

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ

OBTENÇÃO DE *PRIMERS* MICROSSATÉLITE E  
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E MAPEAMENTO DE  
MARCADORES SCAR EM FEIJOEIRO-COMUM

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Q3o  
2004

Queiroz, Vagner Tebaldi de, 1975-

Obtenção de *primers* microssatélite e desenvolvimento, validação e mapeamento de marcadores SCAR em feijoeiro-comum / Vagner Tebaldi de Queiroz. – Viçosa : UFV, 2004.

xiv, 155f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui referências bibliográficas.

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. 3. Mapeamento cromossômico. 4. Locos de caracteres quantitativos. 5. Polimorfismo do DNA ampliado ao acaso. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.652233

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ

OBTENÇÃO DE *PRIMERS* MICROSSATÉLITE E  
DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E MAPEAMENTO DE  
MARCADORES SCAR EM FEIJOEIRO-COMUM

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de setembro de 2004.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

---

Dr<sup>a</sup>. Eveline Teixeira Caixeta

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

*Aos meus pais Saulo e Eneli.*

*Á minha irmã Creide Márcia.*

*Aos meus avós Vivaldo e Maria, Egídio e Guimar.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela oportunidade de concluir mais este objetivo.

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós, que me deram força para vencer as dificuldades ao longo do caminho e que, certamente, compartilham comigo a felicidade e a realização de mais uma etapa vencida.

À Jaqueline, pelo amor, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor Maurilio Alves Moreira, por me confiar a realização deste trabalho, pelo incentivo e pela orientação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos, desde a iniciação científica até o doutorado.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, à pesquisadora Eveline Teixeira Caixeta e ao Dr. Vilmar Antônio Ragagnin, pelo excelente convívio, pelos ensinamentos, críticas e sugestões apresentadas durante a elaboração deste trabalho.

À Cassiana Severiano de Sousa, pelo fundamental apoio, durante a realização deste trabalho, pelas críticas e paciência. Aos amigos Mateus, Francismar e Thaís, pela consideração e pelo auxílio em vários momentos. Ao amigo Luciano, pelos ensinamentos e pelas sugestões durante a realização das análises estatísticas.

Aos amigos Newton, Márcia Flores, Márcia Costa, Demerson, Klever, Thiago, Francisco, Telma, Inês, Max, Pedro Ivo, Gerardo, Andréia, Cândida, David, Taís, Bia, Marcinho (Maurilio), Marcinho (Patarroyo), Cristiano, Maria Fernanda, Edgard e a

todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Aloízio, Expedito, Pintinho, Cao, Marcão, José Fausto, Gláucia, Edson, Eduardo, Naldo, João Paulo, Pedro e Jander, pelo inestimável apoio.

Aos amigos Zulu, Torão, Fubá, Gê, Maurão, Lock e Idelmino, que compartilharam comigo os bons e/ou maus momentos, durante a realização deste curso.

## **BIOGRAFIA**

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ, filho de Saulo de Tarso Ferreira de Queiroz e de Eneli Moreira Tebaldi de Queiroz, nasceu em 12 de março de 1975, em Itaperuna, Rio de Janeiro.

Em março de 1993, ingressou no Curso de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, graduando-se em Bacharel e Licenciado em julho de 1997.

Em agosto de 1997, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 18 de outubro de 1999.

Em 2000, iniciou o curso de Doutorado na área de Biologia Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em setembro de 2004.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Marcadores RAPD e SCAR.....	4
3.2. Marcadores baseados em microssatélites ou SSR.....	5
3.2.1. Microssatélite.....	5
3.2.2. Ocorrência dos microssatélites.....	5
3.2.3. Distribuição dos microssatélites.....	6
3.2.4. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites.....	6
3.2.5. <i>Primers</i> microssatélites para o feijoeiro-comum.....	8
3.3. Marcadores RAPD, SCAR e SSR associados a genes de resistência no feijoeiro-comum.....	9
3.4. Classificação botânica e organização do genoma do feijoeiro-comum.....	11
3.5. Mapeamento genético.....	12
3.5.1. Construção de mapas genéticos.....	12
3.5.2. Mapas genéticos para o feijoeiro-comum.....	13
3.5.3. Mapeamento de locos de herança simples.....	14
3.5.4. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa.....	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1	
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES SCAR ASSOCIADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR.....	27

1. INTRODUÇÃO .....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1. Material genético e cruzamentos .....	30
2.2. Avaliações fenotípicas.....	31
2.2.1. Patótipos e preparo do inóculo.....	31
2.2.2. Inoculação e avaliação da doença .....	31
2.2.3. Análise de segregação da característica resistência a doença.....	32
2.3. Extração de DNA .....	33
2.4. Marcadores RAPD .....	34
2.4.1. Reações de amplificação utilizando <i>primers</i> únicos.....	34
2.4.2. Reações de amplificação utilizando combinação de <i>primers</i> RAPD.....	35
2.5. Purificação, quantificação, ligação dos fragmentos em vetor de clonagem e transformação de células competentes .....	35
2.6. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos <i>primers</i> SCAR .....	36
2.7. Determinação das condições de amplificação dos <i>primers</i> SCAR .....	36
2.8. Análise de co-segregação dos marcadores SCAR e genes de resistência .....	36
2.9. Determinação da distância genética .....	37
2.10. Nomenclatura dos <i>primers</i> SCAR.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1. Isolamento, clonagem e seqüenciamento de fragmentos de DNA .....	38
3.2. Critérios utilizados para o desenho dos <i>primers</i> SCAR.....	39
3.3. Desenho dos <i>primers</i> SCAR e determinação das condições de amplificação ....	41
3.3.1. <i>Primers</i> SCAR originados de fragmentos RAPD que marcam genes de resistência à mancha-angular.....	42
3.3.1.1. sM02.....	42
3.3.1.2. sBA16.....	44
3.3.1.3. sH13 .....	46
3.3.1.4. sAA19.....	46
3.3.2. <i>Primers</i> SCAR originados de fragmentos RAPD que marcam genes de resistência à ferrugem.....	48
3.3.2.1. sAE19 .....	48
3.3.2.2. sAJ18.....	49
3.3.2.3. sX11 .....	50
3.3.3. <i>Primers</i> SCAR originados de fragmentos RAPD que marcam genes de resistência à antracnose .....	54
3.3.3.1. sAZ20 .....	54
3.3.3.2. sY20 .....	54
3.3.3.3. sC08.....	55
3.3.3.4. sZ04.....	55
3.3.3.5. sB03.....	56
3.3.3.6. sZ09 .....	58
3.4. Validação dos <i>primers</i> SCAR .....	59
3.4.1. Análise de co-segregação dos marcadores SCAR e genes de resistência.....	59
3.4.1.1. Marcadores SCAR associados em acoplamento aos genes de resistência.....	59

3.4.1.2. Marcadores SCAR associado em repulsão ao gene de resistência <i>Ur-11</i> .....	61
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CAPÍTULO 2	
CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS ENRIQUECIDAS, SELEÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO MICROSSATÉLITES, DESENHO E TESTE DE <i>PRIMERS</i> SSR EM FEIJOEIRO-COMUM .....	69
1. INTRODUÇÃO .....	70
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	72
2.1. Material genético .....	72
2.2. Construção das bibliotecas enriquecidas .....	72
2.2.1. Extração de DNA .....	73
2.2.2. Escolha das enzimas de restrição .....	74
2.2.3. Digestão do DNA genômico, separação e purificação dos fragmentos.....	74
2.2.4. Remoção das extremidades coesivas e desfosforilação dos fragmentos.....	74
2.2.5. Ligação do adaptador universal SNX aos fragmentos de DNA.....	75
2.2.6. Confirmação da eficiência da reação de ligação .....	75
2.2.7. Reação de <i>nick-ligation</i> .....	76
2.2.8. Reação pós <i>nick-ligation</i> .....	76
2.2.9. Hibridização dos fragmentos pós <i>nick-ligation</i> com oligonucleotídeos contendo microsatélites.....	77
2.2.10. Preparação das partículas magnéticas .....	77
2.2.11. Captura dos fragmentos de DNA hibridizados .....	78
2.2.12. Síntese de fragmentos de DNA fita dupla.....	78
2.2.13. Preparação dos fragmentos de DNA e do plasmídeo.....	79
2.2.14. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor e transformação de células competentes .....	79
2.3. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos <i>primers</i> microsatélite.....	80
2.4. Determinação das condições de amplificação dos <i>primers</i> microsatélite.....	80
2.5. Teste de amplificação dos <i>primers</i> microsatélite em cultivares geneticamente divergentes .....	81
2.6. Nomenclatura dos <i>primers</i> microsatélite .....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
3.1. Adaptador SNX .....	83
3.2. Escolha das enzimas de restrição .....	84
3.3. Digestão do DNA genômico .....	86
3.4. Remoção das extremidades coesivas, desfosforilação dos fragmentos de DNA e reação de ligação .....	87
3.5. Reação de <i>nick-ligation</i> .....	88
3.6. Hibridização dos fragmentos de DNA pós <i>nick-ligation</i> com oligonucleotídeos contendo microsatélites .....	89

3.7. Transformação e seleção de colônias recombinantes.....	92
3.8. Seqüenciamento, análise e classificação dos fragmentos de DNA contendo microsatélites .....	92
3.9. Desenho e determinação das condições de amplificação dos <i>primers</i> microsatélite.....	96
3.10. Teste de amplificação dos <i>primers</i> microsatélite em cultivares geneticamente divergentes .....	98
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
CAPÍTULO 3	
INTRODUÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE E SCAR EM UM MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE QTL ASSOCIADO AO RENDIMENTO DO FEIJOEIRO-COMUM .....	
	105
1. INTRODUÇÃO .....	106
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	108
2.1. Material genético .....	108
2.2. Extração de DNA .....	108
2.3. <i>Primers</i> microsatélite e SCAR utilizados na amplificação do DNA dos genitores .....	108
2.4. Reações de amplificação utilizando <i>primers</i> microsatélite.....	111
2.5. Reações de amplificação utilizando <i>primers</i> SCAR .....	111
2.6. Análise de ligação .....	112
2.7. Introdução de marcadores moleculares ao mapa genético de ligação.....	112
2.8. Identificação e mapeamento de QTLs.....	112
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	114
3.1. Detecção de polimorfismos entre os genitores.....	114
3.2. Análise de segregação dos <i>primers</i> microsatélite e dos marcadores SCAR....	115
3.3. Repetição da análise de segregação dos marcadores RAPD, das características morfológicas e de resistência à doença. ....	116
3.4. Introdução dos marcadores microsatélite e SCAR ao mapa parcial de ligação .....	117
3.5. Identificação de marcadores associados a QTLs.....	121
3.6. Mapeamento de QTLs .....	124
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	129
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
CONCLUSÕES GERAIS .....	135
APÊNDICE .....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados  
AP-PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase iniciada arbitrariamente  
BAC – Cromossomo bacteriano artificial  
CNPAP – Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Embrapa Arroz e Feijão)  
EMBL – European Molecular Biology Laboratory  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations  
GenBank – NCBI Genetic Sequence Database  
GL – Grupo de ligação  
GQMol – Genética Quantitativa e Molecular  
LOD – Likelihood of odds  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PMGF-BIOAGRO – Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV  
QTL – Locos controladores de característica quantitativa  
RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso  
RFLP – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição  
RIL's – Linhagens recombinantes endogâmicas  
SCAR – Regiões amplificadas caracterizadas por sequência  
SSR – Sequências simples repetidas  
STMS – Sítios de microsátélites marcados por sequência  
USDA – United States Department of Agriculture  
pb – pares de base  
kb – kilobase ( $10^3$  pb)  
cM – centiMorgans

## RESUMO

QUEIROZ, Vagner Tebaldi de, D. S., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2004. **Obtenção de *primers* microssatélite e desenvolvimento, validação e mapeamento de marcadores SCAR em feijoeiro-comum.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Elza Fernandes de Araújo.

Embora apresente várias limitações, a técnica de RAPD ainda representa a principal ferramenta utilizada no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro-comum BIOAGRO/UFV. Para contornar os problemas apresentados por esta técnica, a estratégia utilizada por vários pesquisadores tem sido a conversão dos marcadores RAPD em marcadores SCAR e o desenvolvimento de *primers* microssatélite. Assim, no presente trabalho foram desenvolvidos 5 *primers* SCAR para mancha-angular, 5 *primers* para ferrugem e 7 *primers* para antracnose. Os *primers* desenvolvidos para mancha-angular derivaram-se dos marcadores OPM02<sub>425</sub>, OPBA16<sub>669</sub>, OPH13<sub>490</sub> e OPH14+AA19<sub>400</sub> e foram mapeados, em acoplamento, a 5,3, 7,1, 5,6 e 10,1 cM, dos respectivos genes de resistência. Os *primers* desenvolvidos para ferrugem originaram-se dos marcadores OPAE19<sub>890</sub>, OPX11<sub>550</sub>, OPAJ18+AH10<sub>700</sub>, mas apenas o *primer* sAE19 foi validado. Este foi mapeado, em repulsão, a 1,0 cM do gene de resistência *Ur-11*. Os *primers* para antracnose foram desenvolvidos, a partir da seqüência dos fragmentos OPAZ20<sub>940</sub>, OPY20<sub>830</sub>, OPC08<sub>900</sub>, OPZ04<sub>560</sub>, OPB03<sub>1800</sub>, OPZ09<sub>950</sub>, OPH18<sub>830</sub>. Destes, apenas os *primers* sAZ20, sY20, sC08, sZ04 foram mapeados, em acoplamento, a 7,1, 1,2, 7,8 e 2,9 cM, dos respectivos genes de resistência. Os *primers* microssatélite foram

desenvolvidos, a partir das seqüências de fragmentos de DNA genômico de 3 pequenas bibliotecas enriquecidas. As bibliotecas enriquecidas para as repetições GGC, CCA e AT permitiram a seleção de 79, 172 e 50 clones positivos, respectivamente. Do total de 301 clones que foram identificados, 153 já foram seqüenciados. Observou-se que 40 (26%) clones seqüenciados apresentaram fragmentos de DNA contendo microssatélite, os quais variaram quanto ao tipo, número e tamanho. As seqüências apresentaram repetições de di-, tri-, tetra- e até pentanucleotídeos. Em um mesmo fragmento, foram encontrados até 3 microssatélites. Entre as seqüências analisadas, foram observadas repetições perfeitas, imperfeitas e compostas, variando entre 12 e 24 pb. Até o momento, foram desenhados e testados 10 pares de *primers*, sendo um deles originado da seqüência do marcador RAPD OPAZ20<sub>940</sub>. Destes, apenas 5 pares (FCctc001, FCggc001, FCccg001, FCccg002 e FCgca001) amplificaram fragmentos com tamanho esperado e bem definidos. Entretanto, esses *primers* foram monofórficos, quando testados entre diferentes cultivares andinos e mesoamericanos. Os *primers* SCAR, desenvolvidos e validados no presente trabalho, foram testados juntamente com 45 pares de *primers* microssatélite comerciais, entre os genitores de uma população de 154 RIL's. Dos *primers* selecionados, 7 foram mapeados em 10 grupos de um mapa parcial de ligação já existente e 1 permaneceu não-ligado. O mapa de ligação sofreu pequena variação no tamanho (247,8/252 cM) e no número de grupos de ligação (9/10 grupos). Entretanto, pela análise de variância foram constatadas associações significativas desses marcadores com diferentes características quantitativas. As associações mais significativas foram constatadas por meio de análises de regressão *stepwise*, as quais promoveram alteração no valor de R<sup>2</sup> da regressão múltipla para algumas das características. As características MAT (número de dias até a maturação), VAPLA (número médio de vagens por planta), SEPLA (número médio de sementes por planta) e PRVAG (produção média por vagem), que apresentavam valores de R<sup>2</sup> de 40,14; 28,99; 14,03 e 17,13, tiveram um aumento para 44,30; 34,53; 21,92 e 26,03, respectivamente. A inclusão do marcador sH13 no GL 07 possibilitou a identificação de um novo QTL para a característica VAPLA. Este marcador também mostrou-se associado ao QTL, anteriormente, descrito para SEPLA. O marcador BM165 foi mapeado no GL 02 e mostrou-se associado a 4 QTLs diferentes, identificados para as características MAT, P100 (peso de 100 sementes), SEPLA e PRVAG.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Vagner Tebaldi de, D. S., Universidade Federal de Viçosa, September 2004.  
**Obtainment of the microsatellite *primers* and the development, validation and mapping of SCAR markers in the common bean.** Advisor: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Elza Fernandes de Araújo.

The RAPD technique represents the major molecular tool for assisting the common bean breeding program of the BIOAGRO/UFV, in spite of its limitations. The conversion of the RAPD markers into SCAR ones, as well as the development of SSR primers are the strategy adopted by several researchers in order to relieve these problems. Therefore, 5 *primers* SCAR to angular leaf spot, 5 *primers* to rust and 7 *primers* to anthracnose were developed. The *primers* developed to angular leaf spot were derived from the RAPD markers OPM02<sub>425</sub>, OPBA16<sub>669</sub>, OPH13<sub>490</sub> and OPH14+AA19<sub>400</sub> and were mapped, in coupling phase, at 5.3, 7.1, 5.6 and 10.1 cM, from their respective resistance genes. The *primers* developed to rust were originated from the RAPD markers OPAE19<sub>890</sub>, OPX11<sub>550</sub>, OPAJ18+AH10<sub>700</sub>, although only the *primer* sAE19 was validated. It was mapped, in repulsion, at 1.0 cM distance from the resistance gene *Ur-11*. The *primers* developed for anthracnose were obtained from the fragment sequences of OPAZ20<sub>940</sub>, OPY20<sub>830</sub>, OPC08<sub>900</sub>, OPZ04<sub>560</sub>, OPB03<sub>1800</sub>, OPZ09<sub>950</sub>, OPH18<sub>830</sub>, from which, only the *primers* sAZ20, sY20, sC08, sZ04 were validated. They were mapped, in coupling phase, at 7.1, 1.2, 7.8 and 2.9 cM, from their respective resistance genes. The SSR *primers* were developed from the sequences of the

genomic DNA fragments obtained from three small enriched libraries. The libraries were enriched for the repetitions GGC, CCA and AT and made possible the selection of 79, 172 e 50 positive clones, respectively. From the total of 301 positive and identified clones, 153 were sequenced. From these clones, 40 (26%) presented DNA fragments containing microsatellite that showed variations for type, number, and size. The sequences showed repetitions of two, three, four, and five nucleotides. In the same DNA fragment, a total up to three microsatellites were found. Among the analyzed sequences, some perfect, imperfect, and compound repetitions ranging from 12 to 24 bp were found. Until this moment, only 10 pairs of primers were designed and tested; one of them was originated from the RAPD marker OPAZ20<sub>940</sub>. From those, only 5 pairs (FCctc001, FCggc001, FCccg001, FCccg002 e FCgca001) amplified the well-defined fragments with the expected size. However, those *primers* were monomorphic ones, when tested among different andean and mesoamerican cultivars. The developed and validated SCAR primers were tested together with 45 pairs of commercial SSR primers between the genitors of 154 RIL populations. From the selected primers, 7 were mapped into 10 groups of a partial linkage map already available in the lab, whereas one stayed discoupled. The linkage map was slightly altered in its size (247.8/252 cM) and number of linkage groups (9/10 groups). Variance analysis detected significant associations of these markers with different quantitative traits. The most significant associations were detected by *stepwise* regression analysis that promoted alteration in R<sup>2</sup> values of the multiple regression analysis for some traits. The R<sup>2</sup> values of the traits MAT (the number of days until the bean maturation), VAPLA (the average pod number per plant), SEPLA (the average seed number per plant) and PRVAG (the average yield per pod) increased from 40.14, 28.99, 14.03 and 17.13 to 44.30, 34.53, 21.92 and 26.03, respectively. The marker sH13 included into LG 07 allowed for the identification of a new QTL for the trait VAPLA. This marker also showed to be associated with the QTL previously described for SEPLA. The marker BM165 was mapped in LG 02 and showed to be associated with four different QTLs identified for the traits MAT, P100 (100-seed weight), SEPLA and PRVAG.

## 1.INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o grande consumo do feijão associado à sua adaptação climática contribui para a ampla distribuição da cultura em todo território nacional, conferindo-lhe destacada importância nutricional, econômica e social (FALEIRO, 2000). De acordo com a FAO (2001), o Brasil é o maior consumidor e produtor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com um consumo *per capita* de 16,4 kg/hab./ano. Segundo o IBGE (2003), a produção nacional atingiu 1,6 milhões, 1,2 milhões e 462 mil toneladas para a primeira, segunda e terceira safras, respectivamente. Esta produção corresponde a um rendimento médio de 690 kg/ha, 806 kg/ha e 2.128 kg/ha para as referidas safras.

Embora alta, a produção brasileira ainda sofre grandes prejuízos, em virtude da utilização de cultivares com baixo potencial produtivo, plantio em solos de baixa fertilidade, baixa utilização de tecnologia e associação simbiótica ineficiente, além da suscetibilidade a diversas pragas e doenças, que constituem os principais fatores contribuintes para a baixa produtividade nacional (BALARDIN, 1990). VIEIRA (1983) cita mais de 30 doenças, que podem atingir o feijoeiro, sendo que, destas, cerca de oito são de maior importância no território nacional. Dentre estas, merecem destaque as doenças fúngicas: a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*; a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib.; e a mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis grisela* (Sacc.). No Brasil, segundo MORA-BRENES et al. (1983), RAVA et al. (1985) e SARTORATO e RAVA (1992) as perdas causadas pela mancha-angular chegam a 70%, dependendo das condições ambientais e suscetibilidade dos cultivares.

O melhoramento genético do feijoeiro, visando à obtenção de cultivares resistentes, tem se destacado como estratégia para minimizar as perdas na produção. Neste processo, a identificação e utilização de fontes de resistência às principais raças do patógeno, visando a piramidação de genes, são procedimentos necessários para o desenvolvimento de novos cultivares. Deste modo, são desenvolvidas variedades comerciais de feijão com amplo espectro de resistência e, portanto, com maior potencial produtivo (RAGAGNIN et al., 2003; COSTA, 2004).

Embora a piramidação de genes de resistência seja a estratégia mais eficiente, sua utilização no melhoramento genético tem sido dificultada devido às interações epistáticas, que ocorrem entre os genes de resistência. Como o processo de piramidação requer a combinação de genes de resistência epistáticos e hipostáticos a determinadas raças num só genótipo, os melhoristas não encontravam outra alternativa a não ser utilizar múltiplas inoculações com cada raça do patógeno para a seleção, principalmente de genes hipostáticos. Entretanto, os programas de piramidação têm sido auxiliados pela identificação e utilização de marcadores moleculares estreitamente ligados aos genes de resistência (RAGAGNIN et al., 2003; COSTA, 2004). Tais marcadores além de permitirem a seleção indireta destes genes, não têm sua expressão afetada por interações que ocorrem entre os mesmos.

No Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (PMGF-BIOAGRO), os marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990) representam a principal classe utilizada. Tais marcadores têm sido, extremamente, úteis para identificar e selecionar genótipos com importantes genes de resistência a vários patógenos (ALZATE-MARIN et al., 1999; SARTORATO et al., 1999; CORRÊA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003; CAIXETA et al., 2003). Entretanto, os marcadores RAPD apresentam natureza dominante e baixo conteúdo de informação genética por loco. A técnica de RAPD pode ainda não apresentar reprodutibilidade de resultados, quando executada em diferentes condições. Em virtude dessas limitações, a necessidade da utilização de outras classes de marcadores moleculares, para auxiliarem o desenvolvimento dos programas de melhoramento genético do feijoeiro-comum, torna-se cada vez mais evidente.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver marcadores moleculares para auxiliar o desenvolvimento do Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver e validar marcadores SCAR associados a genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular.
- Construir bibliotecas enriquecidas, seqüenciar clones positivos, selecionar fragmentos de DNA contendo microssatélites, desenhar e testar *primers* SSR em diferentes cultivares andinos e mesoamericanos.
- Introduzir marcadores microssatélite e SCAR em um mapa de ligação que apresenta baixo nível de saturação e mapear possíveis QTLs associados ao rendimento do feijoeiro-comum.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Marcadores RAPD e SCAR

As denominações RAPD ou AP-PCR foram sugeridas por dois grupos distintos - WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e McCLELLAND (1990), respectivamente, para descrever a mesma metodologia, sendo que a primeira denominação tornou-se mais conhecida. O RAPD é uma adaptação da técnica de PCR, que utiliza como *primer* os oligodesoxirribonucleotídeos decâmeros únicos de seqüência arbitrária. Os produtos da amplificação são obtidos, quando dois sítios de pareamento do *primer* estão localizados em sentidos opostos no DNA e separados entre si por uma distância amplificável, geralmente, entre 200 e 2.000 pares de bases. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados dependem da seqüência do *primer* e do DNA-molde (TINGEY & DEL TUFO, 1993).

As bandas de DNA originadas pelo RAPD podem ser excisadas, purificadas e clonadas. A partir da clonagem, seqüenciamento e análise das seqüências obtidas, pode-se fazer o desenho de *primers* específicos. Esta metodologia possibilita a conversão dos marcadores RAPD em SCAR. O termo SCAR foi utilizado por PARAN e MICHELMORE (1993), para definir marcadores RAPD cuja seqüência interna tenha sido determinada, permitindo compor *primers* contendo na sua extremidade 5' a própria seqüência do *primer* RAPD e, na extremidade 3' a região interna imediatamente adjacente. Os *primers* SCAR apresentam seqüência específica e por esta razão podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para propósitos de mapeamento ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo

de interesse. Entre outras vantagens, a técnica do SCAR não apresenta problemas de reprodutibilidade.

### **3.2. Marcadores baseados em microssatélites ou SSR**

#### **3.2.1. Microssatélite**

Os microssatélites (LITT & LUTY, 1989) foram, inicialmente, denominados de SSR ou seqüências simples repetidas. BECKMANN e SOLLER (1990) criaram a denominação de STMS, que significa sítios de microssatélites marcados por seqüência.

Nos microssatélites, um único nucleotídeo ou um pequeno número de nucleotídeos é repetido várias vezes. Normalmente, o número de nucleotídeos de cada repetição é menor que 6 (RONGWEN et al., 1995) e o agrupamento de repetições adjacentes apresenta comprimento variando entre 15 e 50 pb (PETES et al. 1997). As repetições podem ser grupos perfeitos, imperfeitos ou compostos (HEARNE et al., 1992). Quando os microssatélites foram descobertos, os mesmos tornaram-se extensivamente usados em análises genéticas. Os microssatélites são freqüentes, encontram-se distribuídos ao acaso no genoma e originam locos genéticos, altamente, polimórficos (ROIZÈS, 2000).

O polimorfismo de um loco microssatélite pode ser constatado por meio de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos e complementares a seqüências únicas, que flanqueiam o loco. Deste modo, cada segmento amplificado com diferente tamanho representa um alelo diferente do mesmo loco (YU et al., 1999; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002).

#### **3.2.2. Ocorrência dos microssatélites**

BECKMANN e WEBER (1992) estimaram que, em humanos, um microssatélite seja encontrado a cada 6 kb, em média. Em plantas, MORGANTE e OLIVEIRI (1993) examinaram seqüências de DNA, publicadas para repetições de di- e trinucleotídeos em 34 espécies e encontraram uma freqüência de 1 a cada 50 kb. SMULDERS et al. (1997) identificaram 220 microssatélites em cerca de 2.000 seqüências de DNA de espécies de *Lycopersicon*. Em média, observou-se um microssatélite a cada 64 kb para monocotiledôneas e a cada 21 kb para dicotiledôneas (MAUGHAN et al., 1995). A freqüência em plantas tem sido também estudada por

hibridização com sondas de oligonucleotídeos específicos, tais estudos sugerem um microssatélite a cada 65 kb a 80 kb (PANAUD et al., 1996; ECHT & MAYMARQUARDT, 1997).

### **3.2.3. Distribuição dos microssatélites**

Os microssatélites são encontrados em procariotos, eucariotos e, até mesmo, nos menores genomas bacterianos (FIELD & WILLS, 1996; HANCOCK, 1996). Segundo HANCOCK (1996a), o conteúdo global de microssatélites em um genoma está correlacionado com o tamanho do genoma do organismo, sendo a frequência e o tipo de microssatélite diferente entre espécies e entre regiões codificadoras, íntrons e DNA intergênico (WAUGH et al., 2000). HANCOCK (1995) demonstrou que microssatélites encontrados em éxons são menos abundantes do que em regiões não codificadoras. A partir de seqüências genômicas, obtidas do GenBank, TÓTH et al. (2000) compararam a abundância de vários tipos de microssatélites em diferentes grupos taxonômicos, e ainda, o modo como as frequências diferem entre éxons, íntrons e regiões intergênicas. Para o grupo Embryophyta, nas regiões intergênicas e íntrons, as repetições mais comuns encontradas foram de 1 e 2 pb, ocorrendo com a frequência de 17% e 15% em regiões intergênicas e 12% e 11% nos íntrons. Nos éxons, as repetições mais comuns foram de 3 pb com uma frequência de 9%.

Diferentes grupos taxonômicos, também, exibem preferências por determinados tipos de SSR. O microssatélite mais abundante em vários mamíferos é  $(AC)_n$  (BECKMANN & WEBER, 1992), enquanto, em muitas espécies de plantas,  $(AT)_n$  ou  $(AG)_n$  é o microssatélite mais abundante (LAGERCRANTZ et al., 1993; WANG et al., 1994). As diferenças também podem existir entre espécies de plantas; as repetições AT/TA prevalecem em soja e abacateiro, mas não foram encontradas em nenhum clone de mangueira ou *Erythoxylum coca* (CREGAN et al., 1994).

### **3.2.4. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites**

Entre os procedimentos utilizados para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, destacam-se: 1) identificação de SSR em biblioteca de DNA genômico, por meio de hibridização de colônias (WEISSENBACH et al., 1992); 2) construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para determinadas repetições (GUILFORD et al.,

1996; HAMILTON et al., 1999; FORSTER et al., 2001; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002); e 3) pesquisa em bancos de dados de DNA de domínio público (YU et al., 1999). O primeiro é um processo demorado e caro, especialmente para espécies de plantas com genomas complexos, enquanto o último requer um número relativamente grande de seqüências de DNA publicadas.

No desenvolvimento de microssatélites para o projeto de mapeamento humano, foi construída uma biblioteca de DNA genômico não enriquecida. A identificação de colônias positivas foi realizada, por meio de hibridização com sonda de oligonucleotídeo marcada. Inicialmente, foram identificados e seqüenciados 12.014 clones, dos quais somente 2.995 (25%) foram selecionados para obtenção de microssatélites (WEISSENBACH et al., 1992). Este número reduzido ocorre por que alguns fragmentos apresentam o microssatélite na extremidade, impedindo a construção de *primers*. Outros fragmentos apresentam reduzido número de repetições.

Como a freqüência média de locos microssatélites é variável entre genomas, o processo de isolamento e caracterização desses locos em plantas mostra-se ainda mais caro e intensivo. Segundo KUBIK et al. (1999), experimentos anteriores envolvendo plantas e utilizando bibliotecas não enriquecidas e hibridização de colônias revelaram um pequeno número de repetições microssatélites. As repetições de interesse foram observadas em, apenas, 0,12% das colônias selecionadas. Uma freqüência reduzida seria normalmente esperada em plantas, porque experimentos envolvendo hibridização com sondas de oligonucleotídeos específicos sugerem um microssatélite a cada 65 kb a 80 kb (PANAUD et al., 1996; ECHT & MAYMARQUARDT, 1997). Por esta razão, o desenvolvimento de microssatélites se mostrou por algum tempo praticamente inviável, sendo aplicado somente a projetos de grande importância e interesse econômico.

Por outro lado, a construção de pequenas bibliotecas genômicas enriquecidas para tais locos facilita o trabalho, possibilitando economia de tempo e custo. FORSTER et al. (2001) desenvolveram e caracterizaram marcadores baseados em microssatélites para *Lolium perenne* L., utilizando biblioteca genômica enriquecida para determinadas repetições. Nesse experimento, foram seqüenciados 1.853 clones dos quais 859 (50%) apresentaram repetições de microssatélites. Segundo CORDEIRO et al. (1999), melhores níveis de enriquecimento podem, ainda, ser obtidos com modificações de metodologias-padrão.

### 3.2.5. *Primers* microssatélite para o feijoeiro-comum

Em pesquisa realizada no *GenBank* entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, YU et al. (1999) examinaram 326 seqüências de DNA e constataram que 61 (18,7%) destas apresentavam repetições microssatélites. Ao contrário do esperado, ou seja, um microssatélite a cada 21 kb para dicotiledôneas, os autores identificaram um microssatélite potencial a cada 7 kb de DNA em média. Os autores testaram 11 *primers* SSR em 12 linhagens endogâmicas de feijoeiro-comum e constataram que 7 desses 11 *primers* microssatélites eram polimórficos, amplificando entre 2 e 10 alelos. Os microssatélites mais comuns eram repetições dos nucleotídeos AT/TA e CT/GA, sendo a primeira predominante. Foram também encontradas repetições de tri- e tetranucleotídeos. As repetições de dinucleotídeos foram encontradas em regiões intergênicas ou de íntrons. A maioria das repetições, contendo trinucleotídeos, foi encontrada em regiões codificadoras, ao passo que grande parte das repetições de tetranucleotídeos encontravam-se em regiões intergênicas.

A partir de 4 clones BAC, CAIXETA et al. (2003a) hibridizaram 890 colônias com as sondas (AT)<sub>15</sub>, (CT)<sub>15</sub> e (ATT)<sub>10</sub>. Destas, 72 colônias foram selecionadas e testadas quanto à presença de inserto por diagnóstico com enzima de restrição. Em 62 colônias, foi revelada a presença de inserto. O DNA plasmidial de tais colônias foi extraído e seqüenciado. Das 62 seqüências analisadas, foram encontrados microssatélites em 27 fragmentos. Para esses, foram desenhados e testados 21 pares de *primers* que amplificaram bandas únicas e bem definidas em 10 cultivares de feijão. Dos *primers* testados, 15 amplificaram bandas polimórficas e 6 monomórficas entre os cultivares avaliados. O número de alelos por loco variou de 1 a 6.

GAITÁN-SOLÍS et al. (2002) construíram 3 bibliotecas enriquecidas, utilizando diferentes linhagens andinas. De um total de 4.682 clones positivos identificados entre as bibliotecas obtidas, apenas 856 foram seqüenciados. Somente para 213 clones seqüenciados, foi possível o desenho de *primers* SSR. Os 213 pares de *primers* SSR foram testados por PCR, utilizando-se os plasmídeos que os originaram como moldes. Dos 213 *primers* testados, somente 68 pares produziram fortes produtos de amplificação. Destes, 59 foram repetições de dinucleotídeos, 4 de trinucleotídeos, 1 de tetranucleotídeo, 1 de pentanucleotídeo e 3 foram repetições compostas. A fim de verificar o nível de conservação desses *primers*, os autores testaram os 68 pares entre diferentes genótipos de 4 espécies do gênero *Phaseolus*, sendo 2 do gênero *P.*

*coccineus*, 2 de *P. polyanthus*, 3 de *P. acutifolius* e 2 de *P. lunatus*. Foi observado que 33 pares de *primers* amplificaram fragmentos em todas as amostras. Os autores concluíram que, entre as diferentes espécies, existe um nível considerável de conservação na seqüência de DNA das regiões, que flanqueiam o microsatélite. A capacidade dos 68 pares de *primers* em detectar locos polimórficos foi avaliada entre 21 genótipos de *P. vulgaris*. Entre os genótipos utilizados havia espécies selvagens e cultivadas, pertencentes aos grupos Andino e Mesoamericano. Dos 68 *primers* testados, 14 pares amplificaram produtos monomórficos no material testado. Entre os *primers* polimórficos, o número de alelos por loco de microsatélite variou entre 1 e 14, com uma média de 6 alelos por par de *primer*.

### 3.3. Marcadores RAPD, SCAR e SSR associados a genes de resistência no feijoeiro-comum

A produtividade da cultura do feijão no Brasil é afetada, principalmente, pela ocorrência de doenças, como a antracnose, mancha-angular e ferrugem. Portanto, a identificação de marcadores RAPD e o desenvolvimento e validação de marcadores SCAR estreitamente ligados ao(s) gene(s) de resistência a tais doenças são de grande importância em programas de melhoramento. No Quadro 1, adaptado de FALEIRO et al. (2003), encontram-se os principais marcadores RAPD e microsatélite, utilizados nos programas de melhoramento genético do feijoeiro, com o propósito de seleção assistida visando à piramidação de genes.

Quadro 1. Marcadores RAPD e microsatélite ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador	Distância (cM) e orientação*	Gene de resistência	Doença**	Fonte de resistência	Referência
OPF10 <sub>530</sub>	1,9 – rep.	<i>Co-1</i>	antracnose	Michigan DRK	YOUNG e KELLY (1997)
OPQ04 <sub>1440</sub>	5,5 – acop.	<i>Co-2</i>	antracnose	Cornell 49242	YOUNG e KELLY (1996)
OPH20 <sub>450</sub>	0,5 – acop.	<i>Co-2</i>	antracnose	Cornell 49242	ADAM-BLONDON et al. (1994)
OPY20 <sub>830</sub>	sem rec.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPJ01 <sub>1380</sub>	18,1 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPI16 <sub>850</sub>	14,3 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPC08 <sub>900</sub>	9,7 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPA18 <sub>830</sub>	17,4 – rep.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPB03 <sub>1800</sub>	3,7 – rep.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)

Quadro 1, Cont.

