

**GISELLY FIGUEIREDO LACANALLO**

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE MARCADOR RAPD  
ASSOCIADO AO GENE *Co-13* DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE  
EM FEIJOEIRO COMUM**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO – 2008**

**GISELLY FIGUEIREDO LACANALLO**

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE MARCADOR RAPD  
ASSOCIADO AO GENE Co-13 DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE  
EM FEIJOEIRO COMUM**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

L129i Lacanallo, Giselly Figueiredo, 1979-  
Identificação e mapeamento de marcador RAPD  
associado ao gene Co-13 de resistência à antracnose  
em feijoeiro comum / Giselly Figueiredo Lacanallo. -  
- Maringá, 2008.  
58 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Celeste Gonçalves-  
Vidigal.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, 2008.

1. Feijoeiro - Antracnose - Marcador molecular.  
2. Feijoeiro - Mapeamento genético. 3. Feijoeiro -  
Fungo (*Colletotrichum lindemuthianum*). I. Gonçalves-  
Vidigal, Maria Celeste, orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 635.652

A meus pais Neusa e Arnaldo, que não mediram esforços para que esse sonho fosse realizado.

A minha irmã Luciana e ao cunhado Guto pelo incentivo, amizade, carinho, compreensão.

Aos amigos, em especial a Dany, pelo apoio, amizade e pelas mãos acolhedoras em todos os momentos,

Com muita alegria e carinho dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre iluminar meu caminho, pela força e fé, que me fortalecem frente a todos os obstáculos da vida.

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade concedida à realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Celeste Gonçalves Vidigal, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao professor Dr. Pedro Soares Vidigal Filho, pela concessão do uso do Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas Aplicada à Agricultura (NUPAGRI), pela co-orientação e pela amizade.

À professora Dr<sup>a</sup>. Adriana Gonela, pela amizade e pelo estímulo.

Aos secretários Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pelos favores prestados, pela atenção e pela paciência.

Aos amigos de todas as horas Dany, Luciana, Guto, pela ajuda, incentivo, paciência nos momentos mais difíceis.

A prima Milene e toda sua família que, mesmo à distância, estiveram presentes nos momentos mais crítico, com muito carinho e amizade.

À técnica do laboratório, Kaciely C. Eing; e aos senhores Edmilson Galacini, Rogério e Engraci, pela amizade e pelos favores prestados.

À prima e amiga Kelly, pelos estímulos, compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos amigos Aline Orbolato, Claudete R. da Silva, Deivid Reche, Gislayne Coimbra, Heloisa Pastre, Maria Paula Nunes e demais colegas do NUPAGRI, pela amizade, companheirismo e dedicação em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*Muito obrigada !!!*

## BIOGRAFIA

Giselly Figueiredo Lacanallo, filha de Arnaldo Luiz Lacanallo e Neusa Maria de Figueiredo Lacanallo, nasceu em 04 de fevereiro de 1979, em Maringá, Estado do Paraná.

Colégio santa cruz 1993 e 1996

Em março de 2004, diplomou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá.

Em abril de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2005 concluiu o curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Maringá, iniciando no mesmo período o Curso de Doutorado na linha de pesquisa melhoramento do feijoeiro visando resistência à antracnose.

## ÍNDICE

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A cultura do feijoeiro comum .....	4
2.2. Antracnose do feijoeiro.....	5
2.2.1. Agente causal e sintomas.....	5
2.2.2. Variabilidade patogênica do <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	7
2.3. Fontes de resistência .....	10
2.4. Genes de resistência ao patógeno da antracnose do feijoeiro comum .....	12
2.5. Marcadores moleculares para resistência à antracnose do feijoeiro .....	16
2.6. Mapeamento genético .....	19
2.7. Cultivar Andina Jalo Listras Pretas.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Material vegetal .....	25
3.2. Preparo do inóculo, Inoculação e incubação.....	25
3.3. Método de avaliação dos sintomas .....	26
3.4. Extração de DNA e Construção dos bulks.....	27
3.5. Análise estatística dos dados .....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5. CONCLUSÕES .....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37



