foram alinhadas contra o genoma de referência de *P. vulgaris*, disponível no Phytozome v.10.3 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), utilizando-se a ferramenta BLAST-N. O diagrama representativo do ordenamento físico dos marcadores, também foi gerado com o auxílio do programa MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

Por fim, a eficiência de seleção (ES%) de cada marcador foi estimada conforme metodologia descrita por Liu (1997). Para os marcadores dominantes ligados por acoplamento, utilizou-se o seguinte estimador:  $ES\% = 1 - (8r - 4rf^2) \times 100$ , em

que  $rf$  é a frequência de recombinação. Já as eficiências de seleção dos marcadores dominantes ligados por repulsão e codominantes foram estimadas por meio da expressão:

$$ES\% = (1 - 4rf^2) \times 100.$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 HERANÇA DA RESISTÊNCIA

Os indivíduos resistentes e suscetíveis ao isolado CL1869 da raça 73, provenientes das populações F<sub>2</sub> e F<sub>2:3</sub> (BRS Cometa x SEL 1308), foram facilmente discriminados. Convém ressaltar que os sintomas observados nos genótipos suscetíveis foram integralmente atribuídos à infecção por *C. lindemuthianum*, o que certifica que o procedimento de inoculação foi eficiente.

Com relação aos genitores, foram observadas reações nitidamente contrastantes entre BRS Cometa e SEL 1308, sendo que somente BRS Cometa apresentou sintomas intensos de severidade (Figura 6). Contudo, há relatos na literatura indicando que BRS Cometa apresenta altos níveis de resistência à antracnose em ensaios de campo. Chiorato et al. (2015) constataram que esse genótipo é resistente aos patótipos 31 e 65 de *C. lindemuthianum* em condições de campo, apresentando comportamento semelhante a outras cultivares-elite também desenvolvidas pela Embrapa Arroz e Feijão, entre as quais se incluem BRS Esteio, BRS Esplendor e BRS Estilo. Faria et al. (2008) também reportaram que em avaliações de campo para ensaios de VCU, BRS Cometa foi resistente aos patótipos 55, 95 e 453, com desempenho superior às testemunhas Carioca Pitoco e Iapar 81.



**Figura 6.** A) Genitor SEL 1308 avaliado com grau 1 de reação à raça 73 de *C. lindemuthianum*; B) Genitor BRS Cometa avaliado com grau 9 de reação à raça 73 de *C. lindemuthianum*.

Dos 261 indivíduos  $F_2$  analisados, 188 foram caracterizados como resistentes e 73 como suscetíveis (Tabela 6). Os resultados demonstraram que a frequência da segregação observada ajustou-se à proporção esperada de 3R:1S ( $\chi^2 = 1,23$ ;  $p = 0,27$ ), sugerindo que a resistência de SEL 1308 à raça 73 de *C. lindemuthianum* é condicionada por um único gene dominante. Esses resultados estão em conformidade com estudos prévios que reportam herança monogênica dominante à antracnose em SEL 1308 (Young et al., 1998; Oblessuc et al. (2015).

**Tabela 6.** Segregação fenotípica de indivíduos das populações  $F_2$  e  $F_{2:3}$ , provenientes do cruzamento BRS Cometa x SEL 1308, avaliados quanto à resistência à raça 73 de *Coletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro-comum

População	Nº de plantas	PE (R:S) <sup>1</sup>	PO (R:S) <sup>2</sup>	$\chi^2$	P (%) <sup>3</sup>
BRS Cometa	10	0:10	0:10	-	-
SEL 1308	10	10:0	0:10	-	-
$F_2$	261	3:1	188:73	1,23	27
$F_{2:3}$	197	1:2:1	49:93:55	0,98	61

<sup>1</sup>Proporção esperada: R – plantas resistentes, S- plantas suscetíveis; <sup>2</sup>Proporção observada: R – plantas resistentes, S- plantas suscetíveis; <sup>3</sup>probabilidade do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Quanto às 188 progênies  $F_{2:3}$  avaliadas, 49 foram homozigotas resistentes, 93 heterozigotas e 55 homozigotas suscetíveis. Estes resultados evidenciam que a segregação observada na geração  $F_{2:3}$  se ajustou à segregação esperada de 1RR:2Rr:1rr ( $\chi^2 = 1,23$ ;  $p = 0,27$ ), reforçando que a herança da resistência à antracnose em SEL 1308 é monogênica com dominância completa. Convém ressaltar que a partir da avaliação de progênies  $F_{2:3}$ , vários autores também constataram maior confiabilidade às estimativas provenientes de estudos de segregação, visto que, geralmente, as avaliações em  $F_2$  são realizadas com uma única planta, o que não permite a discriminação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (Young & Kelly, 1998; Alzate-Marin et al., 2000; Méndez-Vigo et al., 2005; Alzate-Marin et al., 2007; Rodríguez-Suaréz et al., 2008; Capucho et al., 2009; Boersma et al., 2013; Gonçalves-Vidigal et al., 2013)

Resultados similares foram obtidos por Young et al. (1998) e Oblessuc et al. (2015), a partir de avaliações de populações  $F_2$  (SEL 1308 x Black Magic) inoculadas com a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Adicionalmente, Young et al. (1998) também verificaram



que o alelo *Co-4*<sup>2</sup> apresenta segregação independente de outros genes de resistência, também dominantes (*Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-5* e *Co-6*). Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro-comum portadoras do alelo *Co-4*<sup>2</sup> é particularmente interessante para os programas de retrocruzamentos e piramidações, visto que a herança monogênica favorece a introgressão de genes de resistência a doenças para linhagens-elite e populações segregantes.

#### 4.2 CO-SEGREGAÇÃO ENTRE MARCADORES MOLECULARES E O ALELO *Co-4*<sup>2</sup>.

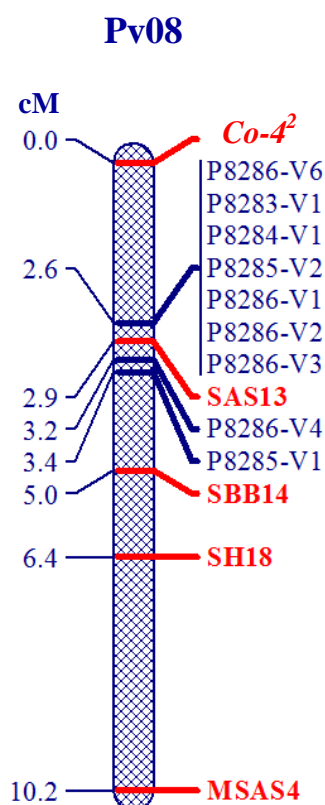
Dos 15 pares de *primers* analisados, 13 foram polimórficos entre os genitores BRS Cometa e SEL 1308, apresentando padrões de amplificação de fácil interpretação para o processo de genotipagem. Os marcadores STS e SSR utilizados neste estudo foram identificados em regiões genômicas que flanqueiam o gene *Co-4*, o que justifica a alta frequência de marcadores polimórficos observada, comparativamente a resultados obtidos em outros estudos de co-segregação (Carvalho et al., 2002; Silva et al., 2008; Zamprogno et al., 2008; Gonçalves-Vidigal et al., 2013; Martins et al., 2014).