Marcador	Distância (cM) e orientação*	Gene de resistência	Doença**	Fonte de resistência	Referência
OPH18 <sub>830</sub>	9,2 – acop.	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	antracnose	G 2333	ALZATE-MARIN et al. (1999)
OPAS13 <sub>950</sub>	sem rec.	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	antracnose	SEL 1308	YOUNG et al. (1998)
OPAL09 <sub>740</sub>	4,5 – acop.	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	antracnose	G 2333	YOUNG et al. (1998)
OPAB03 <sub>450</sub>	5,9 – acop.	<i>Co-5</i>	antracnose	TU, G 2333, SEL 1360	YOUNG e KELLY (1997)
OPAH01 <sub>780</sub>	12,3 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	YOUNG e KELLY (1997)
OPAK20 <sub>890</sub>	7,3 – rep.	<i>Co-6</i>	antracnose	Catrachita	YOUNG e KELLY (1997)
OPAZ20 <sub>940</sub>	7,1 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OPZ04 <sub>560</sub>	8,5 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999b)
OPZ09 <sub>950</sub>	20,4 – rep.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999b)
OPBC06 <sub>300</sub>	1,3 – acop.	<i>Ur-6</i>	ferrugem	'Olathe'	PARK et al. (2003)
OPAG15 <sub>300</sub>	2,0 – acop.	<i>Ur-6</i>	ferrugem	'Olathe'	PARK et al. (2003)
OPAY15 <sub>200</sub>	7,7 – rep.	<i>Ur-6</i>	ferrugem	'Olathe'	PARK et al. (2003)
OPK14 <sub>620</sub>	2,2 – acop.	<i>Ur-3</i>	ferrugem	NEP-II	HALEY et al. (1994)
OPAC20 <sub>490</sub>	sem rec.	<i>Ur-11</i>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OPAE19 <sub>890</sub>	6,2 – rep.	<i>Ur-11</i>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OPA14 <sub>1100</sub>	sem rec.	<i>Ur-4</i>	ferrugem	Early Gallatin	MIKLAS et al. (1993)
OPF10 <sub>970</sub>	2,1 – acop.	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OPI19 <sub>460</sub>	sem rec.	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OPAA11 <sub>500</sub>	sem rec..	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OPAD12 <sub>550</sub>	sem rec.	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OPAF17 <sub>900</sub>	sem rec.	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OPAB16 <sub>850</sub>	2,2 – acop.	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OPAD09 <sub>550</sub>	2,2 – acop.	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OPJ13 <sub>1800</sub>	5,0 – acop.	<i>Ur-9</i>	ferrugem	Pompadour Checa	JUNG et al. (1996)
Satt174 <sub>300</sub> <sup>a</sup>	4,1 e 11,8 – acop.	<i>Ur-ON</i> e <i>Co-10</i>	ferrugem e antracnose	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPBA08 <sub>560</sub>	6,0 – acop.	<i>Ur-ON</i>	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
OPF10 <sub>1072</sub>	4,3 – acop.	<i>Ur-ON</i>	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2000)
OPA18 + AH10 <sub>700</sub>	11,1 e 9,4 – acop.	<i>Ur-ON</i> e <i>Co-10</i>	ferrugem e antracnose	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPX11 <sub>550</sub>	5,8 – acop.	<i>Ur-ON</i>	ferrugem	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2000a)
OPP07 <sub>7</sub>	24,4 – rep.	(?)	man. ang.	ESAL 550	SILVA et al. (2003)
PV-atct001 <sub>282</sub> <sup>a</sup>	7,6 – acop.	(?)	man. ang.	ESAL 550	SILVA et al. (2003)
OPAO12 <sub>950</sub>	5,8 – acop.	<i>Phg-6<sup>2</sup></i>	man. ang.	BAT 332	CAIXETA et al. (2003)
OPAA07 <sub>950</sub>	5,1 – acop.	<i>Phg-6<sup>2</sup></i>	man. ang.	BAT 332	CAIXETA et al. (2003)
OPAD09 <sub>3210</sub>	13,9 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2003)
OPBA16 <sub>583</sub>	10,4 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2003)
OPBA16 <sub>669</sub>	10,4 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2003)
OPE04 <sub>500</sub>	5,8 – acop.	<i>Phg-5<sup>2</sup></i>	man. ang.	MAR-2	FERREIRA et al. (1999)
OPH13 <sub>490</sub>	5,5 – acop.	<i>Phg-1</i>	man. ang.	AND277	CARVALHO et al. (1998)
OPN02 <sub>890</sub>	5,9 – acop.	<i>Phg-2</i>	man. ang.	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999)
OPAC14 <sub>2400</sub>	6,6 – acop.	<i>Phg-2</i>	man. ang.	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999)
OPH14 + AA19 <sub>400</sub>	9,8 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPM02 <sub>425</sub>	5,6 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	CORRÊA et al. (2001)

\* acop. = acoplamento; rep. = repulsão; sem rec. = sem recombinantes; \*\* man. ang. = mancha-angular;

<sup>a</sup> = marcadores microssatélites.

Pela análise dos Quadros 1 e 2, observa-se que os marcadores RAPD (49) ainda representam a principal classe de marcadores utilizada em programas de melhoramento do feijoeiro. Estes apresentam-se em número bem superior, em

comparação com os marcadores microssatélites (2) e SCAR (13) associados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular.

Quadro 2. Marcadores SCAR ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a doenças de importância mundial

SCAR	Marcador RAPD	Doença*	Loco	Referência
sAP6 <sub>820</sub>	AP6	CBB	QTL de efeito maior (GN#1 sel 27)	MIKLAS et al. (2000a)
BAC6 <sub>1250</sub>	BC409	CBB	QTL de efeito maior (GN#1 sel 27)	ARIYARANTHE et al. (1999)
sU91 <sub>700</sub>	U9	CBB	QTL de efeito maior (XAN 159)	PEDRAZA et al. (1997)
R7313 <sub>700</sub>	-	CBB	QTL de efeito maior (OAC 88-1)	BAI et al. (1997) BEATTIE et al. (1998)
R4865 <sub>950</sub>	-	CBB	QTL de efeito maior (OAC 88-1)	BAI et al. (1997) BEATTIE et al. (1998)
sW13 <sub>690</sub>	W13	BCMV	I	MELOTTO et al. (1996)
ROC11 <sub>420</sub>	C11	BCMV	bc-3	JOHNSON et al. (1997)
sBD5 <sub>1250</sub>	BD5	BCMV	bc-12	MIKLAS et al. (2000b)
sR2 <sub>530/570</sub> co-dominante	R2	BGMV	bgm-1	URREA et al. (1996)
sW12 <sub>700</sub>	W12	BGMV	QTL de efeito maior (DOR 364)	MIKLAS et al. (2000c)
sBC06 <sub>300</sub>	BC06	ferrugem	<i>Ur-6</i>	PARK et al. (2003a)
sK14 <sub>620</sub>	K14	ferrugem	<i>Ur-3</i>	NEMCHINOVA e STAVELY (1998) MIKLAS et al. (2002)
sI19 <sub>460</sub>	I19	ferrugem	<i>Ur-5</i>	MELOTTO et al. (1998) MIKLAS et al. (2002)
UR11-GT <sub>2450</sub>	GT02	ferrugem	<i>Ur-11</i>	BOONE et al. (1999) MIKLAS et al. (2002)
sF10 <sub>1072</sub>	F10	ferrugem	<i>Ur-ON</i>	CORRÉA et al. (2000) MIKLAS et al. (2002)
sBA08 <sub>530</sub>	BA8	ferrugem	<i>Ur-ON</i>	CORRÉA et al. (2000) MIKLAS et al. (2002)
sCAreoli <sub>1000</sub>	H20	antracnose	<i>Co-2</i>	GEFFROY et al. (1998)
sAS13 <sub>950</sub>	AS13	antracnose	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	YOUNG et al. (1998) KELLY et al. (2003)
sH18 <sub>1100</sub>	H18	antracnose	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	AWALE e KELLY (2001) KELLY et al. (2003)
sBB14 <sub>1150/1050</sub> co-dominante	BB14	antracnose	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	AWALE e KELLY (2001) KELLY et al. (2003)
sAB3 <sub>400</sub>	AB-3	antracnose	<i>Co-5</i>	VALLEJO e KELLY (2001)
sB12 <sub>350</sub>	B-12	antracnose	<i>Co-9</i>	MENDEZ DE VIGO et al. (2002)
sN02 <sub>890</sub>	N02	man. ang.	<i>Phg-2</i>	NIETSCHKE et al. (2000) MIKLAS et al. (2002)

\* CBB – crestamento bacteriano comum; BCMV – vírus do mosaico comum do feijoeiro; BGMV- vírus do mosaico dourado do feijoeiro; man. ang. – mancha-angular.

### 3.4. Classificação botânica e organização do genoma do feijoeiro-comum

O feijoeiro-comum pertence à tribo Phaseoleae; subtribo Phaseolineae; gênero *Phaseolus*; e espécie *Phaseolus vulgaris* L. (VILHORDO et al., 1996).

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (GEPTS & DEBOUCK, 1991). A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é uma leguminosa diplóide ( $2n = 22$ ) com um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haplóide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991).

### **3.5. Mapeamento genético**

O mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, criando a possibilidade de se ordenar, linearmente, a informação genética ao longo dos cromossomos (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

Por meio do mapa genético, é possível uma representação da ordem e da distância entre os locos nos grupos de ligação. A distância genética é medida em termos da frequência de recombinação entre marcadores, que é transformada em distância de mapa (cM) por meio de algoritmos apropriados. As fórmulas comumente utilizadas no mapeamento são as de Haldane (HALDANE, 1919) e de Kosambi (KOSAMBI, 1944), sendo que a última considera a interferência parcial entre permutas genéticas adjacentes. A frequência de recombinação é bastante variável entre diferentes regiões cromossômicas, entre tipos de cromossomos e entre espécies. Assim, a distância genética não apresenta correlação constante com a distância física, definida em termos de pares de base. No entanto, a ordem dos locos determinada nos grupos de ligação genética corresponde à mesma encontrada nos cromossomos. Com isso, o mapeamento genético de uma espécie consiste na produção de um conjunto ordenado de informações sobre as seqüências de DNA, que cobrem todo o genoma (PATERSON, 1996).

#### **3.5.1. Construção de mapas genéticos**

Para a construção de um mapa genético é necessária a obtenção de populações segregantes e a utilização de vários marcadores, que sejam polimórficos entre os genitores e apresentem segregação mendeliana na progênie (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

Vários tipos de população podem ser utilizados no mapeamento, devendo-se escolher aqueles cruzamentos que maximizem a probabilidade de detectar polimorfismos em nível de DNA. Quanto mais próximas, geneticamente, são as linhagens que darão origem à população segregante, mais difícil é a obtenção de polimorfismos. As populações segregantes utilizadas podem ser originadas de retrocruzamento,  $F_2$ , RIL's, dentre outras (QUEIROZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2003). A população de retrocruzamento é considerada pouco informativa, pois, segrega apenas para os alelos do progenitor doador. A população  $F_2$  pode ser obtida em, apenas, duas gerações e contém as três combinações possíveis de dois alelos (AA, Aa e aa) para um referido loco (PATERSON, 1996). As RIL's constituem uma população permanente, visto que cada indivíduo é resultante de autofecundações sucessivas de uma planta  $F_2$  (BURR et al., 1988; REITER et al., 1992). Entretanto, a limitação na obtenção deste tipo de população é o longo tempo, ou seja, cerca de sete ou mais gerações de autofecundação.

O número de marcadores necessários à construção de um mapa genético varia, em função do tamanho do genoma, do número e do comprimento genético dos cromossomos. Um mapa pode ser considerado completo, quando o número de grupos de ligação obtidos pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo, sugerindo que todas as regiões do genoma estão representadas (BECKMAN & SOLLER, 1983).

O mapeamento genético possibilita o estudo de qualquer processo morfológico, fisiológico ou de desenvolvimento, desde que haja variações na constituição genética de uma população. Os mapas possibilitam a decomposição de características genéticas complexas em componentes mendelianos simples, pois as regiões genômicas que controlam tais caracteres podem ser identificadas e mapeadas. Uma vez que o efeito de cada uma dessas regiões for quantificado, toda a informação pode ser utilizada em programas de melhoramento (PATERSON, 1996). O mapeamento genético representa, ainda, uma importante metodologia para a clonagem de genes, principalmente quando o produto gênico não é conhecido.

### **3.5.2. Mapas genéticos para o feijoeiro-comum**

As classes de marcadores utilizados para a construção de mapas genéticos para o feijoeiro-comum têm variado muito ao longo dos anos. BASSET et al. (1991)

publicaram um mapa de ligação do feijoeiro-comum, o qual consistia de 13 grupos de ligação, que incluem genes controlando, em sua maioria, características morfológicas e de pigmentação, tais como cor de flor e semente. NODARI et al. (1993) analisaram a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos RFLP, 7 locos isoenzimáticos, 8 locos RAPD e 19 locos correspondentes a genes conhecidos. Foram estabelecidos 15 grupos de ligação com um intervalo médio entre os marcadores de 6,5 cM, perfazendo um total de 827 cM. FALEIRO et al. (2003a) utilizaram 10 características de resistência a doenças e hábito de crescimento, 30 marcadores RAPD e 2 marcadores SCAR para a construção de um mapa parcial de ligação. Os marcadores mapeados, distribuídos em 9 grupos de ligação, cobriram uma distância de recombinação total de 247,8 cM. Recentemente, BLAIR et al. (2003) testaram 150 *primers* SSR para mapear 100 locos em um mapa genético integrado. O comprimento total do mapa foi de 1.720 cM e o tamanho médio dos grupos de ligação foi de 156,4 cM, com uma distância média de 19,5 cM entre os locos de SSR.

### **3.5.3. Mapeamento de locos de herança simples**

Variações fenotípicas determinadas pela segregação de um ou poucos genes são fáceis de serem caracterizadas e mapeadas. O mapeamento de caracteres de herança monogênica é relativamente simples, uma vez que classes fenotípicas discretas ou semi-discretas são observadas. Assim, os primeiros trabalhos de mapeamento utilizaram caracteres de herança simples (MEDINA-FILHO, 1980; TANKSLEY, 1983).

Isoenzimas, marcadores RFLP e, mais recentemente, marcadores RAPD e AFLP têm sido utilizados para a identificação de regiões do genoma associadas à caracteres monogênicos, principalmente resistência a doenças e pragas (MIKLAS et al., 1993, HALEY et al., 1993, CORRÊA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003). Análises de linhagens isogênicas com marcadores moleculares permitiram a identificação de marcadores ligados a genes de interesse em várias espécies de importância econômica, como a resistência ao vírus TMV em tomate (YOUNG et al., 1988), resistência a *Pseudomonas* em tomate (MARTIN et al., 1991), resistência a *Pyricularia grisea* em arroz (YU et al., 1991) e resistência a *Phytophthora megasperma* em soja (DIERS et al., 1992).

### **3.5.4. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa**

A maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, sendo de difícil manipulação e compreensão. Esses caracteres envolvem a ação de vários genes e são, altamente, influenciados pelas condições ambientais. Em vez de classes fenotípicas discretas, eles apresentam variação contínua do fenótipo e são denominados poligênicos ou quantitativos. Para a maioria dos caracteres quantitativos, há poucas informações sobre o número, a posição cromossômica, a magnitude do efeito e as interações dos locos que controlam sua expressão (PATERSON, 1998). Esses locos são denominados QTL, ou seja, locos controladores de caracteres quantitativos. Para várias características de importância econômica têm sido identificados QTLs (GRATTAPAGLIA et al., 1995; QUEIROZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2003a).

A capacidade de se detectar um QTL é função da magnitude de seu efeito sobre o caráter, do tamanho da população segregante avaliada e da distância entre o marcador e o loco. Quanto maiores o efeito e o tamanho da população e mais próximo o marcador do QTL, mais fácil será a detecção. O rápido avanço das técnicas de marcadores moleculares, a utilização de delineamentos experimentais apropriados e o desenvolvimento de métodos biométricos com grande poder de resolução têm possibilitado o estudo de caracteres quantitativos, dissecando-os em fatores mendelianos simples (ZENG, 1993 e 1994; JANSEN, 1993).

Com o uso de mapas genéticos e de técnicas de mapeamento de QTL, é possível estimar o número e a localização dos genes, que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos no fenótipo, dos efeitos de dosagem e as interações com outros QTLs (ZENG, 1993 e 1994; JANSEN, 1993). Após análises de mapeamento por intervalo simples e composto, QUEIROZ et al. (2003) identificaram um QTL de efeito maior, explicando 35% da resistência à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. FALEIRO et al. (2003a) construíram um mapa parcial de ligação, utilizando 154 RIL's de feijoeiro-comum e identificaram QTLs associados a 8 características quantitativas. O número de QTLs variou entre as características estudadas. Foram identificados 5 QTLs para a característica número de dias até o florescimento, que explicaram em conjunto 39,79%. Por outro lado, para a característica produção média por planta, apenas 1 QTL foi identificado e explicou 19,20%. Esses autores ainda constataram que características apresentando alta correlação genotípica,

podem apresentar QTLs nos mesmos grupos de ligação e demonstrar os mesmos marcadores associados a cada uma delas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F., SÉVIGNAE, 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**, 88:865-870, 1994.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, 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. **Phytopathology**, 89:281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB136, TO and G2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999a.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., SOUZA, K.A., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Estratégias de separação e identificação dos genes *Co-4*<sup>2</sup> e *Co-5* envolvidos na resistência às raças 73 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* no cultivar G2333. **Resumos da VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 48-50, 1999b.
- ARIYARANTHE, H.M., D.P. COYNE, G. JUNG. P.W. SKROCH, A.K. VIDAVER, J.R. STEADMAN, P.N. MIKLAS, M.J. BASSETT. Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 124:654-662, 1999.
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopatology**, 90:758-761, 2000.

- ARUMUGANATHAM, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, 9: 208-218, 1991.
- AWALE, H.E., KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to *Co-42* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:119-120, 2001.
- BAI, Y., MICHAELS, T.E., PAULS, K.P. Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L.. **Genome**, 40:544-551, 1997.
- BALARDIN, R.S. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia em Santa Catarina, 1990. 252p.
- BASSETT, M.J. A revised linkage map of common bean. **HortScience**, 26:834-836, 1991.
- BEATTIE, A., MICHAELS, T.E., PAUL, K.P. An efficient reliable method to screen for common bacterial blight (CBB) resistance in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:53-54, 1998.
- BECKMAN, J.S., SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theoretical and Applied Genetics**, 67:35-43, 1983.
- BECKMANN, J.S., WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 12:627-631, 1992.
- BECKMANN, J.S., SOLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, 08:930-932, 1990.
- BLAIR, M.W., PEDRAZA, F., BUENDIA, H.F., GAITÁN-SOLÍS, E., BEEBE, S.E., GEPTS, P., TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1362-1374, 2003.
- BOONE, W.E., STAVELY, J.R., WEEDEN, N.F. Development of a sequence-tagged site (STS) marker for *Ur-11*, a gene conferring resistance to the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:33-34, 1999.
- BURR, B., EVOLA, S.V., BURR, F.A., THOMPSON, K.H., ALBERTSON, M., STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, 118:519-526, 1988.
- CAIXETA, E.T. **Caracterização da Resistência Genética à Mancha-Angular e Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para Regiões Específicas do Genoma do Feijoeiro**. Viçosa: UFV, 2002. 90 p. (Tese-Doutorado).

- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., NIESTCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134: 297-303. 2003.
- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., KELLY, J.D. Microsatellite Markers for Common Bean. **Annual Report of Bean Improvement**, 46:157-158, 2003a.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligada ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23:482-485, 1998.
- CORDEIRO, G.M., MAGUIRE, T.L., EDWARDS, K.J., HENRY, R.J. Optimization of microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. **Plant Molecular Biology Report**, 17:225-229, 1999.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. Viçosa: UFV, 1999. 116 p. (Tese - Doutorado).
- CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOODGOD, 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**, 40:804-807, 2000.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHKE, S., MOREIRA, M.A., BARROS E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27-32, 2001.
- COSTA, M.R. **Introgressão de Genes de Resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha-angular no Cultivar de Feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV, 2004. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- CREGAN, P.B., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., RONGWEN, J. Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) as molecular markers in plants. In: GRESSHOFF, P. M. **Plant genome analysis**. Boca Raton: CRC press, 1994. p. 47-56.
- DIERS, B.W., MANSUR, L., IMSANDE, J., SHOEMAKER, R.C. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, 33:377-383, 1992.
- ECHT, C.S., MAYMARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, 40:09-17, 1997.
- FALEIRO, F.G. **Melhoramento e mapeamento genético do feijoeiro-comum: análise de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças**. Viçosa: UFV, 2000. 177 p. (Tese – Doutorado).

- 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**, 23: 399-402, 2000a.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.
- FALEIRO, F.G., SCHUSTER, I., RAGAGNIN, V.A., CRUZ, C.D., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38: 1387-1397, 2003a.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK. (2001). Rome: FAO, 2001. v. 56, 520 p.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Marcador RAPD associado ao gene de resistência à mancha-angular do feijoeiro. **Resumos da VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 60-61, 1999.
- FIELD, D., WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of the Royal Society of London**, 623:209-215, 1996.
- FORSTER, J.W., JONES, E.S., DUPAL, M.P., KÖLLIKER, R., DRAYTON, M.C. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 102:405-415, 2001.
- 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**, 42:2128-2136, 2002.
- GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., SEVIGNAC, M., ADAM-BLONDON, A.F., BANNEROT, H., GEPTS, P., DRON, M. A family of LRR sequences at the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, 96:494-502, 1998.
- GEPTS, P.L., DEBOUCK, D. Domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: SHOONHOVEN, A.V., VOYSEST, O. (Eds.) **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p7-53.
- GRATTAPAGLIA, D., BERTOLUCCI, F.L., SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 933-947, 1995.
- GUILFORD, P., PRAKASH, S., ZHU, J.M., RIKKERINK, E., GARDINER, S., BASSETT, H., FORSTER, R. Microsatellite in *Malus X domestica* (apple):

- Abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:249-254, 1996.
- GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **American Journal of Human Genetics**, 08:299-309, 1919.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L., KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, 34:1061-1066, 1994.
- HAMILTON, M.B., PINCUS, E.L., Di FIORE, A., FLEISCHER, R.C. Universal linker and ligations procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, 27:500-505, 1999.
- HANCOCK, J.M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. **Journal of Molecular Evolution**, 41:1038-1047, 1995.
- HANCOCK, J.M. Simple Sequences in a 'minimal' genome. **Nature Genetics**, 14:14-15, 1996.
- HANCOCK, J.M. Simple Sequences and the expanding genome. **BioEssays**, 18:421-425, 1996a.
- HEARNE, C.M., GHOSH, S., TODD, J.A. Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. **Trends Genetics**, 08:288-294, 1992.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.2003>>. Acessado em agosto de 2004.
- JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, 49:227-231, 1993.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 659-664, 1995.
- JOHNSON, W.C., GUZMAN, P., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., TEMPLE, S., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science**, 37:248-254, 1997.

- JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARIYARATHNE, H., STEADMAN, J.R., BEAVER, J., KAEPLER, S. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 121:794-803, 1996.
- KELLY, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 2003.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenic**, 12:172-175, 1944.
- KUBIK, C., MEYER, W.A., GAUT, B.S. Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. **Crop Science**, 39:1136-1141, 1999.
- LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H., ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acid Research**, 21:1111-1115, 1993.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:398-401, 1989.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K., TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, 88:2336-2340, 1991.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome**, 38:715-723, 1995.
- MEDINA-FILHO, H.P. Linkage of *Aps-1*, *Mi* and other markers on chromosome 6. **Annual Report of Tomato Genetic Cooperative**, 30:26-28, 1980.
- MELOTTO, M., AFANADOR, L., KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, 39:1216-1219, 1996.
- MELOTTO, M., KELLY, J.D. SCAR markers linked to major disease resistance genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 1998.
- MENDEZ DE VIGO, B., C. RODRIGUEZ, A. PANEDA, R. GIRALDEZ, J.J. FERREIRA. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:116-117, 2002.
- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:745-749, 1993.

- MIKLAS, P.N., SMITH, J.R., RILEY, R., GRAFTON, K.F., SINGH, S.P., JUNG, G., COYNE, D.P. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:39-40, 2000a.
- MIKLAS, P.N., LARSEN, R., VICTORY, K., DELORME, R., MARMA, C., RILEY, R.H., KELLY, J.D. Marker-assisted selection for the *bc-12* gene for resistance to BCMV and BCMNV in common bean. **Euphytica**, 116:211-219, 2000b.
- MIKLAS, P.N., STONE, V., DALY, M.J., STAVELY, J.R., STEADMAN, J.R., BASSETT, M.J., DELORME R., BEAVER, J.S. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/XAN 176). **Journal of American Society of Horticultural Science**, 125: 476-481, 2000c.
- MIKLAS, P.N., PASTOR-CORRALES, M.A., JUNG, G., COYNE, D.P., KELLY, J.D., MCCLEAN, P.E., GEPTS, P. Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:125-129, 2002.
- MORA-BRENES, B.M., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, 8:599, 1983.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 03:175-182, 1993.
- NEMCHINOVA, Y.P., STAVELY, J.R. Development of SCAR primers for the *Ur-3* rust resistance gene in common bean. **Phytopathology**, 88:567, 1998.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA, T.J., DE BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, 148:117-121, 2000.
- NODARI, R.O., TSAI, S.M., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:513-520, 1993.
- PANAUD, O., CHEN, X.L., MCCOUCH, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, 252:597-607, 1996.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.
- PARK, S.O., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. Molecular markers to the *Ur-7* gene conferring specific resistance to rust in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:31-32, 1999.

- PARK, S.O., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. RAPD markers tightly linked to the *Ur-6* gene of andean origin controlling specific resistance to rust in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:187-188, 2003.
- PARK, S.O., CROSBY, K.M., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. Development of a SCAR marker linked to the *Ur-6* gene for specific rust resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:189-190, 2003a.
- PATERSON, A.H. **Genome mapping in plants**. San Diego: Academic, 1996. 330p.
- PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press LLC, 1998. 305p.
- PEDRAZA, F., GALLEGO, G., BEEBE, S. TOHME, J. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis comum (CBB). In: SIGH, S.P., VOYSEST, O. (Eds.) **Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para America Latina**. Cali: CIAT, 1997. p.130-134.
- PETES, T.D., GREENWELL, P.W., DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequence by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 146:491-498, 1997.
- QUEIROZ, V.T., GUIMARÃES, C.T., ANHERT, D., SCHUSTER, I., DAHER, R.F., PEREIRA, M.G., MIRANDA, V.R.M., LOGUERCIO, L.L., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, 122:1-5, 2003.
- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003.
- RAVA, C.A., SARTORATO, A., CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 28:5-6, 1985.
- REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, 89:1477-1481, 1992.
- ROIZÈS, G. Identification of microsatellite markers: screening for repeat sequences and mapping polymorphisms. In: HAJEER, A., WORTHINGTON, J., JOHN, S. (Eds.) **SNP and microsatellite genotyping: markers for genetic analysis**. Westborough: Eaton Publishing, 2000. p. 35-48.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 43-48, 1995.

- SARTORATO, A., RAVA, C.A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, 17:43-46, 1992.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42: 21-22, 1999.
- SILVA, G.F., SANTOS, J.B., RAMALHO, M.A.P. Tagging resistance allele of the common bean to angular leaf spot by SSR and RAPD markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:155-156. 2003.
- SMULDERS, M.J.M., BREDEMEIJER, G., RUS-KORTEKAAS, W., ARENS, P., VOSMAN, B. Use of short microsatellites from data-base sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:264-272, 1997.
- TANKSLEY, S.D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, 01:03-08, 1983.
- TINGEY, S.V., DEL TUFO, J.P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Physiology**, 101:349-352, 1993.
- TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, 10:967-981, 2000.
- URREA, C.A., MIKLAS, P.N. BEAVER, J.S., RILEY, R.H. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 121:1035-1039, 1996.
- VALLEJO, V., KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:121-122, 2001.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas no feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231p.
- VILHORDO, B.W., MIKUSINSKI, O.M.F., BURIN, M.W., GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ARAÚJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p.71-99.
- WANG, Z., WEBER, J.L., ZHONG, G., TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:01-06, 1994.
- WAUGH, R., CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D., MACAULAY, M., MARSHALL, D. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, 156:847-854, 2000.

- WEISSENBACH, J., GYPAY, G., DIB, C., VIGNAL, A., MORISSETTE, J., MILLASSEAU, P., VAYSSEIX, G., LATHROP, M. A second-generation linkage map of the human genome. **Nature**, 359:794-801, 1992.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 24:7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RIFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 22:6531-6535, 1990.
- YOUNG, N.D., ZAMIR, D., GANAL, M.W., TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, 120:579-585, 1988.
- YOUNG, R., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemutianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80:650-654, 1996.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, 37:940-946, 1997.
- YOUNG, R.A., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, 96:87-94, 1998.
- YU, Z.H., MACKILL, D.J., BONMAN, J.M., TANKSLEY, S.D. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 81:471-476, 1991.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, 42:27-34, 1999.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 90:10972-10976, 1993.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, 136:1457-1468, 1994.

## **CAPÍTULO 1**

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES SCAR ASSOCIADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR**

## 1. INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil têm visado, sobretudo, o aumento da produtividade e a resistência a doenças (VIEIRA et al., 1999). O Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (PMGF/BIOAGRO) tem como meta principal a obtenção de cultivares resistentes às principais doenças, que atacam a cultura do feijão no Brasil, sendo elas: mancha-angular, ferrugem e antracnose.

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris, ataca o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) reduzindo sua vitalidade e produtividade. Foram observadas perdas de até 80% (SCHWARTZ et al., 1981), em condições favoráveis à infecção. O agente causal da ferrugem é o fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.). Esta doença também afeta drasticamente a produção, tendo sido relatadas perdas de 68 e 75% em Minas Gerais (VIEIRA, 1983) e Porto Rico (VELEZ-MARTINEZ et al., 1989), respectivamente. LINDGREN et al. (1995) estimaram que a cada 1% de aumento na severidade da ferrugem, ocorre um decréscimo de produtividade de cerca de 20 kg/ha. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, pode até mesmo induzir a perda completa da produção, quando há ataque em cultivos com genótipos suscetíveis (YOUNG & KELLY, 1996).

Embora programas de melhoramento por métodos tradicionais tenham desenvolvido vários cultivares resistentes, novos cultivares devem ser desenvolvidos continuamente, devido ao alto grau de variabilidade genética dos patógenos. O desenvolvimento contínuo de tais variedades pode ser acelerado por meio da seleção

assistida por marcadores. O PMGF/BIOAGRO tem utilizado, no processo de seleção assistida, marcadores da classe RAPD para monitorar o desenvolvimento de novos cultivares contendo genes de resistência (RAGAGNIN et al., 2003; COSTA, 2004).

A principal vantagem da técnica de RAPD é a obtenção de elevado número de polimorfismos de forma relativamente simples, uma vez que a utilização desta técnica não requer nenhum conhecimento prévio do genoma (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). Não obstante, os marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados em análises genômicas, mostrando-se particularmente úteis no mapeamento de genes de resistência a doenças em plantas e na seleção assistida por marcadores (ALZATE-MARIN et al., 1999; SARTORATO et al., 1999; CORRÊA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003, RAGAGNIN et al., 2003). Por outro lado, os marcadores RAPD apresentam natureza dominante e podem não apresentar reprodutibilidade de resultados. A natureza dominante desta classe de marcadores não permite a distinção de heterozigotos e confere baixo conteúdo de informação genética por loco.

Normalmente, a estratégia utilizada para contornar tais limitações tem sido a conversão de marcadores RAPD em marcadores SCAR (NIETSCHKE et al., 2000; CORRÊA et al., 2000; AWALE & KELLY, 2001; PARK et al., 2003). A técnica de SCAR é também derivada de PCR, porém, ao contrário do RAPD, baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma. Tais regiões são amplificadas, utilizando-se um par de *primers* desenhados a partir da seqüência do fragmento polimórfico obtido pela técnica de RAPD. A amplificação do DNA com os *primers* SCAR pode conservar a natureza do polimorfismo dominante gerado pelo *primer* RAPD, ou alterar a natureza do mesmo para polimorfismo de comprimento (PARAN & MICHELMORE, 1993). Neste último caso, o marcador RAPD dominante é convertido em um marcador SCAR co-dominante. Na análise dos fragmentos de DNA, amplificados por meio da técnica de SCAR, não são observadas distorções nem problemas de reprodutibilidade. Esta técnica é altamente específica e a amplificação do DNA-molde é realizada em valores elevados de temperatura de pareamento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar *primers* SCAR para os principais marcadores RAPD utilizados pelo PMGF/BIOAGRO.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Materiais genéticos e cruzamentos

No presente trabalho, os cultivares utilizados foram fornecidos pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colômbia), pelo Banco de Germoplasma do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV), pelo USDA (Beltsville, Maryland, EUA) e pelo CNPAF/EMBRAPA (Goiânia, GO, Brasil). Algumas características dos cultivares e das populações segregantes, utilizadas para a validação dos *primers* SCAR, encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1. Genitores, populações F<sub>2</sub> segregantes e alguns marcadores RAPD utilizados no desenvolvimento e validação dos *primers* SCAR

Genitores		Tamanho da população	Doença*	Marcador RAPD**
Resistente	Suscetível			
TO	ON	125 indivíduos	antracnose	OPC08 <sub>900a</sub>
TO	Rudá	162 indivíduos	antracnose	OPY20 <sub>830a</sub>
AB136	Rudá	239 indivíduos	antracnose	OPAZ20 <sub>940a</sub>
AB136	Michelite	81 indivíduos	antracnose	OPZ04 <sub>560a</sub>
Belimidak RR-3	Rudá	53 indivíduos	ferrugem	OPAE19 <sub>890r</sub>
AND 277	Vermelho	197 indivíduos	man. angular	OPH13 <sub>490a</sub>
ON	TO	125 indivíduos	man. angular	OPH14+AA19 <sub>400a</sub> OPBA16 <sub>583a</sub> OPM02 <sub>425a</sub>

\* - man. angular – mancha-angular; \*\* - a: acoplamento; r: repulsão.

As referências bibliográficas dos trabalhos de identificação dos marcadores RAPD encontram-se no Quadro 1 (Revisão de Literatura).

## **2.2. Avaliações fenotípicas**

### **2.2.1. Patótipos e preparo do inóculo**

Para avaliar a resistência/suscetibilidade à ferrugem, foram utilizados os patótipos 46 e 49 de *U. appendiculatus* identificados por FALEIRO *et al.* (1999) e mantidos na micoteca do BIOAGRO/UFV. Os esporos, armazenados a 5 °C e 50% de umidade relativa, foram multiplicados no hospedeiro suscetível US Pinto 111, antes da inoculação. O inóculo foi preparado, utilizando-se uma concentração de aproximadamente  $2 \times 10^4$  uredósporos/mL (DAVISON & VAUGHAN, 1964), suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, para melhor dispersão dos uredósporos.

A avaliação para resistência/suscetibilidade à antracnose foi realizada, utilizando-se os patótipos 65 e 89 de *C. lindemuthianum*, caracterizado por RAVA *et al.* (1994). O preparo do inóculo e a inoculação seguiram a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). Para obtenção de inóculo, o patótipo foi cultivado durante 10 dias a 23 °C em tubos de ensaio, contendo vagens esterilizadas, parcialmente, imersas em meio ágar-água. A inoculação foi feita, utilizando-se uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL.

A avaliação para resistência/suscetibilidade à mancha-angular foi realizada, utilizando-se o patótipo 63-23 classificado por NIETSCHE (1997). O inóculo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio V8. A suspensão do patógeno foi utilizada na concentração de  $2 \times 10^4$  conídios/mL.

### **2.2.2. Inoculação e avaliação da doença**

A inoculação de *U. appendiculatus* foi realizada, quando as folhas primárias apresentavam, aproximadamente, 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. A suspensão contendo o inóculo foi aplicada em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram transferidas e permaneceram por 12 dias em casa de vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ). As plantas foram, então, avaliadas.

A severidade foi determinada, observando-se as pústulas na face superior das folhas primárias (FALEIRO et al., 2001). A avaliação foi realizada, visualmente, com o auxílio de um diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985). Plantas com graus 1 a 3 foram designadas resistentes e aquelas com graus 4 a 6, suscetíveis.

As inoculações com *C. lindemuthianum* foram realizadas 10 dias após a semeadura. A suspensão contendo o inóculo foi aplicada em ambas as superfícies foliares. A atomização e a transferência para câmara de nevoeiro foram semelhantes à inoculação com ferrugem, excetuando-se que as plantas foram incubadas por sete dias em câmara úmida. Após esse período, cada planta foi avaliada visualmente, com base na escala de severidade de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES (1992), em que o grau 1 caracteriza-se por ausência de sintomas e o grau 9 por plantas mortas. As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

A inoculação com *P. griseola* foi realizada sobre a primeira folha trifoliolada. O inóculo consistiu de uma suspensão de conídios preparada, raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade, crescendo a 24°C, sobre placas contendo meio V8 (“Campbell Soup Company”, EUA). A atomização, a temperatura, e a umidade relativa para câmara de nevoeiro e a transferência para casa de vegetação foi semelhante à inoculação com ferrugem. A severidade da doença foi avaliada, visualmente, aos 18 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995). As plantas que apresentaram graus de severidade 1 a 3 foram consideradas resistentes (em que a nota 1 foi dada às plantas com folhas, apresentando ausência total de lesões e a nota 3 às plantas com folhas apresentando poucas lesões, sem a ocorrência de esporulação do patógeno). Plantas apresentando graus de severidade 4 a 9 foram consideradas suscetíveis, sendo a nota 4 dada às plantas com folhas contendo poucas lesões, porém havendo a esporulação do patógeno).

### **2.2.3. Análise de segregação da característica resistência a doença**

Para a análise de segregação da característica resistência a doença, os resultados obtidos na avaliação fenotípica foram transformados em matriz de valores binários. As plantas, classificadas como resistentes, foram codificadas por (2) e as

suscetíveis por (0). A análise de segregação foi realizada por meio do teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ), com auxílio do programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)). Apenas as características que apresentaram a proporção de segregação 3:1 ou 1:2:1 foram utilizadas nas análises posteriores.

### 2.3. Extração de DNA

Cerca de 300 mg de folha foram triturados na presença de N<sub>2</sub> líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos (2,0 mL). Em cada microtubo, foi adicionado um volume de 800  $\mu$ L de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 40 minutos e, posteriormente, centrifugados por 05 minutos a 14.000 RPM em microcentrífuga *Eppendorf 5415C* (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA). O sobrenadante foi transferido para microtubos novos. Ao sobrenadante, foram adicionados 800  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram, suavemente, invertidos e centrifugados por 05 minutos a 14.000 RPM em microcentrífuga *Eppendorf 5415C* (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA). A fase superior foi transferida para microtubos novos e o DNA precipitado com a adição de 800  $\mu$ L de isopropanol gelado. O isopropanol foi descartado, sendo adicionados 600 $\mu$ L de etanol gelado (95%) ao precipitado. Após o descarte do etanol, o precipitado foi seco ao ar, ressuspenso em 300  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubado a 37 °C, por 30 minutos, com RNase A à concentração final de 60 $\mu$ g/mL. O DNA foi novamente precipitado com a adição de 30  $\mu$ L de NaCl 5M e 200  $\mu$ L de isopropanol gelado aos microtubos, seguido de centrifugação a 14.000 RPM em microcentrífuga *Eppendorf 5415C* (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) por 15 minutos. O precipitado foi lavado com 600  $\mu$ L de etanol gelado 95%, seco ao ar e ressuspendido em um volume de 300  $\mu$ L de TE<sub>0,1</sub> (EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,5).

A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro, por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50  $\mu$ g/mL de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

## 2.4. Marcadores RAPD

As amostras de DNA contrastantes para cada doença foram amplificadas com os *primers* RAPD de interesse para obtenção de fragmentos de DNA heteromórficos (Quadro 2). Em alguns casos, utilizou-se um único *primer* e, em outros, uma combinação de *primers* RAPD.

Quadro 2. Principais marcadores RAPD utilizados pelo PMGF-BIOAGRO, que se encontram associados a genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular

Marcador	Distância (cM) e orientação*	Gene de resistência	Doença**	Cultivar resistente	Cultivar suscetível
OPY20 <sub>830</sub>	sem recomb.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	Rudá
OPC08 <sub>900</sub>	9,7 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	Rudá
OPB03 <sub>1800</sub>	3,7 – rep.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	Rudá
OPH18 <sub>830</sub>	9,2 – acop.	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	antracnose	G 2333	Rudá
OPAZ20 <sub>940</sub>	7,1 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	Rudá
OPZ04 <sub>560</sub>	8,5 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	Michelite
OPZ09 <sub>950</sub>	20,4 – rep.	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	Michelite
OPAE19 <sub>890</sub>	6,2 – rep.	<i>Ur-11</i>	ferrugem	Belmidak-RR3	Rudá
OPAJ18 + AH10 <sub>700</sub>	11,1 e 9,4 – acop.	<i>Ur-ON</i> e <i>Co-10</i>	ferrugem e antracnose	Ouro Negro	US Pinto 111
OPX11 <sub>550</sub>	5,8 – acop.	<i>Ur-ON</i>	ferrugem	Ouro Negro	US Pinto 111
OPBA16 <sub>583</sub>	10,4 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	Rudá
OPBA16 <sub>669</sub>	10,4 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	Rudá
OPH13 <sub>490</sub>	5,5 – acop.	<i>Phg-1</i>	man. ang.	AND277	Rudá
OPH14 + AA19 <sub>400</sub>	9,8 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	US Pinto 111
OPM02 <sub>425</sub>	5,6 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	US Pinto 111

\* acop. = acoplamento; rep. = repulsão; recomb. = recombinantes; \*\* man. ang. = mancha-angular.