## RESUMO

LACANALLO, Giselly Figueiredo, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2008. **Identificação e mapeamento de marcador RAPD associado ao gene Co-13 de resistência à antracnose em feijoeiro comum.** Professora Orientadora: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Professores Conselheiros: Pedro Soares Vidigal Filho e Adriana Gonela

A cultivar Jalo Listras Pretas (JLP) é uma importante fonte de resistência à antracnose, doença ocorrente no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. Esse cultivar apresenta um dos três genes andinos de resistência (*Co-13*) identificados até o momento. Neste estudo, foi avaliada a população F<sub>2</sub> derivada do cruzamento entre JLP (resistente a raça 73) e Cornell 49-242 (suscetível a raça 73). A Análise de “Bulk” Segregante (BSA) foi utilizada para identificar marcadores moleculares RAPDs ligados ao gene de resistência à antracnose *Co-13*, presente em JLP. Dentre os primers RAPD utilizados, o OV20 (5’CAGCATGGTC3’) amplificou uma banda heteromórfica em 700 pb, em fase de acoplamento, ligada ao gene de resistência andino *Co-13*. Na genotipagem da população F<sub>2</sub> com o marcador OV20<sub>700</sub>, observou-se uma frequência de recombinação de 1,72%. A utilização deste marcador na análise de segregação da resistência na população de linhagens endogâmicas recombinantes (RIL’s) ajustou-se à razão de 1:1. Estes resultados demonstraram que o marcador OV20<sub>700</sub> está ligado ao gene de resistência *Co-13* a uma distância de 1,8 cM, mapeado no grupo de ligação B3 do mapa consenso do feijoeiro comum Jalo EEP558 x BAT 93. Assim, percebe-se que marcadores moleculares ligados a genes de resistência Andinos consistem em uma valiosa ferramenta de obtenção de cultivares com amplo e durável espectro de resistência, favorecendo assim, programas de melhoramento genético do feijoeiro.

Palavras-chave: Antracnose, mapeamento genético, marcador molecular

## ABSTRACT

LACANALLO, Giselly Figueiredo, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, december, 2008. **Identification and mapping of RAPD marker associated with the Co-13 gene of resistance to anthracnose in common bean.** Adviser: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Committee Members: Pedro Soares Vidigal Filho and Adriana Gonela

The cultivar Jalo Listras Pretas (JLP) is an important source of resistance to anthracnose, disease of great occurrence in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. This common bean cultivar presents the Co-13, one of the three Andean resistant genes currently identified. In this study, the F<sub>2</sub> population derived from the crossing between JLP (resistant to race 73) and Cornell 49-242 (susceptible to race 73) were evaluated. Bulked Segregant Analysis was utilized to identify Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers linked the gene Co-13 present in JLP. Within the RAPD primers utilized, the OV20 (5'CAGCATGGTC3') amplified a heteromorphic band in 700 pb, at coupling phase, linked to the Andean resistant gene Co-13. The F<sub>2</sub> population genotyping with the OV20<sub>700</sub> marker showed a recombination frequency of 1.72%. The use of this marker in the segregation analysis of resistance in the population of the recombinant endogamic lines (RIL's) fitted a ratio of 1:1. These results showed that the marker OV20<sub>700</sub> is linked to the resistant gene Co-13 at a distance of 1.8 cM, mapped on B3 linkage group of the consensus map of common bean Jalo EEP558 x BAT 93. Thus, the use of molecular markers linked to Andean resistant genes consists in a valuable source to obtain cultivars with wide and durable resistance spectrum, therefore, assisting common bean breeding programs.

Key-words: Anthracnose, gene mapping, molecular marker.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário internacional como maior produtor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), contribuindo com cerca de 17,3% da produção mundial (FAO, 2008). O feijoeiro comum é cultivado em todo território nacional, e a região Sul, compreendida pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, constitui a maior região produtora, contribuindo com aproximadamente 34,5% da produção nacional, seguida pela região Sudeste e Nordeste. Dentre estes estados, o Paraná é o principal produtor nacional, contribuindo com cerca de 24% da produção brasileira em uma área total de 563.300 hectares, onde são produzidas 795.300 toneladas de feijão (Conab, 2008).