Dentre os marcadores polimórficos, sete STS (P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3, P8286-V4) e um SSR (MSAS4) estão presentes somente no genitor suscetível (BRS Cometa), genótipos homozigotos suscetíveis e heterozigotos resistentes, indicando, portanto, ocorrência de mutações no sítio de anelamento dos *primers* ou ligação por repulsão ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Como esperado, os marcadores SCAR SAS13 e SH18 também apresentaram natureza dominante e ligação em fase de acoplamento, amplificando fragmentos somente para o genitor resistente (SEL 1308), genótipos heterozigotos e homozigotos resistentes. Também foram observados três marcadores codominantes, sendo dois SSR (P8285-V1, P8286-V6) e um SCAR (SBB14).

Com relação à análise de *bulks* segregantes, observou-se que todos os marcadores polimórficos apresentaram forte associação ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>, demonstrando alta eficiência na discriminação dos 20 genótipos que compuseram os *bulks* resistente e suscetível. Em virtude disso, esses marcadores foram utilizados no processo de genotipagem das 197 progênies da população F<sub>2:3</sub> e, posteriormente, nas análises de co-segregação.

Os resultados obtidos a partir dos testes de qui-quadrado confirmaram as hipóteses de segregação 3:1 e 1:2:1 dos marcadores analisados (Tabela 7). Grande parte dos marcadores (76.9%), por serem dominantes, ajustaram-se à proporção esperada de 3:1, com valores de  $\chi^2$  variando de 0,04 ( $P = 84\%$ ) para o STS P8286-V4 a 2,34 ( $P = 12\%$ ) para o SSR MSAS4. Observou-se, também, que os marcadores P8285-V1, P8286-V6 e SBB14 se ajustaram à proporção de 1:2:1, segregando conforme o esperado para marcadores codominantes.

Quanto às análises de co-segregação, foi constatado que os 13 marcadores moleculares utilizados na genotipagem da população  $F_{2:3}$  (BRS Cometa x SEL 1308) estão ligados ao alelo  $Co-4^2$ , a distâncias que variaram de 2,58 cM (P8286-V6) a 10,21 cM (MSAS4). Destes, oito estão ligados em fase de repulsão (MSAS4, P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3 e P8286-V4), dois estão ligados em fase de acoplamento (SAS13 e SH18) e três são codominantes (P8285-V1, P8286-V6 e SBB14) (Figura 7).



**Figura 7.** Mapa genético do grupo de ligação Pv08 de *Phaseolus vulgaris*, indicando o posicionamento do alelo  $Co-4^2$  de resistência à antracnose em relação a marcadores STS, SSR e SCAR previamente identificados (cor vermelha) e novos marcadores validados neste trabalho (cor azul).

**Tabela 7.** Segregação dos marcadores moleculares testados e co-segregação destes com a resistência à raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* em progênies da população F<sub>2,3</sub> de feijoeiro-comum resultante do cruzamento entre BRS Cometa e SEL 1308.

Marcador	Classe	G1 <sup>1</sup>	G2 <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>	PE <sup>4</sup>	PO <sup>5</sup>	$\chi^2$	P (%) <sup>6</sup>	DG (cM) <sup>7</sup>
MSAS4	SSR	-	435	195	3(+):1(-)	137(+)58(-)	2,34	12	10,2
MSAB3	SSR	318	318	-	-	-	-	-	-
P8283-V1	STS	-	740	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8284-V1	STS	-	750	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8285-V2	STS	-	620	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8286-V1	STS	-	750	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8286-V2	STS	-	750	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8286-V3	STS	-	750	197	3(+):1(-)	150(+)47(-)	0,14	71	2,64
P8286-V4	STS	-	730	197	3(+):1(-)	149(+)48(-)	0,04	84	3,16
P8286-V7	STS	737	737	-	-	-	-	-	-
SAS13	SCAR	1000	-	197	3(+):1(-)	139(+)58 (-)	2,07	15	2,93
SH18	SCAR	1100	-	197	3(+):1(-)	140(+)57(-)	1,63	20	6,42
P8285-V1	STS	732	730	196	1(RR):2(Rr):1(rr)	47(RR)89(Rr) 60 (rr)	3,38	18	3,37
P8286-V6	STS	643	628	196	1(RR):2(Rr):1(rr)	47 (Rr)90(Rr)59(rr)	2,78	25	2,58
SBB14	SCAR	1222	1092	195	1(RR):2(Rr):1(rr)	46(RR)100(Rr)49(rr)	0,22	89	5,01

<sup>1</sup>Genitor 1 – SEL 1308; <sup>2</sup>Genitor 2 – BRS Cometa; <sup>3</sup>Número de plantas; <sup>4</sup>Proporção esperada: (-) presença da banda, (+) ausência da banda, RR : progênies homozigotas resistentes, Rr: progênies heterozigotas resistentes, rr: progênies homozigotas suscetíveis; <sup>5</sup>Proporção observada; <sup>6</sup>Porcentagem de probabilidade do  $\chi^2$ ; <sup>7</sup>Distância genética em centimorgans.

Dentre os marcadores ligados por repulsão, observou-se que seis STS (P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3) foram mapeados a uma distância de 0,0 cM entre si e 2,64 cM do alelo do *Co-4<sup>2</sup>*. Por sua vez, os marcadores MSAS4 e P8286-V4 estão ligados ao alelo de resistência a 10,21 cM e 3,16 cM, respectivamente. Os resultados sugerem que esses marcadores, com exceção do MSAS4 e P8286-V4, apresentam grande potencial para serem utilizados rotineiramente em programas de SAM, particularmente nas etapas iniciais de seleção de genótipos resistentes. Marcadores ligados por repulsão são considerados altamente eficientes na seleção de genótipos homozigotos resistentes, o que reflete em grande redução da quantidade de plantas a serem avaliadas, pois evita testes de progênies. É notório que essa característica atribui maior eficiência e agilidade no processo de desenvolvimento de linhagens elite resistentes a antracnose, por isso, a literatura é rica em trabalhos que reportam o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados por repulsão a genes de resistência a doenças em feijoeiro-comum (Young & Kelly, 1997; Geffroy et al., 1998; Alzate-Marin et al., 1999; Côrrea et al., 2000; Miklas et al., 2000; Alzate-Marin et al., 2003; Alzate-Marin et al., 2004; Queiroz et al., 2004; Méndez-Vigo et al., 2005 e Rodríguez-Suárez et al., 2008). Entretanto, para o gene *Co-4<sup>2</sup>*, ainda não há relatos anteriores de marcadores ligados por repulsão. Isto sugere que os marcadores validados neste estudo são os primeiros dessa natureza estritamente relacionados ao *Co-4<sup>2</sup>*.