As referências bibliográficas dos trabalhos de identificação dos marcadores RAPD encontram-se no Quadro 1 (Revisão de Literatura).

### 2.4.1. Reações de amplificação utilizando *primers* únicos

As reações de amplificação foram feitas em 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA) 0,4 µM, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40

ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 1 minuto a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos.

#### **2.4.2. Reações de amplificação utilizando combinação de *primers* RAPD**

As reações de amplificação, utilizando combinação de *primers*, foram realizadas conforme descrito anteriormente, modificando-se apenas a concentração de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) para 120 µM e a de cada *primer* para 0,3 µM. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 4 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 35 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 40 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos (CORRÊA, 1999).

#### **2.5. Purificação, quantificação, ligação dos fragmentos em vetor de clonagem e transformação de células competentes**

Os fragmentos RAPD heteromórficos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL, por aproximadamente 14 horas a 50 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os fragmentos de interesse foram excisados e purificados do gel com o kit Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os fragmentos purificados foram quantificados em minigel de agarose (1,2%), utilizando-se o DNA de fago lâmbda como padrão de concentração. Em seguida, os fragmentos foram ligados no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA). As reações de ligação foram realizadas em volume de 10 µL, contendo 1 µL do vetor pGEM-T Easy, 5 µL do tampão 2X, 3 unidades da enzima T4 DNA ligase e, no máximo, 3 µL da solução contendo o fragmento de interesse. As reações foram homogeneizadas e incubadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 1 ciclo a 16 °C por 4 horas. O conteúdo da reação foi utilizado para transformação de células competentes da cepa DH5 de *Escherichia coli*. A transformação foi realizada por choque térmico, de acordo com protocolo-padrão descrito por AUSUBEL (1998).

## **2.6. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos *primers* SCAR**

Após a transformação por choque térmico, foi feita a seleção e o diagnóstico de colônias brancas, utilizando-se a técnica de PCR e os *primers* SP6 e T7. O DNA plasmidial das colônias de interesse foi extraído, quantificado e seqüenciado pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977). A determinação da seqüência dos fragmentos de DNA foi realizada com auxílio do seqüenciador automático ABI Prism 377 (PE Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos fragmentos foram analisadas, utilizando-se o programa SeqMan 3.57 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Os pares de *primers* SCAR foram desenhados com auxílio dos programas Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Os *primers* foram sintetizados pela IMPRINT GENETIX (São Paulo, SP, Brasil).

## **2.7. Determinação das condições de amplificação dos *primers* SCAR**

Amostras de DNA dos cultivares contrastantes (Quadro 2) foram amplificadas com os *primers* SCAR, em diferentes valores de temperatura de pareamento. As misturas de reação continham os reagentes nas mesmas concentrações que as utilizadas nos ensaios de RAPD, exceto para o *primer* e para MgCl<sub>2</sub>. Foram empregados 5 pmoles de cada *primer* específico. Na maioria das reações, o valor da concentração de MgCl<sub>2</sub> foi 2,4 mM. Em alguns casos específicos, também foram testados 1,2 mM e 2,0 mM. As reações foram realizadas em um termociclador modelo Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), programado para 1 ciclo a 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 46 a 67 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL, por cerca de 4 horas a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

## **2.8. Análise de co-segregação dos marcadores SCAR e genes de resistência**

Os fragmentos amplificados pelos *primers* SCAR foram codificados como presença (2) e ausência (0) nos indivíduos das diferentes populações F<sub>2</sub> (Quadro 1). O

número (9) foi atribuído a dados perdidos. Codificação semelhante foi utilizada para os indivíduos resistentes (2) e suscetíveis (0) destas populações. A análise de co-segregação foi realizada por meio do teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ), com auxílio do programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)), para avaliar se a proporção de segregação ajustou-se a 9:3:3:1.

## **2.9. Determinação da distância genética**

A determinação da distância genética entre os marcadores SCAR e os genes de resistência foi feita com o auxílio do programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)). Marcadores e genes de resistência foram agrupados, utilizando-se valor LOD mínimo de 3,0. A função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944) foi utilizada para a conversão da frequência de recombinação para centiMorgans.

## **2.10. Nomenclatura dos *primers* SCAR**

A nomenclatura dos *primers* SCAR foi derivada da numeração do marcador RAPD que o originou, precedida pela letra s. As designações F para *forward* e R para *reverse* foram utilizadas para diferenciar cada *primer* SCAR. Portanto, a representação sAZ20F se refere ao *primer* SCAR *forward* originado da sequência do fragmento OPAZ20<sub>940</sub>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolamento, clonagem e seqüenciamento de fragmentos de DNA

As amostras de DNA de cultivares contrastantes para resistência a diferentes doenças foram amplificadas com 16 *primers* RAPD (Quadro 2). A análise eletroforética dos produtos de amplificação possibilitou a identificação de 17 fragmentos de DNA heteromórficos. A partir dos cultivares contrastantes para resistência à mancha-angular foram isolados 6 fragmentos, para ferrugem 5 fragmentos e para antracnose 6 fragmentos. Após a separação dos fragmentos em gel de agarose (Fig. 1), foi feita excisão e purificação dos fragmentos referidos anteriormente.

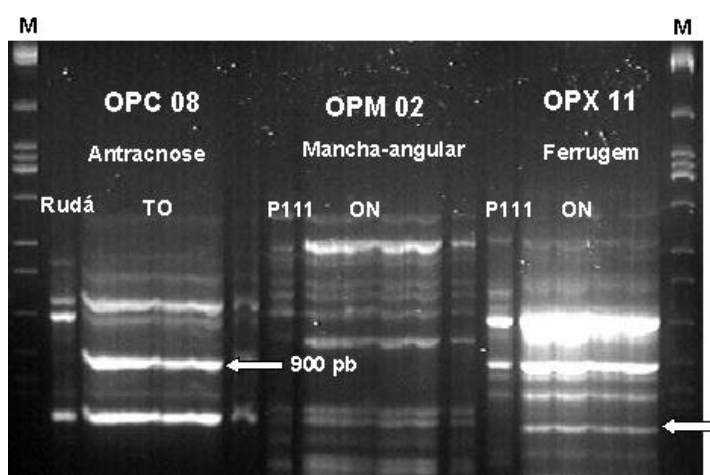


Figura 1. Padrão eletroforético de fragmentos RAPD heteromórficos em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de DNA indicados pelas setas correspondem aos marcadores OPC08<sub>900</sub> (A), OPM02<sub>425</sub> (B) e OPX11<sub>550</sub> (C). ON – cultivar Ouro Negro, P111 – cultivar US Pinto 111, TO – cultivar TO, Rudá – cultivar Rudá. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI.

Cada fragmento de DNA de interesse foi quantificado (Fig. 2) e ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy. A construção plasmídeo/fragmento foi utilizada para transformação de células competentes da cepa DH5 de *Escherichia coli*. Os clones positivos foram selecionados e seqüenciados.

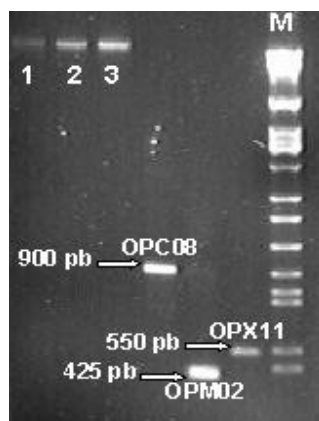


Figura 2. Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados pela técnica de RAPD, previamente purificados, em gel de agarose 1,2%. As canaletas 1, 2 e 3 correspondem a padrões de concentração de 15, 25 e 50 ng/ L, respectivamente. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI.

### 3.2. Critérios utilizados para o desenho dos *primers* SCAR

Para o desenho dos *primers*, foram priorizados os critérios dos programas Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA).

Inicialmente, o desenho dos *primers* foi realizado pelo programa Primer3, utilizando-se os seguintes critérios: 1) Tamanho do primer - variou entre 18 e 27 nucleotídeos, com o valor ótimo de 20; 2) %GC - variou entre 20 e 80%; 3)  $T_m$  - variou entre 57 e 63 °C, com o valor ótimo de 60 °C. Após a obtenção das seqüências pelo programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), estas foram averiguadas segundo os critérios do programa PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Neste programa, os seguintes fatores são indispensáveis em um oligonucleotídeo iniciador: 1) Estabilidade do pentâmero 3' - é um valor limite de

estabilidade para os cinco últimos nucleotídeos do terminal 3'. *Primers* com o valor de energia livre (G) do pentâmero menor do que - 8,5 kcal/mol apresentam uma tendência de pareamento em regiões inespecíficas e são mais prováveis de formar estruturas em grampo e dímeros com ele mesmo. A estabilidade do pentâmero 3' é uma das considerações mais importantes para se desenhar bons *primers*. O *primer* ideal deve possuir um gradiente crescente de G da extremidade 5' para a extremidade 3'; 2) Seqüência 3' única de 7 pb - este critério impede o pareamento inespecífico na extremidade 3'. Usando este critério, qualquer *primer* que não apresente uma seqüência específica de 7 pb ou superior, que seja exatamente complementar ao sítio de pareamento, é eliminado; 3) Formação de dímeros – segundo este critério, 2 é o número máximo de pares de bases que o dímero pode conter; 4) Formação de estruturas em grampo - este critério limita, no valor 2, o número de pares de bases que a estrutura pode conter. O valor 3 raramente altera o desempenho do *primer*, a não ser que o pareamento seja próximo à extremidade 3'; 5) Formação de fita dupla próximo à extremidade 3' - este critério elimina *primers* candidatos, que apresentem qualquer dímero ou estrutura em grampo a uma distância de 8 pares de base da extremidade 3'; e 6) Temperatura de pareamento ( $T_A$ ) - este critério determina o valor ótimo de  $T_A$  para a combinação específica dos *primers* e da seqüência-alvo. O cálculo é realizado da seguinte maneira:  $T_A = 0,3 T_m (\text{Primer}) + 0,7 T_m (\text{Produto}) - 14,9$ .

Algumas características do *primer* sAE19R (item 3.3.2.1), obtidas pelo programa PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA), são apresentadas na Figura 3.

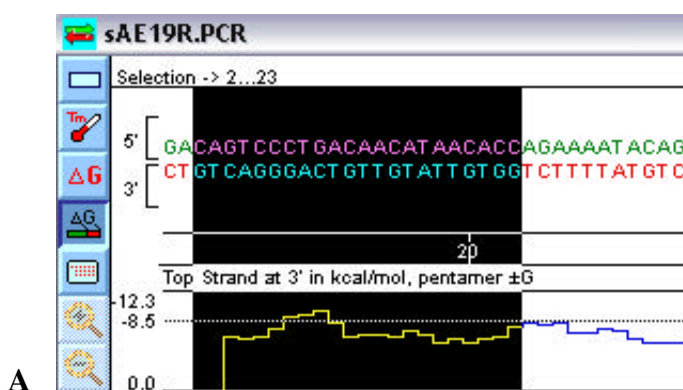


Figura 3. Análise do *primer* sAE19R pelo programa PrimerSelect, segundo os critérios: (A) estabilidade do pentâmero 3'; (B) formação de dímeros; (C) formação de estruturas em grampo.

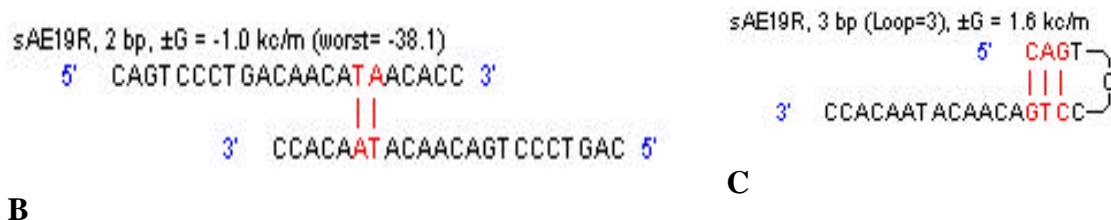


Figura 3, Cont.

A seqüência do *primer* sAE19R é 5' – CAG TCC CTG ACA ACA TAA CACC – 3'. O pentâmero da extremidade 3' encontra-se sublinhado. Na Figura 3A, observa-se que os valores de G para o pentâmero da extremidade 3' encontram-se dentro da faixa esperada ( $G > -8,5$  kcal/mol). Na representação do dímero (Fig. 3B), nota-se que ele contém somente 2 pb e que o valor G é de aproximadamente -1 kcal/mol, indicando que esta estrutura não é tão estável ( $G > -8,5$  kcal/mol) a ponto de permanecer intacta, dificultando o processo de pareamento do *primer* à seqüência-alvo. Da mesma maneira, pode-se inferir que a estrutura secundária (Fig. 3C) provavelmente não será estável, pois, apresenta G em torno de + 1,6 kcal/mol. Embora apresentando uma hélice de 3 pb, a mesma encontra-se na extremidade 5' e a mais de 8 pb da extremidade 3'.

### 3.3. Desenho dos *primers* SCAR e determinação das condições de amplificação

Os 16 *primers* RAPD possibilitaram a clonagem e o seqüenciamento de 17 fragmentos de DNA. A análise desses fragmentos permitiu a elaboração e o teste de 19 pares de *primers* SCAR. A partir dos cultivares contrastantes para resistência à mancha-angular, foram isolados 6 fragmentos e desenhados 5 pares de *primers*. A amplificação das amostras de DNA contrastantes para resistência à ferrugem possibilitou o isolamento de 5 fragmentos e a elaboração de 6 pares de *primers*. A comparação dos produtos de amplificação de cultivares contrastantes para resistência à antracnose possibilitou o isolamento de 6 fragmentos e desenho de 8 pares de *primers*. Para o fragmento OPB03<sub>1800r</sub> (Quadro 2), por exemplo, 3 pares de *primers* foram desenhados e testados. Após o desenho e obtenção dos *primers*, foi feita a determinação das



As amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível) foram amplificadas com os *primers* sM02F e R, para determinação da temperatura adequada de pareamento. O fragmento amplificado foi monomórfico entre os cultivares, em todos os valores de temperatura de pareamento testados (Fig. 5A). A variação da concentração do cofator Mg<sup>2+</sup> na mistura de reação, também, não alterou o resultado anterior (dados não apresentados). Portanto, não foi possível diferenciar esses cultivares com os *primers* sM02F e R nessas condições. O fato de a amplificação ter gerado fragmento de DNA monomórfico indica que as diferenças entre os dois alelos devem localizar-se em um, ou ambos os sítios de pareamento e que os *primers* SCAR, mais longos, sobrepuseram essas diferenças (PARAN & MICHELMORE, 1993). Assim, a amplificação do DNA do cultivar Ouro Negro foi testada e comparada com outros cultivares suscetíveis, utilizados no PMGF-BIOAGRO. A amplificação das amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e TO produziu um fragmento de DNA heteromórfico nos valores de temperatura de pareamento de 57, 58 e 59 °C (Fig. 5B). Os cultivares Ouro Negro e Pérola também foram diferenciados para os valores de 61, 62 e 63 °C (Fig. 5C).

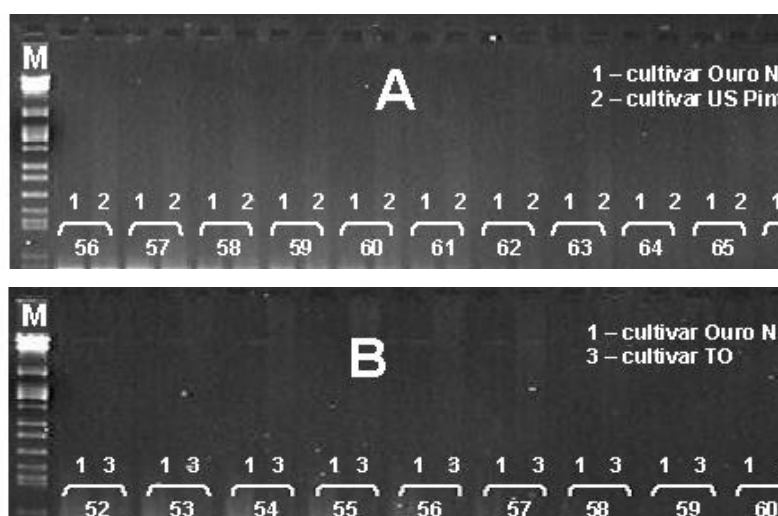


Figura 5. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) do teste de gradiente de temperatura, realizado para amostras de DNA de diferentes cultivares com o *primer* sM02. 1 – cultivar Ouro Negro (resistente); 2 – cultivar US Pinto 111 (suscetível); 3 – cultivar TO (suscetível); 4 – cultivar Pérola (suscetível). (A) Produtos de amplificação das amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e US Pinto 111; (B) Ouro Negro e TO; (C) Ouro Negro e Pérola. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI.

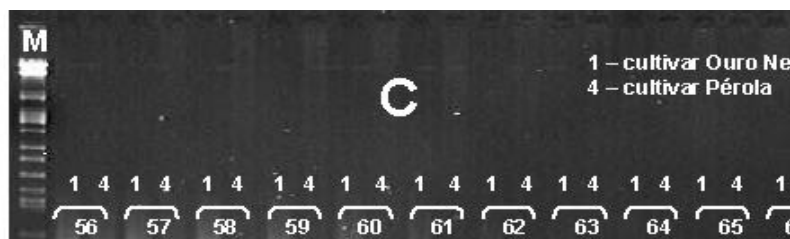


Figura 5, Cont.

### 3.3.1.2. sBA16

FALEIRO et al. (2003) descreveram 2 marcadores moleculares ligados à resistência do feijoeiro-comum às raças fisiológicas 31.55 e 63.31 de *P.griseola*, os quais originaram-se do *primer* OPBA16. Os fragmentos OPBA16<sub>583</sub> e OPBA16<sub>669</sub>, correspondentes a esses marcadores, foram seqüenciados (Fig. 6). Na Figura 6, observa-se que os fragmentos apresentam grande homologia, principalmente nas regiões que contêm a seqüência do *primer* RAPD de origem. Deste modo, foi desenhado apenas um par de *primer* SCAR, utilizando-se o fragmento do marcador OPBA16<sub>669</sub> como molde. Os seguintes *primers* SCAR foram obtidos: sBA16F - 5' TTC CAC GTC TAT TTT GCA TCA 3' e sBA16R - 5' CAC GCA TCA CGC AGA ACT 3'. O *primer* sBA16F não contém nenhum nucleotídeo do *primer* RAPD OPBA16, por outro lado, o *primer* sBA16R contém 9 nucleotídeos (Fig. 6).

```

OPBA16_583      CCACGCATCATAATAGGTATATATTTTTTTCTTG-ATAAATATTTAATTAATATAAAATTTA
OPBA16_669      CCACGCATCATAATAGGAATATATTTTTTTCTTGGATAAAATATTTAATTAATATAAAATTTA
*****

OPBA16_583      G-TAAAAAACATGTTAAACTTTCCAAGTCTATTTTGCATCAAATAATGTG-AATAATTTG
OPBA16_669      GGTAAAAAACATGTTAAACTTTCCACGTCTATTTGCATCAAAATAATGTGGAATAATTTG
* *****

OPBA16_583      TTTTAAGGTTGTATTAAAAAAAATGAGAATGTGAATCAATTAATATTTAATT-----
OPBA16_669      TTTTAAGGTTGTATTAAAAAAAATGAGAATGTGAATCAATTAATATTTAATTTGTAAGT
*****

OPBA16_583      -----GTCTTGGTAGTT-GTTCTTTTGTTC AATACGTCGTTT
OPBA16_669      ATCCTCAACTACTTCAAATTTGTTTGGTACTTAGTTATTTCTTCAATACGTCGTTT
** *****

```

Figura 6. Alinhamento da seqüência dos fragmentos dos marcadores OPBA16<sub>583</sub> e OPBA16<sub>669</sub>. \*\*\*\* - regiões conservadas; ---- regiões onde ocorreram deleções; sublinhado – seqüência do *primer* OPBA16. As seqüências dos *primers* sBA16 F e R encontram-se em negrito e itálico.

```

OPBA16_583      CCACTTCCACTTTTTTCACTTCATCTTCTTACTTACCCTTTGCTCTGCAACT-----
OPBA16_669      CCGCTTCCACTTTTTTCACTTCATCTTCTTACTTACCCTTTGCTCTGCAACGCCCATTTT
                  ** *****
OPBA16_583      -----GCAACGCGG-ATTTTCTG-----CTTCGAATCACACT
OPBA16_669      CTGCTTCGAATCAAATGAGCAGCAACAAAGCATAGCCTGGGTACGTTTCAAATCACACT
                  ***** * ** **      *** *****
OPBA16_583      TTTCTTTGTTTCCTTCACTTCTCTCATGCTAAAAACAACTCTCATTCTGCACCTCAAATTT
OPBA16_669      TT-CTTTGTTTCCTTCACTTCTCTCATACTCAAACAAACTCTCATTCTGCACCTCAAATTT
                  ** ***** ** *****
OPBA16_583      CATTTCTTCTACCAACTTTACTTGCACCAGAGGTAACCCAGTAGCCGCTTCTTCCTTTC
OPBA16_669      CATTTCTTCTACCAACTTTACTTGCACCAGAGGTAACCCAGTAGCCGCTTCTTCCTTTC
                  ***** *****
OPBA16_583      CTCGTTTCCCCTCAA AAAAAGTCCGCGTCTTTTGACTTTTCATGACATCTCAACCCAA
OPBA16_669      CTCGTTTCCCCTCAA AAAAAGTCTGCGTCTTTTGACTTTTCATGACATCTCAACCCAA
                  ***** ***** * *****
OPBA16_583      AACCGAACCTGGGTATCGCCTAGGTCCATTCTGGCACCAATAAAAGAAGCTACGATGA
OPBA16_669      AACCGAACCTGGGTATCGCCTAGGTCCATTCTGGCACCAATAAAAGAAGCTACGATGA
                  *****
OPBA16_583      AATGAGCATTTCTGAGCTTGTTTCAGTTCTGCGTGATGCGTGG
OPBA16_669      AATGAGCATTTCTGAGCTTGTTTCAGTTCTGCGTGATGCGTGG
                  *****

```

Figura 6, Cont.

As amostras de DNA dos cultivares contrastantes para resistência à mancha angular foram amplificadas com os *primers* sBA16F e R, para determinação da temperatura adequada de pareamento. Tanto os cultivares Ouro Negro e Rudá quanto Ouro Negro e TO foram diferenciados, em relação ao produto de amplificação. No teste de amplificação realizado entre os cultivares Ouro Negro (resistente) e Rudá (suscetível), os *primers* sBA16 F e R amplificaram 2 alelos nos valores de temperatura de 56 a 61°C. Um alelo foi amplificado, a partir da amostra de DNA de Ouro Negro e o outro a partir de Rudá, ou seja, o *primer* se mostrou co-dominante (Fig. 7). Por outro lado, no teste realizado entre os cultivares Ouro Negro (resistente) e TO (suscetível), apenas um alelo foi amplificado à temperatura de 58 °C. O alelo foi amplificado a partir do DNA do cultivar Ouro Negro, ou seja, o *primer* apresentou-se dominante (dados não apresentados).

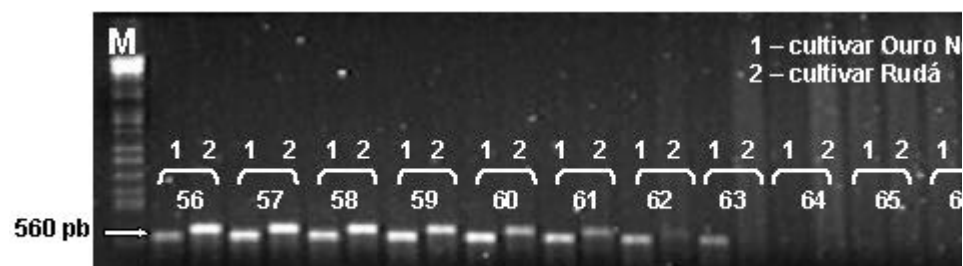


Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) do teste de gradiente de temperatura realizado para amostras de DNA de Ouro Negro (resistente) e Rudá (suscetível). O *primer* utilizado foi o sBA16 e a concentração de  $MgCl_2$  foi de 2,4 mM. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI.

### 3.3.1.3. sH13

O marcador OPH13<sub>490</sub>, identificado e validado por CARVALHO et al. (1998), encontra-se ligado em acoplamento a 5,5 cM do gene de resistência *Phg-1* (Quadro 2). A partir da análise da seqüência do fragmento OPH13<sub>490</sub>, foram desenhados os *primers* SCAR: sH13F - 5' GAC GCC ACA CCC ATT ATG TT 3' e sH13R - 5' GCC ACA CAG ATG GAG CTT TA 3'. Ambos os *primers* contêm a seqüência original do *primer* RAPD (APÊNDICE, Seção 1). O teste de gradiente de temperatura foi realizado entre o cultivar resistente AND 277 e os cultivares suscetíveis Vermelho e Rudá (Quadros 1 e 2). Apenas o DNA do cultivar AND 277 foi amplificado no valor de temperatura de pareamento de 59 °C. Portanto, o *primer* sH13 se mostrou dominante em relação ao produto de amplificação. O fragmento de DNA amplificado apresentou cerca de 520 pb e diferenciou o cultivar AND 277 dos cultivares Vermelho e Rudá no valor de temperatura referido anteriormente (dados não apresentados).

### 3.3.1.4. sAA19

CORRÊA (1999), procurando identificar marcadores ligados a resistência à mancha-angular, testaram 200 combinações de pares de *primers* RAPD. Das combinações testadas, o par OPH14+OPAA19 gerou uma banda de aproximadamente 400 pb, que co-segregou com a resistência ao patótipo 63.39 de *P. griseola*. WELSH e McCLELLAND (1991) propuseram a estratégia de combinar pares de *primers* para ampliar as possibilidades de detectar polimorfismos. A partir da amplificação de

amostras de DNA contrastantes (Quadro 2) com a combinação dos *primers* OPH14 e OPAA19, dois fragmentos de DNA foram isolados, purificados e seqüenciados. Um fragmento apresentou 334 e o outro 650 pb (APÊNDICE, Seção 1).

Para cada fragmento, foi desenhado 1 par de *primers*. Para o fragmento OPH14+OPAA19<sub>334</sub>, os *primers* obtidos foram: sAA19<sub>330</sub>F - 5' AGG CGT GTG GAG GAT CAG 3' e sAA19<sub>330</sub>R - 5' CAG GTT GGC AAC GGA TAT TA 3'. O fragmento OPH14+OPAA19<sub>650</sub> originou o seguinte par de *primers* SCAR: sAA19<sub>650</sub>F - 5' TGA GGC GTG TCA ATG GAT ATA A 3' e sAA19<sub>650</sub>R - 5' GAG GCG TGT TGA TAA TTC TGG 3'.

O teste de gradiente de temperatura foi realizado, utilizando-se o cultivar resistente Ouro Negro e o cultivar suscetível US Pinto 111 (Quadro 1) e os *primers* sAA19<sub>330</sub> e sAA19<sub>650</sub>. O produto da amplificação com o *primer* sAA19<sub>330</sub> foi monomórfico entre os cultivares testados (Fig. 8A). A amplificação deste *primer* com amostras de DNA de outros cultivares de interesse do PMGF-BIOAGRO está em fase de teste. Por outro lado, o produto da amplificação com o *primer* sAA19<sub>650</sub> diferenciou os cultivares no valor de temperatura de pareamento de 56 °C. Este *primer* amplificou um alelo a partir do DNA do cultivar Ouro Negro e outro a partir do DNA do cultivar US Pinto 111, mostrando-se co-dominante (Fig. 8B). Amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e TO (suscetível) também foram amplificadas com o *primer* sAA19<sub>650</sub>, em diferentes valores de temperatura de pareamento. O *primer* diferenciou os cultivares testados no valor de temperatura de 56 °C (dados não apresentados).

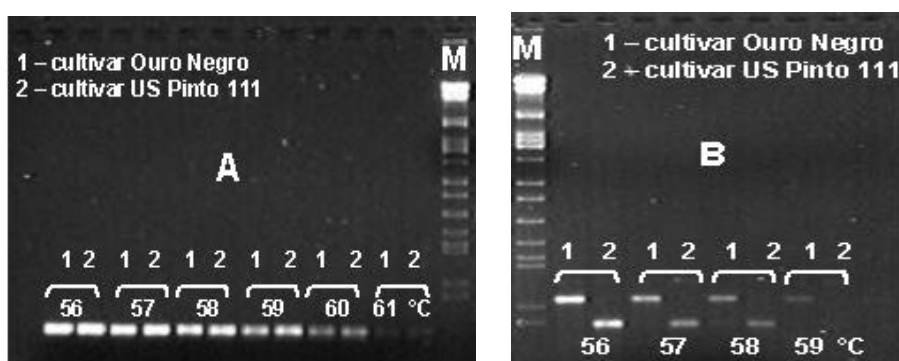


Figura 8. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) do teste de gradiente de temperatura de pareamento realizado para amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível). Os *primers* utilizados foram: (A) sAA19<sub>330</sub> e (B) sAA19<sub>650</sub>. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI.

O Quadro 3 apresenta, resumidamente, as informações de cada *primer* SCAR apresentado no texto. As amostras de DNA foram amplificadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.7). Em todos os casos, foi utilizada a concentração de 2,4 mM para o cofator Mg<sup>+2</sup>.

Quadro 3. Seqüência, temperatura de pareamento e tamanho do produto amplificado pelos *primers* SCAR originados de marcadores RAPD, que marcam genes de resistência à mancha-angular

<i>Primer</i>	Seqüência dos <i>primers</i> F e R (5' 3')	T <sub>A</sub> (°C) <sup>a</sup>	T <sub>F</sub> (pb) <sup>b</sup>	Natureza do <i>primer</i> <sup>c</sup>
sM02	F: CAACGCCTCATTA AATTGGA R: CGCCTCTAAACGGGAGAAAC	58	460	dominante
sBA16	F: TTCCACGTCTATTTTGCATCA R: CACGCATCACGCAGAACT	58 e 60	560	co-dominante e dominante
sH13	F: GACGCCACACCCATTATGTT R: GCCACACAGATGGAGCTTTA	59	520	dominante
sAA19 <sub>330</sub>	F: AGGCGTGTGGAGGATCAG R: CAGGTTGGCAACGGATATTA	EM TESTE	330	EM TESTE
sAA19 <sub>650</sub>	F: TGAGGCGTGTCAATGGATATAA R: GAGGCGTGTGATAATTCTGG	56	650	co-dominante

<sup>a</sup> - T<sub>A</sub> - temperatura de pareamento do *primer*; <sup>b</sup> - T<sub>F</sub> - tamanho do fragmento; <sup>c</sup> - dominante - *primer* que não permite a identificação de indivíduo heterozigoto; co-dominante - *primer* que permite a identificação de indivíduo heterozigoto.

### 3.3.2. *Primers* SCAR originados de fragmentos RAPD que marcam genes de resistência à ferrugem

#### 3.3.2.1. sAE19

O cultivar Ouro Negro é a fonte de resistência à ferrugem, normalmente, utilizada pelo PMGF-BIOAGRO. No intuito de utilizar outras fontes, ALZATE-MARIN et al. (2004) demonstraram que o gene de resistência presente no cultivar Belmidak RR-3 (*Ur-11*) é distinto do gene presente no cultivar Ouro Negro (*Ur-ON*). Esses autores demonstraram, também, que o marcador OPAE19<sub>890</sub> pode ser utilizado para monitorar cruzamentos realizados entre os cultivares Belmidak RR-3 (resistente) e Rudá (suscetível). O marcador OPAE19<sub>890</sub> foi, originalmente, descrito por JOHNSON et al. (1995) e encontra-se ligado em repulsão a 6,2 cM do gene *Ur-11*. O fragmento OPAE19<sub>890</sub> foi isolado, purificado e seqüenciado. A partir da análise da seqüência deste fragmento de DNA, foram desenhados os seguintes *primers*: sAE19F (5' CAG TCC

CTG ACA ACA TAA CAC C 3') e sAE19R (5'CAG TCC CTA AAG TAG TTT GTC CCT A 3').

Ambos os *primers* contêm a seqüência original do *primer* RAPD (APÊNDICE, Seção 1). O teste de gradiente de temperatura foi realizado entre os cultivares Belmidak RR-3 (resistente) e Rudá (suscetível). O produto de amplificação do *primer* diferenciou os cultivares no valor de temperatura de pareamento de 58 °C. O *primer* sAE19 apresentou padrão dominante e encontra-se em repulsão, pois, amplificou apenas o DNA do cultivar Rudá (dados não apresentados).

### 3.3.2.2. sAJ18

CORRÊA (1999) descreveu que a amplificação do DNA do cultivar Ouro Negro com a combinação dos *primers* OPAJ18 e OPAH10 gerou uma banda de cerca de 700 pb, que se mostrou ligada, simultaneamente, aos genes de resistência à ferrugem (11,1 cM) e à antracnose (9,4 cM) deste cultivar. A partir da amplificação das amostras de DNA contrastantes (Quadro 2) com a mesma combinação de *primers*, três fragmentos de DNA foram isolados, purificados, clonados e seqüenciados. Os fragmentos apresentaram 405, 472 e 704 pb (APÊNDICE, Seção 1).

A análise das seqüências possibilitou o desenho dos seguintes pares de *primers*: sAJ18<sub>405</sub>F - 5' TGA CCA TAC CCA ACA CTA ACC 3' e sAJ18<sub>405</sub>R - 5' GCT AGG TGG AAA GGC AGG T 3'; sAJ18<sub>472</sub>F - 5' GAT GAC CAG AAG GAG GCA AA 3' e sAJ18<sub>472</sub>R - 5' GGC TAG GTG GTG ACA CAA GAA 3' e sAJ18<sub>700</sub>F - 5' GGT GGC GTT ATA TGA CCT TAT TG 3' e sAJ18<sub>700</sub>R - 5' GGG ATG ACC ACG CCA ATC 3'.

As amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível) foram amplificadas com cada um dos *primers* sAJ18. O produto de amplificação dos *primers* sAJ18<sub>472</sub> e sAJ18<sub>700</sub> foi monomórfico entre os cultivares testados. Este resultado se repetiu em todos os valores de temperatura de pareamento e concentração de MgCl<sub>2</sub> utilizados (dados não apresentados). A análise eletroforética dos produtos de amplificação, envolvendo a combinação dos *primers* sAJ18<sub>405</sub> F e R, revelou a presença de 3 fragmentos, sendo um deles polimórfico (Fig. 9). Como o padrão de amplificação obtido não foi o esperado para *primers* SCAR, novos testes envolvendo o referido *primer* serão realizados. A amplificação dos *primers* sAJ18<sub>405</sub>, sAJ18<sub>472</sub> e sAJ18<sub>700</sub> com amostras de DNA de outros cultivares de interesse do PMGF-

BIOAGRO está sendo testada. Tal procedimento está sendo realizado a fim de possibilitar a validação dos *primers*, tornando-os úteis ao monitoramento de genes de resistência em outros cruzamentos.

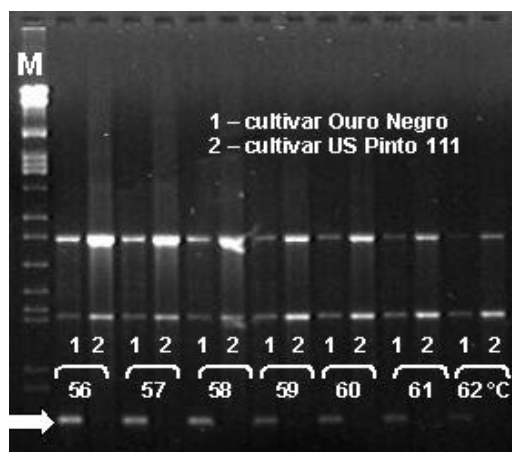


Figura 9. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) do teste de gradiente de temperatura realizado para amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível). O *primer* utilizado foi sAJ18<sub>405</sub> e a concentração de MgCl<sub>2</sub> foi 2,4 mM. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lãmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI. A seta indica o fragmento polimórfico (405 pb) entre os cultivares testados.

### 3.2.3.3. sX11

O marcador OPX11<sub>550</sub>, identificado e validado por FALEIRO et al. (2000), encontra-se ligado em acoplamento a 5,8 cM do gene de resistência à ferrugem, presente no cultivar Ouro Negro (Quadro 2). A tentativa inicial de construção de *primers* SCAR para este marcador foi realizada por CORRÊA (1999), que a partir da análise da seqüência do fragmento de DNA desenhou os *primers* SCAR: sX11F - 5' GGA GCC TCA GCC AAA ACT C 3' e sX11R - 5' GAG CCT CAG ATT CGT CCC G 3'. Tal procedimento foi repetido no presente trabalho. Os resultados obtidos foram os mesmos descritos pelo autor, anteriormente, mencionado (dados não apresentados). CORRÊA (1999) também relatou que o produto de amplificação das amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível) com o *primer* SCAR sX11 foi monomórfico.

No presente trabalho foi realizada a amplificação de amostras de DNA de outros cultivares com o *primer* SCAR descrito por CORRÊA (1999). Os testes foram efetuados na tentativa de validar este *primer*, tornando-o útil ao monitoramento de genes de resistência em outros cruzamentos. Os cultivares utilizados foram: Ouro Negro (resistente), Rudá e Pérola (suscetíveis). O *primer* sX11 se mostrou monomórfico, para diferentes valores de concentração de MgCl<sub>2</sub> e de temperatura de pareamento, entre os cultivares testados (dados não apresentados).