Embora o Brasil, seja o maior produtor mundial do feijoeiro, sua produtividade ainda é considerada baixa (Assis, 2005). De acordo com dados da FAO (2008), quando comparado com os Estados Unidos, que apresenta uma área plantada 15,3% inferior, o Brasil apresenta-se com uma produtividade 44% menor que a desse país. Essa baixa produtividade é atribuída a vários fatores, como a incidência de doenças, a ocorrência de pragas, as deficiências nutricionais e períodos de estiagens (Vieira, 1983).

Dentre esses fatores o que mais se destaca é a ocorrência de enfermidades, onde a antracnose é apontada como uma das mais importantes. Essa doença tem como agente causal o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib., sendo que sua transmissibilidade tem sido observada, principalmente por meio do uso de sementes infectadas, que proporcionam significativas perdas econômicas (Rey et al., 2005).

O controle da antracnose pode ser atingido por meio de um conjunto de medidas culturais, químicas e genéticas, executadas de forma integrada e com caráter preventivo. Assim, o plantio de cultivares resistentes demonstra ser o meio mais efetivo e econômico, uma vez que reduz o uso de produtos agroquímicos (Mahuku e Riascos, 2004). Entretanto, a alta variabilidade genética do patógeno dificulta esse controle, pois com o tempo, tornam as cultivares resistentes em suscetíveis, indicando necessidade de introdução de novos alelos de resistência (Pastor-Corrales, 1995; Young e Kelly, 1996a).

Desta forma, torna-se perceptível a extrema importância da identificação constante desses novos alelos, que poderão ser incorporados nas cultivares, por meio de programas de melhoramento genético, ampliando o espectro de resistência e aumentando assim, a estabilidade de produção desta cultura.

Em todo o mundo, foram identificados cerca de 114 patótipos ou raças do *C. lindemuthianum* (Balardin et al., 1997; Mahuku e Riascos, 2004). Atualmente, só no Brasil, já foram identificadas mais de 57 raças desse patógeno (Rava et al., 1994; Andrade et al., 1999; Thomazella et al., 2002; Alzate-Marin e Sartorato, 2004; Talamini et al., 2004; Damasceno e Silva et al., 2007; Sansigolo, 2007).

Até o presente momento 13 genes de resistência à antracnose foram caracterizados e identificados no feijoeiro comum (Kelly e Young, 1996; Bassett, 2004; Kelly e Vallejo, 2004, Gonçalves-Vidigal et al., 2008; Gonçalves-Vidigal et al., 2009). Os genes e seus alelos foram nomeados como *Co-1* (Mc Rostie, 1919), *Co-1<sup>2</sup>* (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1<sup>3</sup>* (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1<sup>4</sup>* (Alzate-Marin et al., 2003a), *Co-1<sup>5</sup>* (Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006), *Co-2* (Mastenbroek, 1960), *Co-3*, *Co-3<sup>2</sup>* (Bannerot, 1965; Fouilloux, 1976 e 1979), *Co-4* (Fouilloux, 1976 e 1979); *Co-4<sup>2</sup>* (Young et al., 1998); *Co-4<sup>3</sup>* (Alzate-Marin et al., 2007), *Co-5* (Young et al., 1998; Alzate-Marin et al., 2007), *Co-6* (Schwartz et al., 1982; Gonçalves-Vidigal, 1994; Kelly e Young, 1996), *Co-7* (Pastor-Corrales et al., 1994; Young et al., 1998), *co-8* (Alzate-Marin et al., 1997), *Co-9* recentemente renomeado *Co-3<sup>3</sup>* (Geffroy et al., 1999; Rodríguez-Suárez et al., 2004, Mendez-Vigo et al., 2005; Alzate-Marin et al., 2007), *Co-10* (Alzate-Marin et al., 2003b), *Co-11* (Gonçalves-Vidigal et al., 2007a), *Co-12* (Gonçalves-Vidigal et al., 2008) e *Co-13* (Gonçalves-Vidigal et al., 2009)

Dos genes de resistência identificados em *P. vulgaris*, somente três deles (*Co-1*, *Co-12* e *Co-13*) são de origem andina, os quais estão presentes nas cultivares Michigan Dark Red Kidney, Jalo Vermelho e Jalo Listras Pretas, respectivamente (McRostie, 1919, Gonçalves-Vidigal et al., 2008 e Gonçalves-Vidigal et al., 2009).