Conforme já previsto, o marcador SAS13, desenvolvido por Young et al. (1998), está ligado por acoplamento ao alelo *Co-4<sup>2</sup>*. Contudo, esse marcador foi posicionado mais distante do alelo de resistência (2,93 cM), discordando de estimativas relatadas anteriormente na literatura. Nos trabalhos de Young et al. (1998) e Oblessuc et al. (2015), o SCAR SAS13 foi posicionado, respectivamente, a 0,39 e 0,70 cM do alelo *Co-4<sup>2</sup>*. Entretanto, é importante mencionar que esses autores utilizaram populações segregantes com tamanhos populacionais menores em relação às populações avaliadas no presente estudo, o que justifica as diferenças observadas nas distâncias genéticas entre o alelo *Co-4<sup>2</sup>* e o marcador SAS13. Oblessuc et al. (2015) avaliaram 98 indivíduos F<sub>2</sub> e 84 progênies F<sub>2,3</sub>. Young et al. (1998), por sua vez, utilizaram somente 99 indivíduos F<sub>2</sub> em seu trabalho. No presente estudo os tamanhos amostrais foram de 261 plantas F<sub>2</sub> e 197 progênies F<sub>2,3</sub>. Segundo Bhering & Cruz (2008), o tamanho populacional é um dos fatores de fundamental

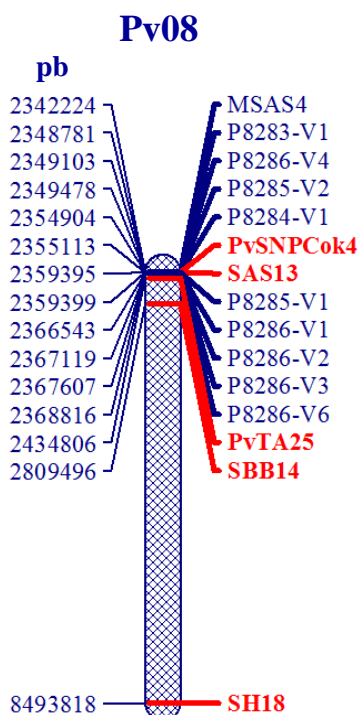
importância para estimar a distância e o ordenamento correto de marcadores e genes ao longo do cromossomo. Dessa forma, quanto maior o tamanho amostral das populações segregantes, maior será a precisão dos resultados.

De forma similar ao SAS13, o SCAR SH18 também está ligado em fase de acoplamento a *Co-4<sup>2</sup>*, corroborando resultados apresentados por Awale & Kelly (2001), Oblessuc et al. (2015) e Trabanco et al. (2015). Esse marcador foi desenvolvido por Awale & Kelly (2001), a partir do sequenciamento do fragmento amplificado pelo RAPD OH18, utilizando o genótipo SEL 1308. Juntamente com o trabalho de identificação do marcador, os autores também realizaram um estudo de co-segregação, utilizando-se 76 plantas F<sub>2</sub> (SEL 1308 x Black Magic), e constataram que o SH18 está ligado a *Co-4<sup>2</sup>* por uma distância de  $4,27 \pm 2,37$  cM. Entretanto, alguns trabalhos relatam ligação desse marcador ao alelo *Co-4<sup>2</sup>* a distâncias maiores em comparação com as estimativas apresentadas anteriormente, provavelmente justificadas por diferenças nos tamanhos amostrais das populações segregantes avaliadas. Oblessuc et al. (2015) utilizaram 99 indivíduos F<sub>2</sub> e 84 progênies F<sub>2,3</sub>, também provenientes de cruzamentos entre SEL 1308 e Black Magic e observaram que o SH18 encontra-se ligado ao *Co-4<sup>2</sup>* a uma distância de 10,4 cM. Por sua vez, no presente estudo esse marcador foi mapeado a 6,42 cM do alelo *Co-4<sup>2</sup>*. De modo geral, apesar do SCAR SH18 ser mais reprodutível, comparativamente ao RAPD que lhe deu origem, observa-se uma alta distância entre esse marcador e o *Co-4<sup>2</sup>*, o que o torna pouco eficiente na seleção indireta de genótipos portadores dessa resistência quando utilizado individualmente.

No que se refere aos marcadores codominantes analisados, observa-se que as distâncias relativas ao alelo *Co-4<sup>2</sup>* variaram de 2,58 cM (P8286-V6) a 5,01 cM (SBB14). A alta distância genética estimada entre o SCAR SBB14 e o alelo *Co-4<sup>2</sup>* foi concordante com resultados reportados por Awale & Kelly (2001) e Oblessuc et al. (2015). Portanto, apesar de possuir natureza codominante, este estudo revelou o SBB14 não constitui um bom marcador para implementação em programas de seleção assistida do *Co-4<sup>2</sup>*, conforme foi relatado por Arruda (2009). Em contrapartida, a análise de co-segregação evidenciou que dentre os marcadores codominantes validados, o STS P8286-V6 está fortemente ligado a *Co-4<sup>2</sup>*. Tal constatação provavelmente decorre do fato de que esse marcador foi identificado a partir de um gene-alvo (*Phvul.008G028600*) altamente homólogo à ORF

(*Open Read Frame*) *Cok-4*, localizada dentro do gene *Co-4* de resistência à antracnose (Cieslak, 2014; Melloto & Kelly, 2001). Dessa forma, esses resultados sugerem que o marcador P8286-V6, além de ser codominante, constitui uma excelente ferramenta para a seleção do alelo *Co-4*<sup>2</sup>.

O alinhamento e mapeamento físico dos marcadores moleculares com a sequência do genoma de referência do feijoeiro-comum indicou que o ordenamento físico é parcialmente concordante com as estimativas das posições genéticas. Todos os marcadores estão fisicamente mapeados no cromossomo Pv08, assim como o gene *Co-4* de resistência à antracnose (Figura 8).



**Figura 8.** Mapa físico do cromossomo Pv08 de *Phaseolus vulgaris*, indicando o posicionamento do alelo *Co-4*<sup>2</sup> de resistência à antracnose em relação a marcadores STS, SSR e SCAR previamente identificados (cor vermelha) e novos marcadores validados neste trabalho (cor azul).

A menor distância física foi observada entre SAS13 e P8285-V1 (4 pb), e a maior distância foi obtida entre o marcador MSAS4 e SH18 (6.151.594 pb). Adicionalmente, constatou-se que somente os marcadores P8286-V1, P8286-V3, MSAS4, SBB14 e SH18 foram alinhados em diferentes posições do genoma, o que reflete a possibilidade de estarem associados a outros genes de resistência a doenças. O marcador SCAR SW13, por exemplo, está ligado, ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> a  $1 \pm 5$  cM no grupo de ligação Pv08

e aos genes *I* e *bc-3*, localizados no grupo de ligação Pv02, que conferem resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) (Melloto & Kelly, 1998; Burle et al., 2010; Bello et al., 2014). Do ponto de vista prático, a associação simultânea de um marcador a genes que conferem resistência a múltiplos patógenos pode ser vantajosa, pois possibilita a seleção indireta de genótipos superiores a partir de um único marcador, reduzindo custos e mão-de-obra.

Richard et al. (2013) demonstraram que o gene *Co-4* está localizado em uma região de 325 Kpb (Chr08: 2.245.000 – 2.570.000), adjacente ao telômero do cromossomo Pv08 de *P. vulgaris*. Logo, todos os marcadores, com exceção dos SCAR SBB14 e SH18, estão posicionados na região do genoma que compreende o gene *Co-4* e, conseqüentemente, o alelo *Co-4*<sup>2</sup>.

Outro aspecto de grande interesse refere-se ao ordenamento dos marcadores SSR PvTA25 e SNP PvSNPCok-4. Esses marcadores foram validados por Oblessuc et al. (2015) e destacam-se pela forte ligação ao *Co-4*<sup>2</sup>, juntamente com o SCAR SAS13. Os autores reportaram que os marcadores SAS13 e PvTA25 flanqueiam o *Co-4*<sup>2</sup> a uma distância de 1,4 cM. Por sua vez o SNP PvSNPCok-4 foi posicionado a 2,8 cM do alelo e a 1,4 cM do PvTA25. No presente estudo, os marcadores PvTA25 e PvSNPCok-4 foram mapeados fisicamente a menores distâncias dos STS P8286-V6 (65.990 pb) e P8284-V1 (209 pb), respectivamente (Figura 8).