Outro procedimento foi realizado com o objetivo de obter *primers* SCAR funcionais para o marcador OPX11<sub>550</sub>. As amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro, US Pinto 111, Rudá e Pérola foram amplificadas, no valor de temperatura de pareamento de 60 °C. Em seguida, procedeu-se à purificação, clonagem, seqüenciamento e análise dos fragmentos originados a partir destes cultivares. As seqüências foram representadas na Figura 10.

```

X11RUDA      -GGAGCCTCAGCCAAAACCTCAGTAGACACAGTGACGA-ATGTCTGGTAAAAATTTTCAG-A
X11ONEGRO    GGGAGCCTCAGCCAAAACCTCAGCAGACACAGTGACGA-ATgtctggtaaaaaatttcaggA
X11P111      -GGAGCCTCAGCCAAAACCTCAACAGACACAGTGACGA-ATGTCTGGTAAAAATTTTCACCA
X11Perola    -GGAGCCTCAGCCAAAACCTCAGCAGACACAGTGACGAGATGTCTGGTAAAAATTTTCAT-A
              *****
X11RUDA      CCAAAATACCCAG-GGAGTGAGGCGCAGTAAGTCCCAGACCGAGAGTGAACAAAACCGGT
X11ONEGRO    CCAAAATaccaatggagtaAGGCGCAGTAAGTCCCAGACCGAGAGTGAACAAAACCGGT
X11P111      CCAAAATACACAA-GGAGTAAGGCGCAGTAAGTCCGAGACCGAGAGTGAACATAACCGGT
X11Perola    CCAAAATACCCAA-GGAGAAAGGCGCAGCAAGTCCCAGACCGAGAGTGAACAAAACCGGT
              ***** **
X11RUDA      TTTCCGAAAACAAAACGTCCTGGCTTTTCTTCCCGTATCTTCTTTCTGTGATTCGTTTA
X11ONEGRO    TTTCCGAAAACAAAACGTCCTGGCTTTTCTTCCCGTATCTTCTTTTGTATTCGTTTA
X11P111      TTTCCGAAAACAAAACGTCCTGGCTTTTCTTCCCGTATCTTCTTTTGTGATTCGTTTA
X11Perola    TTTCCGAAAACAAAACGTCCTGGCTTTTCTTCCCGTATCTTCTTTTGTGATTCGTTTA
              ***** **
X11RUDA      TGGACGTTCTCCTTGCCCTGGGTGCAAACAGCACACGAAAGTGCTTGTGCGAATTTTTTT
X11ONEGRO    TGGACGTTCTCCTCCCTGCCTGGGTGCAAACAGCATAACGAAAGTGCTTGTGCGGATTTTTTT
X11P111      TGGACGTTCTCCTTGCCCTGGGTGCAAACAGTATACGAAAGTGCTTGTGCGAATTTTTTT
X11Perola    TGGACGTTCTCCTTGCCCTGGGTGCAAACAGCATAACGAAAGTGCTTGTGCGAATTTATTT
              ***** *

```

Figura 10. Alinhamento da seqüência dos fragmentos gerados a partir da amplificação do DNA de diferentes cultivares com o *primer* sX11. X11RUDA – cultivar Rudá; X11ONEGRO – cultivar Ouro Negro; X11P111 – cultivar US Pinto 111; X11Perola – cultivar Pérola; \*\*\*\*\* - regiões conservadas; ---- regiões onde ocorreram deleções; sublinhado e maiúsculo – seqüência do *primer* sX11 F; sublinhado, maiúsculo e itálico – seqüência do *primer* sX11 R; sublinhado e minúsculo - sX11F<sub>01</sub>; sublinhado, minúsculo e itálico - sX11F<sub>02</sub>.

X11RUDA	CAGCGCAGTACGGACCCAGAATGAAATTGCAGAAATTAGGCCGGAATTTACACAAGTTTCG
X11ONEGRO	CAGCGCAGTACGGACCCAGAATGAAATTGCAGAAATTAGGCCGGAATTTACACAAGTTTCG
X11P111	CAGCGCAGTACGGACCCAGAATGAAATTGCAGAAATTAGGCCGGAATTTACACAAGTTTCG
X11Perola	CAGCGCAGTACGGACCCAGAATGAAATTGCAGAAATTAGGCCGGAATTTACACAAGTTTCG ***** **
X11RUDA	GTAGAGGATAGCCTTGGTTTTTACAAAATTTCTGAAAAATTTCTCCGGAATGG-TTTTTT
X11ONEGRO	GTAGAGGATAGCCTTGGTTTTTACAAAATTTCTGAAAAATTTCTCCGGAATGGTTTTTT
X11P111	GTAGAGGATAGCCTTGGTTTTTACAAAATTTCTGAAAAATTTCTCCGGAATGGTTTTTT
X11Perola	GTAGAGGATAGCCTTGGTTTTTACAAAATTTCTGAAAAATTTCTCCGGAATGG-TTTTTT ***** * *****
X11RUDA	CCTGAAATTCACCCAAGAATCTCCACTGAATTTGGGACAAAACGGGACAAATTTTCAGGT
X11ONEGRO	CCTGAAATTCACCCATGAATCTCCACTGAATTTGGGACAAAACGGGACAAATTTTCAGGT
X11P111	CCTGAAATTCACCCAAGAATCTCCACTGAATTTGGGACAAAACGGGACAAATTTTCAGGT
X11Perola	CCTGAAATTCACCCAAGAATCTCCAATGAATTTGGGACAAAACGGGACAAATTTTCAGGT ***** *****
X11RUDA	CAAACGGATGAGTATTCACCCACAAAAGAATCAAACAGTTTACACACAAACGAACCTT
X11ONEGRO	CAAACGGATGAGTATTCACCCACGAAAAGAATCAAACAGTTTACACACAAACGAACCTT
X11P111	CAAACGGATGAGTATTCACCCACGAAAAGAATCAAACAGTTTACACACAAACGAACCTT
X11Perola	CAAACGGATGAGTATTCACCCACGAAAAGAATCAAACAGTTTACACACAAACGAACCTT ***** *****
X11RUDA	CCTTTCAGCCCTGGCAGTGACGAATAAAAAATTTATTGCCAATCCT-GCGGGACGAATCT
X11ONEGRO	CCTTTCAGCCCTGGCAGTGCGGAATAAAAAATTTATTGCCAATCCT- <u>GCGGGACGAATCT</u>
X11P111	CCTTTCAGCCCTGGCAGTGACGAATAAAAAATTTATTGCCAATCCT-GCGGGACGAATCT
X11Perola	CCTTTCAGCCCTGGCAGTGACGAATAAAAAATTTATTGCCAATCCTTGCAGGGACGAATCT ***** *****
X11RUDA	GAGGCTC-
X11ONEGRO	<u>GAGGCTC</u>
X11P111	GAGGCTC-
X11Perola	GAGGCTC- *****

Figura 10, Cont.

Na Figura 10, observa-se que uma possibilidade de distinção entre os indivíduos resistentes e suscetíveis seria a identificação de sítios e utilização de enzimas de restrição. Outra possibilidade seria o desenho de um *primer* complementar a uma região específica do DNA do cultivar Ouro Negro (resistente) e que amplificasse fragmentos, somente, a partir deste DNA. Assim, foram desenhados 2 *primers*, a partir da seqüência do fragmento amplificado do DNA de Ouro Negro; são eles: sX11F<sub>01</sub> - 5' ACC CAA TGG AGT A 3' e sX11F<sub>02</sub> - 5' GTC TGG TAA AAA TTT CAG G 3'. Os *primers* sX11F<sub>01</sub> e sX11F<sub>02</sub> (Fig. 10) possuem, respectivamente, 13 e 19 pb e foram utilizados nas reações de amplificação, em substituição ao *primer* sX11F. O teste de gradiente de temperatura de pareamento foi realizado com as amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e US Pinto 111. Foram observados dois resultados distintos. A combinação de *primers* sX11F<sub>01</sub> e sX11R amplificou vários fragmentos monomórficos, a partir das amostras de DNA testadas, sendo 1 deles polimórfico (Fig. 11). A

combinação de *primers* sX11F<sub>02</sub> e sX11R não amplificou nenhum fragmento a partir das amostras de DNA desses cultivares, em temperatura variando de 45 a 67 °C (dados não apresentados). A amplificação de amostras de DNA de outros cultivares do PMGF-BIOAGRO, com os pares de *primers* sX11R/sX11F<sub>01</sub> e sX11R/sX11F<sub>02</sub>, está sendo testada.

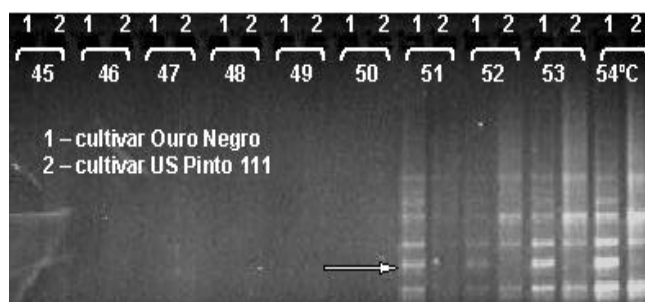


Figura 11. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) do teste de gradiente de temperatura de pareamento, realizado para amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro (resistente) e US Pinto 111 (suscetível). Os *primers* utilizados foram sX11F<sub>01</sub> e sX11R, a concentração de MgCl<sub>2</sub> foi 2,4 mM. A seta indica o fragmento polimórfico entre os cultivares.

O Quadro 4 apresenta, resumidamente, as informações de cada *primer* SCAR apresentado no texto. As amostras de DNA foram amplificadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.7). Em todos os casos, foi utilizada a concentração de 2,4 mM para o cofator Mg<sup>+2</sup>.

Quadro 4. Seqüência, temperatura de pareamento e tamanho do produto amplificado pelos *primers* SCAR originados de marcadores RAPD, que marcam genes de resistência à ferrugem

<i>Primer</i>	Seqüência dos <i>primers</i> F e R (5' 3')	T <sub>A</sub> (°C) <sup>a</sup>	T <sub>F</sub> (pb) <sup>b</sup>	Natureza do <i>primer</i> <sup>c</sup>
sAE19	F: CAGTCCCTGACAACATAACACC R: CAGTCCCTAAAGTAGTTTGTCCCTA	58	890	dominante
sAJ18 <sub>405</sub>	F: TGACCATACCCAACACTAACC R: GCTAGGTGGAAGGCAGGT	EM TESTE	400	EM TESTE
sAJ18 <sub>472</sub>	F: GATGACCAGAAGGAGGCAAA R: GGCTAGGTGGTGACACAAGAA	EM TESTE	470	EM TESTE
sAJ18 <sub>700</sub>	F: GGTGGCGTTATATGACCTTATTG R: GGGATGACCACGCCAATC	EM TESTE	700	EM TESTE
sX11	F: GAGCCTCAGATTCGTCCCG	EM	550	EM TESTE
sX11F <sub>01</sub>	F: ACCCAATGGAGTA	TESTE		

<sup>a</sup> - T<sub>A</sub> - temperatura de pareamento do *primer*; <sup>b</sup> - T<sub>F</sub> - tamanho do fragmento; <sup>c</sup> - dominante - *primer* que não permite a identificação de indivíduo heterozigoto.

### 3.3.3. *Primers* SCAR originados de fragmentos RAPD que marcam genes de resistência à antracnose

#### 3.3.3.1. sAZ20

O marcador OPAZ20<sub>940</sub> foi descrito por ALZATE-MARIN et al. (1999a) e encontra-se ligado, em acoplamento, a 7,1 cM do gene de resistência *Co-6* presente no cultivar AB136 (Quadro 2). O fragmento do marcador OPAZ20<sub>940</sub> foi seqüenciado e sua análise originou os seguintes *primers* SCAR: sAZ20F - 5' ACC CCT CAT GCA GGT TTT TA 3' e sAZ20R - 5' CAT AAT CCA TTC ATG CTC ACC 3'. A seqüência do *primer* sAZ20F contém, parcialmente, a seqüência do *primer* RAPD de origem, enquanto o sAZ20R não apresenta nenhum nucleotídeo (APÊNDICE, Seção 1).

No teste realizado entre os cultivares AB136 (resistente) e Rudá (suscetível), os *primers* sAZ20 F e R amplificaram 2 alelos no valor de temperatura de pareamento de 58 °C. Um alelo foi amplificado, a partir da amostra de DNA de AB136 e o outro a partir de Rudá, ou seja, o *primer* se mostrou co-dominante. Por outro lado, no teste realizado a 60 °C entre os mesmos cultivares, apenas um alelo foi amplificado. Este foi amplificado a partir do DNA do cultivar AB136, ou seja, o *primer* apresentou-se dominante neste valor de temperatura (dados não apresentados).

#### 3.3.3.2. sY20

O marcador OPY20<sub>830</sub> foi identificado e validado por ARRUDA et al. (2000) e encontra-se ligado ao gene de resistência *Co-4* presente no cultivar TO (Quadro 2). A análise da seqüência do fragmento OPY20<sub>830</sub> possibilitou o desenho dos seguintes *primers* SCAR: sY20F - 5' AGC CGT GGA AGG TTG TCA T 3' e sY20R - 5' CCG TGG AAA CAA CAC ACA AT 3'. A seqüência do *primer* RAPD OPY20, encontrada em cada um dos *primers* sY20, está sublinhada. O *primer* sY20 F contém toda a seqüência RAPD original e o *primer* sY20R quase toda.

As amostras de DNA dos cultivares TO (resistente) e Rudá (suscetível) foram amplificadas com a combinação dos *primers* sY20. A concentração de MgCl<sub>2</sub> foi 2,4 mM. Os cultivares foram diferenciados quanto ao produto de amplificação no valor de temperatura de pareamento de 65 °C. O DNA do cultivar TO amplificou um fragmento de cerca de 830 pb. O *primer* apresentou natureza dominante, pois, o DNA de apenas um dos cultivares foi amplificado nessas condições (dados não apresentados).

### 3.3.3.3. sC08

A amplificação das amostras de DNA dos cultivares TO e Rudá com o *primer* RAPD OPC08 possibilitou o isolamento, a clonagem e o seqüenciamento de um fragmento polimórfico de cerca de 900 pb. O marcador OPC08<sub>900</sub> foi identificado e validado por ARRUDA et al. (2000) e encontra-se ligado em acoplamento a 9,7 cM do gene de resistência *Co-4* presente no cultivar TO (Quadro 2). A análise da seqüência do mesmo permitiu o desenho dos *primers* SCAR: sC08F - 5' AGA ATG CCT TTA GCT GTT GG 3' e sC08R - 5' CAG AGA GGC TAG GCT TAT CG 3' . Nem o *primer* sC08F nem o sC08R apresentaram a seqüência do *primer* RAPD original (Apêndice, Seção 1).

O teste de gradiente de temperatura de pareamento foi realizado entre os cultivares TO (resistente), Rudá e Ouro Negro (suscetíveis). A amplificação das amostras de DNA dos cultivares TO e Rudá com o *primer* sC08 produziu um fragmento monomórfico em todos os valores testados de temperatura e concentração de MgCl<sub>2</sub> (dados não apresentados). Como nenhum dos *primers* SCAR apresentou a seqüência do RAPD original, é possível que o polimorfismo tenha sido perdido, pois, localizava-se no sítio de pareamento do *primer* RAPD. Assim, considerando que os sítios de pareamento dos *primers* SCAR estavam presentes tanto no DNA do cultivar TO quanto em Rudá, estes amplificaram o mesmo fragmento. Por outro lado, quando o teste de gradiente foi realizado com os cultivares TO e Ouro Negro, apenas o DNA do cultivar TO foi amplificado. O *primer* apresentou natureza dominante e amplificou, na temperatura de pareamento de 65 °C, um fragmento de cerca de 910 pb (dados não apresentados).

### 3.3.3.4. sZ04

ALZATE-MARIN et al. (1999b) identificaram e validaram o marcador OPZ04<sub>560</sub>, o qual mostrou-se ligado em acoplamento a 8,5 cM do gene de resistência *Co-6* presente no cultivar AB 136 (Quadro 2). Após a clonagem, seqüenciamento e análise do fragmento OPZ04<sub>560</sub>, foram desenhados os seguintes *primers* SCAR: sZ04F - 5' GGC TGT GCT GAT TAA TTC TGG 3' e sZ04R - 5' TGC TCA TTT TAT AAT GGA GAA AAA 3'. A seqüência do *primer* RAPD OPZ04 é 5' AGG CTG TGC T 3'. A seqüência sublinhada no *primer* sZ04F contém quase toda a seqüência do *primer* OPZ04. Por outro lado, no *primer* sZ04R, a seqüência sublinhada corresponde a apenas 4 nucleotídeos do *primer* original.

O teste de gradiente de temperatura foi realizado com a amplificação do DNA dos cultivares AB136 (resistente) e Michelite (suscetível). Como apenas o DNA do cultivar AB136 foi amplificado, o *primer* apresentou natureza dominante (dados não apresentados). Para este caso específico, a reação da técnica SCAR foi realizada, utilizando-se 45 ciclos de amplificação. O fragmento, amplificado a partir do valor de temperatura de pareamento de 45 °C, apresentou cerca de 567 pb.

### 3.3.3.5. sB03

ARRUDA et al. (2000) descreveram um marcador de 1800 pb ligado em repulsão a 3,7 cM do gene de resistência *Co-4* (Quadro 2). Por meio da amplificação do DNA dos cultivares TO (resistente) e Rudá (suscetível) com o *primer* OPB03, foi possível observar que, apenas, o DNA do cultivar Rudá amplificava o fragmento de DNA de cerca de 1800 pb. Este fragmento foi clonado e seqüenciado. A análise da seqüência do mesmo possibilitou o desenho de 2 *primers* SCAR: sB03F - 5' TCC CAT TTA GCT GTG ATG GT 3' e sB03R - 5' CCT GCG AAA TGT GGA TTA TG 3'. Nem o *primer* sB03F nem o sB03R apresenta a seqüência do *primer* RAPD original (Apêndice, Seção 1).

As amostras de DNA dos cultivares contrastantes TO (resistente) e Rudá (suscetível) foram amplificadas com os *primers* sB03. A concentração de MgCl<sub>2</sub> foi de 2,4 mM e o gradiente de temperatura testado variou de 45 a 67 °C. Nenhum produto de amplificação foi observado, a partir das amostras de DNA e nas condições de amplificação utilizadas (dados não apresentados). Inicialmente, suspeitou-se que a enzima *Taq* DNA polimerase poderia estar falhando, ao tentar amplificar um fragmento tão extenso. Assim, novas reações de amplificação foram realizadas e o plasmídeo contendo o fragmento OPB03<sub>1800</sub> clonado também foi testado. Foram utilizados os *primers* SCAR sB03, RAPD OPB03 e a temperatura de pareamento de 35 °C (Fig. 12).

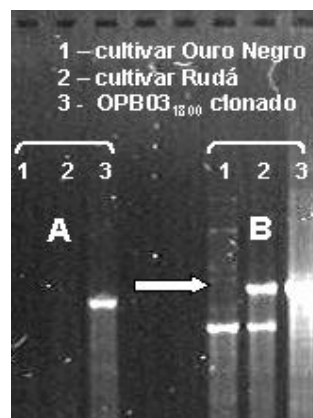


Figura 12. Padrão eletroforético de amplificação gerado pelo *primers* SCAR sB03 e RAPD OPB03 em gel de agarose 1,2%. (A) Técnica de SCAR. (B) Técnica de RAPD. 1 – DNA do cultivar TO (resistente), 2 – DNA do cultivar Rudá (suscetível) e 3 – DNA plasmidial contendo OPB03<sub>1800</sub>. A seta indica o marcador OPB03<sub>1800</sub>.

Na Figura 12A, observa-se que a amostra de DNA plasmidial, contendo o fragmento OPB03<sub>1800</sub>, apresentou amplificação com o *primer* sB03, o que não ocorreu com o DNA do cultivar Rudá. O teste de gradiente de temperatura foi, novamente, repetido para as amostras de DNA contrastantes. Entretanto, os resultados obtidos foram os mesmos descritos anteriormente (dados não apresentados). Desse modo, optou-se por desenhar novos pares de *primers*, que amplificassem fragmentos de menor tamanho. Os *primers* desenhados foram: sB03F<sub>01</sub> - 5' TGA TTT GCT TCT GCT TTG ACA 3' e sB03R<sub>01</sub> - 5' GGA ACC CTC ACC ACA TAA CC 3'; sB03F<sub>02</sub> - 5' CCC TGC GAA ATG TGG 3' e sB03R<sub>02</sub> - 5' CCC CTG GAC ACA ACT TTT 3'.

No teste de gradiente de temperatura, realizado entre os cultivares TO e Rudá, o resultado obtido pela amplificação com o *primer* sB03<sub>01</sub> foi diferente do obtido com o sB03<sub>02</sub>. Na temperatura de pareamento de 63 °C, o *primer* sB03<sub>01</sub> conseguiu diferenciar os cultivares, pois, amplificou apenas o DNA do cultivar Rudá. Resultado semelhante foi obtido, utilizando-se os cultivares Ouro Negro e Rudá e o mesmo valor de temperatura (dados não apresentados). Em contrapartida, nos valores de temperatura que variaram entre 45 e 67 °C, o *primer* sB03<sub>02</sub> não amplificou nenhum fragmento a partir das amostras de DNA acima mencionadas (dados não apresentados).

### 3.3.3.6. sZ09

A partir da análise da seqüência do fragmento OPZ09<sub>950</sub>, foram desenhados os *primers* SCAR: sZ09F - 5' CAC CCC AGT CTA ACA TAT ATA CCC 3' e sZ09R - 5' CAC CCC AGT CGG AAT ATC AA 3'. As seqüências completas dos *primers* sZ09 F e R e outras informações a respeito deste podem ser encontradas no Apêndice (Seção 1). O *primer* sZ09 não chegou a ser sintetizado nem testado. O marcador OPZ09<sub>950</sub> encontra-se ligado em repulsão a cerca de 20,4 cM do gene de resistência *Co-6* (ALZATE-MARIN et al., 1999b), portanto, não representa um bom marcador.

O Quadro 5 apresenta, resumidamente, as informações de cada *primer* SCAR apresentado no texto. As amostras de DNA foram amplificadas, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.7). Em todos os casos, foi utilizada a concentração de 2,4 mM para o cofator Mg<sup>+2</sup>. Para o caso específico do *primer* sZ04, foram utilizados 45 ciclos de amplificação.

Quadro 5. Seqüência, temperatura de pareamento e tamanho do produto amplificado pelos *primers* SCAR originados de marcadores RAPD, que marcam genes de resistência à antracnose

<i>Primer</i>	Seqüência dos <i>primers</i> F e R (5' 3')	T <sub>A</sub> (°C) <sup>a</sup>	T <sub>F</sub> (pb) <sup>b</sup>	Natureza do <i>primer</i> <sup>c</sup>
sAZ20	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	58 e 60	845	co-dominante e dominante
sY20	F: AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R: CCGTGGAACAACACACAAT	65	830	dominante
sC08	F: AGAATGCCTTTAGCTGTTGG R: CAGAGAGGCTAGGCTTATCG	65	910	dominante
sZ04	F: GGCTGTGCTGATTAATTCTGG R: TGCTCATTTTATAATGGAGAAAAA	45	567	dominante
sB03 <sub>01</sub>	F: TGATTTGCTTCTGCTTTGACA R: GGAACCCTCACCACATAACC	63	EM TESTE	dominante
sZ09	F: CACCCAGTCTAACATATATACCC R: CACCCAGTCGGAATATCAA	-	-	-

<sup>a</sup> - T<sub>A</sub> - temperatura de pareamento do *primer*; <sup>b</sup> - T<sub>F</sub> - tamanho do fragmento; <sup>c</sup> - dominante - *primer* que não permite a identificação de indivíduo heterozigoto; co-dominante - *primer* que permite a identificação de indivíduo heterozigoto.

### 3.4. Validação dos *primers* SCAR

No presente trabalho vários *primers* SCAR foram desenvolvidos e testados. Alguns *primers* se mostraram polimórficos, enquanto outros foram monomórficos entre os diferentes cultivares testados. Os *primers* SCAR polimórficos, que produziram bandas fortes e bem definidas, foram avaliados como marcadores candidatos de genes de resistência.

Inicialmente, a segregação de cada fragmento polimórfico foi testada por meio do teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ), em população  $F_2$  apropriada. O Quadro 1 resume cada população segregante  $F_2$  utilizada e os progenitores que as originaram. Apenas os fragmentos cuja proporção de segregação se ajustou a 3:1 ( $P < 0,05$ ) foram utilizados. O fragmento amplificado pelo *primer* sB03<sub>01</sub> não segregou na proporção esperada e, portanto, não foi validado. Este será testado em uma população originada do cruzamento entre os cultivares Ouro Negro e Rudá.

O padrão de segregação da característica resistência à doença foi considerado 3:1 entre as plantas resistentes e suscetíveis, em todas as populações  $F_2$  utilizadas no presente trabalho. Nas populações inoculadas com o patótipo 63-23 de *P. griseola*, por exemplo, o padrão de segregação fenotípico foi 3:1, sugerindo que a resistência a este patótipo é governada por um único gene. O padrão de herança monogênica e dominante já havia sido descrito para os genótipos AND 277 e Ouro Negro (CARVALHO et al., 1998, CORRÊA et al., 2001). Este padrão de herança também foi observado para os genótipos MAR-2 (FERREIRA et al., 2000), Cornell 49-242 (NIETSCHKE et al., 2000), Mexico 54 (SARTORATO et al., 2000) e BAT 332 (CAIXETA et al., 2003).

#### 3.4.1. Análise de co-segregação dos marcadores SCAR e genes de resistência

##### 3.4.1.1. Marcadores SCAR associados em acoplamento aos genes de resistência

Os fragmentos amplificados pelos *primers* sAA19, sBA16, sM02, sH13, sY20, sC08, sAZ20 e sZ04 encontram-se em acoplamento e segregaram na proporção de 3:1 ( $P < 0,05$ ), nas populações  $F_2$  utilizadas (dados não apresentados). Estes fragmentos foram, então, testados para a hipótese de segregação de 9:3:3:1 com os respectivos genes de resistência. Os resultados foram apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Análise de co-segregação e distância genética (cM) entre os marcadores SCAR e os genes de resistência à mancha-angular e à antracnose

Locos testados	Progenitores		P. Esp.	P. Obs.	2	Prob. (%)	cM
	R	S					
<b>Mancha-angular</b>							
sAA19 <sub>650</sub> / <i>Phg-ON</i>	ON	TO	9:3:3:1	63:5:4:53	292,75	0,00	10,1
sBA16/ <i>Phg-ON</i>	ON	TO	9:3:3:1	64:4:3:54	307,57	0,00	7,1
sM02/ <i>Phg-ON</i>	ON	TO	9:3:3:1	65:2:3:55	322,84	0,00	5,3
sH13/ <i>Phg-1</i>	AND277	Vermelho	9:3:3:1	148:4:7:38	119,71	0,00	5,6
<b>Antracnose</b>							
sY20/ <i>Co-4</i>	TO	Rudá	9:3:3:1	115:3:0:44	177,56	0,00	1,2
sC08/ <i>Co-4</i>	TO	ON	9:3:3:1	69:5:4:47	227,21	0,00	7,8
sAZ20/ <i>Co-6</i>	AB136	Rudá	9:3:3:1	176:13:2:48	149,57	0,00	7,1
sZ04/ <i>Co-6</i>	AB136	Michelite	9:3:3:1	63:0:1:17	63,23	0,00	2,9

R – cultivar resistente; S – cultivar suscetível; P.Esp. – proporção esperada; P.Obs. - proporção observada; Prob. – probabilidade.

No Quadro 6, observa-se que, em todos os casos, a probabilidade de segregação independente entre os locos testados foi 0,00 %. Portanto, pode-se inferir que os marcadores se encontram ligados aos respectivos genes de resistência.

Análises de ligação anteriores mostraram que os marcadores OPAA19<sub>400</sub>, OPBA16<sub>669</sub>, OPM02<sub>425</sub> e OPH13<sub>490</sub> encontram-se ligados e acoplados a 10,0; 10,4; 5,6 e 5,5 cM dos respectivos genes de resistência (CARVALHO et al., 1998; CORRÊA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003). Os marcadores sAA19, sBA16, sM02 e sH13 foram mapeados em acoplamento a 10,1, 7,1, 5,3 e 5,6 cM dos genes de resistência (Quadro 6). A diferença encontrada, nos valores da distância genética, após o mapeamento de alguns *primers* SCAR, pode ser explicada pelas populações utilizadas no presente trabalho. Estes *primers* foram avaliados em populações diferentes das utilizadas na validação dos marcadores RAPD que os originaram. Estas diferenças são esperadas uma vez que a determinação da distância genética entre marcador/gene de resistência, é feita a partir do número de indivíduos recombinantes. SARTORATO et al. (1999) mapearam o marcador OPN02<sub>890</sub> em acoplamento a 5,9 cM do gene *Phg-2*. Este marcador foi convertido em SCAR e também foi mapeado a 5,9 cM do gene de resistência (SARTORATO et al., 2000). Neste caso, os autores utilizaram a mesma população segregante na validação dos marcadores RAPD e SCAR. HALEY et al. (1993) mapearam o marcador OPF10<sub>970</sub> a 2,1 cM do bloco gênico, que confere resistência à ferrugem em cultivares Mesoamericanos. CORRÊA et al. (2000) converteram este

marcador em SCAR e validaram-no em uma população segregante diferente. O marcador SCAR foi mapeado a 6,0 cM do loco de resistência à ferrugem.

### 3.4.1.2. Marcador SCAR associado em repulsão ao gene de resistência *Ur-11*

No presente trabalho, utilizou-se o marcador OPAE19<sub>890</sub> que se encontra ligado em repulsão ao gene de resistência à ferrugem *Ur-11*, presente no cultivar Belmidak RR-3 (JOHNSON et al., 1995; ALZATE-MARIN et al., 2004). As amostras de DNA de indivíduos de uma população F<sub>2</sub>, originadas do cruzamento entre os cultivares Belmidak RR-3 (resistente) e Rudá (suscetível), foram amplificadas com os *primers* OPAE19<sub>890</sub> e sAE19<sub>890</sub> (dados não apresentados). Como os fragmentos OPAE19<sub>890</sub> e sAE19<sub>890</sub> encontram-se ligados em repulsão, a avaliação fenotípica correta de cada planta F<sub>2</sub> é fundamental à determinação da distância genética. Essa confirmação foi obtida por meio da análise de famílias F<sub>2:3</sub>. Para tal, as famílias F<sub>2:3</sub> correspondentes também foram avaliadas para resistência/suscetibilidade ao patótipo 10 de *U. appendiculatus* (FALEIRO et al., 1999). Utilizando esta análise, foi possível determinar o genótipo correto de cada planta F<sub>2</sub> (Quadro 7). As plantas que apresentavam o marcador foram divididas em suscetíveis (rr) e resistentes (Rr) e aquelas plantas sem o marcador foram consideradas resistentes (RR).

ALZATE-MARIN et al. (2004) utilizaram 53 plantas F<sub>2</sub>, originadas do cruzamento entre os cultivares Belmidak RR-3 (resistente) e Rudá (suscetível), para avaliar a segregação do marcador OPAE19<sub>890</sub>. Os autores demonstraram que o marcador encontra-se ligado em repulsão a 1,0 cM do gene de resistência à ferrugem *Ur-11*. No presente trabalho, a análise de segregação foi realizada na mesma população e o marcador SCAR sAE19<sub>890</sub> também foi mapeado em repulsão a 1,0 cM do gene de resistência *Ur-11* (Quadro 7).

Quadro 7. Segregação para resistência e análise de ligação entre os marcadores OPAE19<sub>890</sub>, sAE19<sub>890</sub> e o gene de resistência *Ur-11* em população segregante F<sub>2</sub>, derivada do cruzamento entre os cultivares Rudá e Belmidak RR-3

Locos testados	Geração	Proporção esperada	Proporção observada	$\chi^2$	Prob. (%)	cM
<i>Ur-11</i>	F <sub>2:3</sub>	1:2:1	12RR:28Rr:13rr	0,578	74,87	-
OPAE19 <sub>890</sub>	F <sub>2</sub>	3:1	13(-):40(+)	0,188	99,06	1,0
sAE19 <sub>890</sub>	F <sub>2</sub>	3:1	13(-):40(+)	0,188	99,06	1,0

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Atualmente, a principal técnica de análise genética utilizada no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro BIOAGRO/UFV envolve marcadores RAPD. Tais marcadores têm sido, extremamente, úteis para selecionar genótipos com genes de resistência a vários patógenos. Entretanto, os marcadores RAPD apresentam natureza dominante e podem não apresentar reprodutibilidade de resultados. Para contornar tais problemas, a estratégia utilizada por vários pesquisadores tem sido a conversão dos marcadores RAPD em marcadores SCAR. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e validar *primers* SCAR para as principais doenças, que atacam a cultura do feijão no Brasil: antracnose, ferrugem e mancha-angular. Foram desenvolvidos 5 *primers* SCAR para mancha-angular, 5 *primers* para ferrugem e 7 *primers* para antracnose. Os *primers* desenvolvidos para mancha-angular derivaram dos marcadores OPM02<sub>425</sub>, OPBA16<sub>669</sub>, OPH13<sub>490</sub> e OPH14+AA19<sub>400</sub>; são eles: sM02, sBA16, sH13, sAA19<sub>330</sub> e sAA19<sub>650</sub>. Os *primers* sM02, sBA16, sH13 e sAA19<sub>650</sub> foram mapeados em acoplamento a 5,3, 7,1, 5,6 e 10,1 cM dos respectivos genes de resistência. Os *primers* desenvolvidos para ferrugem tiveram origem nos marcadores OPAE19<sub>890</sub>, OPX11<sub>550</sub>, OPAJ18+AH10<sub>700</sub>; são eles: sAE19, sX11, sAJ18<sub>405</sub>, sAJ18<sub>472</sub> e sAJ18<sub>700</sub>. Apenas o *primer* sAE19 foi validado. Este foi mapeado em repulsão a 1,0 cM do gene de resistência *Ur-11*. Os *primers* desenvolvidos para antracnose foram obtidos, a partir da seqüência dos fragmentos OPAZ20<sub>940</sub>, OPY20<sub>830</sub>, OPC08<sub>900</sub>, OPZ04<sub>560</sub>, OPB03<sub>1800</sub>, OPZ09<sub>950</sub>, OPH18<sub>830</sub>, são eles: sAZ20, sY20, sC08, sZ04, sB03, sZ09 e sH18. Os *primers* sAZ20, sY20, sC08, sZ04 foram mapeados em acoplamento a 7,1, 1,2, 7,8 e 2,9

cM dos respectivos genes de resistência. Os marcadores SCAR, desenvolvidos no presente trabalho, já estão sendo utilizados no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro BIOAGRO/UFV. Esses marcadores têm sido utilizados em associação com dados de avaliação fenotípica, para aumentar a eficiência de seleção em programas de melhoramento.

Os *primers* SCAR, que se mostraram monomórficos, poderão ser úteis futuramente, caso sejam validados em cruzamentos envolvendo outros cultivares.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, 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. **Phytopathology**, 89:281-285, 1999.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB136, TO and G2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999a.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., SOUZA, K.A., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Estratégias de separação e identificação dos genes *Co-4*<sup>2</sup> e *Co-5* envolvidos na resistência às raças 73 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* no cultivar G2333. **Resumos da VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, 48-50, 1999b.
- ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O, RAGAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, 152:60-64, 2004.
- ARRUDA, M.C.C., ALZATE-MARIN, A.L., CHAGAS, J.M., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopatology**, 90:758-761, 2000.
- AUSUBEL, F. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Tenton Data Systems, 1998.
- AWALE, H.E., KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to *Co-42* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:119-120, 2001.

- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134: 297-303. 2003.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligada ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23:482-485, 1998.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. Viçosa: UFV, 1999. 116 p. (Tese - Doutorado).
- CORRÊA, R.X., COSTA, M.R., GOODGOD, 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**, 40:804-807, 2000.
- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., OLIVEIRA, M.L.P., NIETSCHE, S., MOREIRA, M.A., BARROS E.G. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 26:27-32, 2001.
- COSTA, M.R. **Introgessão de Genes de Resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha-angular no Cultivar de Feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV, 2004. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- DAVISON, A.D., VAUGHAN, E.K. Effect of uredospore concentration on determination of races of *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*. **Phytopathology**, 54: 336-338, 1964.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JR., T.J., MOREIRA, E.G., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 24: 166-169, 1999.
- 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**, 23: 399-402, 2000.
- FALEIRO, F.G., NIETSCHE, S., RAGAGNIN, V.A., BORÉM, A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha-angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, 26: 86-89, 2001.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G.

- Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHÉ, S., PAULA JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, 40: 1130-1133. 2000.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 659-664, 1995.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenetic**, 12:172-175, 1944.
- LINDGREN, D.T., ESCRIDGE, K.M., STEADMAN, J.R., SCHAAF, D.M. A model for dry bean yield loss due to rust. **Hort Technology**, 5: 35-37. 1995.
- NIETSCHÉ, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa:UFV, 1997. 47p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., ROCHA, R.C., PAULA, T.J., DE BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, 148:117-121, 2000.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.
- PARK, S.O., CROSBY, K.M., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. Development of a SCAR marker linked to the *Ur-6* gene for specific rust resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:189-190, 2003.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali: CIAT, 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19: 15-22, 1995.

- PIO-RIBEIRO, G., CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, 19: 95-118, 1975.
- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19: 167-172, 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.03, p.08B.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 74:5463-5467, 1977.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42: 21-22, 1999.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G. and MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, 25: 637-642. 2000.
- SCHWARTZ, H.F., CORREA-VICTORIA, F., PINEDA, P.A., OTOYA, M., KATHERMAN, M.J. Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, 65:494-496, 1981.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas no feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231p.
- VIEIRA, C, BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV. 1999. p 273-349.
- VELEZ-MARTINEZ, H., LOPEZ-ROSA, J., FREYTAG, G.F. Determination of yield loss caused by rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Puerto Rico. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 32:134-135, 1989.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 24:7213-7218, 1990.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix pairwise combination of primers. **Nucleic Acids Research**, 19:5275-5279, 1991.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RIFALSKI, J.A., TINGEY, S.V.  
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.  
**Nucleic Acids Research**, 22:6531-6535, 1990.

YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose  
resistance in common bean. **Journal of American Society of Horticultural  
Science**, 121:37-41, 1996.

## **CAPÍTULO 2**

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS ENRIQUECIDAS,  
SELEÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO MICROSSATÉLITES,  
DESENHO E TESTE DE *PRIMERS* SSR EM FEIJOEIRO-COMUM**

## 1. INTRODUÇÃO

Uma porção do genoma de organismos eucarióticos é composta de seqüências de DNA repetitivo. Estas seqüências diferem em número e composição de nucleotídeos, sendo encontradas agrupadas ou dispersas ao longo do genoma, formando sítios altamente polimórficos. Esta porção do genoma pode ser dividida em diferentes classes, baseando-se no tamanho das repetições e no número de vezes que essas repetições ocorrem. Uma dessas classes apresenta seqüências simples repetidas, sendo denominada SSR ou microssatélites (LITT & LUTY, 1989).

Nos microssatélites, um único nucleotídeo ou um pequeno número de nucleotídeos é repetido várias vezes. Normalmente, o número de nucleotídeos de cada repetição é menor que 6 (RONGWEN et al., 1995). Segundo HEARNE et al. (1992), as repetições podem ser constituídas por grupos perfeitos, compostos ou imperfeitos de nucleotídeos. O agrupamento de repetições adjacentes apresenta comprimento, que varia entre 15 e 50 pb (PETES et al., 1997). O tipo de microssatélite pode variar entre os diferentes organismos eucarióticos. Em vários mamíferos, o tipo mais abundante de microssatélite é  $(AC)_n$  (BECKMANN & WEBER, 1992). Por outro lado, o microssatélite mais comum em muitas espécies de plantas é  $(AT)_n$  ou  $(AG)_n$  (LAGERCRANTZ et al., 1993; WANG et al., 1994). Em média, um microssatélite foi observado, a cada 64 kb, para monocotiledôneas e a cada 21 kb para dicotiledôneas (MAUGHAN et al., 1995).

A constatação da existência de microssatélites em diferentes espécies de plantas sugeriu o potencial uso dos mesmos como marcadores. As seqüências, que flanqueiam

os microssatélites, são conservadas entre os genótipos de uma mesma espécie, possibilitando que *primers* específicos sejam desenhados para estas regiões (YU et al., 1999; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002). Estes *primers* podem ser utilizados, para amplificar fragmentos a partir do DNA de diferentes indivíduos. Uma vez que o número de microssatélites pode variar entre os genótipos de uma mesma espécie, cada segmento amplificado com diferente tamanho representa um alelo do mesmo loco. Por esta razão, os microssatélites originam locos genéticos, altamente, polimórficos (ROIZÉS, 2000). Os microssatélites são muito freqüentes, multialélicos e encontram-se distribuídos ao acaso no genoma (HANCOCK, 1996; TÓTH et al., 2000). Esta classe de marcadores apresenta natureza co-dominante, o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo entre as diferentes classes e não apresentam os problemas de reprodutibilidade dos marcadores RAPD (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Em função destas características, os microssatélites representam uma das classes de marcadores de maior interesse em programas de melhoramento. Eles podem ser utilizados para os mais diferentes propósitos: identificação de genótipo, avaliação de germoplasma, mapeamento comparativo, análise filogenética e, principalmente, mapeamento genético (CÔRREA, 1999; SILVA et al., 2003; BLAIR et al., 2003).