Desse modo, pode-se ressaltar a importância do estudo com fontes de resistência andina já que somente o gene *Co-1*, têm sido valorizado no melhoramento de feijões mesoamericanos, de tal forma que as cultivares a serem

obtidas possam alcançar amplo espectro de resistência. Uma vez que os hospedeiros de origem Andina são mais resistentes às raças Mesoamericanas e hospedeiros mesoamericanos são mais resistentes às raças Andinas do *C. lindemuthianum*. Conforme Young e Kelly (1997) e Melotto e Kelly (2000), o gene *Co-1* de origem Andina confere resistência à raça 73 de origem Mesoamericana, enquanto o gene *Co-2*, de origem Mesoamericana confere resistência à raça 7, cuja origem é Andina. A combinação dos genes *Co-1* e *Co-2* em uma mesma cultivar é a melhor estratégia para o desenvolvimento de uma cultivar resistente a essas duas raças (Young e Kelly, 1997).

Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares tem facilitado a identificação de genes de resistência à antracnose (Adam-Blondon et al., 1994; Freyre et al., 1998; Alzate-Marin et al., 1999a; Faleiro et al., 2004; Kelly e Vallejo, 2004). A identificação de marcadores ligados a genes associados ao conjunto gênico Andino e Mesoamericano e a genes de resistência à antracnose será um avanço diretamente aplicável na caracterização e manutenção de recursos genéticos para disponibilizá-los aos programas de melhoramento da cultura.

Assim, o gene andino *Co-13* que confere resistência a oito raças de *C. lindemuthianum* destaca-se como uma relevante fonte de resistência passível de ser utilizada em programas de melhoramento. Porém, até o presente momento não foi identificado nenhum marcador molecular ligado a este gene. Assim, urge a necessidade de identificar marcadores moleculares ligados a genes de resistência andinos e a realização de trabalhos de mapeamento genético.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou identificar marcadores moleculares RAPD ligados ao locus de resistência à antracnose *Co-13*, presente na cultivar andina Jalo Listras Pretas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura do feijoeiro comum

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro, não somente por ser uma fonte rica em proteínas, mas também pelo alto teor de lisina, carboidratos, sais minerais, fibras alimentares e a presença de vitaminas do complexo B (Del Peloso et al., 2003). Além da sua relevância na dieta do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância socioeconômica, por ser cultivado em grandes áreas e por empregar elevada mão de obra durante seu ciclo (Vieira et al., 1999).

O feijoeiro comum é classificado como uma espécie predominantemente autógama, domesticada há mais de sete mil anos em dois centros de origem: a Mesoamérica (México e América Central) e a região Andina (Ansari et al., 2004). Porém, de acordo com dados sobre características morfológicas, tipo eletroforético da faseolina (proteína de reserva em sementes dos feijoeiros cultivados e selvagens), isoenzimas e marcadores RFLP (Gepts, 1988; Singh et al., 1991a; Haley et al., 1994), o feijoeiro foi agrupado em três centros de origem. Um na região central das Américas (Mesoamericano) e dois na América do Sul. No centro de origem mesoamericano, predominam germoplasmas de grãos pequenos (< 20g/100 sementes) e faseolina do tipo 'S'. No Sul dos Andes (Andinos) encontram-se os feijões de sementes graúdas (> 40g/100 sementes) e faseolina do tipo 'T' (e possivelmente também as dos tipos 'A', 'C' e 'H'). E o outro centro, de menor importância, no Norte dos Andes (Colômbia), com feijões de sementes pequenas e faseolina do tipo 'B'.

Por meio de estudos realizados por Singh et al. (1991a), Beebe et al. (2000), constata-se que o conjunto gênico Mesoamericano apresenta maior variabilidade genética quando comparado ao conjunto gênico Andino.

No Brasil, essa cultura apresenta uma ampla adaptação edafoclimática, o que permite o seu cultivo durante todo ano, em quase todos os Estados da Federação, destacando-se como maior produtor mundial de feijoeiro, contribuindo com 17,3% da produção mundial (FAO, 2008).