Por fim, considerando os resultados do estudo de co-segregação, conclui-se que o STS P8286-V6 possui um grande potencial para seleção de linhagens portadoras do *Co-4*<sup>2</sup> devido à sua forte ligação ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> e à sua natureza codominante. Além deste marcador, P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2 e P8286-V3, ligados em fase de repulsão ao gene *Co-4*, também foram mapeados a uma pequena distância do alelo de resistência e são úteis por permitirem a seleção de genótipos homozigotos resistentes.

#### 4.3 EFICIÊNCIA DE SELEÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

A utilização de marcadores moleculares fortemente associados ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> em programas de SAM representa, sem dúvidas, um recurso valioso para o desenvolvimento de linhagens de feijoeiro-comum contendo esse importante alelo de

resistência à antracnose. Quanto maior a eficiência de seleção (ES) de um marcador, maior será a sua contribuição na tomada de decisões pelos programas de melhoramento (Silva et al., 2007b). Nesse sentido, foi estimada a ES dos 13 marcadores ligados ao *Co-4<sup>2</sup>* utilizados neste estudo.

Os resultados revelaram que os marcadores P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3 e P8286-V6 apresentaram estimativas de ES superiores (99%) em relação aos demais marcadores analisados (Tabela 8). Por sua vez, a menor ES (84%) foi atribuída ao MSAS4, mapeado a uma distância de 10,21 cM do *Co-4<sup>2</sup>*. É importante ressaltar que o ordenamento obtido no mapeamento genético é altamente confiável, visto que os marcadores posicionados a menores distâncias do alelo *Co-4<sup>2</sup>* apresentaram as maiores estimativas de ES.

**Tabela 8.** Estimativas das distâncias de ligação, das frequências de recombinação e da eficiência de seleção de 13 marcadores SCAR, SSR e STS em relação ao alelo *Co-4<sup>2</sup>* de resistência à antracnose do feijoeiro-comum.

Marcador	Distância de ligação (cM)	Frequência de recombinação (Fr)	Eficiência de seleção (%)
MSAS4	10,21	0,100	84
P8283-V1	2,64	0,026	99
P8284-V1	2,64	0,026	99
P8285-V2	2,64	0,026	99
P8286-V1	2,64	0,026	99
P8286-V2	2,64	0,026	99
P8286-V3	2,64	0,026	99
P8286-V4	3,16	0,031	98
SAS13	2,93	0,029	93
SH18	6,42	0,064	85
P8285-V1	3,37	0,034	98
P8286-V6	2,58	0,025	99
SBB14	5,01	0,500	88



Os marcadores STS destacaram-se pela maior eficiência em discriminar genótipos portadores do alelo de resistência comparativamente aos marcadores SAS13, SH18 e SBB14, previamente relatados na literatura como ligados ao *Co-4*<sup>2</sup>. Do ponto de vista do melhoramento genético, esses STS, além de serem eficientes no monitoramento do alelo de resistência, são particularmente vantajosos por serem acessíveis a laboratórios suficientemente equipados para procedimentos simples, tais como eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida. Alternativamente, também podem ser utilizados em laboratórios de média e alta infraestrutura, para procedimentos mais aprimorados como eletroforese capilar por meio da marcação de *primers* com fluoróforos específicos e genotipagem em sequenciador automático.

#### 4.4 ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES MOLECULARES

A análise de caracterização molecular de linhagens de feijoeiro-comum permitiu a obtenção de informações mais detalhadas acerca da especificidade dos marcadores moleculares testados neste trabalho em relação ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Ao todo, 12 linhagens foram caracterizadas, sendo que quatro delas são portadoras de variações alélicas do gene *Co-4* (G 2333, PI207262, SEL 1308 e TO) (Tabela 9).

Os marcadores MSAS4, MSAB3, P8286-V1, P8286-V2 e P8286-V3 discriminaram as plantas portadoras dos diferentes alelos do gene *Co-4*, bem como o gene de resistência presente na cultivar-elite BRSMG Realce, ainda não identificado. De acordo com Melo et al. (2014), essa cultivar apresenta moderada resistência em campo aos patótipos 65, 73, 77, 81, 91, 475 e 479 de *C. lindemuthianum*. Entretanto, estudos mais detalhados estão em curso visando à completa caracterização dos genes de resistência à antracnose presentes nessa cultivar de feijão rajado. Dos 15 marcadores moleculares analisados, apenas o SCAR SBB14 amplificou fragmentos para genótipos portadores de diferentes genes, dentre os quais o *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*. Logo, é possível inferir que este marcador é inespecífico, ou seja, apresenta pouca eficiência na detecção específica do gene *Co-4*, além da baixa eficiência de seleção. Certamente, as características mencionadas tornam este marcador pouco viável para SAM do alelo *Co-4*<sup>2</sup>.

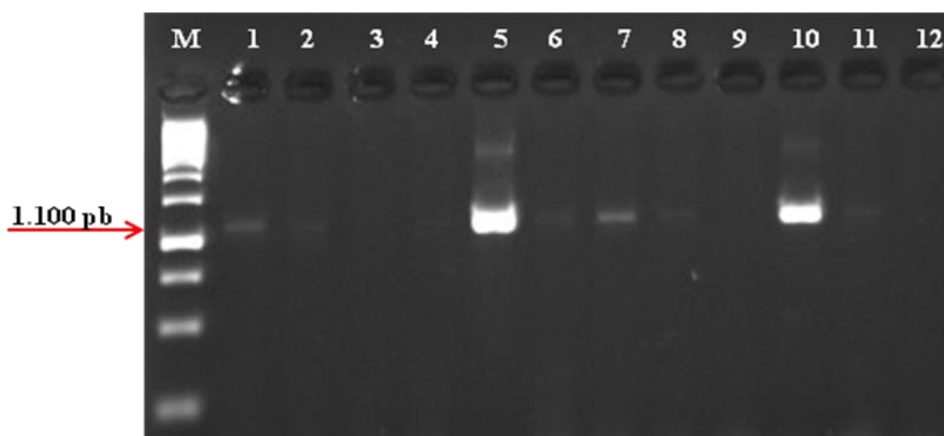
**Tabela 9.** Perfil molecular de genótipos de feijoeiro-comum contendo diferentes alelos de resistência à antracnose com base em 15 marcadores moleculares associados ao gene *Co-4*.