Embora os marcadores microssatélites apresentem várias características favoráveis, as técnicas de RAPD e SCAR ainda são as mais utilizadas no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (RAGAGNIN et al., 2003; COSTA, 2004). Isto ocorre devido ao número limitado de *primers* microssatélites, desenvolvidos para essa cultura (YU et al., 1999; CAIXETA et al., 2003; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002; BLAIR et al., 2003). Portanto, o presente trabalho objetivou: a construção de bibliotecas enriquecidas, o seqüenciamento de clones positivos, a seleção de fragmentos de DNA contendo microssatélites, o desenho e o teste de *primers* SSR em feijoeiro-comum.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

O cultivar TO foi utilizado para construção das bibliotecas enriquecidas com fragmentos contendo microssatélites. Este cultivar teve origem no cruzamento de “Tanderette” (suscetível à antracnose) com a linhagem mexicana Acapulco (resistente à antracnose) e possui o gene dominante *Co-4* (FOUILLOUX, 1976).

### 2.2. Construção das bibliotecas enriquecidas

O procedimento para construção das bibliotecas utilizando fragmentos de DNA, contendo diferentes microssatélites, encontra-se representada na Figura 1 e descrita a seguir.

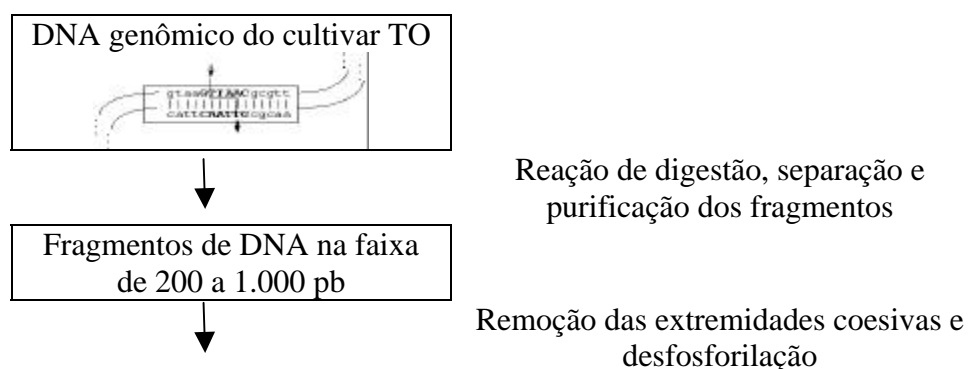


Figura 1. Procedimento para construção de bibliotecas enriquecidas com fragmentos de DNA, contendo diferentes microssatélites. Adaptado de HAMILTON et al. (1999).

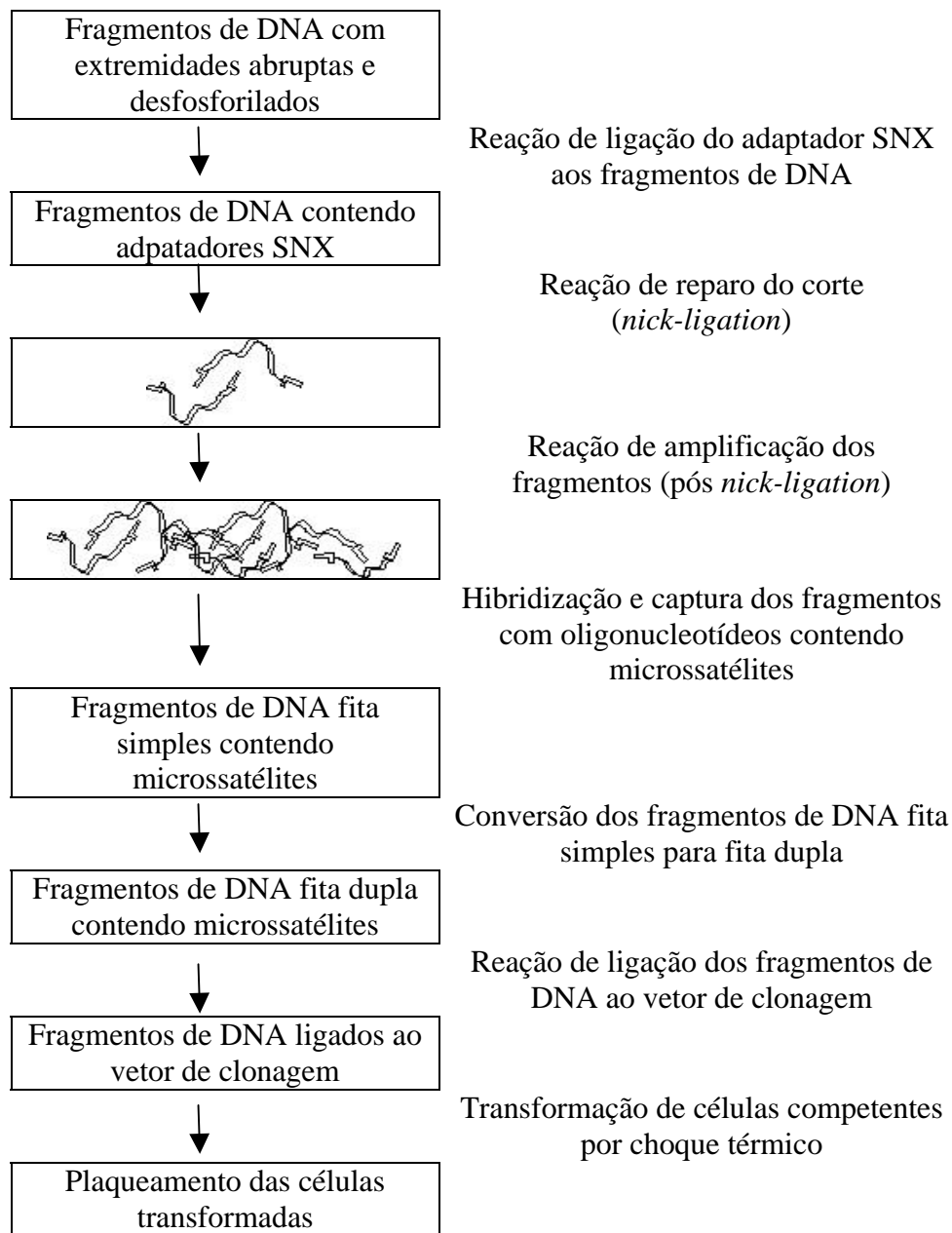


Figura 1, Cont.

### 2.2.1. Extração de DNA

Cerca de 6 g de folhas de plantas do cultivar TO foram trituradas na presença de nitrogênio líquido. O pó resultante foi transferido para tubos de polipropileno. Em cada tubo, foram adicionados 25 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; NaCl 1,4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)).

O processo de extração foi continuado, conforme descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

### **2.2.2. Escolha das enzimas de restrição**

Conforme sugerido por HAMILTON et al. (1999), foram realizados testes de digestão do DNA genômico com diferentes enzimas de restrição. As enzimas *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *EcoRI*, *NheI* e *XmnI* foram testadas, individualmente, e em combinação. Exceto a *Taq* DNA polimerase, todas as enzimas utilizadas neste trabalho foram adquiridas do New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA).

### **2.2.3. Digestão do DNA genômico, separação e purificação dos fragmentos**

O DNA do cultivar TO foi digerido com as enzimas *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *EcoRI* e *NheI*. A mistura da reação de restrição (200  $\mu$ L) continha 50 U de cada enzima, tampão NEB 2 1X, 100  $\mu$ g/mL de BSA (albumina sérico bovina), 50  $\mu$ g de DNA genômico (~330 ng/ $\mu$ L) e água deionizada. O conteúdo da reação foi mantido a 37 °C por 14 horas. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel preparativo de agarose 2% em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM) por 3 horas a 90 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados com o kit Gel Extraction (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Uma vez que a capacidade máxima de retenção da matriz de cada coluna (QIAquick spin column) é de 10  $\mu$ g de DNA, foram utilizadas 5 colunas para purificação dos fragmentos de DNA a partir do gel. Os fragmentos de DNA foram eluídos, de cada coluna, com 50  $\mu$ L de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). A eficiência da reação de digestão foi confirmada por análise eletroforética de uma alíquota de 3  $\mu$ L de amostra, em gel de agarose (1,2%).

### **2.2.4. Remoção das extremidades coesivas e desfosforilação dos fragmentos**

A reação para remover as extremidades coesivas foi realizada com 240  $\mu$ L dos fragmentos de DNA da reação de restrição, 15 U da enzima MBN (*Mung Bean Nuclease*), tampão MBN 1X e água deionizada para completar 270  $\mu$ L. Os reagentes foram transferidos para um microtubo, que foi mantido a 30 °C por 40 minutos. Os

fragmentos de DNA com extremidades abruptas foram purificados com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Para purificação dos fragmentos, foram utilizadas 2 colunas (QIAquick spin column). Os fragmentos de DNA foram eluídos, adicionando-se 50 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) a cada coluna.

A reação de desfosforilação foi realizada com 100 µL dos fragmentos de DNA com extremidades abruptas, 30 U da enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*), tampão NEB 3 1X e água deionizada para completar 120 µL. A mistura de reação permaneceu, por 4 horas, a 37 °C. Os fragmentos de DNA desfosforilados foram purificados com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. A purificação dos fragmentos foi efetuada, utilizando-se 2 colunas (QIAquick spin column). A eluição dos fragmentos a partir de cada coluna foi realizada com 30 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

#### **2.2.5. Ligação do adaptador universal SNX aos fragmentos de DNA**

A reação de ligação do adaptador aos fragmentos de DNA foi realizada com 10 µL dos fragmentos desfosforilados, adaptador SNX fita dupla 1,7 µM, tampão NEB 2 1X, ATP 1 mM, 100 µg/mL de BSA (albumina sérico bovina), 20 U da enzima *XmnI* e 15 unidades Weiss de T<sub>4</sub> DNA ligase. A mistura de ligação foi transferida para um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 19 ciclos a 16 °C por 30 minutos e 37 °C por 10 minutos. Uma etapa final a 65 °C por 20 minutos foi realizada, para inativar as enzimas *XmnI* e T<sub>4</sub> DNA ligase. O conteúdo da reação permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, foi armazenado a – 20 °C.

#### **2.2.6. Confirmação da eficiência da reação de ligação**

A eficiência da reação de ligação foi confirmada por PCR, utilizando o oligonucleotídeo SNX<sub>forward</sub> (SNX<sub>f</sub>) como *primer*. A reação de amplificação foi feita com 1 µL da mistura de ligação, tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1,5 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk,

CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. A eficiência da reação de ligação foi confirmada por eletroforese dos produtos da reação em minigel de agarose (1,2%). A eletroforese foi realizada a 90 volts por 1 hora.

### **2.2.7. Reação de *nick-ligation***

O conteúdo da reação de ligação foi dividido em alíquotas de 3µL. Para cada alíquota, foi realizada a reação de *nick-ligation* com tampão *Taq* DNA polimerase 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 25 µg/mL de BSA (albumina sérico bovina), 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA). As reações foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 72 °C por 30 minutos. O conteúdo de todas as reações foi reunido e purificado com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os produtos da reação de *nick-ligation* foram eluídos, a partir da coluna com 30 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

### **2.2.8. Reação pós *nick-ligation***

O conteúdo da reação de *nick-ligation* foi dividido em alíquotas de 10µL. Para cada alíquota, foi realizada a reação pós *nick-ligation* com tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 2 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da reação pós *nick-ligation* foram, diretamente, utilizados na etapa de hibridização seletiva sem nenhum processo de purificação.

### **2.2.9. Hibridização dos fragmentos pós *nick-ligation* com oligonucleotídeos contendo microssatélites**

Nesta etapa, foram utilizados 2 pmols de cada um dos seguintes oligonucleotídeos biotinizados: (AT)<sub>15</sub>, (TC)<sub>15</sub>, (CCA)<sub>10</sub>, (CTT)<sub>10</sub> e (GGC)<sub>10</sub>. Os oligonucleotídeos foram utilizados, separadamente, no processo de hibridização dos fragmentos de DNA. Cada oligonucleotídeo foi transferido para um microtubo, contendo 17 µL dos produtos da reação pós *nick-ligation*, 50 µL da solução de hibridização (SSC 12 X; SDS 0,1%) e 31 µL de água deionizada. A mistura foi aquecida a 95 °C por 15 minutos. Em seguida, cada microtubo foi incubado a uma temperatura específica, durante 14 horas. O microtubo contendo o oligonucleotídeo com as repetições AT foi incubado a 45 °C e os microtubos, contendo os demais oligonucleotídeos, a 65 °C.

### **2.2.10. Preparação das partículas magnéticas**

A solução contendo as partículas Dynabeads M-270<sup>®</sup> (DynaLabs, Lake Success, NY, EUA) foi cuidadosamente agitada, a fim de obter uma suspensão homogênea. O volume de 20 µL da solução contendo as partículas (50 µg/µL) foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. O microtubo foi mantido próximo a um magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi removido. Ao mesmo microtubo, foram adicionados 30 µL do tampão de lavagem (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; NaCl 1 M). Em seguida, o microtubo foi afastado do magneto e as partículas foram cuidadosamente ressuspensas. O microtubo foi novamente aproximado do magneto e, após 2 minutos, o tampão de lavagem foi novamente removido. Este procedimento de lavagem das partículas foi repetido por 3 vezes. As partículas ressuspensas foram divididas em alíquotas de 6 µL antes da última etapa de remoção do sobrenadante. Essas alíquotas foram transferidas para 5 microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram aproximados do magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante foi removido. A quantidade de partícula magnética coberta com estreptoavidina transferida para cada microtubo foi de 200 µg.

### **2.2.11. Captura dos fragmentos de DNA hibridizados**

O volume de 100 µL dos fragmentos de DNA hibridizados com os oligonucleotídeos biotinizados foi transferido para cada microtubo, contendo as partículas magnéticas. Os microtubos foram incubados a 37 °C por 4 horas, sendo cuidadosamente agitados a cada 20 minutos. Em seguida, os microtubos foram aproximados de um magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi descartado. Inicialmente, o conteúdo de todos os microtubos foi lavado com 200 µL de SSC 2X e SDS 0,1%, em temperatura ambiente. Posteriormente, as partículas presentes no tubo contendo as repetições AT foram lavadas a 45 °C com 200 µL de SSC 1X e SDS 0,1%. As partículas dos tubos, contendo as demais repetições, também foram lavadas com 200 µL de SSC 1X e SDS 0,1%. Entretanto, as etapas de lavagem foram realizadas à temperatura de 60 °C. Todos os processos de lavagem foram realizados por 2 vezes, durante 5 minutos. No final de cada etapa de lavagem, o microtubo foi aproximado do magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi removido. Após a remoção do sobrenadante da última etapa, foram adicionados 100µL de tampão TE<sub>0,1</sub> (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM) pré-aquecido em todos os microtubos. Os microtubos contendo os fragmentos de interesse e o tampão TE<sub>0,1</sub> foram acoplados ao magneto. O magneto e os microtubos foram imersos em uma caixa de isopor, contendo água na temperatura de 95 °C. Após 10 minutos, cada sobrenadante foi transferido para um microtubo e armazenado a – 20 °C.

### **2.2.12. Síntese de fragmentos de DNA fita dupla**

Os oligonucleotídeos contendo microssatélites capturaram, por hibridização, fragmentos de DNA fita simples enriquecidos com microssatélites. A reação de conversão dos fragmentos de DNA fita simples em fita dupla continha 15,0 µL dos fragmentos capturados, tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP) e água deionizada para completar 50µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos.

A eficiência da reação de amplificação foi confirmada por meio de análise eletroforética de uma alíquota de 12 µL de amostra em minigel de agarose (1,2%). Os fragmentos de DNA fita dupla foram purificados com o kit PCR purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. A concentração dos fragmentos de DNA foi estimada, utilizando-se um fluorômetro.

#### **2.2.13. Preparação dos fragmentos de DNA e do plasmídeo**

A quantidade de 400 ng dos fragmentos de DNA foi tratada com 1 U de *NheI* em tampão NEB 2 1X. Os fragmentos de DNA enriquecidos com os diferentes tipos de microssatélites foram digeridos, separadamente, por 14 horas a 37 °C. A reação de digestão de 3 µg do plasmídeo pBluescript SK (+) foi realizada com 6 U de *XbaI* em tampão NEB 2 1X. A mistura de reação também permaneceu, por 14 horas, a 37 °C. O conteúdo de todas as reações foi purificado com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, o plasmídeo foi desfosforilado com 10 U da enzima CIP em tampão NEB 3 1X a 37 °C, por 10 horas. Após a reação, o plasmídeo foi purificado, conforme descrito anteriormente. O plasmídeo desfosforilado foi ressuspendido em tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) na concentração de 100 ng/µL. A eficiência da reação de digestão do plasmídeo foi confirmada por meio de análise eletroforética de uma alíquota de 3 µL de amostra em minigel de agarose (1,2%).

#### **2.2.14. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor e transformação de células competentes**

A reação de ligação foi realizada com 15 µL dos fragmentos de DNA digeridos (~ 200 ng), tampão NEB 2 1X, ATP 0,8 mM, 100 µg/mL de BSA (albumina sérico bovina), 150 ng do plasmídeo pBluescript SK (+) digerido e desfosforilado, 7 U de *NheI* e 6 unidades Weiss de T<sub>4</sub> DNA ligase. A reação de ligação foi realizada em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 19 ciclos a 16 °C, por 30 minutos, e 37 °C por 10 minutos. Uma etapa final a 65 °C por 20 minutos foi realizada, para inativar as enzimas *Xmn I* e T<sub>4</sub> DNA ligase. O conteúdo da reação permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, foi utilizado para transformação de células competentes da cepa DH5 de *Escherichia*

*coli*. A transformação foi realizada por meio de choque térmico, de acordo com protocolo-padrão descrito por AUSUBEL (1998).

### **2.3. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos *primers* microssatélite**

Após a transformação por choque térmico, foi feita a seleção e o diagnóstico de colônias brancas, utilizando-se a técnica de PCR e os *primers* T3 e T7. O DNA plasmidial das colônias de interesse foi extraído, quantificado e seqüenciado pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977). A determinação da seqüência dos fragmentos de DNA foi realizada com auxílio do seqüenciador automático ABI Prism 377 (PE Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos fragmentos foram analisadas, utilizando-se os programas SeqMan 3.57 (DNASTAR, Madison, WI, EUA) e SSRIT (<http://www.gramene.org/>). Os *primers* microssatélites foram desenhados com auxílio dos programas Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Os *primers* foram sintetizados pela IMPRINT GENETIX (São Paulo, SP, Brasil).

### **2.4. Determinação das condições de amplificação dos *primers* microssatélite**

As condições de amplificação dos *primers* microssatélite foram testadas em amostras de DNA de cultivares utilizados no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Os cultivares utilizados foram: TO, Ouro Negro e Rudá. As reações de amplificação foram feitas em volume de 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 120 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer forward* 0,2 µM, *primer reverse* 0,2 µM, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), utilizando o procedimento de *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu de uma etapa a 94 °C por 4 minutos, seguida de 18 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 65 a 48 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos. Terminados os 18 ciclos, procedeu-se com 22 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 48 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos. Após os 22 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72

°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM). Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

## 2.5. Teste de amplificação dos *primers* microssatélite em cultivares geneticamente divergentes

Os *primers* microssatélite, que originaram produtos de amplificação, foram utilizados para amplificar amostras de DNA de diferentes cultivares andinos e mesoamericanos (Quadro 1). Essas reações foram realizadas, a fim de verificar o índice de heterozigosidade e o número de alelos amplificados para cada loco microssatélite.

Quadro 1. Genótipos andinos e mesoamericanos utilizados para teste dos *primers* microssatélite

Cultivar	Centro de Origem <sup>a</sup>	Cultivar	Centro de Origem	Cultivar	Centro de Origem
AND 277	A	Perry Marrow	A	Pérola	MA
Antioquia 8	A	Pompadour	A	Pinto Villa	MA
Brown B	A	Bambuí	MA	Porriho sintético	MA
Cal 143	A	Bat 332	MA	Rio Tibagi	MA
Diacol Calimã	A	Cornell	MA	Sel 1308	MA
Jalo EEP	A	Emgopa Ouro	MA	Rudá	MA
Kaboon	A	Equador 299	MA	Bat 93	MA
Manteigão Fosco	A	Ica Pijão	MA	Nunãs	A
MDRK	A	Jamapa	MA		
Mineiro Precoce	A	Ouro Negro	MA		

<sup>a</sup> A – Andino; MA – Mesoamericano.

As reações de amplificação foram realizadas, conforme descrito no item 2.4. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel desnaturante, contendo poliacrilamida 7%, formamida 36% e uréia 5,6M em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM). A eletroforese foi efetuada por 4 horas a 40 watts. Terminada a eletroforese, o gel foi transferido para uma solução contendo brometo de etídio 0,2

µg/mL. Após 30 minutos, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

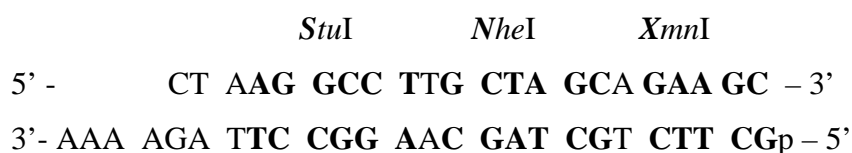
## **2.6. Nomenclatura dos *primers* microssatélite**

A denominação dos *primers* microssatélite foi derivada da unidade repetitiva, precedida pelas letras FC para feijoeiro-comum. As designações F para *forward* e R para *reverse* foram utilizadas, para diferenciar cada *primer* SSR. Portanto, a representação FCctc01 F refere-se ao *primer* microssatélite *forward* flanqueando repetições CTC.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Adaptador SNX

O desenho da seqüência de um adaptador é crítico porque este deve ligar-se ao DNA genômico, servir como sítio de pareamento do *primer* em reações de amplificação e conter os sítios de restrição necessários para ligação em vetores de clonagem. Normalmente, os adaptadores utilizados apresentam um desenho que possibilita, apenas, a ligação de fragmentos de DNA genômico, que foram clivados com uma enzima de restrição específica (FISCHER et al., 1998). Em algumas espécies, esta limitação permite que pequena proporção do genoma possa ser diretamente clonada, pois, poucos fragmentos de DNA serão originados na faixa de 200 a 1.000 pb. Este fato pode descartar potenciais locos de microssatélites, em fragmentos de DNA de tamanho superior a 1.000 pb e resultar em bibliotecas, que são amostras limitadas de um genoma (ARMOUR et al., 1994). Deste modo, buscando uma melhor representação do genoma do feijoeiro-comum, foi utilizado o adaptador SNX, desenvolvido por HAMILTON et al. (1999). O adaptador SNX possui a seguinte estrutura:



A seqüência terminal de quatro adenilatos polariza o adaptador de maneira que, apenas, uma de suas extremidade possa servir para ligação com o fragmento de DNA.

As condições da reação de ligação foram otimizadas por HAMILTON et al. (1999), para compensar a ineficiência da ligação entre extremidades abruptas e a tendência dos adaptadores se ligarem formando dímeros (Fig. 2).

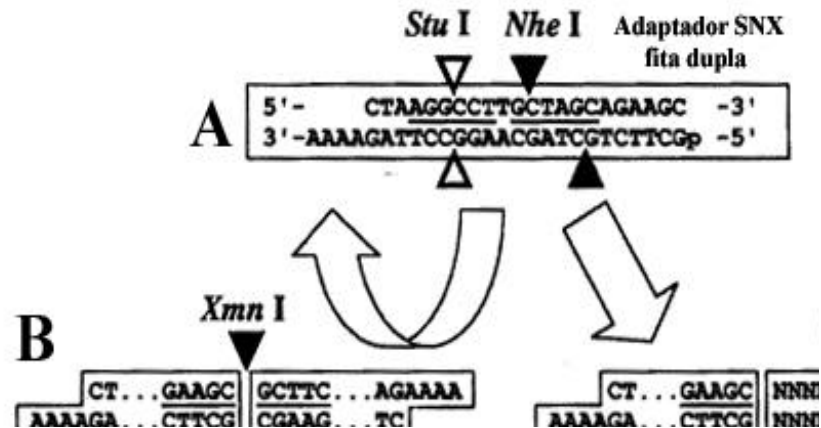


Figura 2. Adaptador SNX e suas propriedades. (A) A restrição do adaptador com as enzimas *StuI* e *NheI* origina sítios de clonagem com extremidades abruptas e coesivas, respectivamente. (B) Durante a reação de ligação, dois fragmentos do adaptador podem se ligar formando dímeros. A formação do dímero origina um sítio de restrição para a enzima *XmnI*. (C) A adição de *XmnI* na reação de ligação garante uma grande proporção de adaptadores disponíveis como monômeros para ligação de fragmentos de DNA genômico.

Uma vez que o adaptador SNX apresenta extremidades abruptas, o mesmo pode ser utilizado com qualquer enzima ou combinação de enzimas de restrição. Com o objetivo de construir bibliotecas representativas, a partir do DNA genômico do feijoeiro-comum, foram escolhidas enzimas capazes de converter todo o DNA-alvo em fragmentos na faixa de 200 a 1.000 pb.

### 3.2. Escolha das enzimas de restrição

No protocolo descrito por HAMILTON et al. (1999), a enzima *XmnI* é incorporada na mistura de ligação para clivar os dímeros formados pelo adaptador SNX (Figs. 2B e 2C). Portanto, o genoma do cultivar TO não deve apresentar, com frequência, sítios de restrição para tal enzima. Caso isto aconteça, vários fragmentos de

DNA serão clivados durante a reação de ligação. Os fragmentos originados apresentarão o adaptador em apenas uma das extremidades, o que impedirá a ligação correta destes ao vetor de clonagem.

Inicialmente, foi realizada uma reação de digestão do DNA do cultivar TO com a enzima *XmnI*. O padrão eletroforético dos fragmentos obtidos encontra-se na Figura 3A.

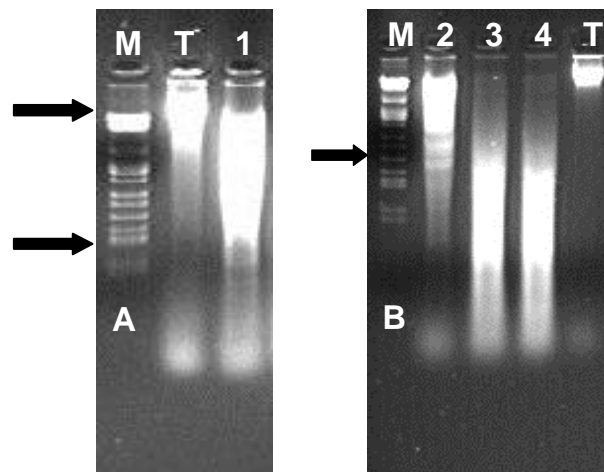


Figura 3. Padrão eletroforético em minigel de agarose 1,2% de fragmentos obtidos da digestão do DNA do cultivar TO com diferentes enzimas de restrição. (A) enzima *XmnI* (1). As setas indicam fragmentos de DNA de, aproximadamente, 15 kb e 784 pb. (B) enzima *EcoRI* (2), enzimas *HaeIII*, *AluI*, *NheI* e *EcoRI* (3), enzimas *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *NheI*, *EcoRI* (4). A seta indica fragmento de cerca de 1.120 pb. T – DNA genômico do cultivar TO. M – Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *BamHI*, *HindIII* e *EcoRI*.

O sítio de restrição da enzima *XmnI* é 5' GAA NN NN TTC 3'. Apesar de a enzima *XmnI* ser considerada de corte raro, a reação de digestão do DNA do cultivar TO com esta enzima originou vários fragmentos de restrição. Na Figura 3A, observa-se que foram originados fragmentos de DNA com tamanho entre 15 kb e 780 pb. A solução encontrada para tal problema foi incorporar a enzima *EcoRI* na mistura de digestão. A enzima *EcoRI* apresenta o sítio de restrição 5' GAA TTC 3' e por isso consegue clivar grande parte das seqüências reconhecidas pela enzima *XmnI* (Fig. 3B).

O adaptador deve ser clivado pela enzima *NheI*, antes da etapa de ligação dos fragmentos de DNA contendo microssatélites ao vetor de clonagem (HAMILTON et al., 1999). Após a restrição, os adaptadores apresentarão extremidades coesivas, o que facilita a ligação dos fragmentos ao plasmídeo. Entretanto, se os fragmentos de DNA apresentarem sítios de restrição para a enzima *NheI*, estes também serão clivados. Para contornar tal problema, esta enzima também foi incorporada na mistura de digestão. Portanto, as enzimas escolhidas para a digestão do DNA genômico foram: *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *NheI* e *EcoRI*. Por meio desta combinação de enzimas, praticamente todo o DNA genômico foi convertido em fragmentos de tamanho entre 200 e 1.000 pb (Fig. 3B).

### 3.3. Digestão do DNA genômico

Após a digestão do DNA do cultivar TO, foi realizada a eletroforese para a separação e excisão dos fragmentos de DNA de interesse. O gel de agarose utilizado para a eletroforese foi preparado com 400 mL de TBE 1X. As divisórias do pente foram unidas 6 a 6 (Fig. 4). Tal procedimento foi realizado, a fim de possibilitar a transferência de, aproximadamente, 300  $\mu$ L do conteúdo da reação de digestão para uma única canaleta do gel. Deste modo, o processo de purificação foi facilitado, pois, os fragmentos de DNA foram extraídos a partir de uma quantidade menor de gel de agarose.

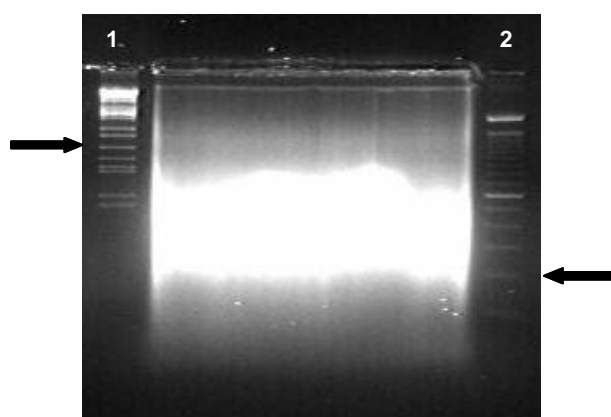


Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose preparativo da digestão de 50  $\mu$ g de DNA do cultivar TO com as enzimas *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *NheI*, *EcoRI*. (1) Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *BamHI*, *HindIII* e *EcoRI*. A seta à esquerda indica o fragmento de cerca de 1.120 pb. (2) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. A seta à direita indica o fragmento de cerca de 200 pb.

### 3.4. Remoção das extremidades coesivas, desfosforilação dos fragmentos de DNA e reação de ligação

As extremidades coesivas dos fragmentos de DNA foram removidas, no intuito de originar fragmentos abruptos para permitir a ligação do adaptador SNX. Em seguida, os fragmentos de DNA com extremidades abruptas foram desfosforilados, a fim de impedir a união entre eles durante a reação de ligação. As reações, acima descritas, foram realizadas para duas classes de fragmentos de DNA: 1) fragmentos de DNA excisados e purificados a partir do gel de agarose, após a reação de digestão; e 2) fragmentos de DNA não-purificados após a reação de digestão. A Figura 5A ilustra o padrão eletroforético dessas duas classes de fragmentos de DNA. Na canaleta 2, observa-se que os fragmentos de DNA excisados e purificados apresentaram tamanho inferior a 1.000 pb. Por outro lado, na canaleta 1, observa-se que uma parte dos fragmentos de DNA não-purificados apresentou tamanho superior a 1.000 pb. Uma vez que a clonagem e o seqüenciamento de fragmentos de DNA com tamanho superior a 1.000 pb não é recomendada, a reação de ligação foi realizada com a classe de fragmentos de DNA excisada e purificada a partir do gel. A eficiência da reação de ligação foi confirmada por PCR, utilizando-se o oligonucleotídeo SNX<sub>forward</sub> como *primer*.

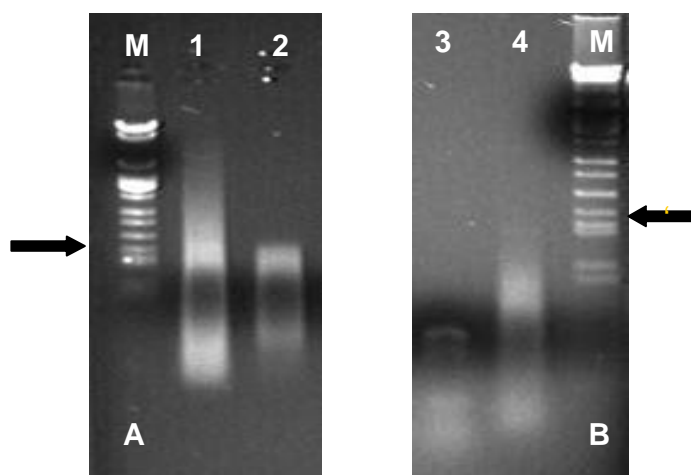


Figura 5. Padrão eletroforético de fragmentos de DNA em minigel de agarose 1,2%. (A) Fragmentos de DNA com extremidades abruptas e desfosforilados. (1) fragmentos de DNA não-purificados do gel após a reação de digestão; (2) fragmentos de DNA excisados e purificados do gel após a reação de digestão. (B) Confirmação da eficiência da reação de ligação. (3) Controle negativo; (4) produtos de amplificação da mistura de ligação. M - Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI. As setas indicam o fragmento de cerca de 947 pb.

A Figura 5B ilustra o padrão eletroforético dos produtos da reação de amplificação. Na canaleta 4, observa-se um arraste de fragmentos de DNA com tamanho inferior a 947 pb, indicando que a reação de ligação do adaptador ocorreu conforme esperado.

### 3.5. Reação de *nick-ligation*

Apenas um dos oligonucleotídeos, que compõem o adaptador SNX, é fosforilado na extremidade 3' e consegue ligar-se aos fragmentos de DNA genômico. Na Figura 6A, este oligonucleotídeo foi representado como SNX<sub>R</sub>. O outro oligonucleotídeo, SNX<sub>F</sub>, encontra-se desfosforilado. Desta forma, o adaptador SNX é capaz de ligar-se aos fragmentos de DNA por, apenas, um dos oligonucleotídeos que o compõem. Esse fato deve ser reparado, pois, caso contrário, em etapas de amplificação subseqüentes, ocorrerá a formação de vários fragmentos com adaptador em apenas uma das extremidades (Figs. 6B e 6C).

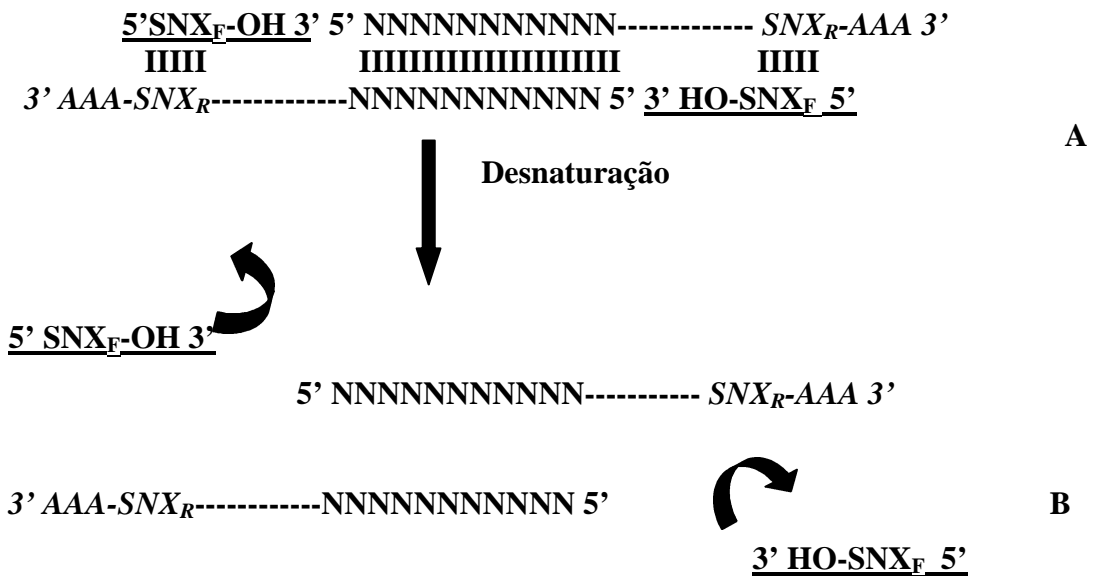


Figura 6. Representação de PCR envolvendo fragmentos de DNA com adaptador ligado a apenas uma das fitas dos fragmentos de DNA genômico. A simbologia NNNN denota um fragmento de DNA qualquer; em *itálico* – oligonucleotídeo SNX<sub>R</sub>; em sublinhado - oligonucleotídeo SNX<sub>F</sub>. (A) Oligonucleotídeo SNX<sub>R</sub> ligado a apenas uma das fitas do fragmento de DNA. (B) Após a etapa de desnaturação, o oligonucleotídeo SNX<sub>F</sub> é separado da estrutura. (C) Etapa de extensão da cadeia originando produtos de amplificação com adaptador ligado a apenas uma das extremidades dos fragmentos de DNA genômico.

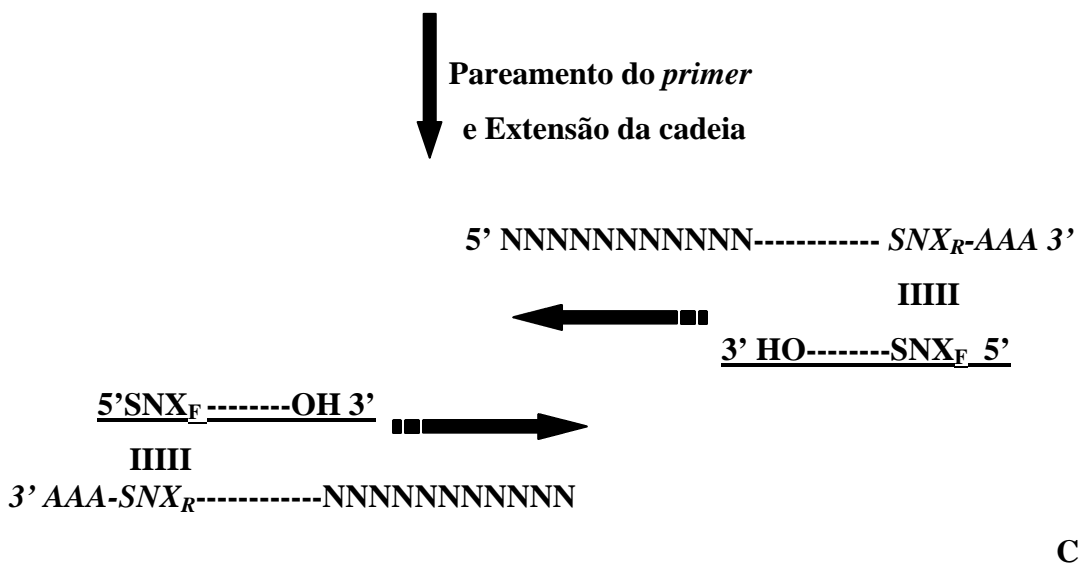


Figura 6, Cont.