Dentre os Estados que cultivam *Phaseolus vulgaris* o Paraná destaca-se

como principal produtor nacional, contribuindo com cerca de 24% da produção brasileira, atingindo uma produção de 795.300 toneladas em uma área de 563.300 hectares, resultando em uma produtividade de 1.412 kg ha<sup>-1</sup> (Conab, 2008).

Embora o Brasil, seja o maior produtor mundial de feijão, sua produtividade ainda é considerada baixa (Assis, 2005). Essa baixa produtividade é atribuída a vários fatores, como a incidência de doenças, a ocorrência de pragas, as deficiências nutricionais e períodos de estiagens (Schwartz e Pastor-Corrales, 1989). Dentre esses fatores a ocorrência de enfermidades destaca-se entre os mais importantes, sendo a antracnose cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib, uma das doenças de maior importância desta cultura.

## **2.2. Antracnose do feijoeiro**

### **2.2.1. Agente causal e sintomas**

A transmissibilidade do patógeno, por meio das sementes, as perdas econômicas proporcionadas por essa doença e a ocorrência nas três épocas de cultivo qualificam a antracnose como uma das doenças fúngicas foliares mais importante do feijoeiro (Carbonell et al., 1999; Rey et al., 2005). A antracnose do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., é uma doença de caráter cosmopolita que ocorre, em todo o mundo, nas cultivares suscetíveis, adaptadas às regiões subtropical e temperada, especialmente sob condições de baixa a moderada temperatura e umidade elevada (Pastor-Corrales, 1988; Kelly et al., 1994; Kimati et al., 1997). Em temperaturas superiores a 25°C e inferiores a 18°C limitam tanto a infecção quanto o desenvolvimento do fungo. Além disso, a esporulação é abundante em temperaturas de 14 a 18°C nas vagens (Zaumeyer e Thomas, 1957).

O fungo *C. lindemuthianum*, foi descrito em 1878 por Saccardo e Magnus, como *Gloeosporium lindemuthianum*, com base em coletas feitas por Lindemuth

em Bonn, na Alemanha (Zaumeyer e Thomas, 1957). Scribner (1888), ao verificar a presença de setas, estruturas filamentosas produzidas entre os conidióforos e as margens dos acérvulos, transferiu-o para o gênero *Colletotrichum* (Barrus, 1921).

Este fungo pertence à classe dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), ordem Melanconiales, família Melanconiaceae (Kimati, 1980; Rava et al., 1994). Apresenta duas fases reprodutivas: uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita. Reproduz-se assexuadamente produzindo os conídios ou esporos assexuais, em um corpo de frutificação que recebe o nome de acérvulo (Sutton, 1992). O seu estado sexual é conhecido como *Glomerella cingulata* f. (Stonem Spaulde & V. Schrenk) sp. Nesta fase o fungo produz peritécio e ascos, dentro dos quais origina-se os esporos, denominados de ascósporos (Kimati, 1980).

O *C. lindemuthianum* é um patógeno necrotrófico, sobrevivendo de uma safra para outra como micélio dormente no interior das sementes ou em restos culturais na forma de esporos. As sementes contaminadas externamente por conídios, ou internamente pelo micélio dormente, constituem a mais importante via de disseminação a longa distância (Kimati, 1980). Respingos da água de chuva ou de irrigação podem disseminar os esporos a curtas distâncias (Costa e Rava, 2004). Outras formas de disseminação também podem ocorrer através de insetos, bem como de animais e do homem, durante os tratos culturais e implementos agrícolas (Kimati, 1980; Vieira et al., 1993).

Os sintomas podem ser observados em todos os órgãos aéreos da planta e em todos os estádios fenológicos (Sartorato et al., 2003), sendo eles visualizados no hipocótilo, pecíolo, caule, folhas, vagens e sementes (Kimati, 1980). Além de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos, tornando-os impróprios para o consumo (Alzate-Marin et al., 2003c).