Marcadores	Genótipos <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<i>Loci</i>	<i>Co-6</i>	<i>Co-?</i> <sup>2</sup>	<i>Co-?</i>	<i>Co-?</i>	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	<i>Co-3</i> <sup>4</sup>	-	<i>Co-3</i> <sup>4</sup> / <i>Co-4</i> <sup>3</sup>	-	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	<i>Co-4</i>	<i>Co-5</i>
MSAS4		435	435	435	466	- <sup>3</sup>	435	435	-	435	-	-	435
MSAB3		318	318	318	297	318	318	318	321	318	318	321	318
P8283-V1		740	740	740	740	-	740	740	-	740	-	-	740
P8284-V1		750	750	750	750	-	750	750	-	750	-	-	750
P8285-V1		732	732	732	732	730	732	732	730	-	730	730	732
P8285-V2		620	620	620	620	-	620	620	-	-	-	-	620
P8286-V1		750	750	750	-	-	750	750	-	750	-	-	750
P8286-V2		750	750	750	-	-	750	750	-	750	-	-	750
P8286-V3		750	750	750	-	-	750	750	-	750	-	-	750
P8286-V4		730	730	730	730	-	730	730	-	730	-	730	730
P8286-V6		628	628	628	732	643	628	628	643	628	643	730	628
P8286-V7		737	737	737	652	737	737	737	737	737	737	730	737
SAS13		-	-	-	-	1000	-	-	1000	-	1000	-	-
SBB14		1222	1092	1092	1092	1222	1092	1092	1092	1092	1222	1092	1222
SH18		-	-	-	-	1100	-	-	-	-	1100	-	-

<sup>1</sup>Genótipos: (1) AB136; (2) BRS Cometa; (3) BRS Horizonte; (4) BRSMG Realce; (5) G 2333; (6) Ouro Negro; (7) Pérola; (8) PI207262; (9) Rosinha G2; (10) SEL 1308; (11) TO; (12) TU;

<sup>2</sup>Genes/alelos de resistência não identificado; <sup>3</sup>Ausência de amplificação para o genótipo/marcador.

Por sua vez, os marcadores P8283-V1, P8285-V1, P8286-V4, P8286-V6, SAS13 e SH18 discriminaram apenas os genótipos portadores de alelos do gene *Co-4*. Destes, somente o SCAR SH18 está especificamente associado ao *Co-4<sup>2</sup>*, apesar de apresentar baixa eficiência de seleção (85%) (Tabela 7; Figura 9). Por outro lado, vale ressaltar que o marcador STS P8286-V4 destaca-se pela alta eficiência de seleção (98%) e, adicionalmente, discrimina os genes de resistência presentes em SEL 1308, G 2333 e PI207262. Contudo, os resultados indicam que nenhum dos marcadores analisados, possui, concomitantemente, alta eficiência de seleção e especificidade para detecção do *Co-4<sup>2</sup>*. Isto sugere a necessidade do uso marcadores em combinação ou de forma sequencial para a seleção específica e eficiente do alelo *Co-4<sup>2</sup>*.



**Figura 9.** Perfil eletroforético do produto de amplificação do marcador SCAR SH18. (M) marcador de peso molecular; (1) AB136 (*Co-6*); (2) BRS Cometa (*Co-?*); (3) BRS Horizonte (*Co-?*); (4) BRSMG Realce (*Co-?*); (5) G 2333 (*Co-4<sup>2</sup>*); (6) Ouro Negro (*Co-3<sup>4</sup>*); (7) Pérola (-); (8) PI207262 (*Co-3<sup>4</sup>/Co-4<sup>3</sup>*); (9) Rosinha G2 (-); (10) SEL 1308 (*Co-4<sup>2</sup>*); (11) TO (*Co-4*); (12) TU (*Co-5*). A seta indica a banda de aproximadamente 1.100 pb ligada especificamente ao alelo *Co-4<sup>2</sup>* de resistência à antracnose.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que os STS P8283-V1, P8284-V1, P8285-V2, P8286-V1, P8286-V2, P8286-V3 e P8286-V6 são mais eficientes na seleção dos genótipos portadores dos alelos *Co-4*, *Co-4*<sup>2</sup> e *Co-4*<sup>3</sup>, comparativamente aos marcadores SAS13, SH18 e SBB14, previamente relatados na literatura. Isso permite inferir que esses marcadores são mais promissores para implementação em programas de SAM dos diferentes alelos do gene *Co-4* de resistência à antracnose, possibilitando maior eficiência na tomada de decisões pelos melhoristas de feijoeiro-comum.

Os marcadores STS e SSR validados neste estudo não foram eficientes na discriminação de alelos específicos do gene *Co-4*, sendo que somente o SCAR SH18 está especificamente associado ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>. Portanto, recomenda-se a utilização combinada ou sequencial dos marcadores P8286-V6 e SH18 para seleção do alelo *Co-4*<sup>2</sup> em detrimento dos demais alelos do gene *Co-4* que estejam segregando na população. Para SAM em populações nas quais apenas o alelo *Co-4*<sup>2</sup> está presente, sugere-se a utilização apenas do marcador P8286-V6, que se destaca por ser codominante e eficiente na seleção de genótipos portadores do alelo de resistência. Vale ressaltar que tanto o SH18, quanto o P8286-V6 podem ser aplicados em diferentes procedimentos de genotipagem, entre os quais se incluem eletroforese vertical, horizontal e capilar. Por isso, a utilização combinada ou sequencial desses marcadores em SAM representa uma alternativa eficiente e bastante flexível, diante da possibilidade de adoção por laboratórios com diferentes níveis de infraestrutura. Assim, a adoção rotineira desses marcadores em programas de melhoramento pode contribuir efetivamente no desenvolvimento de linhagens de feijoeiro-comum resistentes à antracnose.

- ABUD, R. O. G.; WENDLAND, A.; PEREIRA, R. J.; MELO, L. C. M.; PEREIRA, H. S. P.; COSTA, J. G. C. Frequência de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* nos estados brasileiros produtores de feijoeiro comum. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 6, 2011, Búzios. **Anais...**
- ADAM-BLONDON, A. F.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 6-7, p. 865-870, 1994.
- AGUIAR, R. S.; MODA-CIRINO, V.; FARIA, R. T. F.; VIDAL, L. H. I. Avaliação de linhagens promissoras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tolerantes ao déficit hídrico. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2008.
- ALCÂNTARA, B. K. **Caracterização da diversidade genética de teca (*Tecnona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ALZATE-MARIN, A. L.; BAYA, G. S.; PAULA-JUNIOR, T. J.; CARVALHO, G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 5, p. 996-998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G. A.; PAULA-JUNIOR, T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopatology**, v. 89, p. 281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; CHAGAS, J. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistant gene in common bean cultivar AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 633-637, 2000.
- ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; BAÍA, G. S.; PAULA-JÚNIOR, T. J.; SOUZA, K. A.; COSTA, M. R.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4*<sup>2</sup> gene. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 149, p. 259-264, 2001.
- ALZATE-MARIN, A. L.; SILVA, M. G. M.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Inheritance of anthracnose resistance genes of common bean cultivar PI 207262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 45, p. 112-113, 2002.

ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, K. M.; MOREIRA, M. A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 46, p. 173-174, 2003a.

ALZATE-MARIN, A. L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 47, p. 241-242, 2004.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

ALZATE-MARIN, AL.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.M.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4<sup>3</sup>* and *Co-9* in common bean cultivar Tlalnepantla 64 (PI 207262), **Euphytica**, Netherlands, v. 154, p. 1-8, 2007.

ALVARES, R. C. **Escurecimento de grãos em feijão: parâmetros genéticos e fenotípicos, associação com tempo de cocção, seleção assistida por marcadores e obtenção de linhagens elite**. 2015. Tese (Doutorado em GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

ARRUDA, M. C. C.; ALZATE-MARIN, A. L.; CHAGAS, J. M.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Identificação de marcadores de DNA polimórfico amplificado ao acaso ligados ao gene de resistência *Co-4* a *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p.758-761, 2000.