A reação de *nick-ligation* foi realizada, a fim de efetuar a união do oligonucleotídeo SNX<sub>F</sub> com os fragmentos de DNA. A enzima utilizada foi a *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA) que apresenta atividade exonucleásica 5' 3'. Após a reação de *nick-ligation*, foi realizada a amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.

### 3.6. Hibridização dos fragmentos de DNA pós *nick-ligation* com oligonucleotídeos contendo microssatélites

Os produtos da reação de PCR pós *nick-ligation* foram, diretamente, utilizados na etapa de hibridização com oligonucleotídeos contendo microssatélites. O Quadro 2 apresenta os valores de temperatura de hibridização e as condições de lavagens utilizadas inicialmente.

Quadro 2. Quantidade de oligonucleotídeo biotilado, temperatura de hibridização e condições de lavagem utilizadas no processo de captura de fragmentos de DNA contendo microssatélites

Oligonucleotídeos biotilados*	Hibridização	Lavagem
AT	45 °C	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) a 25 °C 2X (SSC 1X, SDS 0,1%) a 45 °C
TC, CCA, CTT e GGC	65 °C	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) a 25 °C 2X (SSC 1X, SDS 0,1%) a 60 °C

\* - a quantidade de cada oligonucleotídeo foi 2 pmol.

Após a etapa de captura, os fragmentos de DNA foram separados dos oligonucleotídeos e convertidos para fita dupla por PCR. Uma alíquota dos produtos de amplificação foi aplicada em minigel de agarose, sendo o resultado apresentado na Figura 7. Na análise das canaletas 3 e 5, pode-se observar que os fragmentos de DNA, capturados com os oligonucleotídeos CCA e GGC, originaram fortes produtos de amplificação. Os fragmentos de DNA capturados com o oligonucleotídeo TC, praticamente, não foram amplificados (canaleta 2). Nas canaletas 1 e 4, observa-se que não ocorreu amplificação, a partir dos fragmentos de DNA capturados com os oligonucleotídeos AT e CTT.

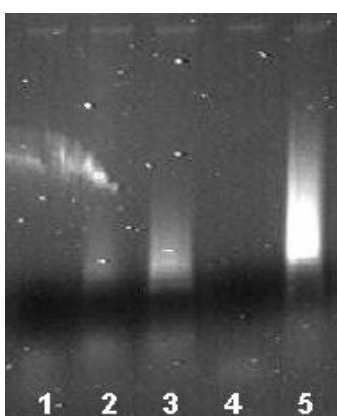


Figura 7. Padrão eletroforético de produtos de amplificação de fragmentos de DNA capturados, nas condições descritas no Quadro 2. (1) Fragmentos de DNA capturados com repetições AT; (2) Fragmentos de DNA capturados com repetições TC; (3) Fragmentos de DNA capturados com repetições CCA; (4) Fragmentos de DNA capturados com repetições CTT; (5) Fragmentos de DNA capturados com repetições GGC.

Devido aos resultados observados, o procedimento de hibridização foi repetido com os oligonucleotídeos contendo as repetições AT, TC e CTT. Os oligonucleotídeos biotinizados foram testados nas quantidades de 2, 4 e 70 pmol. A etapa de hibridização foi realizada com fragmentos amplificados e não amplificados, após a reação de *nick-ligation*. A etapa de captura dos fragmentos de DNA com o oligonucleotídeo AT foi realizada à temperatura de hibridização de 42 °C. Os oligonucleotídeos TC e CTT foram hibridizados aos fragmentos de DNA, na temperatura de 63 °C. Durante o

procedimento de captura dos fragmentos, o número de etapas de lavagem foi, também, modificado (Quadro 3).

Quadro 3 – Valores de temperatura de hibridização, quantidade de oligonucleotídeos e condições de lavagem para o processo de captura de fragmentos de DNA contendo microssatélites

Procedimento	Temperatura de hibridização	Condições de lavagem	
		Oligonucleotídeo AT	Oligonucleotídeos TC e CTT
1 <sup>a</sup> (2 pmol)	AT (42 °C) TC e	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C
	CTT (63 °C)	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 42 °C	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 60 °C
2 <sup>a</sup> (4 pmol)	AT (42 °C) TC e	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C
	CTT (63 °C)	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 42 °C	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 60 °C
3 <sup>b</sup> (70 pmol)	AT (42 °C) TC e	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C	2X (SSC 2X, SDS 0,1%) 25 °C
	CTT (63 °C)	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 42 °C	1X (SSC 1X, SDS 0,1%) 60 °C

<sup>a</sup> – procedimento realizado com fragmentos de DNA amplificados após a reação de *nick-ligation*; <sup>b</sup> - procedimento realizado com fragmentos de DNA não amplificados após a reação de *nick-ligation*.

Os fragmentos de DNA foram convertidos em fita dupla, após o procedimento de captura. Na Figura 8, observa-se que a diminuição do vigor das condições possibilitou a captura de fragmentos de DNA com os oligonucleotídeos contendo as repetições AT, TC e CTT. Observa-se, também, que a quantidade de 2 pmol é suficiente para a realização do processo de captura, pois, não existe diferença qualitativa entre os procedimentos 1 e 2.

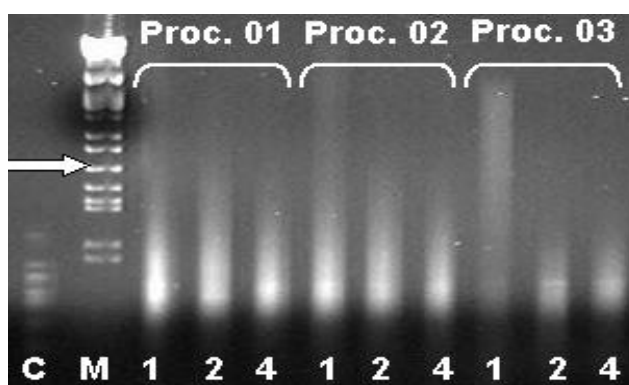


Figura 8. Padrão eletroforético de produtos de amplificação de fragmentos de DNA capturados, nas condições descritas no Quadro 3. (1) Fragmentos de DNA capturados com repetições AT; (2) Fragmentos de DNA capturados com repetições TC; (4) Fragmentos de DNA capturados com repetições CTT. C – controle negativo; M - Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI. A seta indica o fragmento de cerca de 1.120 pb.

No procedimento 3, os fragmentos de DNA não foram amplificados após a reação de *nick-ligation*. Assim, foi utilizado um excesso de oligonucleotídeo para garantir a captura do maior número possível de fragmentos de DNA. Pela análise e comparação da intensidade luminosa, entre os diferentes procedimentos, observa-se que a quantidade de fragmentos capturados no procedimento 3, foi inferior àquela obtida em 1 e 2.

### 3.7. Transformação e seleção das colônias recombinantes

Os fragmentos de DNA, utilizados na construção das bibliotecas enriquecidas, foram: 1) fragmentos capturados com os oligonucleotídeos GGC e CCA (Quadro 2); 2) fragmentos capturados com o oligonucleotídeo AT (Quadro 3, procedimento 1). Após a realização da ligação dos diferentes fragmentos no plasmídeo, foi feita a transformação das células de *Escherichia coli*. As colônias brancas foram diagnosticadas por PCR, utilizando-se os *primers* T3 e T7 (Fig. 9). O produto da amplificação do DNA do vetor pBluescript SK (+) com os *primers* T3 e T7 é um fragmento de cerca de 170 pb. Assim, apenas os fragmentos de DNA com tamanho superior a 400 pb foram selecionados.

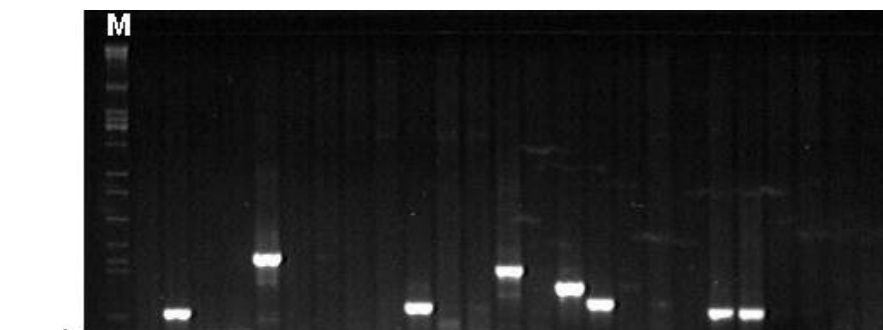


Figura 9. Padrão eletroforético de produtos de amplificação de DNA plasmidial com os *primers* T3 e T7 em gel de agarose 1,2%. M - Marcador de tamanho molecular, DNA do fago lâmbda digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI. A seta indica o fragmento de cerca de 493 pb.

### 3.8. Seqüenciamento, análise e classificação dos fragmentos de DNA contendo microssatélites

Segundo PETES et al. (1997), o comprimento do microssatélite varia, normalmente, entre 15 e 50 pb. As repetições podem ser grupos perfeitos, imperfeitos





Quadro 4. Diferentes motivos SSR obtidos na análise de seqüências de fragmentos de DNA genômico, capturados com os oligonucleotídeos AT, CCA e GGC

Colônia/*Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
AT/01	213 pb	(GGA) <sub>2</sub> (GGC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
AT/02	158 pb	(CTC) <sub>3</sub> (CAT) <sub>2</sub>	Composta	15 pb
AT/03	432 pb	(ACC) <sub>5</sub>	Perfeita	15 pb
AT/12	214 pb	(TTCG) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
AT/13	201 pb	(TTC) <sub>2</sub> (AAT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(CTTT) <sub>2</sub> (TTTT) <sub>2</sub>	Composta	18 pb
AT/14	290 pb	(CT) <sub>2</sub> (TTAT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(GGT) <sub>5</sub>	Perfeita	15 pb
AT/21	330 pb	(TA) <sub>3</sub> (CTC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
AT/26	192 pb	(CCA) <sub>6</sub>	Perfeita	18 pb
AT/28	181 pb	(TGG) <sub>5</sub>	Perfeita	15 pb
AT/53	189 pb	(ACC) <sub>5</sub>	Perfeita	15 pb
AT/57	270 pb	(CAT) <sub>3</sub> (CAC) <sub>5</sub>	Composta	24 pb
AT/58	316 pb	(TGG) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
CCA/02	402 pb	(TGA) <sub>2</sub> (TGT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/09	199 pb	(CTT) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	Composta	12 pb
CCA/12	210 pb	(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/27	251 pb	(CT) <sub>3</sub> (GCC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/34	252 pb	(GGT) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub>	Composta	12 pb
CCA/35	235 pb	(GTT) <sub>2</sub> (AC) <sub>3</sub>	Composta	12 pb
CCA/36	203 pb	(ACG) <sub>2</sub> (ACC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(CAC) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
CCA/44	210 pb	(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/46	205 pb	(TA) <sub>2</sub> (GTTT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/47	205 pb	(GT) <sub>3</sub> (AAC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
CCA/59	296 pb	(CTT) <sub>2</sub> (CTG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(TTCG) <sub>3</sub>	Perfeita	12 pb
CCA/60	288 pb	(TGGT) <sub>2</sub> n(GTG) <sub>3</sub>	Imperfeita	14 pb
GGC/01**	281 pb	(CTC) <sub>3</sub> n(CCG) <sub>4</sub>	Imperfeita	21 pb
GGC/02**	319 pb	(GGC) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/03**	227 pb	(CCG) <sub>5</sub>	Perfeita	15 pb
GGC/04**	141 pb	(CCG) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/05**	208 pb	(CTT) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/06**	252 pb	(CCA) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
		(CCT) <sub>3</sub> (CCA) <sub>3</sub>	Composta	18 pb
		e (CCT) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/07**	289 pb	(GCC) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/08**	172 pb	(GCA) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/09**	236 pb	(CTT) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/28	126 pb	(CGG) <sub>4</sub> (CGA) <sub>3</sub>	Composta	21 pb
GGC/28 A	171 pb	(AT) <sub>3</sub> (TAG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
GGC/170	260 pb	(GCATT) <sub>2</sub> (TGC) <sub>2</sub>	Composta	16 pb
GGC/179	188 pb	(CA) <sub>2</sub> (TCCC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb
		(CCG) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
GGC/198	218 pb	(CGC) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
		(CG) <sub>2</sub> (CAC) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Composta	14 pb
GGC/249	274 pb	(CGG) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb
		(CAA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub> (GC) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Composta	24 pb
GGC/260	196 pb	(GCA) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb

\* - número; \*\* - fragmentos de DNA para os quais foram desenhados e testados *primers*;

A seqüência completa de cada fragmento encontra-se no Apêndice (Seção 3); As seqüências de todos os fragmentos foram alinhadas para eliminar possíveis repetições.

Do total de 301 clones positivos identificados, 153 já foram seqüenciados. Observou-se que, do total de clones seqüenciados, 40 (26%) apresentaram fragmentos de DNA contendo microssatélite (Quadro 4). Até o presente momento, foram desenhados e testados *primers* para, apenas, 9 desses clones. Uma vez que os resultados ainda são preliminares, não é possível tirar conclusões definitivas. Por outro lado, pode-se afirmar que o nível de enriquecimento das bibliotecas, para fragmentos contendo microssatélites, foi satisfatório. GAITÁN-SOLÍS et al. (2002) construíram 3 bibliotecas enriquecidas, utilizando diferentes linhagens andinas de feijoeiro-comum. Do total de 4.682 clones positivos, identificados entre as bibliotecas, 856 foram seqüenciados. Os autores constataram que o desenho de *primers* microssatélite foi possível para 213 (25%) dos clones seqüenciados.

### 3.9. Desenho e determinação das condições de amplificação dos *primers* microssatélite

Conforme sugerido por YU et al (1999), os critérios utilizados para o desenho dos *primers* foram: A) Tamanho dos primers - inferior a 30 pb; 2)  $T_m$  - superior a 46 °C; 3) Concentração de sal - 50 mM; 4) Produtos de amplificação - entre 100 – 360 pb. Nas seqüências que apresentaram mais de um microssatélite, os *primers* foram desenhados de forma a permitir que um maior número de repetições fosse amplificado. O desenho de *primers* foi realizado para 10 seqüências de fragmentos de DNA. Foram desenhados e testados 9 pares de *primers* para fragmentos da biblioteca GGC (Quadro 4) e 1 par de *primer* para o fragmento OPAZ20<sub>940</sub>. A seqüência dos *primers* microssatélite que foram testados, os valores de  $T_m$  e o tipo de repetições que estes flanqueiam encontram-se no Quadro 5.

Quadro 5. Seqüência dos *primers* microssatélite candidatos, valores de  $T_m$ , tipo de repetição e tamanho esperado para os fragmentos amplificados

Repetição	Primer	Seqüência dos <i>primers</i> F e R (5' 3')	$T_m$ (°C)*	T.frag. (pb)**
(CTC) <sub>3</sub> n(CCG) <sub>4</sub>	FCctc001 F	AAGTTTCGCAACCACCACAT	60	272
	FCctc001 R	AGCGTTCTGCGAAAGAAAAA	60	
(GGC) <sub>4</sub>	FCggc001 F	AACTTGTCGTGTTCCGGGTTTC	60	280
	FCggc001 R	CGAATACGTTTCGCCACAA	60	
(CCG) <sub>5</sub>	FCccg001 F	CTCCGAAATCGACGCACTA	59	206
	FCccg001R	CCTTAACGGACGAAGTGACG	60	

Quadro 5, Cont.

Repetição	Primer	Seqüência dos primers F e R (5' 3')	T <sub>m</sub> (°C)*	T.frag. (pb)**
(CCG) <sub>4</sub>	FCcgc002 F	ACCCACATCCCTCCCACT	60	124
	FCcgc002R	CTCCGTGGACCCTAACAGG	60	
(CTT) <sub>4</sub>	FCctt001 F	CCAAAAGGTTTAAAACTACTGCAA	59	193
	FCctt001R	TCTGAAGTTGAAAAGCGTATGGT	60	
(CCA) <sub>4</sub> , (CCT) <sub>3</sub> (CCA) <sub>3</sub> e (CCT) <sub>4</sub>	FCcca001 F	TCCAAACCCAGACCTCCTC	60	227
	FCcca001R	TCTTTTATCATCCAGGGTTTGG	60	
(TTA) <sub>4</sub> , (AAT) <sub>2</sub> (AT) <sub>5</sub>	FCtta001 F	TGAGTTGAAAACCTCTGGAAGA	58	309
	FCtta001R	AACACAAATTTTTAAATGCATAACA	57	
(GCC) <sub>4</sub>	FCgcc001 F	AAAAATGTGGGCGGGTTG	61	268
	FCgcc001R	CCACTAGCCATTATAAATGATCCA	59	
(GCA) <sub>4</sub>	FCgca001 F	CTGCGTGCCTCTCCAC	61	150
	FCgca001R	TTTAATTTGATGGGTTTGTAGGTATG	59	
(CTT) <sub>4</sub>	FCctt002 F	GGTGTCTTCTTCGTCTTGG	60	214
	FCctt002 R	CGTCAGGCTTCTCCCTACTG	60	

\* T<sub>m</sub> – temperatura de fusão em graus Celsius; \*\* T.frag. – tamanho do fragmento amplificado em pares de base; Os primers microssatélite desenhados a partir do fragmento OPAZ20<sub>940</sub> encontram-se representados como FCtta001F e FCtta001R.

As condições de amplificação dos primers microssatélite candidatos foram, inicialmente, testadas nas amostras de DNA dos cultivares TO, Ouro Negro e Rudá. Inicialmente, os produtos de amplificação do DNA dos diferentes cultivares com os primers microssatélite foram visualizados em gel de agarose (Fig. 11). Na Figura 11A, o fragmento de DNA amplificado pelo primer FCctc001 encontra-se indicado por uma seta. Este fragmento apresenta cerca de 272 pb. Utilizando a seta como referência, observa-se que alguns produtos de amplificação apresentaram o tamanho esperado, enquanto outros não.

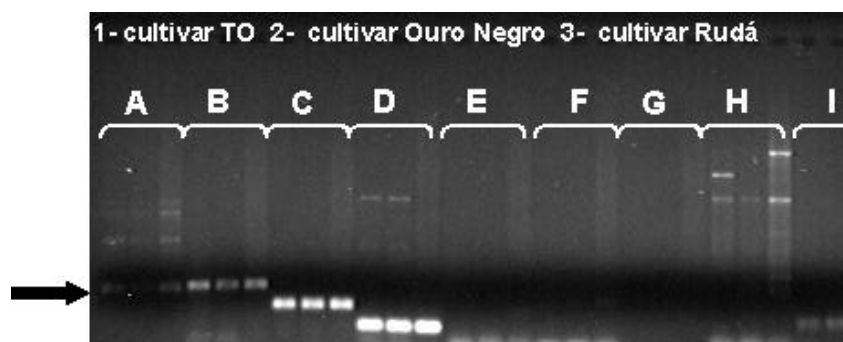


Figura 11. Padrão eletroforético em gel de agarose 1,2% de produtos de amplificação do DNA dos cultivares (1) TO, (2) Ouro Negro e (3) Rudá com os primers: (A) FCctc001; (B) FCggc001; (C) FCcgc001; (D) FCcgc002; (E) FCctt001; (F) FCcca001; (G) FCtta001; (H) FCgcc001; (I) FCgca001; e (J) FCctt002. A seta indica o fragmento de, aproximadamente, 272 pb.

Os *primers* FCggc001 (B), FCccg001 (C), FCccg002 (D) e FCgca001 (I) amplificaram, respectivamente, os fragmentos esperados de 280, 206, 124 e 150 pb. O tamanho do produto de amplificação, esperado para os *primers* FCgcc001 (H) e FCctt002 (J), era 268 e 214 pb, respectivamente. Entretanto, o tamanho dos fragmentos obtidos foi superior. Os *primers* FCctt001 (E), FCcca001 (F) e FCtta001 (G) não amplificaram nenhum fragmento, nas condições em que as reações foram realizadas.

Os *primers* que não amplificaram fragmentos (FCctt001, FCcca001 e FCtta001), ou amplificaram fragmentos de tamanho diferente do esperado (FCgcc001 e FCctt002), serão testados em outras condições de amplificação. Caso não ocorra amplificação, novos *primers* serão desenhados para as referidas seqüências. Em outra oportunidade, também serão desenhados e testados *primers* para as demais seqüências representadas no Quadro 4.

### 3.10. Teste de amplificação dos *primers* microssatélite em cultivares geneticamente divergentes

Com o objetivo de validação, os *primers* FCctc001, FCggc001, FCccg001, FCccg002 e FCgca001 foram utilizados para amplificar o DNA de cultivares divergentes. Nesta etapa, foram utilizados diferentes cultivares andinos e mesoamericanos (Materiais e Métodos, Quadro 1). Os produtos de amplificação foram visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 12.

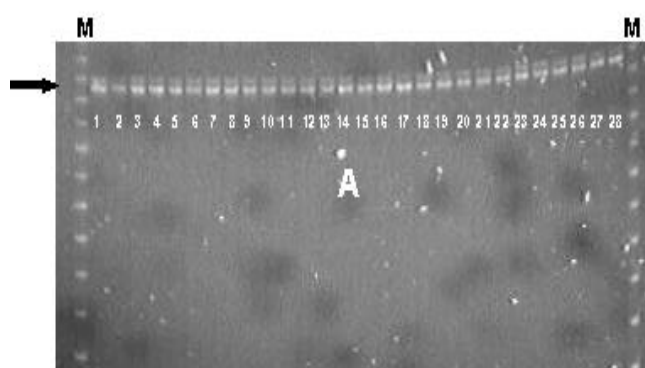


Figura 12. Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do DNA dos cultivares relacionados no Quadro 1 em gel desnaturante de poliacrilamida 7,0%. (A) *primer* FCggc001. A seta indica o fragmento de cerca de 280 pb. (B) *primer* FCccg001. A seta indica o fragmento de, aproximadamente, 206 pb. M - Marcador de tamanho molecular de 10 pb.

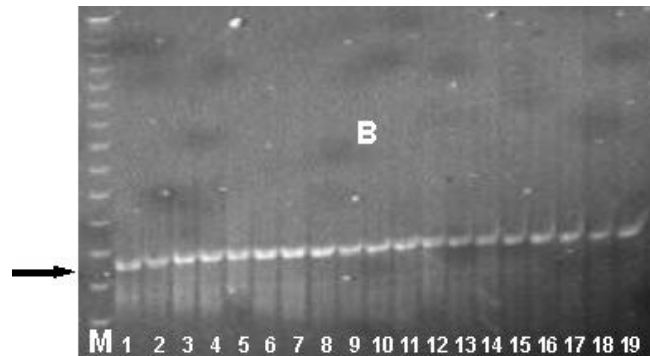


Figura 12, Cont.

Na Figura 12, observa-se que tanto o *primer* FCggc001 quanto FCccg001 amplificaram fragmentos monomórficos entre as amostras de DNA dos cultivares testados. O mesmo resultado foi observado para os *primers* FCctc001, FCccg002 e FCgca001 (dados não apresentados). Uma vez que o DNA de todos os cultivares foi amplificado, conclui-se que as regiões, em que os *primers* foram desenhados, são realmente conservadas. Entretanto, não é possível justificar, com exatidão, a razão pela qual tais *primers* mostraram-se monomórficos em relação ao produto de amplificação. Segundo WEBER (1990), o número de alelos originados a partir de um microsatélite está, normalmente, correlacionado com o número de repetições que este apresenta, ou seja, quanto maior o número de repetições, maior o polimorfismo. Por outro lado, CAIXETA et al. (2003) obtiveram *primers*, que flanqueiam microsatélites com repetições de 12 pb e que amplificaram 2 alelos e *primers*, que flanqueiam repetições de 22, 16 e 15 pb e que se mostraram monomórficos. Segundo RICHARDS e SUTHERLAND (1994), o polimorfismo é gerado pela perda ou ganho de seqüências repetidas, mais provavelmente através do ganho. Este fenômeno não é ainda completamente entendido, porém acredita-se que esta expansão ocorra durante a replicação. TÓTH et al. (2000) acreditam que a geração de novos SSR seja determinada pela interação entre vários fatores, dos quais os mais importantes seriam o tipo de repetição, a posição genômica do microsatélite e as condições genético-bioquímicas da célula. Ou seja, a causa do polimorfismo gerado por locos microsatélites parece não envolver, simplesmente, o tamanho das repetições.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A constatação de microssatélites em diferentes espécies de plantas sugeriu o potencial uso dos mesmos como marcadores. Os *primers* SSR são desenhados para as regiões conservadas, que flanqueiam os microssatélites. Estes *primers* podem ser utilizados para amplificar fragmentos de DNA contendo microssatélites, em diferentes indivíduos. Cada segmento, amplificado com diferente tamanho, representa um alelo do mesmo loco. Portanto, os marcadores microssatélite são multialélicos, co-dominantes e, ainda, encontram-se distribuídos ao acaso no genoma. Apesar de tantas características favoráveis à utilização desta técnica, os marcadores RAPD e SCAR, ainda, continuam sendo os mais utilizados em programas de melhoramento do feijoeiro-comum. Isto ocorre devido ao número limitado de *primers* microssatélite desenvolvidos para esta cultura. Portanto, o presente trabalho objetivou a construção de bibliotecas enriquecidas, a seleção de fragmentos contendo microssatélites, o desenho e o teste de *primers* SSR em feijoeiro-comum. A metodologia, utilizada neste trabalho, permite a representação de todo o genoma do feijoeiro-comum. Esta metodologia baseia-se na clonagem de fragmentos de DNA genômico enriquecidos para diferentes microssatélites. Entre as bibliotecas construídas, as que foram enriquecidas para as repetições GGC, CCA e AT possibilitaram a seleção de 79, 172 e 50 clones, respectivamente. Destes, já foram seqüenciados 63 (80%), 53 (31%) e 37 (74%). A análise das seqüências obtidas revelou que 40 (26%) apresentaram microssatélite, variando em tipo, número e tamanho. As seqüências apresentaram repetições de di-, tri-, tetra- e até pentanucleotídeos. Em um mesmo fragmento, foram encontrados até 3 microssatélites. Nas seqüências analisadas,

foram observadas repetições perfeitas, imperfeitas e compostas variando entre 12 e 24 pb. Até o presente momento, foram desenhados e testados 10 pares de *primers*, sendo um deles originado da seqüência do marcador RAPD OPAZ20<sub>940</sub>. Destes, 5 pares (FCctc001, FCggc001, FCccg001, FCccg002 e FCgca001) amplificaram fragmentos de DNA bem definidos e de tamanho esperado. Entretanto, estes *primers* foram monofórficos, quando testados entre diferentes cultivares andinos e mesoamericanos. Alguns *primers* (FCgcc001 e FCctt002) amplificaram fragmentos de tamanho diferente do esperado, enquanto outros (FCctt001, FCcca001 e FCtta001) não amplificaram nenhum fragmento. As condições de amplificação destes, ainda, estão sendo optimizadas. Outros clones positivos estão sendo seqüenciados e novos pares de *primers* serão desenhados e testados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18: 265-273, 1995.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB136, TO and G2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999.
- ARMOUR, J.A.L., NEUMANN, R., GOBERT, S., JEFFREYS, A.J. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. **Human Molecular Genetics**, 03:599-605. 1994.
- AUSUBEL, F. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Tenton Data Systems, 1998.
- BECKMANN, J.S., WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 12:627-631, 1992.
- BLAIR, M.W., PEDRAZA, F., BUENDIA, H.F., GAITÁN-SOLÍS, E., BEEBE, S.E., GEPTS, P., TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1362-1374, 2003.
- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., KELLY, J.D. Microsatellite Markers for Common Bean. **Annual Report of Bean Improvement**, 46:157-158, 2003.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. Viçosa: UFV, 1999. 116 p. (Tese - Doutorado).

- COSTA, M.R. **Introgessão de Genes de Resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha-angular no Cultivar de Feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV, 2004. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FISCHER, D., BACHMANN, K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). **BioTechniques**, 24:796-802. 1998.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:36-37, 1976.
- 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**, 42:2128-2136, 2002.
- HAMILTON, M.B., PINCUS, E.L., Di FIORE, A., FLEISCHER, R.C. Universal linker and ligations procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, 27:500-505, 1999.
- HANCOCK, J.M. Simple Sequences and the expanding genome. **BioEssays**, 18:421-425, 1996.
- HEARNE, C.M., GHOSH, S., TODD, J.A. Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. **Trends Genetics**, 08:288-294, 1992.
- LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H., ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acid Research**, 21:1111-1115, 1993.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:398-401, 1989.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome**, 38:715-723, 1995.
- PETES, T.D., GREENWELL, P.W., DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequence by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 146:491-498, 1997.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLARD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 249-250, 2004.

- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003.
- RICHARDS, R.I; SUTHERLAND, G.R. Simple Repeat DNA is not replicated simply. **Nature Genetics**, 06:114-116, 1994.
- ROIZÈS, G. Identification of microsatellite markers: screening for repeat sequences and mapping polymorphisms. In: HAJEER, A., WORTHINGTON, J., JOHN, S. (Eds.) **SNP and microsatellite genotyping: markers for genetic analysis**. Westborough: Eaton Publishing, 2000. p. 35-48.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 43-48, 1995.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 74:5463-5467, 1977.
- SILVA, G.F., SANTOS, J.B., RAMALHO, M.A.P. Tagging resistance allele of the common bean to angular leaf spot by SSR and RAPD markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:155-156. 2003.
- TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, 10:967-981, 2000.
- WANG, Z., WEBER, J.L., ZHONG, G., TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:01-06, 1994.
- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dGdT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, 07:524-530, 1990.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, 42:27-34, 1999.

## **CAPÍTULO 3**

### **INTRODUÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE E SCAR EM UM MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE QTL ASSOCIADO AO RENDIMENTO DO FEJOEIRO-COMUM**

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (GEPTS & DEBOUCK, 1991). A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é uma leguminosa diplóide ( $2n = 22$ ), que apresenta um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haplóide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991).

Recentemente, vários trabalhos com marcadores moleculares têm sido desenvolvidos para o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os trabalhos envolvendo o mapeamento genético e a seleção assistida por marcadores (SILVA et al., 2003; BLAIR et al., 2003; FALEIRO et al., 2003; COSTA, 2004) possuem grande aplicabilidade em programas de melhoramento de plantas. A construção de mapas de ligação possibilita a identificação de regiões genômicas, que controlam características de interesse econômico, a quantificação dos efeitos e a identificação de marcadores moleculares associados a essas regiões (FALEIRO et al., 2003; PATERSON, 1998). Uma vez identificados, os marcadores moleculares podem ser utilizados para implementação de programas de melhoramento genético, pois, aceleram significativamente a produção de cultivares com desempenho agrônômico superior (RAGAGNIN et al., 2003; COSTA, 2004).

Nos trabalhos de mapeamento genético do feijoeiro-comum, observa-se que as classes de marcadores utilizadas têm variado muito ao longo dos anos. NODARI et al. (1993) analisaram a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos RFLP, 7 locos

isoenzimáticos, 8 locos RAPD e 19 locos correspondentes a genes conhecidos. MIKLAS et al. (1998) mapearam 147 marcadores RAPD, 2 marcadores SCAR e 2 marcadores fenotípicos em 10 grupos de ligação, para um comprimento total do mapa de 924 cM. Recentemente, BLAIR et al. (2003) utilizaram 150 *primers* SSR, dos quais 100 foram mapeados em 11 grupos de ligação. Entre as diferentes classes, os marcadores moleculares baseados em PCR vêm sendo cada vez mais utilizados. Estes marcadores apresentam nível de polimorfismo, geralmente, alto para cada loco e não são afetados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Os microssatélites e o SCAR são classes de marcadores moleculares baseados em PCR que possuem grande aplicação em análises genéticas porque não apresentam problemas de reprodutibilidade. Tanto na técnica de microssatélite quanto na de SCAR, o polimorfismo gerado por PCR pode ser visualizado e analisado de forma, relativamente, simples (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Portanto, o presente trabalho objetivou: 1) introduzir marcadores microssatélites e SCAR em um mapa de ligação, que apresenta baixo nível de saturação; e 2) mapear QTLs associados ao rendimento do feijoeiro-comum.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

A população utilizada no presente trabalho foi desenvolvida por FALEIRO et al. (2003). Trata-se de uma população segregante, composta por 154 RIL's de feijoeiro-comum e originada do cruzamento entre os cultivares Ouro Negro e Rudá. O Ouro Negro tem apresentado resistência a diferentes raças de *Uromyces appendiculatus* (ferrugem), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose) e *Phaeoisariopsis griseola* (mancha-angular), em condições de casa de vegetação (FALEIRO et al., 1996, 1999; LANZA et al., 1997) e de campo (VIEIRA et al., 1992). O cultivar Rudá apresenta grão do tipo carioca e ótimas qualidades agronômicas; entretanto, é suscetível a várias raças fisiológicas dos fungos mencionados anteriormente.

### 2.2. Extração de DNA

O processo de extração foi realizado, conforme descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

### 2.3. *Primers* microssatélite e SCAR utilizados na amplificação do DNA dos genitores

As amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e Rudá foram amplificadas com 45 pares de *primers* microssatélite (Quadro 1) e 9 pares de *primer* SCAR (Quadro 2).

Quadro 1. *Primers* microssatélite utilizados na amplificação de amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e Rudá

<i>Primers</i> SSR*	Seqüência dos <i>primers</i> R e F (5' 3')	Tamanho do fragmento (pb)
GATS 91	R: GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG F: TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	229
BM 188	R:TCGCCTTGAAACTTCTTGTATC F:CCCTTCCAGTTAAATCAGTCG	177
BM 53	R:AACTAACCTCATACGACATGAAA F:AATGCTTGCACTAGGGAGTT	287
BM 141	R:TGAGGAGGAACAATGGTGGC F:CTCACAACCACAACGCACC	218
BM 152	R:AAGAGGAGTTCGAAACCTTAAATCG F:CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	127
BM 199	R:AAGGAGAATCAGAGAAGCCAAAAG F:TGAGGAATGGATGTAGCTCAGG	304
BM 210	R:ACCACTGCAATCCTCATCTTTG F:CCCTCATCTCCATTCTTATCG	166
BM 150	R:CGAACTATTTGATACTCATGTGC F:TTGCAGGACAGATAAGTTAGAAGA	196
BM 175	R:CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT F:CCACTCTTAGCATCAACTGGA	170
BM 183	R:CTCAAATCTATTCAGTGGTCAGC F:TCTTACAGCCTTGACAGATC	149
BM 170	R:AGCCAGGTGCAAGACCTTAG F:AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	179
BM 114	R:AGCCTGGTGAAATGCTCATAG F:CATGCTTGGTGCCTAACTCTCT	234
BM 172	R:CTGTAGCTCAAACAGGGCACT F:GCAATACCGCCATGAGAGAT	107
BM 165	R:TCAAATCCCACACATGATCG F:TTCTTTTCATTCATATTATCCGTTCA	177
BM 167	R:TCCTCAATACTACATCGTGTGACC F:CCTGGTGTAACCCTCGTAACAG	165
BM 189	R:CTCCCACTCTCACCTCACT F:GCGCCAAGTGAACTAAGTAGA	114
BM 164	R:CCACCACAAGGAGAAGCAAC F:ACCATTCAGGCCGATACTCC	182
BM 185	R:AAGGAGGTTTCTACCTAATTCC F:AAAGCAGGGATGTAGTTGC	105
BM 140	R:TGCACAACACACATTTAGTGAC F:CCTACCAAGATTGATTTATGGG	190
BM 201	R:TGGTGCTACAGACTTGATGG F:TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	102
BM 212	R:AGGAAGGGATCCAAAGTCACTC F:TGAACCTTTCAGGTATTGATGAATGAAG	214
BM 160	R:CGTGCTTGGCGAATAGCTTTG F:CGCGGTTCTGATCGTGACTTC	211
BM 159	R:GGTGCTGTTGCTGCTGTTAT F:GGGAGATGTGGTAAGATAATGAAA	198
GATS 11	R:CACATTGGTGCTAGTGTCCG F:GAACCTGCAAAGCAAAGAGC	306
BM 138	R:TGTCCCTAAGAACGAATATGGAATC F:GAATCAAGCAACCTTGGATCATAAC	203
BM 211	R:ATACCCACATGCACAAGTTTGG F:CCACCATGTGCTCATGAAGAT	186
BM 184	R:AGTGCTCTATCAAGATGTGTG F:ACATAATCAATGGGTCCTG	160
BM 197	R:TGGACTGGTTCGATACGAAGC F:CCCAGAAGATTGAGAACCAC	201

Quadro 1, Cont.

<i>Primers SSR*</i>	<i>Seqüência dos primers R e F (5' 3')</i>	<i>Tamanho do fragmento (pb)</i>
BM 142	R:TTCCGCTGATTGGATATTAGAG F:AGCCCGTTCCTTCGTTTAG	157
BM 155	R:GTTTCATGTTTGTGTTGACAGTTCA F:CAGAAAGTTAGTGTGGTTTGATACA	114
BM 181	R:ATGCTGCGAGTTAATGATCG F:TGAGGAGCAAACAGATGAGG	192
BM 161	R:TGCAAAGGGTTGAAAGTTGAGAG F:TTCCAATGCACCAGACATTCC	185
BMd-1	R:GTCGGAGCCATCATCTGTTT F:CAAATCGCAACACCTCACAA	165
BMd-2	R:CAACAAACGGTGATTGACCA F:AGCGACAGCAAGAGAACCTC	106
BMd-7	R:CATACCCAATGCCATGTTCTC F:GGATATGGTGGTGATCAAGGA	166
BMd-9	R:CACTGCGACATGAGAGAAAGA F:TATGACACCACTGGCCATACA	135
BMd-10	R:ATCTGAGAGCAGCGACATGGTAG F:GCTCACGTACGAGTTGAATCTCAG	139
BMd-15	R:TTGGAGGAAGCCATGTATGC F:TTGCCATCGTTGCTTAATTG	166
BMd-17	R:AGATAGGAAGGGCGTGGTTT F:GTTAGATCCCGCCAATAGTC	116
BMd-18	R:TCGTGAGGTAGGAGTTTGGTG F:AAAGTTGGACGCACTGTGATT	156
BMd-19	R:GGAAGCGAGGCAGTTATCTTT F:GCCAACCACTTCTCCCTAC	154
BMd-20	R:GTGAGGCAAGAAGCCTTCAA F:GTTGCCACCGTGATAATCT	123
BMd-25	R:CGTTGACGAGAAGCATCAAG F:GCAGATCGCCTACTCACAAA	118
BMd-27	R:TGGTGGAGGTGGAGATTTGT F:GGACCCACCATCACCATAAC	109
BMd-38	R:AAATTCCGAACCCGTGAACT F:GCGTTTCCATGAATCAATCC	178

\* - Os primers SSR da série BMd foram desenvolvidos por BLAIR et al. (2003), os demais por GAITÁN-SOLÍS et al. (2002).

Quadro 2. *Primers SCAR* utilizados na amplificação de amostras de DNA dos cultivares Ouro Negro e Rudá

<i>Primers SCAR</i>	<i>Seqüência dos primers R e F (5' 3')</i>	<i>T<sub>A</sub> (°C)*</i>	<i>T.frag. (pb)**</i>	<i>Referência</i>
sM02	F: CAACGCCTCATTAAATTGGA R:CGCCTCTAAACGGGAGAAAC	58	460	QUEIROZ et al., 2004a
sBA16	F: TTCCACGTCTATTTTGCATCA R: CACGCATCACGCAGAACT	59	560	QUEIROZ et al., 2004a
sH13	F: GACGCCACACCCATTATGTT R: GCCACACAGATGGAGCTTTA	59	520	QUEIROZ et al., 2004a
sAA19	F: TGAGGCGTGTCAATGGATATAA R: GAGGCGTGTGATAATTCTGG	56	650	QUEIROZ et al., 2004a
sAE19	F: CAGTCCCTGACAACATAACACC R: CAGTCCCTAAAGTAGTTTGTCCCTA	58	890	QUEIROZ et al., 2004c

Quadro 2, Cont.