ARRUDA, K. M. A. **Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular e estudos de alelismo em feijão comum**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

AWALE, H. E.; KELLY, J. D. Development of SCAR markers linked to *Co-4<sup>2</sup>* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 44, p. 119-120, 2001.

BALARDIN, R. S.; PASTOR-CORRALES, M. A.; OTOYA, M. M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 1184-1191, 1990.

BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1184-1191, 1997.

BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 6, p. 1038-1047, 1998.

BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'antracnose. **Annual de Amélioré des Plantes**, Paris, v. 15, n. 2, p. 201-222, 1965.

BARRUS, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, Berlin, v. 1, p. 190-199, 1911.

BARRUS, M. F. Varietal susceptibility of beans to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Briosi & Cavara. **Phytopathology**, Berlin, v. 8, p. 589-614, 1918.

BEEB, S. E.; RAO, M. I.; BLAIR, M. W.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Phenotyping common beans for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1-20, 2013.

BELLO, M. H.; MOGHADDAM, S. M.; MASSOUDI, M.; McCLEAN, P. E.; CREGAN, P. B.; MIKLAS, P. N. Application of in silico bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common bean. **BMC genomics**, Londres, v. 15, n. 1, p. 903, 2014.

BERALDO, A. L. A. **Utilização de SCARs para avaliações de genes de resistência à antracnose em feijoeiro**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

BERALDO, A. L. A.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 53-61, 2009.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, Madson, v. 48, n. 5, p. 1649-1664, 2008.

BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 379-385, 2008.

BLAIR, M. W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H. F.; GAITAN-SOLIS, E.; BEEBE, S. E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 8, p. 1362-74, 2003.

BOERSMA, J. G.; CONNER, R. L.; BALASUBRAMANIAN, P. M.; YU, K.; HOU, A. Marker-assisted dissection of anthracnose resistance in the dry bean cultivar Morden003. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 93, n. 6, p. 1115-1123, 2013.

BONETT, L. P.; SCHEWE, I.; SILVA, L. I. Variabilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro comum no oeste do Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-210, 2008.

BORGES, A.; MELOTTO, M.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology**, Saint Paul, v. 169, n. 8, p. 1216-1220, 2012.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2003 n. 21, 16 p. (**Comunicado Técnico**).

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C. Aplicação de tecnologias genômicas baseadas em marcadores microssatélites para discriminação de cultivares e análise de pureza genética em feijoeiro-comum. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006, n.132, 5p. (**Comunicado Técnico**).

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, Philadelphia, v. 234, n. 3, p. 177-186, mai. 1999.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEB, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and soil**, Netherlands, v. 252, n. 2, p. 55-128, 2003.

BURKHOLDER, W. H. The gamma strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Bri.et Cav. **Phytopathology**, Berlin, v. 13, p. 316-323, 1923.

BURLE, M. L.; FONSECA, J. R.; KAMI, J. A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, n. 5, p. 801-813, 2010.

CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDKR and TU. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 2, p. 1-11, 2009.

CANTERI, M. G.; BERGAMIN FILHO, A.; PRIA, M. D.; AMORIM, L. (Ed.). Epidemiologia das doenças. In: CANTERI, M. G.; PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Principais doenças fúngica do feijoeiro: orientações para o manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEGP, 1999, p. 35-51.



CAPUCHO, A. S.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 276-282, 2009.

CARVALHO, G. A.; SEDIYAMA, T. U. N. E. O.; ALZATE-MARIN, A. L.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27, p. 474-478, 2002.

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

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BOSETTI, F.; SASSERON, G. R.; LOPES, R. L. T.; AZEVEDO, C. V. G. Common bean genotypes for agronomic and market-related traits in VCU trials. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 1, p. 34-40, 2015.

CHOI, I. Y.; HYTEN, D. L.; MATUKUMALLI, L. K. SONG, Q.; CHAKY, J. M.; QUIGLEY, C. V.; CHASE, K.; LARK, K.G.; REITER, R. S.; YOON, M. S. HWANG, E. Y.; YI, S. I.; YOUNG, N. D.; SHOEMAKER, R. C.; VAN TASSEL, C. P.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P.B. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. **Genetics society of America**, v. 176, n. 1, p. 685-696, 2007.

CIESLAK, J. F. **Caracterização de regiões genômicas que flanqueiam os locos de resistência à antracnose do feijoeiro-comum *Co-4* e *Co-5***. 2014. Dissertação (Mestrado em GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

CORRÊA, R. X.; COSTA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; RAGAGNIN, V. A.; FALEIRO, F. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 804-807, 2000.

COSTA, M. R. **Melhoramento de feijões preto e vermelho visando resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular com auxílio de marcadores microssatélites**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

COUTO, K. R.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P.; SILVA, G. S. Identificação de marcadores microssatélites relacionados ao escurecimento de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 45, p. 1268-1274, 2010.

CRUZ, A. S. **Mapeamento de genes *Co-10* e *Phg-ON* de resistência à antracnose e à mancha angular na cultivar de feijoeiro comum Ouro negro**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

DAMASCENO E SILVA, K. J.; SOUZA, E. A. ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais. **J. Phytopathology**. Berlin, v. 151, p. 241-247, 2007.

DARBEN, L. M. **Identificação de genótipos de feijoeiro comum resistentes à antracnose por meio de avaliação das reações de incompatibilidade e marcadores moleculares SCAR**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

FARIA, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C.; DA COSTA, J. G. C.; RAVA, C. A.; DÍAZ, J. L. C.; DE FARIA, J. C.; DA SILVA, H. T.; SARTORATO, A.; BASSINELLO, P. Z. BRS Cometa: a carioca common bean cultivar with erect growth habit. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**. Viçosa, v. 8, n. 2, p. 167-169, 2008.

DEL PELOSO, M. J.; CARNEIRO, J. E. S.; Melhoramento do feijoeiro visando obtenção de cultivares produtivas e resistentes à antracnose e crestamento bacteriano para o Estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 147, 1989.

DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C. **Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro-comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 131 p.

DOERGE, R. W. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v. 2, p.121-132, 1996.

DONGFANG, Y.; CONNER, R. L.; Yu, K.; BALASUBRAMANIAN, P.; PENNER, W. C.; YAGER, L. M. Identification of anthracnose resistance genes in dry bean cultivars grown in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, n. 4, p. 771-781, 2008.

EBANA, K.; YONEMARU, J.; FUKUOKA, S.; IWATA, H.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; NAGASAKI, H.; YANO, M.; Genetic structure revealed by a whole-genome single-nucleotide polymorphism survey of diverse accessions of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Genomics**, Londres, v. 11, n. 8, p. 2-10, 2010.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados de conjuntura da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 - 2013)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao/produtos-processos-e-servicos>>. Acesso em: 12 jun. 2015.

FAGERIA, N. K. Eficiência de uso de fósforo pelos genótipos de feijão. **Revista de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p. 128-131, 1998.

FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 399-402, 2000.

FALEIRO, G. F. **Marcadores genético-moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Cenargen, 2007. 102 p.

FELIPIN-AZEVEDO, R.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SOUSA, L. L.; LACANALLO, G. F.; MARTINS, V. S. R.; CONCEIÇÃO, M. M. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* oriundos dos estados do Paraná e Mato Grosso. In: Congresso Nacional de Feijão, 2014, Londrina. **Anais...**

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Safra de feijão 2012**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2014

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; PÉREZ-VEJA, E.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; GIRALDEZ, R. Introgression and pyramiding into common bean market class fabada of genes conferring resistance to anthracnose and potyvirus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 124, n. 6, p. 777-778, 2011.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; PEREZ-VEGA, E.; RODRIGUEZ-SUAREZ, C.; GIRALDEZ, R. Introgression and pyramiding into common bean market class fabada of genes conferring resistance to anthracnose and potyvirus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 124, n. 4, p. 777-788, 2012.

FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: **Proceedings of the International Symposium on Diseases of Tropical Food Crops**. Louvain-la-Neuve, 1978. Louvain-la-Neuve: Université Catholique de Louvain, Belgium, 1979. p. 221-235.

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

GARZÓN, L. N.; LIGARRETO, G. A.; BLAIR, M. W. Molecular Marker-Assisted Backcrossing of Anthracnose Resistance into Andean Climbing Beans (L.). **Crop science**, Madson, v. 48, n. 2, p. 562-570, 2008.

GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SÉVIGNAC, M.; ADAN-BLONDON, A. F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. A family of LLR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 494-502, 1998.

GEPTS, P.; ARAGÃO, J.L.; BARROS, E.; BLAIR, M. W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNANDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; McCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; KANGFU, Y. Genomics of *Phaseolus*

*vulgaris* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE & MING (Coord.). **Genomics of Tropical Crop Plants**, New York: Springer, 2008. p. 113-143.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. RAPD marker linked to *Co-1<sup>5</sup>* anthracnose resistance gene in Widusa. **Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 47, p. 135-136, 2004.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, Dordrecht, v. 151, n. 4, p. 411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SILVA, C. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVTSHAL, V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, *Co-11*. **Genetics Molecular Biology**, San Francisco, v. 30, n. 3, p. 589-593, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL-FILHO, P. S. A new Andean gene conferring resistance to anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). cultivar Jalo Vermelho. **Plant Breeding**, Westport, v. 127, n. 8, p. 592-596, 2008a.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; THOMAZELLA, C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; KVITSCHAL, M. V.; ELIAS, H. T. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates Using Differential Cultivars of Common Bean in Santa Catarina State, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.5, p. 883-888, 2008b.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL-FILHO, P. S.; MEDEIROS, A. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. Common Bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 133-138, 2009.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; MEIRELLES, A. C.; POLETINE, J. P.; SOUSA, L. L.; CRUZ, A. S.; NUNES, M. P.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL, P. S. Genetic analysis of anthracnose resistance in Pitanga dry bean cultivar. **Plant breeding**, v. 131, n. 3, p. 423-429, 2012.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; LACANALLO, G.L. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose *Co-10* and angular leaf spot *Phg-ON* disease-resistance genes in the common bean cultivar ouro negro. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 126, n. 6, p. 2245-2255, 2013.

GUPTA, P. K.; ROY, J. K; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, Bangaloric, v. 80, n. 1, p. 524-535, 2001.

HAYASHI, T.; ARIMURA, T.; ITOH-SATOH, M.; UEDA, K.; HOHDA, S.; INAGAKI, N.; TAKAHASHI, M.; HORI, H.; YASUNAMI, M.; NISH, H.; KOGA, Y.;

NAKAMURA, H.; MATSUZAKI, M.; CHOI, B. Y.; BAE, S. W.; YOU, C. W.; HAN, K. H.; PARK, J. E.; KNOLL, R.; HOSHIJIMA, M.; CHIEN, K. R.; KIMURA, A. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. **American College of Cardiology Foundation**, Cambridge, v. 44, n. 12, p. 2192-2201, 2004.

HANAI, E. M. **Desenvolvimento de marcadores SSR-EST e construção de mapas genéticos em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2008. 164 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

HEFNI, M.; ÖHRVIK, V.; MOHAMED, T.; WITTHOFT, C. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. **Food chemistry**, v. 121, n. 2, p. 540-545, 2010.

HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T. V.; ZEIGLER, R. S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. . **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 7, n. 2, p. 1121-1128, 2000.

JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP) - methods and applications in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 5, n. 3, p. 435-459, 2006.

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

KELLY, J.D; YOUNG, R. A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 39, p. 20-24. 2006.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro – *Phaseolus vulgaris*. In: GALLI, F. (eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 297-318.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. 774 p.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v.12, p.172-175, 1944.

LACANALLO, G. F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; KAMI, J.; GONELA, A. Mapping of an Andean gene for resistance to anthracnose in the landrace Jalo Listras Pretas. **Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 53, p. 96-97, 2010

LITT, M.; LUTY, J.A.; A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. New York: CRC Press, 1997. 648 p.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, v. 144, n. 3, p. 78-79, 2007.

MARCONDES, E. H. K.; SANTOS, J. B.; PEREIRA, H. Seleção de linhagens de feijoeiro com tipo de grão carioca e com os alelos *Co-4* e *Co-5* de resistência à antracnose. **Ciência agrotecnológica**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 975-982, 2010.

MARKELL, S.; WUNSCH, M.; DEL RIO, L. **Anthracnose of dry beans**. Fargo: North Dakota Agricultural Experiment Station, 2012. 4 p. Disponível em: < <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/pests/pp1233.pdf> >. Acesso em: 12 nov. 2013.

MARTINS, V. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL FILHO, P. S. Validation of molecular markers linked to alleles controlling growth habit in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 11, p. 1503, 2014.

MASTENBROEK, C. A breeding program e for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based a new gene. **Euphytica**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 177-258, 1960.

McCLEAN, P. E.; MAMIDI, S.; McCONNELL, M.; CHIKARA, S.; LEE, R.; Syntenic mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. **BMC genomics**, Londres, v. 11, n. 1, p. 184, 2010.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. SCAR marker linked to major disease resistance genes in common bean. **Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 41, p. 64-65, 1998.

MELLOTO, M.; KELLY, J. D. An allelic serie at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Dordrecht, v. 116, n. 2, p. 143-149, 2000.

MENDÉZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. **Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 45, p. 116-117, 2002.

MENDÉZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 141, n. 3, p. 237-245, 2005.

MENDOZA, A.; HERNANDEZ, F.; HERNANDEZ, S. Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 3, p. 252-255, 2001.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in

specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, 1991.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, M. J.; STAVELY, J. R.; STEADMAN, J. R.; BEAVER, J. S. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population (Dorado'/XAN 176). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 4, p. 476-481, 2000.

MOHAMMED, A.; AYALEW, A.; DECHASSA, N. Effect of integrated management of bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. and Magn.) through soil solarization and fungicide applications on epidemics of the disease and seed health in Hararghe Highlands, Ethiopia. **Plant Pathology & Microbiology**, Riverside, v. 4, n. 6, p. 2-7, 2013.

MONTOYA, C. A.; LALLÉS, J. P.; BEEB, S.; LATTERMÉ, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans. **Food Research International**, Philadelphia, v. 43, n. 2, p. 443-449, 2010.

MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G. R. A.; GARCIA, A. A. F. Comparação dos algoritmos delimitação rápida em cadeia e serialização, para a construção de mapas genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 505-512, 2008.