<b>Primers SCAR</b>	<b>Seqüência dos primers R e F (5' 3')</b>	<b>T<sub>A</sub> (°C)*</b>	<b>T.frag. (pb)**</b>	<b>Referência</b>
sAZ20	F: ACCCCTCATGCAGGTTTTTA R: CATAATCCATTCATGCTCACC	59	845	QUEIROZ et al., 2004b
sY20	F: AGCCGTGGAAGGTTGTCAT R: CCGTGGAACAACACACAAT	65	830	QUEIROZ et al., 2004b
sC08	F: AGAATGCCTTTAGCTGTTGG R: CAGAGAGCTAGGCTTATCG	65	910	QUEIROZ et al., 2004b
sZ04	F: GGCTGTGCTGATTAATTCTGG R: TGCTCATTTTATAATGGAGAAAAA	45	567	QUEIROZ et al., 2004b

\* T<sub>A</sub> – Temperatura de pareamento do *primer*; \*\* T.frag. – Tamanho do fragmento em pares de base.

#### 2.4. Reações de amplificação utilizando *primers* microssatélite

As reações de amplificação foram feitas em volume de 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 120 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer forward* 0,2 µM e *primer reverse* 0,2 µM (IMPRINT GENETIX, São Paulo, SP, Brasil), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 ng de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), utilizando-se o procedimento de *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu de 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos, seguido de 18 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 65 a 48 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos. Terminados os 18 ciclos, seguiram-se 22 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 48 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos. Após os 22 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel nativo de poliacrilamida 10% em TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM), durante 4 horas a 120 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi incubado em solução, contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL, por 30 minutos. Em seguida, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

#### 2.5. Reações de amplificação utilizando *primers* SCAR

As reações de amplificação utilizando *primers* SCAR continham os reagentes nas mesmas concentrações que as utilizadas nos ensaios da técnica de microssatélite, exceto para os desoxirribonucleotídeos. Foram empregados 100 µM de cada um dos

desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 45/67 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL, por aproximadamente 4 horas a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

## **2.6. Análise de ligação**

Os *primers*, que revelaram polimorfismos entre os genitores, foram utilizados para amplificar amostras de DNA das 154 RIL's. Os fragmentos amplificados pelos *primers* microssatélite e SCAR foram codificados em cada uma das RIL's. O alelo presente no cultivar Ouro Negro foi codificado como (2) e o alelo presente no cultivar Rudá como (0). O número (9) foi atribuído a dados perdidos. A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população, por meio do teste de qui-quadrado. Os fragmentos utilizados em análises posteriores foram aqueles cuja proporção de segregação se ajustou a 1:1 ( $P < 0,05$ ). Os testes foram realizados com auxílio do programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)).

## **2.7. Introdução de marcadores moleculares ao mapa genético de ligação**

O programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)) foi utilizado para o cálculo da frequência de recombinação e para a determinação da ordem dos diferentes marcadores no mapa de ligação. Para o agrupamento dos marcadores, foram testados os valores de LOD de 3,0, 4,0 e 5,0 e valores de frequência máxima de recombinação de 30, 40 e 50. A conversão da frequência de recombinação para centiMorgans foi feita, utilizando-se a distância de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

## **2.8. Identificação e mapeamento de QTLs**

Inicialmente, foram feitas análises de regressão simples para detectar associações entre os marcadores microssatélite e SCAR e as características quantitativas

descritas por FALEIRO et al. (2003). Utilizaram-se as seguintes características quantitativas: FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem) PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem). A proporção da variância fenotípica, explicada por marcador, foi estimada por meio dos valores de  $R^2$  obtidos da regressão linear, conforme descrito por EDWARDS et al. (1987). Os marcadores associados à característica fenotípica a  $P < 0,05$  foram analisados por meio de modelos de regressão múltipla. Para tal, adotou-se o procedimento de eliminação por *stepwise* ( $P_{\text{entrada}}$  e  $P_{\text{saída}} = 10\%$ ) do programa GQMol ([www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)). Deste modo, foi determinada a proporção da variância fenotípica, explicada pelo conjunto de marcadores, que se ajustaram ao modelo de regressão múltipla a  $P < 0,05$ .

As informações do mapa genético foram utilizadas para mapear QTLs ao longo dos grupos de ligação. O mapeamento foi realizado por intervalo simples (LANDER & BOTSTEIN, 1989) e composto (ZENG, 1993 e 1994, JANSEN, 1993). Este último tipo diferencia-se do anterior, porque isola o efeito de outros QTLs ligados ao intervalo. Conforme sugerido por FALEIRO et al. (2003), como nível de significância para o mapeamento por intervalo, adotou-se o valor de LOD de 2,0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Detecção de polimorfismos entre os genitores

Inicialmente, apenas o DNA dos genitores Ouro Negro e Rudá foram testados com os *primers* microssatélite e SCAR (Quadros 1 e 2). Tal procedimento foi realizado com a finalidade de identificar e selecionar *primers*, que amplificassem fragmentos polimórficos entre os cultivares que originaram as 154 RIL's.

Dos 45 pares de *primers* microssatélite utilizados (Quadro 1), 32 foram escolhidos com base no valor de poder discriminatório ( $D_L$ ) e 13 a partir de um mapa construído por BLAIR et al. (2003). Os valores de  $D_L$  dos 32 *primers* variaram entre 0,64 (BM 161) e 0,94 (BM 188). De acordo com esses valores, a probabilidade de os *primers* distinguirem 2 indivíduos encontra-se entre 64 e 94% (GAITÁN-SOLÍS et al., 2002). Dos 45 pares de *primers* analisados no presente trabalho, BM161 ( $D_L= 0,64$ ), BM165 ( $D_L= 0,83$ ), BM210 ( $D_L= 0,89$ ), GATS91 ( $D_L= 0,91$ ) e BMd-20 foram selecionados, pois, amplificaram fragmentos de DNA polimórficos entre os genitores (dados não apresentados). Dos 9 pares de *primers* SCAR testados (Quadro 2), foram selecionados os *primers* sBA16, sAZ20 e sH13 por amplificarem fragmentos de DNA heteromórficos entre os cultivares Ouro Negro e Rudá (dados não apresentados). Portanto, do total de 54 pares de *primers* testados, 8 pares foram utilizados para avaliar as 154 RIL's.

A quantidade de marcadores polimórficos identificados e selecionados varia de espécie para espécie. Espécies como o feijoeiro-comum, que se reproduzem por autofecundação, são essencialmente homozigotas na maioria dos locos. Normalmente,

estas espécies são menos polimórficas do que outras, que se reproduzem por fecundação cruzada, altamente heterozigotas (HELENTJARIS et al., 1986; GALE et al., 1990; QUEIROZ et al., 2003). A distância genética entre as linhagens, que darão origem à população segregante, também influencia a obtenção de marcadores polimórficos. Observa-se que quanto mais próximas geneticamente forem as linhagens, mais difícil será a obtenção de polimorfismos. Assim, a escolha de linhagens sem ancestral comum, ou mesmo cruzamentos interespecíficos para espécies de autofecundação, têm sido preferida em maior ou menor escala para permitir, ou aperfeiçoar, o processo de análise de marcadores (BONIERBALE et al., 1988; TANKSLEY et al., 1988). Níveis moderados de polimorfismos podem ser detectados entre *pools* gênicos mesoamericanos e andinos do feijoeiro-comum (CHASE et al., 1991; VALLEJOS et al., 1992). Para realizar a integração de mapas, BLAIR et al. (2003) utilizaram duas populações RIL's, sendo uma obtida do cruzamento entre DOR364 (mesoamericano) x G19833 (andino) e a outra a partir de BAT93 (mesoamericano) x JaloEEP558 (andino). De 150 pares de *primers* microssatélites utilizados, 78 (52%) e 22 (15%) pares foram mapeados nas populações originadas de DOR364 x G19833 e BAT93 x JaloEEP558, respectivamente. No presente trabalho, 8 (15%) pares de *primers* se mostraram polimórficos entre os genitores Ouro Negro e Rudá. Este número é considerável, uma vez que os genitores utilizados pertencem ao mesmo *pool* gênico.

### 3.2. Análise de segregação dos *primers* microssatélite e dos marcadores SCAR

Os *primers* sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91 e BMd-20 foram selecionados e utilizados para amplificar amostras de DNA das 154 RIL's. A Figura 1 ilustra o padrão eletroforético de produtos de amplificação do DNA dos genitores e de 10 RIL's com os *primers* sAZ20 e BM210.

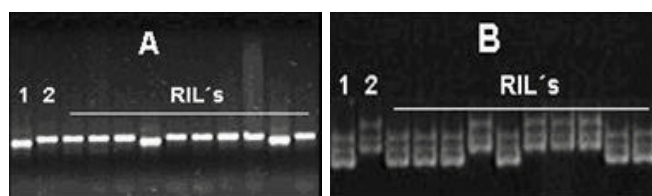


Figura 1. Padrão eletroforético de produtos de amplificação do DNA de Ouro Negro (1), Rudá (2) e 10 linhas endogâmicas recombinantes. (A) produtos da amplificação realizada com o *primer* SCAR sZA20 em gel de agarose 1,2%. (B) produtos da amplificação realizada com o *primer* microssatélite BM210 em gel nativo de poliacrilamida 10%.

Os resultados da análise de segregação dos fragmentos amplificados, a partir do DNA das 154 RIL's, encontram-se no Quadro 3.

Quadro 3. *Primers* microssatélite e SCAR que amplificaram fragmentos DNA segregando na proporção mendeliana esperada (1:1) e o valor de qui-quadrado significativo a  $P < 0,05$

Marcador	Relação observada	Dados perdidos		$\chi^2$ <sup>b</sup>	Prob. <sup>c</sup> (%)
	Ouro Negro:Rudá	Número	RIL's (n <sup>o</sup> ) <sup>a</sup>		
sBA16	88:66	-	-	0,104	74,72 ns <sup>d</sup>
sAZ20	75:79	-	-	3,143	7,62 ns
sH13	83:71	-	-	0,935	33,35 ns
BM161	74:79	1	124	0,163	68,60 ns
BM165	83:71	-	-	0,935	33,35 ns
BM210	67:86	1	115	2,359	12,45 ns
GATS91	68:85	1	129	1,889	16,93 ns
BMd-20	83:70	1	148	1,105	29,32 ns

<sup>a</sup> - número da RIL; <sup>b</sup> - hipótese testada: monogênica com segregação 1:1; <sup>c</sup> - probabilidade em porcentagem; <sup>d</sup> - não significativo ( $P > 0,05$ );

O padrão de segregação de cada marcador se encontra no Apêndice (Seção 4).

### 3.3. Repetição da análise de segregação dos marcadores RAPD, das características morfológicas e de resistência à doença

Os resultados descritos por FALEIRO (2000) foram novamente analisados, para confirmar o padrão de segregação dos marcadores genéticos utilizados na construção do mapa parcial de ligação. A existência de dados perdidos, para alguns indivíduos da população segregante, alterou o padrão de segregação do marcador RAPD BA16<sub>583</sub> (Quadro 4) e de algumas características de resistência à doença (Quadro 5).

Quadro 4. Repetição da análise de segregação do marcador RAPD BA16<sub>583</sub> nos indivíduos da população de RIL's

Marcador RAPD	Origem do marcador	Relação observada	Número	RIL's (n <sup>o</sup> ) <sup>a</sup>	$\chi^2$ <sup>b</sup>	Prob. (%) <sup>c</sup>
BA16 <sub>583</sub>	Ouro Negro	82:72	-	-	0,649	42,03 ns

<sup>a</sup> - número da RIL; <sup>b</sup> - Hipótese testada: monogênica com segregação 1:1; <sup>c</sup> - probabilidade em porcentagem; ns - não significativo ( $P > 0,05$ ).

Quadro 5. Repetição da análise de segregação de resistência dos indivíduos da população de RIL's à diferentes raças fisiológicas de *U. appendiculatus* (ferr), *C. lindemuthianum* (ant) e *P. griseola* (man)

Raças fisiológicas <sup>a</sup>	Notas <sup>b</sup>		Relação observada	Dados Perdidos		c <sup>2 e</sup>	Prob. (%) <sup>f</sup>
	ON <sup>c</sup>	Rudá		Número	RIL's (n <sup>o</sup> ) <sup>d</sup>		
ferr 47	3	5	80:73	1	103	0,32	57,14 ns <sup>f</sup>
ferr 52	3	4	79:74	1	103	0,163	68,60 ns
ant 89	1	9	89:64	1	103	4,085	4,32 a
man 63.31	1	5	85:61	8	01, 39, 40, 41, 44, 46, 120, 126	3,945	4,70 a

<sup>a</sup> - Resistência a doença: ferr 47 (raça fisiológica 47 de *U. appendiculatus*); ferr 52 (raça fisiológica 52 de *U. appendiculatus*); ant 89 (raça fisiológica 89 de *C. lindemuthianum*); man 63.31 (raça fisiológica 63.31 de *P. griseola*); <sup>b</sup> - Notas de 1 a 3 (resistente) e maior que 3 (susceptível); <sup>c</sup> - Ouro Negro; <sup>d</sup> - número da RIL; <sup>e</sup> - Hipótese testada: monogênica com segregação 1:1; <sup>f</sup> - Prob.(%) – probabilidade em porcentagem; ns – não significativo ( $P > 0,05$ ); a – significativo ( $P < 0,05$ ).

Após a repetição da análise dos dados, foram selecionados 51 marcadores genéticos que segregaram na proporção de 1:1 ( $P > 0,05$ ). Destes, um marcador corresponde a característica morfológica, oito a características de resistência a doenças e 42 a marcadores RAPD.

### 3.4. Introdução dos marcadores microssatélite e SCAR ao mapa parcial de ligação

Vários testes de agrupamento foram realizados entre os marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91, BMd-20 e os 51 descritos por FALEIRO et al. (2003). O agrupamento dos marcadores foi testado para diferentes valores de LOD e máxima frequência de recombinação ( $r$ ). Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 6.

Quadro 6. Agrupamento dos 59 marcadores em diferentes valores de LOD e máxima frequência de recombinação ( $r$ )

LOD	$r$	Marcadores ligados	Marcadores não ligados	Número de grupos de ligação	Tamanho do mapa (cM) <sup>a</sup>	V. G. <sup>b</sup>
3,0	0,30	49	10	09	280	2-12
	0,40	49	10	09	280	2-12
4,0	0,30	48	11	10	252	2-12
	0,40	48	11	10	252	2-12
5,0	0,30	46	13	09	201,5	2-12
	0,40	46	13	09	201,5	2-12

<sup>a</sup> – centiMorgans; <sup>b</sup> – variação do número de marcadores entre os diferentes grupos de ligação.

Em todos os valores de LOD testados, observa-se que não houve diferença no agrupamento dos marcadores para  $r$  de 0,3 e 0,4. O valor de LOD é o logaritmo, na base 10, da razão entre a hipótese que os marcadores estejam ligados e a hipótese que eles não estejam ligados. O limite convencional para este critério é definido como  $\text{LOD} > 3,0$ , que corresponde a uma taxa de 1.000:1 a favor da ligação (WILLIAMS, 1998). Analisando os resultados apresentados para  $\text{LOD} = 3,0$ , observa-se que este valor possibilitou a ligação do maior número de marcadores (49), cobrindo uma distância genética de 280 cM. O valor de  $\text{LOD} = 5,0$  assegura a existência de ligação entre 2 marcadores com uma taxa de 100.000:1 a favor da ligação. Por outro lado, foi o que apresentou o menor número de marcadores ligados e cobriu apenas 201,5 cM do genoma. Portanto, os valores adotados para a introdução dos marcadores microssatélite e SCAR ao mapa parcial de ligação foram  $\text{LOD} = 4,0$  e  $r = 0,4$ . A utilização destes parâmetros possibilitou o mapeamento de 48 marcadores em 10 grupos de ligação. O número de grupos de ligação obtido é o que mais se aproxima do número haplóide de cromossomos em *Phaseolus vulgaris* L.,  $n = 11$  (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Dos marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91 e BMd-20, apenas o GATS91 não foi mapeado.

Os 48 marcadores cobriram uma distância de recombinação total de 252 cM. A distância genética encontrada é bem menor, em comparação com as descritas em outros mapas genéticos em feijoeiro-comum. NODARI et al. (1993) e MIKLAS et al. (1998) utilizaram 152 e 151 marcadores na construção de mapas de feijoeiro-comum, que apresentaram valores de distância de recombinação total de 827 e 924 cM, respectivamente. Como os mapas de ligação baseiam-se na frequência de recombinação entre 2 marcadores adjacentes, eles podem apresentar variações no tamanho dos grupos de ligação, de acordo com o nível de saturação do mapa e, até mesmo com a natureza dos marcadores utilizados no mapeamento. Na construção de um mapa de ligação em *Theobroma cacao* L., CROUZILLAT et al. (1996) mapearam 138 marcadores em 10 grupos de ligação. O comprimento do mapa foi de 1.068 cM e cerca de 23% dos marcadores apresentavam natureza co-dominante. LANAUD et al. (1995) mapearam 193 marcadores em *Theobroma cacao* L. Destes, 83% dos marcadores eram co-dominantes. Os marcadores foram mapeados em 10 grupos de ligação e cobriram uma distância de 759 cM.

Os 10 grupos de ligação obtidos no presente trabalho variaram, em tamanho, de 6,41 a 41,02 cM. A distribuição dos intervalos entre 2 marcadores adjacentes variou entre 0,29 e 30,48 cM, com média de 7,4 cM. A maioria dos intervalos (92%) são menores que 20 cM entre marcadores adjacentes, aumentando as chances de determinação de QTLs (PATERSON, 1996). Os 10 grupos de ligação obtidos foram representados na Figura 2. Os grupos de ligação foram ordenados segundo a ordem proposta por FALEIRO et al. (2003).

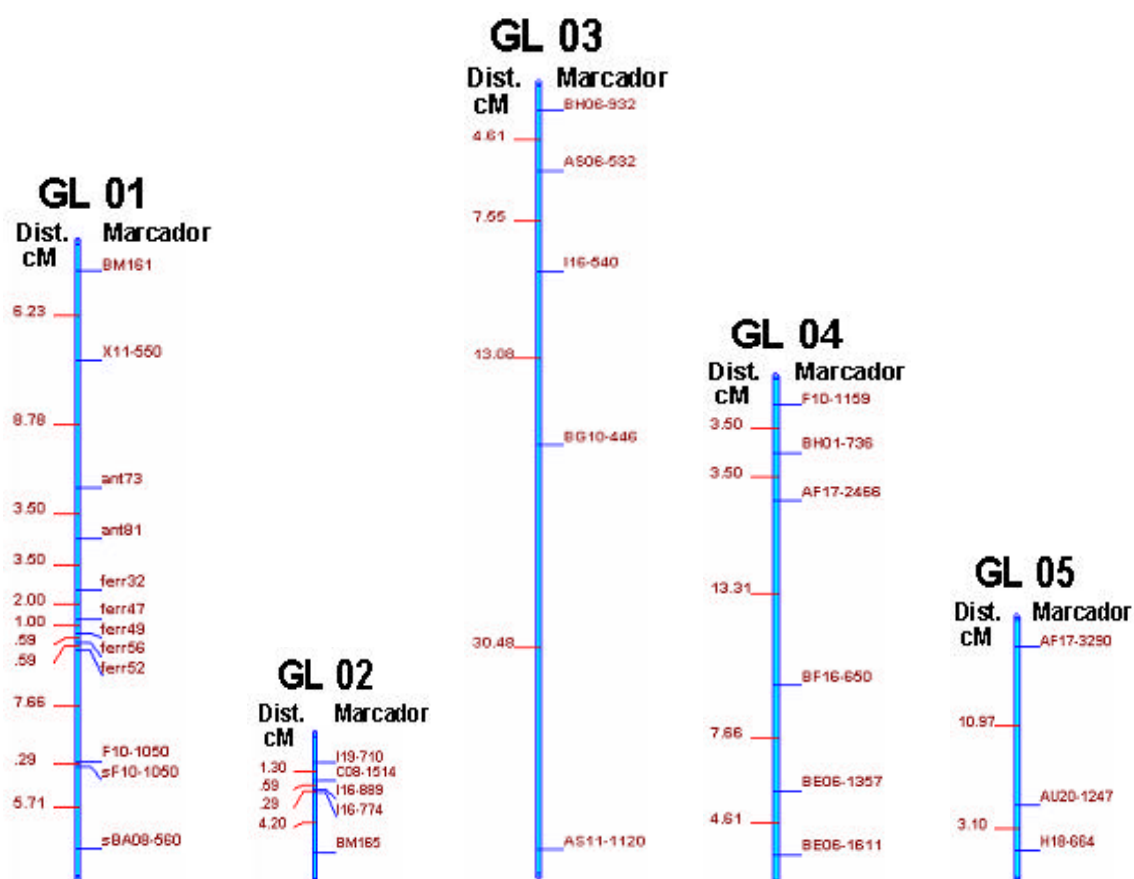


Figura 2. Mapa parcial de ligação genética do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), obtido após a introdução de marcadores microsatélite e SCAR ao mapa construído por FALEIRO et al. (2003). Os marcadores foram mapeados, utilizando-se valores de LOD = 4 e máxima frequência de recombinação = 0,4. Os 48 marcadores encontram-se distribuídos ao longo dos 10 grupos de ligação. Os marcadores estão indicados no lado direito e as distâncias em cM, calculadas pela função de Kosambi, no lado esquerdo de cada grupo.

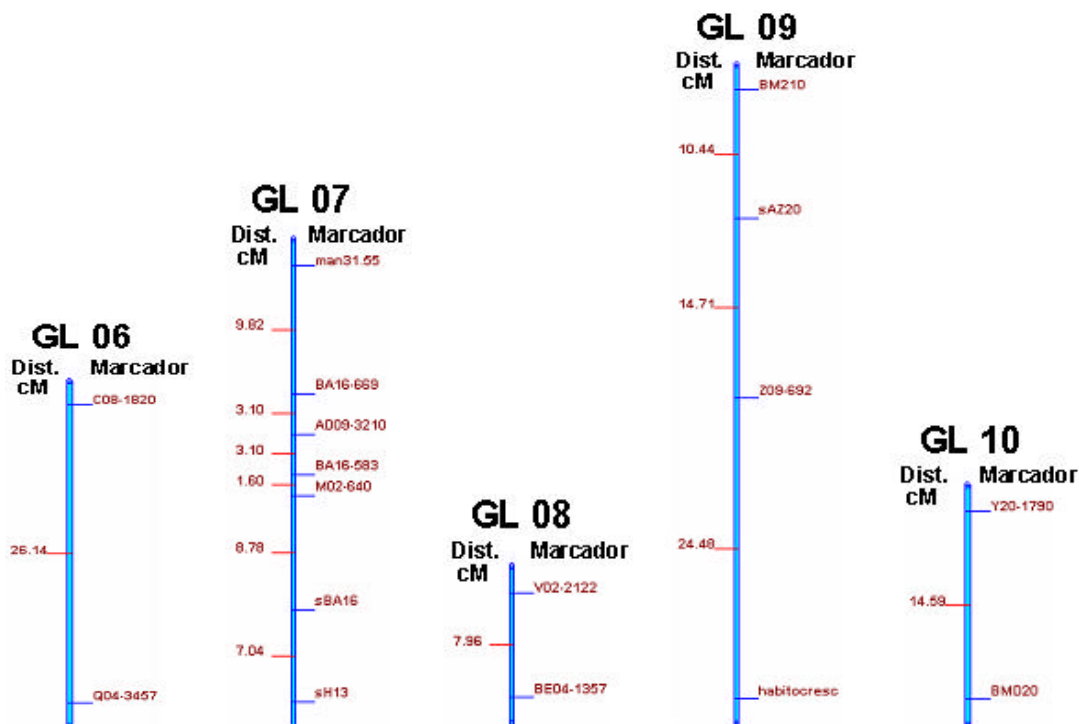


Figura 2, Cont.

No Quadro 7, observa-se que o mapa parcial de ligação descrito por FALEIRO et al. (2003) sofreu pequenas alterações, após o mapeamento dos marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210 e BMd-20. Com exceção dos grupos de ligação GL 05, GL 06 e GL 08, todos os outros sofreram modificações. A alteração mais expressiva foi observada no grupo de ligação GL 01. Com a inclusão do marcador BM161 neste grupo, os marcadores RAPD X11<sub>550</sub> e F10<sub>1050</sub> passaram a flanquear o bloco gênico de resistência à antracnose e ferrugem.

Quadro 7. Comparação entre o mapa parcial de ligação descrito por FALEIRO et al. (2003) e o apresentado no presente trabalho

Mapa	Grupos de ligação	Tamanho do mapa	D.M.M. <sup>a</sup>	10 cM (%) <sup>b</sup>	Marcadores ligados
FALEIRO et al (2003)	09	247,8 cM	7,3 cM	82	43
Atual	10	252 cM	7,4 cM	76	48

<sup>a</sup> – distância média entre marcadores adjacentes em centiMorgans; <sup>b</sup> – porcentagem de intervalos menores que 10 cM entre marcadores adjacentes.

### 3.5. Identificação de marcadores associados a QTLs

A análise de variância, usando os marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91 e BMd-20 como tratamento, foi utilizada para testar associações entre estes e as características quantitativas descritas por FALEIRO et al. (2003). Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8. Associação entre os marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91 e BMd-20 e as características FLOR, MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRVAG, detectadas por meio da regressão simples

Característica quantitativa	Marcadores	Grupo de ligação	Prob.(F)	R <sup>2</sup> (%)	Efeito
FLOR	<i>o</i> BM 165	02	0,005**	5,07	+
	<i>rs</i> BA16	07	0,0457*	2,60	+
MAT	<i>o</i> BM 165	02	0,0001**	9,10	+
VAPLA	<i>o</i> BM 165	02	0,0006**	7,44	+
	<i>r</i> BMd-20	10	0,0195*	3,56	+
	<i>r</i> BM 210	09	0,0292*	3,11	+
	<i>rs</i> BA16	07	0,0416*	2,70	+
	<i>os</i> H13	07	0,0046**	5,16	-
P100	<i>r</i> BM 165	02	0**	10,28	+
	<i>o</i> BMd-20	10	0,0227*	3,34	+
	<i>o</i> GATS 91	NL	0,0249*	3,30	+
	<i>o</i> BM 210	09	0,0101*	4,30	+
	<i>os</i> AZ20	09	0,0071**	4,67	+
	<i>os</i> BA16	07	0,0007**	7,33	+
	<i>os</i> H13	07	0,0031**	5,62	+
SEPLA	<i>o</i> BM 165	02	0,0024**	5,89	+
	<i>r</i> BMd-20	10	0,0365*	2,86	+
	<i>r</i> BM 210	09	0,0244*	3,31	+
	<i>rs</i> BA16	07	0,0065**	4,77	+
	<i>os</i> H13	07	0,0008**	7,18	-
SEVAG	<i>o</i> BM 161	01	0,0037**	5,43	+
	<i>rs</i> BA16	07	0,0109*	4,18	+
	<i>os</i> H13	07	0,0234*	3,33	-
PRVAG	<i>r</i> BM 165	02	0,0001**	9,74	+
	<i>o</i> BMd-20	10	0,0187*	3,60	+
	<i>o</i> GATS 91	NL	0,0058**	4,93	+
	<i>o</i> BM 210	09	0,0468*	2,59	+
	<i>os</i> AZ20	09	0,0206*	3,47	+
	<i>os</i> BA16	07	0,036*	2,86	+

\* - significativo a  $P < 0,05$ . \*\* - significativo a  $P < 0,01$ . NL - não ligado. Prob. – probabilidade.

Os marcadores com iniciais *o* e *r* identificam os alelos provenientes dos genitores Ouro Negro e Rudá, respectivamente.

Características quantitativas: FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem) e PRVAG (produção média por vagem).

Entre os marcadores testados na análise de variância, vários encontravam-se associados às diferentes características quantitativas, com valores de probabilidade sempre inferiores a 5%. Os valores de  $R^2$  variaram entre 2,59 % e 10,28 %. Dos marcadores testados, o único que apresentou natureza dominante foi o sH13. Para este marcador, o fragmento polimórfico foi amplificado a partir do DNA do cultivar Ouro Negro. Dependendo da característica em questão, a presença deste fragmento pode estar associada ao efeito positivo, ou negativo. Para as características VAPLA e P100, os efeitos observados em relação ao fragmento de DNA amplificado pelo *primer* sH13 são negativos e positivos, respectivamente. Em relação à característica VAPLA, tal marcador encontra-se ligado em repulsão, pois, a média apresentada pelos indivíduos, que possuem a banda (genótipos: AA), é inferior ao valor médio dos indivíduos que não a possuem (genótipo: aa). Como os demais marcadores apresentam natureza co-dominante, a origem do alelo escolhido foi aquela que produziu efeito positivo nas características estudadas.

Com exceção da característica MAT, para todas as outras existem alelos originados de ambos os genitores, que se encontram associados com efeito positivo. FALEIRO et al. (2003) descreveram que a média apresentada para a característica P100 pelo genitor Ouro Negro é superior à apresentada por Rudá. Entretanto, no Quadro 8, observa-se que o alelo originado do genitor Rudá (*r*BM 165) foi o que se mostrou mais associado ( $R^2 = 10,28\%$ ) e produziu efeito positivo para a característica P100. Isto mostra que o fenótipo dos genitores nem sempre reflete os alelos, que eles possuem e que são transmitidos à sua descendência. GUIMARÃES (1999) detectou alelos, que contribuem para o aumento da média de vários caracteres agrônômicos em cana-de-açúcar, advindos do genitor com média inferior e vice-versa. As contribuições de QTLs complementares, advindos de ambos os genitores, foram também observadas na identificação de QTLs para caracteres agrônômicos em arroz e em *Theobroma cacao* L. (XIAO et al., 1996; QUEIROZ, 1999). Uma vez que estes alelos encontram-se mascarados nos genótipos que não expressam a característica, não é possível acessá-los sem o auxílio dos marcadores moleculares. Assim, os marcadores moleculares constituem uma importante estratégia para acelerar e aumentar os ganhos de seleção no melhoramento de características quantitativas.

Os marcadores sBA16, sAZ20, sH13, BM161, BM165, BM210, GATS91 e BMd-20 e os descritos por FALEIRO et al. (2003) também foram avaliados, simultaneamente, utilizando-se as análises de regressão *stepwise* e múltipla (Quadro 9).

Quadro 9. Associação entre os marcadores e as características MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRVAG detectadas por meio das análises de regressão *stepwise* ( $P_{\text{entrada}}$  e  $P_{\text{saída}} = 10\%$ ) e múltipla ( $P < 0,05$ )

Característica quantitativa	Marcadores excluídos <sup>a</sup>	Grupo de ligação	Marcadores associados	F	Prob.	R <sup>2</sup> (%) FALEIRO et al. (2003)	R <sup>2</sup> (%)* Atual
MAT	oI19 <sub>710</sub>	NL	oX11 <sub>1000</sub>	11,740	0,00079	40,14	44,30
		1	oF10 <sub>1050</sub>	7,646	0,00644		
		6	rC08 <sub>1820</sub>	12,233	0,00062		
		NL	oAD12 <sub>921</sub>	10,33	0,00161		
		NL	oH18 <sub>692</sub>	16,541	0,00008		
		3	oBG10 <sub>446</sub>	20,201	0,00001		
		9	rHábito IIIa	24,048	0,00000		
VAPLA	oM02 <sub>640</sub>	2	oBM 165*	15,691	0,00011	28,99	34,53
		1	oF10 <sub>1050</sub>	4,20	0,04206		
		6	rC08 <sub>1820</sub>	12,69	0,00049		
		2	oC08 <sub>1514</sub>	17,68	0,00004		
		NL	rAD12 <sub>921</sub>	9,60	0,00233		
		NL	oM02 <sub>1967</sub>	3,28	0,07185		
		7	osH13*	10,87	0,00122		
9	rBM 210*	3,30	0,07118				
P100	oOI16 <sub>540</sub> oOAF17 <sub>3290</sub> rOH18 <sub>1537</sub> oOI19 <sub>710</sub> rHábito IIIa	5	rAU20 <sub>1247</sub>	20,97	0,00000	36,07	36,09
		7	oM02 <sub>640</sub>	15,01	0,00016		
		2	rBM 165*	23,72	0,00000		
		NL	oGATS 91*	9,13	0,00298		
		10	oBMd-20*	4,51	0,03533		
		9	oBM 210*	5,65	0,01873		
SEPLA	oM02 <sub>640</sub>	2	oC08 <sub>1514</sub>	23,52	0,00000	14,03	21,92
		7	osH13*	10,85	0,00123		
		9	rBM 210*	4,19	0,04226		
SEVAG	oF10 <sub>1050</sub>	5	rAU20 <sub>1247</sub>	14,36	0,00021	23,62	22,03
		9	rHábito IIIa	8,29	0,00456		
		7	osH13*	3,46	0,06456		
		1	oBM 161*	5,55	0,01977		
PRVAG	oOI16 <sub>540</sub> oC08 <sub>1514</sub> oM02 <sub>640</sub>	6	rQ04 <sub>3457</sub>	6,25	0,01350	17,13	26,03
		2	rBM 165*	19,79	0,00001		
		NL	oGATS 91*	9,41	0,00257		
		7	osBA16*	6,44	0,01224		
		10	oBMd-20*	4,05	0,04602		
		9	oBM 210*	2,84	0,09396		

<sup>a</sup> - marcadores descritos como associados por FALEIRO et al. (2003) e que foram excluídos; NL - não-ligado; \*- marcadores incluídos; Prob. - probabilidade; \*\* - não ajustado;

Os marcadores com iniciais *o* e *r* identificam os alelos provenientes dos genitores Ouro Negro e Rudá, respectivamente.

Características quantitativas: MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem) e PRVAG (produção média por vagem).

No Quadro 9, observa-se que o método de eliminação *stepwise* promoveu uma alteração nos marcadores associados com 6 características quantitativas e, conseqüentemente, nos valores de  $R^2$ . A alteração dos marcadores contribuiu para um aumento dos valores de  $R^2$  das características MAT, VAPLA, SEPLA e PRVAG. O número de marcadores descritos, como associados, por FALEIRO et al. (2003) e que foram excluídos na presente análise, variou entre 1 e 5 para diferentes características. O marcador oI19<sub>710</sub>, de menor efeito (dados não apresentados), foi excluído e o marcador BM 165 foi incorporado para as características MAT e P100. A eliminação de marcadores ligados próximos em um mesmo grupo de ligação é esperada, uma vez que estes possuem elevada correlação entre si, comportando-se como uma mesma variável. Alguns marcadores mostraram-se associados com mais de uma característica. O marcador BM 210 mostrou-se ligado às características VAPLA, SEPLA, P100 e PRVAG e o sH13 com VAPLA, SEPLA e SEVAG. O marcador BM 165 mostrou-se ligado a MAT, PRVAG e P100, explicando a variação fenotípica desta última em 10,28% (Quadro 8). Nenhum marcador SCAR ou microssatélite, utilizado no presente trabalho, manteve-se associado, pela análise de *stepwise*, às características FLOR e PRPLA (dados não apresentados).

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 9, conclui-se que os marcadores SCAR e os microssatélites foram úteis à identificação de QTLs. A associação destes marcadores com as diferentes características, mediante análises de regressão *stepwise*, promoveu uma alteração no valor de  $R^2$  da regressão múltipla. As características MAT, VAPLA, SEPLA e PRVAG, que apresentavam valores de  $R^2$  de 40,14; 28,99; 14,03 e 17,13 tiveram um aumento para 44,30; 34,53; 21,92 e 26,03, respectivamente.

### **3.6. Mapeamento de QTLs**

Os modelos lineares simples, como ANOVA e regressão linear, não necessitam das informações dos mapas de ligação, pois realizam a distribuição dos valores fenotípicos para cada marcador separadamente. Portanto, por utilizarem apenas diferenças entre as médias dos marcadores, não é possível estimar a magnitude do efeito do QTL nem sua posição no genoma (LYNCH & WALSH, 1997). Desse modo, foram utilizados os métodos de mapeamento por intervalo simples (LANDER & BOTSTEIN, 1989) e composto (ZENG, 1993 e 1994, JANSEN, 1993), no intuito de aumentar o

poder de detecção de QTLs e melhorar a precisão das estimativas do efeito e posição destes. Foi adotado o valor de LOD = 2,0, como ponto de corte para o mapeamento em todos os grupos de ligação, conforme sugerido por FALEIRO et al. (2003).

Os cofatores, utilizados no mapeamento por intervalo composto, foram selecionados por meio da regressão *stepwise*, com probabilidade de entrada e saída de 10%. De acordo com os resultados obtidos pelo mapeamento por intervalo simples (dados não apresentados) e os observados no Quadro 9, o mapeamento de QTLs foi realizado apenas para as características MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRVAG e para os grupos de ligação GL 01, GL 02, GL 07 e GL 09. Os grupos de ligação, que foram analisados para a presença de QTLs, bem como os resultados obtidos encontram-se no Quadro 10.

Quadro 10. Resumo dos resultados obtidos para o mapeamento de QTLs por intervalo composto, para as características MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG e PRVAG nos grupos de ligação GL 01, GL 02, GL 07 e GL 09

Características Quantitativas	Cofatores	Grupo de ligação	Marcador	Resultados
MAT	BM165, I16 <sub>774</sub> e BG10 <sub>446</sub>	02	BM165	O marcador foi incluído no QTL e não alterou a localização do mesmo.
VAPLA	sBA16, C08 <sub>1514</sub>	07	sH13	O marcador contribui para a identificação de um QTL, que não havia sido descrito.
P100	BA16 <sub>669</sub> , BM165	07	sBA16 e sH13	Os marcadores não foram incluídos no QTL anteriormente descrito.
	BA16 <sub>669</sub> , BM165	02	BM165	O marcador foi incluído no QTL e não alterou a localização do mesmo.
	BA16 <sub>669</sub> , BM165 e Z09 <sub>692</sub>	09	BM210	Não foi detectado QTL neste grupo de ligação.
SEPLA	sH13, C08 <sub>1514</sub>	07	sH13 e sBA16	Os marcadores alteraram a localização do QTL e estão flanqueando-o.
	sH13, C08 <sub>1514</sub>	02	BM165	O marcador foi incluído no QTL e não alterou a localização do mesmo.
SEVAG	man31.55 e F10 <sub>1050</sub>	01	BM161	O marcador não está participando do QTL, anteriormente descrito.
PRVAG	AD09 <sub>3210</sub> , BM165 e I16 <sub>774</sub>	02	BM165	O marcador foi incluído no QTL e não alterou a localização do mesmo.
		09	BM 210	Não foi detectado QTL neste grupo de ligação.

A Figura 3 ilustra os resultados obtidos no mapeamento por intervalo composto, nos grupos de ligação GL 02, GL 07 e GL 09 para a característica P100. Os QTLs mapeados por FALEIRO et al. (2003), ao longo de 9 grupos de ligação, encontram-se representados na Figura 3A. Os marcadores sBA16 e sH13 não se mostraram, pela metodologia utilizada, associados ao QTL identificado no grupo de ligação GL 07 (Fig. 3B). Embora o marcador BM 210 tenha se mostrado associado à característica P100 (Quadros 8 e 9), pode-se observar, na Figura 3D, que nenhum QTL foi encontrado no grupo de ligação GL 09. Por outro lado, o marcador BM 165 mostrou-se associado ao QTL, anteriormente identificado para o grupo de ligação GL 02 (Fig. 3C).