MUHALET, C. S.; ADAMS, M. W.; SAETLER, A. W.; GHADERI, A. Genetic system for the reaction of field beans to beta, gamma and delta races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 106, n. 2, p. 601-604, 1981.

NOGUEIRA, G. B.; QUEIROZ, M. V.; RIBEIRO, R. A.; ARAÚJO, E. F. Structural and functional characterization of the *Colletotrichum lindemuthianum nit1* gene, which encodes a nitrate reductase enzyme. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 420-433, 2013.

OBLESSUC, P. R.; BORGES, A.; CHOWDHURY, B.; CALDAS, D. G. G.; TSAI, S. M.; CAMARGO, L. E. A.; MELOTTO, M. Dissectin *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-14, 2012.

OBLESSUC, P. R.; FRANCISCO, C.; MELOTTO, M. The Co-4 locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 *COK-4* genes and is regulated by immune response in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 6, p. 1193-1208, 2015.

OLIVEIRA, M. B. Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microsatélites genotipados em sequenciador automático. 2009. 87f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura). UNIPAR. Umuarama, 2009.

PÁDUA, J. M. V. **Implicações da seleção precoce para resistência à antracnose no melhoramento genético do feijoeiro**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

PARADELA FILHO, O.; ITO, M. F.; POMPEU, A. S. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, p. 181-187, 1991.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 985-993, 1993.

PARRELLA, N. N. L. D.; SANTOS, J. B.; COSTA, R. A. P. Seleção de famílias de feijão com resistência à antracnose, produtividade e tipo de grão carioca. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1503-1509, 2008.

PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. Antracnose. In: PASTOR-CORRALES, M. A.; SCHWARTZ, H. H. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104.

PASTOR-CORRALES, M. A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 694, 1991.

PASTOR-CORRALES, M. A.; OTAYA, M. M.; MOLINA, A.; SINGH, S. P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 1, p. 63-67, 1995.

PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. **Doenças**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa: UFV, 1998. p.375-433

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B. S.; BARBOSA, A. A. F.; CALDAS, D. G. G.; TSAI, S. M.; CAMARGO, L. E. A.; MELOTTO, M. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agrônômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 209-215, 2004.

PERSEGUINI, J. M. K. C.; CHIORATTO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; COLOMBO, C. A.; CARBONELL, S. A.; COSTA, M. J. M.; GAZAFFI, R.; FRANCO, A. A. G.; DE CAMPOS, T.; DE SOUZA, A. P.; RUBIANO, L. B. Genetic diversity cultivated carioca common beans based on molecular marker analysis. **Genetics Molecular Biology**, San Francisco, v. 34, n. 1, p. 88-102, 2011.

PHYTOZOME. *Phaseolus vulgaris*. Disponível em: <<http://www.phytozome.net/search.php>>. Acesso em: 11 jun. 2014



RAGAGNIN, V. A.; ALZATE-MARIN, A. L.; SOUZA, T. L. P. O; ARRUDA, K. M. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 591-596, 2003.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *C. lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p. 167-172, 1994.

RICHARD, M. M.; CHEN, N. W.; THAREAU, V.; PFLIEGER, S.; BLANCHET, S.; PEDROSA-HARAND, A.; GEFFROY, V. The subtelomeric khipu satellite repeat from *Phaseolus vulgaris*: lessons learned from the genome analysis of the Andean genotype G19833. **Frontiers in plant science**, Lausanne Switzerland, v. 4, 2013.

RIOS, S. A.; ALVES, K. R.; COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. D. Biofortificação: culturas enriquecidas com micronutrientes pelo melhoramento genético. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 713-718, 2009.

RODRÍGUES-GUERRA, R.; RAMÍRES-RUEDA, M. T.; MARTINEZ DE LA VEGA, O; SIMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 52, n. 2, p. 228-235, 2003.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J. J.; GIRALDEZ, R. Allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 47, p. 145-146, 2004.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 116, n. 6, p. 807-814, 2008.

SANSIGOLO, A.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M. V. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Paraná state, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 51, p. 192-193, 2008.

SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A.; SINGH, P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris*). **Euphytica**, Dordrecht, v. 31, p. 741-754, 1982.

SCHREIBER, F. Zurgenetik der weissen und schwarzen farbe bei *Phaseolus vulgaris*. **Zuchter**, Berlin, v. 6, p. 53-61, 1934.

SILVA, M. V.; SANTOS, J. B. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo *Co-4*<sup>2</sup> de resistência do feijoeiro comum ao agente causal da antracnose. **Revista Ciencia e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1097-1104, 2001.

SILVA, M. G. M.; ALZATE-MARIN, A. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Association between RAPD marker OPAS13<sub>950C</sub> and anthracnose resistance allele *Co-4*<sup>3</sup> of common bean cultivar PI 207262. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 7, p. 21-26, 2007a.

SILVA, M. F. D.; SCHUSTER, I.; SILVA, J. F. V. D.; FERREIRA, A.; BARROS, E. G. D.; MOREIRA, M. A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143-1150, 2007b.

SILVA, M. G. M.; ALZATE-MARIN, A. L.; MOREIRA, M. A. Association between RAPD marker OPAS13(950C) and anthracnose resistance allele *Co-4*<sup>3</sup> of common bean cultivar PI 207262. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 24-28, 2007c.

SILVA, D. F. **Identificação e validação de marcadores moleculares INDEL e SNP para lipoxigenases de sementes de soja**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SINGH, S. P.; SCHUWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 5, p. 2199-2223, 2010.

SOUZA, T. L. P. O.; BARROS, E. G.; BELLATO, C. M.; HWANG, E. Y.; CREGAN P. C.; PASTOR-CORRALES, M. A. Single nucleotide polymorphism discovery in common bean. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 30, n. 6, p. 419-428, 2012.

SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A.; SINGH, S. P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Breeding**, Lleida, v. 30, n. 6, p. 419-428, 1982.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.; ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 371-375, 2004.

TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Identification of a new chromosomal region involved in the genetic control of resistance to anthracnose in common bean. **The Plant Genome**, Madison, v. 8, n. 2, p. 1-11, 2015.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* gene in common bean. **Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 44, p. 121-122, 2001.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. Molecular tagging and genetic characterization of alleles at the *Co-1* anthracnose resistance locus in common bean. **The IUP Journal of Genetics and Evolution**, v. 20, p. 1-7, 2008.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G2333. **The Open Horticultural Journal**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 2009.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005. Review.

VOORRIPS, E. R. MapChart: Software para a apresentação gráfica dos mapas de ligação e QTLs. **The Journal of Heredity**, v.93, p.1-2, 2002

ZAMPROGNO, K. C.; FURTADO, E. L.; MARINO, C. L.; BONINE, C. A.; & DIAS, D. C. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em *Eucalyptus sp.* **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 253-255, 2008.

WILLIAMS, J. G. K.; KENNETH, A. R. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YERKES, W. D. Additional new races of *Colletotrichum lindemuthianum* in México. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 42, n. 3, p. 329, 1958.

YOUNG, A.; KELLY, J. D. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 121, n. 1, p. 37-51, 1996.

YOUNG, A.; KELLY, J. D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 940-946, 1997.

YOUNG, R. A.; MELOTTO, M.; NODARI, R. O.; KELLY, J. D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar G2333. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 7, p. 87-94, 1998.

XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, Madson, v. 48, n. 2, p. 391-407, 2008.