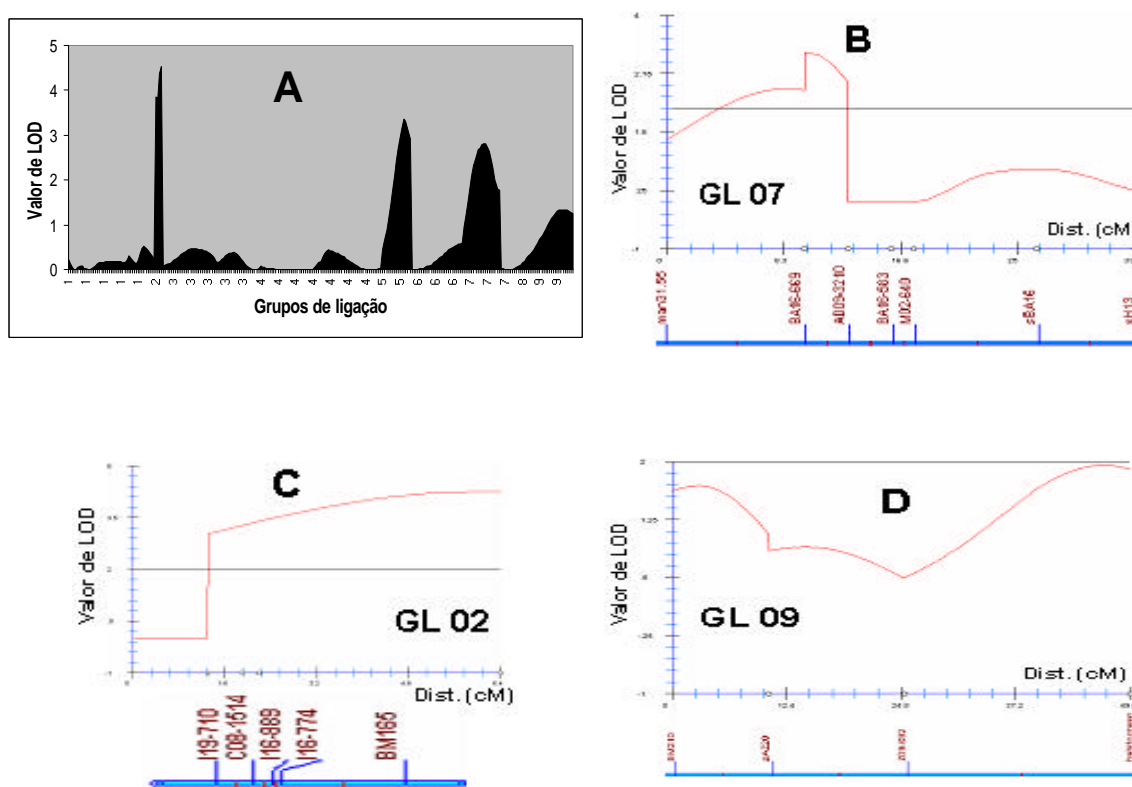


Figura 3. Mapeamento por intervalo composto nos grupos de ligação GL 02, GL 07 e GL 09 para a característica P100. A curva representa os valores de LOD, calculados para cada cM dos grupos de ligação. Considerou-se o limite de significância de LOD = 2,0. (A) Resultado obtido por FALEIRO et al. (2003); (B) mapeamento do GL 07, incluindo os marcadores sBA16 e sH13; (C) mapeamento do GL 02, incluindo o marcador BM 165; e (D) mapeamento do GL 09, incluindo os marcadores BM210 e sAZ20.

Os resultados obtidos no mapeamento por intervalo composto no grupo de ligação GL 07, para as características VAPLA e SEPLA, encontram-se na Figura 4. Na Figura 4A, observa-se no grupo de ligação GL 07, que nenhum QTL havia sido descrito para a característica VAPLA. A introdução do marcador sH13 neste grupo possibilitou a identificação de um novo QTL. O QTL encontra-se representado na Figura 4B e está flanqueado pelos marcadores sBA16 e sH13. Após a introdução dos marcadores microssatélite e SCAR, a localização do QTL identificado para a característica SEPLA no grupo de ligação GL 07 (Fig. 4C) também foi alterada. Na Figura 4D, observa-se que este QTL encontra-se flanqueado pelos marcadores SCAR sBA16 e sH13.

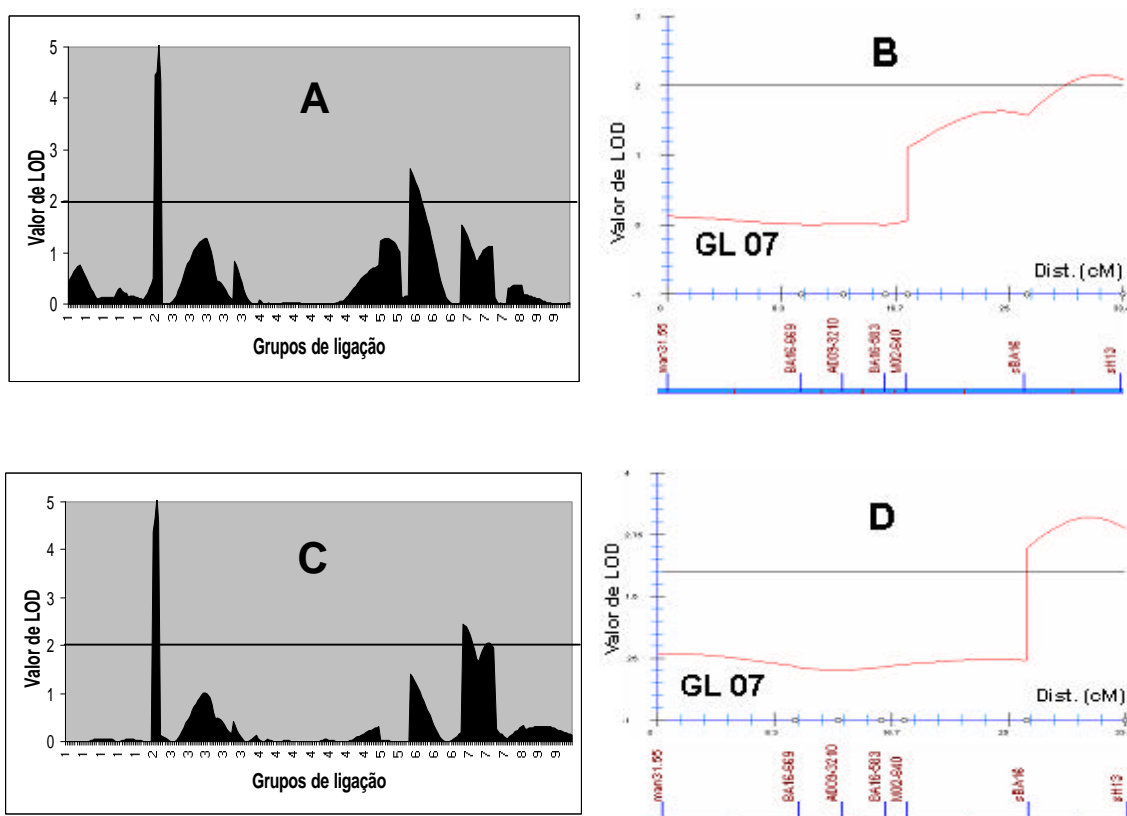


Figura 4. Mapeamento por intervalo composto para as características VAPLA e SEPLA no grupo de ligação GL 07. A curva representa os valores de LOD, calculados para cada cM dos grupos de ligação. O limite de significância considerado foi LOD = 2,0. (A) e (C) representam, respectivamente, os resultados obtidos por FALEIRO et al. (2003) para as características VAPLA e SEPLA; (B) mapeamento para a característica VAPLA no GL 07, incluindo os marcadores sBA16 e sH13; e (D) mapeamento para a característica SEPLA no GL 07, incluindo os marcadores sBA16 e sH13.

Pelos resultados apresentados no Quadro 10, conclui-se que os marcadores utilizados no presente trabalho foram úteis no mapeamento de QTLs. O mapeamento do marcador sH13, no grupo de ligação GL 07, possibilitou a identificação de um novo QTL para a característica VAPLA. Este marcador também mostrou-se associado ao QTL, anteriormente, descrito para SEPLA (FALEIRO et al., 2003). O marcador BM165 foi mapeado no grupo de ligação GL 02 e mostrou-se associado a 4 QTLs diferentes, identificados para as características MAT, P100, SEPLA e PRVAG.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A construção de mapas de ligação possibilita a identificação de regiões genômicas, que controlam características de interesse econômico, a quantificação dos efeitos e a identificação de marcadores moleculares associados a essas regiões. Uma vez identificados, os marcadores moleculares podem ser utilizados para assistirem programas de melhoramento genético, pois, aceleram significativamente a produção de cultivares com desempenho agrônomico superior. Nos trabalhos de mapeamento genético do feijoeiro-comum, observa-se que diferentes classes de marcadores moleculares têm sido utilizadas ao longo dos anos. Entre as diferentes classes, os marcadores moleculares baseados em PCR vêm sendo cada vez mais utilizados. Os microssatélites e o SCAR são classes de marcadores moleculares baseados em PCR, que possuem grande aplicação em análises genéticas porque não apresentam problemas de reprodutibilidade. Tanto na técnica de microssatélite quanto na de SCAR, o polimorfismo gerado por PCR pode ser visualizado e analisado de modo relativamente simples. Assim, no presente trabalho, foram testados 45 *primers* microssatélite e 9 *primers* SCAR entre os genitores de uma população de RIL's. Dos *primers* testados, 8 (15%) foram utilizados para caracterização de 154 RIL's. Destes, 7 foram mapeados em 10 grupos de um mapa parcial de ligação genética já existente e 1 permaneceu não-ligado. O mapa parcial de ligação já existente apresentou pequena variação no tamanho (247,8/252 cM) e número de grupos de ligação (9/10 grupos). Entretanto, por meio da análise de variância, foram constatadas associações significativas destes marcadores com diferentes características quantitativas. As associações mais significativas foram

obtidas por meio das análises de regressão *stepwise*, as quais promoveram alteração no valor de  $R^2$  da regressão múltipla. As características MAT, VAPLA, SEPLA e PRVAG, que apresentavam valores de  $R^2$  de 40,14; 28,99; 14,03 e 17,13, tiveram um aumento para 44,30; 34,53; 21,92 e 26,03, respectivamente. O mapeamento do marcador sH13, no grupo de ligação GL 07, possibilitou a identificação de um novo QTL para a característica VAPLA. Este marcador também mostrou-se associado a um QTL, anteriormente, descrito para SEPLA. O marcador BM165 foi mapeado no grupo de ligação GL 02 e mostrou-se associado a 4 QTLs diferentes, identificados para as características MAT, P100, SEPLA e PRVAG.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18: 265-273, 1995.
- ARUMUGANATHAM, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, 9: 208-218, 1991.
- BLAIR, M.W., PEDRAZA, F., BUENDIA, H.F., GAITÁN-SOLÍS, E., BEEBE, S.E., GEPTS, P., TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1362-1374, 2003.
- BONIERBALE, M.W., PLAISTED, R.L., TANKSLEY, S.D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. **Genetics**, 120:1095-1103, 1988.
- CHASE, C.D., ORTEGA, V.M., VALLEJOS, C.E. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 81: 806-811, 1991.
- COSTA, M.R. **Introgessão de Genes de Resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha-angular no Cultivar de Feijão Diamante Negro**. Viçosa: UFV, 2004. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- CROUZILLAT, D., LERCETEAU, E., PETIARD, V., MORERA, J., RODRIGUEZ, H., WALKER, D., PHILLIPS, W., RONNING, C., SCHNELL, R., OSEI, J., FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 93:205-214, 1996.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.

- EDWARDS, M.D., STUBER, C.W., WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I: numbers, genomic distribution, and types of gene action. **Genetics**, 116:113-125. 1987.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G., FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18. 1999.
- FALEIRO, F.G. **Melhoramento e mapeamento genético do feijoeiro-comum: análise de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças**. Viçosa: UFV, 2000. 177 p. (Tese – Doutorado).
- FALEIRO, F.G., SCHUSTER, I., RAGAGNIN, V.A., CRUZ, C.D., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38: 1387-1397, 2003.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- 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**, 42:2128-2136, 2002.
- GALE, M.D., CHAO, S., SHARP, P.J. RFLP mapping in wheat - progress and problems. In: GUSTAFSON J.P. (Ed.). **Gene manipulation in plant improvement**. Vol 2. New York: Plenum Press. 1990. p. 353-364.
- GEPTS, P.L., DEBOUCK, D. Domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: SHOONHOVEN, A.V., VOYSEST, O. (Eds.) **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p7-53.
- GUIMARÃES, C.T. **Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 70p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., WRIGHT, S., SCHAEFER, A., NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, 72:761-769, 1986.
- JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, 49:227-231, 1993.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenic**, 12:172-175, 1944.

- LANAUD, C., RISTERUCCI, A.M., N'GORAN, A.K.J., CLEMENT, D., FLAMENT, M.H., LAURENT, V., FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 91:987-993, 1995.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, 121:185-199, 1989.
- LANZA, M.A., PAULA JÚNIOR, T.J., VINHADELLI, W.S., MORANDI, M.A.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, 22: 560-562, 1997.
- LYNCH, M., WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 990p.
- MIKLAS, P.N., DELORME, R., STONE, V., URREA, C.A., BEAVER, J.S., STEADMAN, J.R. A RAPD map of disease resistance traits in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:93-94, 1998.
- NODARI, R.O., TSAI, S.M., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:513-520, 1993.
- PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press, 1998. 305p.
- QUEIROZ, V.T. **Mapeamento Genético do Cacaueiro e Identificação de QTLs para Resistência à Vassoura-de-Bruxa**. Viçosa:UFV, 1999. 62p. (Dissertação - Mestrado em Agroquímica).
- QUEIROZ, V.T., GUIMARÃES, C.T., ANHERT, D., SCHUSTER, I., DAHER, R.F., PEREIRA, M.G., MIRANDA, V.R.M., LOGUERCIO, L.L., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, 122:1-5, 2003.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLARD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 237-238, 2004a.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., COSTA, M.R., SANGLARD, D.A., ARRUDA, K.M.A., SOUZA, T.L.P.O., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 249-250, 2004b.
- QUEIROZ, V.T., SOUSA, C.S., SOUZA, T.L.P.O., SANGLARD, D.A., RAGAGNIN, V.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean

- rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 271–272, 2004c.
- RAGAGNIN, V.A., SANGLARD, D.A., SOUZA, T.L.P.O., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Pérola assisted by molecular markers. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 46: 159-160, 2003.
- SILVA, G.F., SANTOS, J.B., RAMALHO, M.A.P. Tagging resistance allele of the common bean to angular leaf spot by SSR and RAPD markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:155-156. 2003.
- TANKSLEY, S.D., BERNATZKY, R., LAPITAN, N.L., PRINCE, J.P. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 85:6419-6423, 1988.
- VALLEJOS, C.E., SAKIYAMA, N.S., CHASE, C.D. A molecular marker-based linkagem map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, 131: 733-740, 1992.
- VIEIRA, C., ARAÚJO, G.A.A., CRUZ, C.D. **Comportamento de cultivares de feijão no plantio de outono/inverno**. In: VIEIRA, R.F. (Ed.). Projeto Feijão - Relatório 88/92. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG. 1992. p. 71-76.
- XIAO, J., LI, J., YUAN, L., TANKSLEY, S.D. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. **Theoretical and Applied Genetics**, 92:230-244, 1996.
- WILLIAMS, C.G. QTL mapping in outbred pedigrees. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press LLC, 1998. p.81-94.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 90:10972-10976, 1993.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, 136:1457-1468, 1994.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil têm visado, sobretudo, a resistência a doenças e o aumento da capacidade produtiva. A identificação e a utilização de fontes de resistência, visando à piramidação de genes, são procedimentos necessários ao desenvolvimento de novos cultivares. A piramidação de genes de resistência representa a estratégia mais eficiente para o desenvolvimento de variedades comerciais de feijão com amplo espectro de resistência. Entretanto, o processo de piramidação por métodos convencionais é dificultado, devido a interações epistáticas entre genes de determinadas raças do patógeno e à necessidade de inoculações múltiplas. Por outro lado, a identificação e utilização de marcadores moleculares estreitamente ligados aos genes de resistência têm auxiliado, enormemente, os programas de piramidação.

Atualmente, a principal técnica de análise genética utilizada no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro BIOAGRO/UFV envolve marcadores RAPD. Tais marcadores têm sido, extremamente, úteis à seleção de genótipos com genes de resistência a vários patógenos. Entretanto, os marcadores RAPD apresentam natureza dominante e podem não apresentar reprodutibilidade de resultados. Em virtude das limitações apresentadas por tal classe de marcadores, o presente trabalho objetivou mapear, desenvolver e validar marcadores moleculares para auxiliar o desenvolvimento dos programas de melhoramento genético do feijoeiro-comum.

Alguns dos principais marcadores RAPD, associados a genes de resistência a doenças que atacam a cultura do feijão no Brasil, foram convertidos em marcadores

SCAR e validados. A técnica de SCAR não apresenta problemas de reprodutibilidade. Os *primers* SCAR apresentam seqüência específica e por isso podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma. Estes marcadores podem servir para propósitos de mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo de interesse. Foram validados 4 *primers* SCAR para mancha-angular, 1 *primer* para ferrugem e 4 *primers* para antracnose. Os marcadores SCAR, desenvolvidos no presente trabalho, já estão sendo utilizados no Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro BIOAGRO/UFV. Estes marcadores têm sido utilizados em associação com dados de avaliação fenotípica, para aumentar a eficiência de seleção em programas de melhoramento. Os *primers* SCAR, que se mostraram monomórficos, poderão ser úteis, futuramente, caso sejam validados em cruzamentos envolvendo outros cultivares.

A utilização de marcadores microssatélite, nos programas de melhoramento do feijoeiro-comum, representa outra alternativa para contornar os problemas apresentados pelos marcadores RAPD. Entretanto, o número de *primers* microssatélite para essa cultura é ainda limitado. Com o objetivo de desenvolver *primers* microssatélite, foram construídas bibliotecas enriquecidas para as repetições GGC, CCA e AT. A partir dessas bibliotecas, foram identificados 301 clones positivos. Destes, 153 foram sequenciados e 40 (26%) apresentaram fragmentos com microssatélites. Até o momento, foram desenhados e testados apenas 10 pares de *primers*. Destes, 5 pares amplificaram fragmentos de DNA de tamanho esperado e bem definidos. Entretanto, esses *primers* foram monomórficos, quando testados entre diferentes cultivares andinos e mesoamericanos. Como apenas 10 *primers* microssatélite foram testados, não é possível tirar conclusões definitivas. Por outro lado, pode-se afirmar que o nível de enriquecimento das bibliotecas para fragmentos contendo microssatélites foi satisfatório.

Outra estratégia que pode ser utilizada, para auxiliar os programas de melhoramento, é a construção de mapas genéticos utilizando marcadores moleculares. Por meio da construção desses mapas, é possível a identificação de marcadores moleculares associados a regiões genômicas, que controlam características de interesse econômico. Assim, foram testados 45 *primers* microssatélite e 9 *primers* SCAR entre os genitores de uma população de RIL's. Dos *primers* selecionados, 7 foram introduzidos em um mapa parcial de ligação genética já existente e 1 permaneceu não-ligado. Por

meio das análises de regressão *stepwise*, foram constatadas associações significativas destes marcadores com diferentes características quantitativas. As características MAT (número de dias até a maturação), VAPLA (número médio de vagens por planta), SEPLA (número médio de sementes por planta) e PRVAG (produção média por vagem), apresentaram aumento nos valores de  $R^2$ . O mapeamento do marcador sH13 possibilitou a identificação de um novo QTL para a característica VAPLA. Este marcador também se mostrou associado a um QTL, anteriormente, descrito para SEPLA. O marcador BM 165 mostrou-se associado a 4 QTLs diferentes, identificados para as características MAT, P100 (peso de 100 sementes), SEPLA e PRVAG.

## **APÊNDICE**





















Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
AT/57	270 pb	(CAT) <sub>3</sub> (CAC) <sub>5</sub>	Composta	24 pb

ACTTAACATCAATCTCTCAAATGGTGACATAGATGTGATGCATTCTCCCATGTTTCCAGCACTTGGACCAACATCATAAGCACCACCAGGACCAACATTGC  
CTTCTTTCAGCATGGTATCCAACATCATCATCACCACCACCACCAGGTTCTCCTTCATCATCTTCAGCATGAATGTCACCTTGAGGAAC TAGGCTTCTGC  
TAGCAAGGCTTAGAAAAACGGAATTGCGGTACGGTGGGACCTTTCTTGACCTTTCACATCTTCAGT

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
AT/58	316 pb	(TGG) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb

TCTTCTTCAGCCGATTACCCTAAATTCATATAAAAAAGAGATAAAAAAGAATACCAGAGTCATGATCTAATTAAGACACACTAAAATAATTTAGACCAAAA  
ATTGAGTGACCTAAATCACATTTTATCCCTAAAGTATGAAAAAATTTACCAGCCTCGGAGGAAACGAAAAGCAATTCAGGCTCCTGGTGGTGGTGGTATGCG  
CCACATGCTGGTGGTGGTGGTAGTCGTAGTGGCGGAGGAGGTGGCGGAGGATACCCGTTATCGAAATACCCCTGGTACGAGTCATATGGCGGACGCGGCGGA  
GGATAACCCCGT

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/02	402 pb	(TGA) <sub>2</sub> (TGT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

ACGTAATTCACGGAAATATATGGATAATCATCGCAAGACCCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCGGGGAAAT  
TCGAGCTGGTCACCATGCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTGATGATGTTGTTGGGTTTGACCGTTCACCTCAGCACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGAAAA  
TAAGCCATCGCCGCCACCCTCAACACGGGTTCCCTTGACCGTGGATGAAGTGTGTTGCCAAAACCAAATCCAAAGTTGCATGGTACACCAAGTACCT  
GGAACAACCCCTTAGGGAAGGGCTGCTTCTCTTCATCACACTCACAATAGGGTGGCCTTTGTATTAGCCTTCAATGTCTCTGGCAGACCCCTATGGA

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/09	199 pb	(CTT) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	Composta	12 pb

CTACTTTCGAAGTAACAGAAAGAAAAGCAACGACTGGAGTGGGAGAGTCAGAGTCGAAAAGAGGATTCTCACTTCTTTCTCTCATTCAAACCGTGCATG  
AGACTTTCATCTCGCACGGCTCCTAAGTGATAAAAAGAAAGAGGATGAGTCTTCTTCTTTTGGATTACTTCTCTCGCGTATGTATAAGACCGAATC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/12	210 pb	(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub> (GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta Composta	12 pb 12 pb

GCTTCGGGGAGTTGAAAAAAGCGTAGATCCGGAGATTCCCGATATAGGTCAACCTTTTCGAACTGCTGCTGAATCCACGGGCAGGCAAGAGACAACCTGGT  
GAACTGAAACATCTTAGTAGCCAGAGGAAAAGAAAGCAAAAGCGATTCCCGTAGTAGCGGAGCGGAAATGGGAGCAGCCTAAACCGTGAAAACGGGGTTG  
TGAGAGAG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/27	251 pb	(CT) <sub>3</sub> (GCC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

CCACTTGGCTACTGACCACCGATCATCGTCTCTGGATGATCTGTCCCCGACCTCTCTGCCGCTGATCTGTGGTGGTCACTTGGTTACGGACCCCGAT  
CACCTCTCTGGCGATCGTCTCCCTGATCTCCCTGCCACCTGGTCCACGTGTCAACCTGCGGGTGGTCCACGTGGTCCCTACTGCTGACGTCATCTACG  
ACCGATGACCGATCGGATCACAAGCCCGCTAGTCTCGAGCTGTGAAT

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/34	252 pb	(GGT) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub>	Composta	12 pb

AGTTCTCGACTCGAGACTAGGGGGCTTGTGATCCGATCGGTCATCGGTAGTCGATGACGTCAGCATCAGAGAACCACGTGGACCACTCGCAGGGTGACACG  
 TGGACCAGGTGGTAGAGAGTTCGGGGGGGACGATCGCCAAGAAAGGTGATCGGTGGTCAGTAACCAAGTGACCACCAACAGATCAGGCGACAGAGAGTTCG  
 GGGGACAGTTCATCCAGAGTGGTGGATCGGTGGTCAGTAGCCCAAGTGG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/35	235 pb	(GTT) <sub>2</sub> (AC) <sub>3</sub>	Composta	12 pb

ACTTGCCCCGACGGCCGGGTATAGGTCGCGCGCTTTAGCGCCATCCATTTTCGGGGCTAGTTGATTTCGGCAGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGATT  
 TCGACTTCCATGACCACCGTCTGCTGTCTTAATCGACCAACACCCTTTGTGGGGTCTAGGTTAGCGCGCAGTTGGGCACCGTAACCCAGCTTCCGGTTCA  
 TCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/36	203 pb	(ACG) <sub>2</sub> (ACC) <sub>2</sub> (CAC) <sub>4</sub>	Composta Perfeita	12 pb 12 pb

AGTTCACCGCATCCACGATCACCGAGCACCCGACCAACGACGACCACCAACTGCATACCACCGAGTCATACCCATTGACCACCACAACCGACACC  
 ACCGGGGAGTCACACACCACCACGACCAACTTGCACCACACTATCAACCTACACGGACCTTTCACCAAGTCCAAACTCTTGCCGAGCACATCCA  
 G

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/44	210 pb	(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

GCTTCGGGGAGTTGAAAATAAGCGTAGATCCGGAGATTCCCGATATAGGTCAACCTTTTCGAACTGCTGCTGAATCCACGGGGGGCAAGAGACAACCTGGT  
 GAACTGAAACATCTTAGTAGCCAGAGGAAAAGAAAGCAAAAGCGATTCCCGTAGTAGCGCGAGCGGAATGGGAGCAGCCTAAACCGTGAAAACGGGGTTG  
 TGGGAGAG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/46	205 pb	(TA) <sub>2</sub> (GTTT) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

AATTCAGACTGTGCAAACTGCGAATGGGTCATTAAATCAATTTATAGTTTGGTTGATGGTATCTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACG  
 TGCAACAAACCCGACTTCTGGAAGGGACGCATTTATTAGATAAAAAGGTCAACGCGAGGCTCGCCTGTTGCTTTGATGATTCATGATAACTCGTCGGATCG  
 CAC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/47	205 pb	(GT) <sub>3</sub> (AAC) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

TGGCGATGCGGGATGAACCAAGCTGGGTTGGGGTGCCCAACTGCGCGCTAACCTACACCCCAAAAGGGTGTGGTTCGATTAAGACAGCAGGACGGTGGT  
 CATGGAAGTCGAAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCAACTAGCCCCGAAAATGGATGGCGCTAAAGCGCGGACCTATACCCGGCC  
 GTCGGGGCAAGTG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/59	296 pb	(CTT) <sub>2</sub> (CTG) <sub>2</sub> (TTCG) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	12 pb 12 pb

ACCCCTTTACTTCTTCGCTGATTTTCCCTGCATTTTAAACCGATTTCGGTGCATCCATTAACCTGTCTGGTGCATACGCTGTGGCTGTTTCTTCTGTTTC  
TCCCTTCTCGTAACTTAGGCTTCGTCTCCATTACAACGAACCTTCGTTTCGTTTCGTTTTCATCCTTCTTTCACGATCGAGTCAGCCTCTGGCAAACCT  
GGCTACACCTTTGCCCTTTCTTTTCTTTTTCAGTTTCCGCGATGGCTCGCTGCAAAGATCCACCCCAAATACTTCTCCCTCGCTCACGAACC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
CCA/60	288 pb	(TGGT) <sub>2</sub> n(GTG) <sub>3</sub>	Imperfeita	14 pb

CTATTTTAAACGGTGGTGGTTCGTGGTGGTAAGTGTGCGTGTTCACAGTGGTGGTGTGCGTAGGCGTGCCTATTTGACGGTGGTGGTGGTGGTGG  
TGGTGGGCGACTGTTTGGAGCGGTGG  
GGCATAGGTGAGTGGTATGGGTGATCCAAAGGTAATAGCATTTTGATTGTGTGTTTAGTATTGCTTATTTTCTAGAGTAC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/28	126 pb	(CGG) <sub>4</sub> (CGA) <sub>3</sub>	Composta	21 pb

TTATTTCAATTCAATTCGCCCCATTGCTATCGTGTGTTCGATTACAGAGAAATACCTGACGAGGTTTACCGGAATCTGGAGGGGCTCGGCGGCGGGC  
GCGACGACGACAAGTGGTGGGAGGT

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/28 A	171 pb	(AT) <sub>3</sub> (TAG) <sub>2</sub>	Composta	12 pb

ATTTCTGTGGAAAGAGTCACAATGATAGTATGTTGGAACCAAGGAAAGAGGGATTATCAACTGGGAAAAAGGGAGGCACAAAAAATATATTAGTAGA  
GAATAATAGTGAACGGCTACAGTTGGGAATATTGTTGGGGGTGGGAAGATGACCTAATCTGCAGTGGG

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/170	260 pb	(GCATT) <sub>2</sub> (TGC) <sub>2</sub>	Composta	16 pb

CAATCTTTTTTTTAGCAGTCTTCATTGGTGCATTTATTTTTTTAGCAGCATCTTTGTGCAATTAATTTTCTGGGAGCATTGCAATTAT  
TTTTTTGGACAGCCTTAATGTTGCACTTTTTTTCTTATCTTTCTCCACTGACCACCCTTGCACCGTTACTGCCAGCCCCATTGACCGTCCGCGA  
CCGCCCGCTGATACGCCGGAACCGCCACTGGCAACCGGAACTGCTGCCGAAAT

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/179	188 pb	(CA) <sub>2</sub> (TCCC) <sub>2</sub> (CCG) <sub>4</sub>	Composta Perfeita	12 pb 12 pb

GAATTTGAGACTTTTACCACCAAAAATATTCTTAAATGAAGGCCACCCAAACCCCATCCCTCCACTGCCGTACCGCCGCGCGCTGCCTCCT  
CGCTCCACAAACCCAAATTTCTGATCGCCACGCCCTCATGATGCAGCGGATTTTCGGACTGTTAGGGTACGGAGCCCCGGGAACC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/198	218 pb	(CGC) <sub>4</sub> (CG) <sub>2</sub> (CAC) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Perfeita Composta	12 pb 14 pb

GCCGCCGTGCGCTTACGCGAACCATCGCGAACGCTGCGTTGCGCCGCGCGCTTCGCGCACCCCGCGAACGCTCCGCTTTCGTGCTCTCTGCTTCG  
TGCTCTCCGCTTCGCGATCGCTCCGCCACTGCCTCCGCTCCGCTCAGTGCCTTTCTCTGCACTGCCTTTCGTTAATTTTTGGTGAATTTATAAT  
GGCTAGTGAAGAACC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/249	274 pb	(CGG) <sub>4</sub> (CAA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub> (GC) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Perfeita Composta	12 pb 24 pb

TGATCGTCGGCAACGCGGCCAATAACGTGCTGAAAGCGCGGGTAAACGACGTACTGTTCCGGCGGGCGGGCGGATGAGCTGTGGGGCGGTGCCGGTAAAGACATCTTCGTGTTCTCTGCCGCCAGCGATTCCGCACCGGGCGCTTCAGACTGGATCCGCGACTTCCAGAAAGGGATCGACAAGATTGATCTGTCTGTTCTTCAACAAGAGGGCGAGAGCAGCGACTTCATTCACTTCGTGATCACTTCAGCGGGCGGGCGGTGAAGC

Colônia/Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
GGC/260	196 pb	(GCA) <sub>4</sub>	Perfeita	12 pb

ACGCGTCGCTGCACTCCTCCACCAGCCCGCAGCAGCAGCACTTCACGGACGACACCGCCGCTCCGCGGCTCCGCGAGTCATCTCCGCCGCGTTCATCGACTTTGTCTCTTTTCAAGACCTTCGCCGCATACCTACAAACCCATCAAATTAGATAAGAATTACACGAACAGCTTCTGTAGCAAGGCCTTAGAAAA

Seção 4. Padrão de segregação dos fragmentos amplificados pelos *primers* microssatélite e SCAR nos genitores Ouro Negro (ON) e Rudá, e em cada uma das 154 RIL's. O alelo presente no cultivar Ouro Negro foi codificado como (2) e o alelo presente no cultivar Rudá como (0). O número (9) foi atribuído a dados perdidos.

	BM161	BM165	BMD20	GATS91	BM210	sAZ20	sBA16	sH13
ON	2	2	2	2	2	2	2	2
Rudá	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	2	0	0	0	2	2
2	0	0	2	2	2	2	0	0
3	2	0	2	2	0	0	2	2
4	2	0	2	2	2	2	2	2
5	0	0	2	0	2	0	0	0
6	2	0	2	0	2	2	0	0
7	0	2	0	0	2	2	0	0
8	2	0	2	0	2	2	0	0
9	0	2	2	2	0	0	2	2
10	0	2	2	0	0	0	0	0
11	0	2	0	2	0	0	2	2
12	2	2	2	0	0	0	0	0
13	0	0	0	2	2	2	0	0
14	2	0	0	0	0	0	2	2
15	2	2	0	0	0	0	0	2
16	0	0	2	0	2	2	2	2
17	0	2	0	2	0	0	0	2
18	0	2	2	0	0	0	2	2
19	2	2	0	0	2	2	0	2
20	2	0	2	2	2	2	0	0
21	0	2	2	2	0	0	0	0
22	2	0	0	0	2	2	2	2
23	2	2	0	0	2	2	2	2
24	0	0	2	2	0	0	0	2
25	0	2	2	2	2	2	2	2
26	2	0	0	2	2	2	2	0
27	0	2	2	0	2	2	2	2

28	0	2	0	0	2	2	0	0
29	0	0	2	2	0	0	0	0
30	0	0	0	2	0	0	2	2
31	0	2	2	0	0	0	2	2
32	2	2	2	0	0	2	2	2
33	2	2	0	2	0	0	2	0
34	0	0	0	0	0	0	2	0
35	0	0	0	2	2	2	0	2
36	2	2	0	2	0	2	2	0
37	0	0	0	2	0	0	2	2
38	2	0	2	0	0	0	2	2
39	0	2	2	2	2	2	2	2
40	0	2	2	0	2	0	2	2
41	0	2	2	0	2	2	2	2
42	0	0	2	0	0	2	2	2
43	2	2	2	2	2	2	0	0
44	0	2	2	2	2	2	2	2
45	0	0	0	2	0	2	0	0
46	0	0	2	2	2	2	2	2
47	0	0	0	0	2	2	2	2
48	2	2	0	2	0	0	2	2
49	2	2	0	0	0	0	0	0
50	2	2	0	0	0	0	0	0
51	0	2	0	0	2	2	2	2
52	0	2	2	0	2	2	2	2
53	0	2	0	0	0	0	0	0
54	2	2	0	2	2	0	2	0
55	2	0	2	0	0	0	0	0
56	2	2	0	2	2	2	2	2
57	2	0	2	0	0	0	0	0
58	2	0	2	0	0	2	2	2
59	0	2	2	2	2	0	2	2
60	0	0	2	0	0	0	0	0
61	0	0	0	2	0	0	0	0
62	2	0	0	0	0	0	0	0
63	2	0	2	0	0	0	2	2
64	2	2	2	0	0	0	0	0
65	2	2	0	2	0	0	0	0
66	2	2	2	0	0	0	0	0
67	0	0	2	0	0	0	2	2
68	2	2	2	0	0	0	2	2
69	0	2	0	2	0	0	0	0
70	0	2	2	0	2	2	2	2
71	0	0	2	2	0	2	0	0
72	0	0	2	2	0	0	0	0
73	2	0	2	0	2	2	0	0
74	2	2	2	0	0	0	2	2
75	0	2	0	2	0	0	2	2
76	2	2	2	2	0	0	0	0
77	2	0	2	0	0	0	0	0
78	2	0	0	2	2	2	0	0
79	2	0	0	2	0	0	0	0

80	2	0	0	0	0	0	2	2
81	2	0	0	2	0	2	2	2
82	0	0	2	0	2	2	0	0
83	0	2	0	0	0	0	0	0
84	0	2	0	0	2	2	0	0
85	0	0	0	2	2	2	0	0
86	2	2	0	0	0	2	0	0
87	0	0	0	2	2	2	2	2
88	2	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	2	0	2	2	2	2
90	2	2	2	0	0	0	0	0
91	2	2	2	2	2	2	0	0
92	0	2	0	0	2	2	0	0
93	0	0	2	2	0	0	2	2
94	2	2	2	2	2	2	2	2
95	2	2	2	2	0	0	2	2
96	2	2	0	0	2	0	2	2
97	0	0	2	0	0	2	2	2
98	2	0	0	2	0	0	2	2
99	2	0	2	0	2	2	2	2
100	0	0	2	0	0	0	2	2
101	0	2	0	0	0	0	2	2
102	0	2	0	2	2	2	2	2
103	2	0	2	2	0	0	0	0
104	2	0	2	0	0	0	0	0
105	0	2	2	2	2	2	2	2
106	2	2	2	0	0	0	2	2
107	2	2	2	0	0	0	2	2
108	2	0	2	2	2	2	2	2
109	0	0	2	2	2	2	2	2
110	0	2	0	0	0	0	2	0
111	2	0	2	0	2	2	0	2
112	2	0	0	0	2	2	2	0
113	2	2	0	0	0	0	0	2
114	0	2	0	2	2	2	2	0
115	2	2	2	0	9	0	2	2
116	0	2	0	0	0	0	2	2
117	0	0	2	2	0	0	0	0
118	2	0	0	0	2	2	0	0
119	2	2	2	0	0	0	2	2
120	0	2	2	2	2	2	0	0
121	0	0	2	0	2	2	2	2
122	2	2	0	0	2	0	0	0
123	0	0	0	2	0	2	2	2
124	9	0	2	2	2	2	2	2
125	2	2	0	2	2	2	2	0
126	2	2	0	0	2	2	2	2
127	2	0	2	2	0	0	0	0
128	2	0	2	2	0	0	2	2
129	2	2	0	9	0	2	0	0
130	2	0	2	0	0	2	0	0
131	0	2	0	0	2	0	2	2

132	2	0	0	0	2	2	2	2
133	0	2	2	2	2	2	2	2
134	2	2	0	2	2	2	2	2
135	0	2	0	2	2	0	2	2
136	2	2	2	2	2	2	2	2
137	2	2	2	0	2	2	2	2
138	2	2	2	0	0	0	0	0
139	2	2	0	0	2	0	0	0
140	2	0	0	2	0	0	0	0
141	0	2	0	2	0	0	0	0
142	0	2	0	2	0	0	0	0
143	0	0	2	0	2	2	2	2
144	0	0	2	0	2	2	2	2
145	0	2	0	0	0	0	0	0
146	0	0	0	0	0	0	2	2
147	0	0	0	2	2	2	2	2
148	0	0	9	2	0	0	0	0
149	0	2	2	0	0	0	2	0
150	2	2	2	2	0	2	0	0
151	0	2	0	0	0	2	2	0
152	0	2	2	2	0	2	2	2
153	0	2	0	0	0	2	2	2
154	0	2	2	0	0	2	2	0