O patógeno pode afetar as sementes e, ao atravessar o tegumento, produzir desde uma leve descoloração até lesões nos tecidos dos cotilédones. As lesões são cancrs ligeiramente deprimidos e de tamanho variado. As sementes infectadas são geralmente descoloridas, podendo apresentar cancrs cuja coloração varia de amarela a café-escura a negra (Zaumeyer e Thomas, 1957;



Chaves, 1980). Por outro lado, nas sementes que possuem tegumento negro, estes sintomas são mais difíceis de serem observados.

Por sua vez, nas folhas, a formação de lesões necróticas de coloração marrom-escura são primeiramente visualizados nas nervuras primárias da face abaxial. Estas lesões, ao se desenvolverem, dão origem a regiões cloróticas, fazendo com que as folhas se curvem para baixo (Kimati, 1980), diminuindo a área foliar da planta.

A antracnose é mais fácil de ser reconhecida nas vagens, onde as lesões que caracterizam os sintomas se apresentam de forma arredondada, deprimida, de tamanho variável e com o centro claro sendo delimitadas por um anel negro, um pouco saliente, rodeado por um bordo de cor café avermelhado (Chaves, 1980; Kimati, 1980; Pastor-Corrales e Tu, 1989).

As lesões produzidas no caule e nos pecíolos são alongadas, escuras e às vezes deprimidas, podendo apresentar cancrios. As plântulas, provenientes de tais sementes, geralmente apresentam cancrios escuros nos cotilédones (Chaves, 1980; Kimati, 1980).

### **2.2.2. Variabilidade patogênica do *Colletotrichum lindemuthianum***

O controle da antracnose inclui o emprego de sementes livres da doença, o uso das cultivares resistentes, os tratamentos químicos e as práticas culturais, como a rotação de culturas e a eliminação dos restos culturais (Zambolim e Chaves, 1978; Sartorato, 1985). Dentre essas medidas, o emprego de cultivares resistentes é a mais eficiente e econômica, uma vez que reduz o uso de insumos agrícolas, acarretando conseqüentemente menores danos ambientais, e menor custo final de produção da lavoura (Mahuku e Riascos, 2004). Porém, um fator que dificulta o controle dessa doença é a variabilidade genética do patógeno.

Em todo o mundo, foram identificados cerca de 114 patótipos ou raças do *C. lindemuthianum* (Balardin et al., 1997; Mahuku e Riascos, 2004). Atualmente, só no Brasil, já foram identificadas mais de 50 raças desse patógeno (Rava et al., 1994; Andrade et al., 1999; Thomazella et al., 2002; Alzate-Marin e Sartorato,

2004; Talamini et al., 2004; Damasceno e Silva et al., 2007). No Estado do Paraná, Sansigolo (2007), identificou sete novas raças (10, 11, 17, 26, 27, 75 e 83) elevando o número de raças descritas no Paraná para 40.

O sucesso do desenvolvimento das cultivares resistentes à antracnose depende da compreensão dos níveis de variabilidade entre e dentro das populações do patógeno (Rodríguez-Guerra et al., 2003). Para tanto, o estudo da variabilidade é de fundamental importância para a realização de trabalhos que visem o controle da doença.

O estudo da variabilidade genética de *C. lindemuthianum*, iniciou-se em 1911, por Barrus, o qual identificou duas raças distintas do patógeno, que posteriormente foram denominadas Alfa e Beta, iniciando assim, a utilização das letras gregas para identificar as raças fisiológicas do patógeno. Após esse trabalho, em todo mundo foram identificadas várias raças, demonstrando a sua ampla variabilidade patogênica. Até pouco tempo, esta variabilidade era representada, por grupos de raças denominados Alfa, Beta, Gama, Delta, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro, Brasileiro II e raças fisiológicas pertencentes a estes grupos (Carbonell et al., 1999).

Em todo mundo, grupos diferentes de pesquisadores estudavam a variabilidade patogênica, o que gerava uma grande dificuldade na troca de informações devido a diferenças nas metodologias e nomenclaturas utilizadas para a caracterização do patógeno (Alzate-Marin et al., 2001a). Desta forma, surgiu-se a necessidade de utilizar uma metodologia padrão para a identificação e denominação das raças.

Pastor-Corrales (1991) propôs a utilização de um grupo de cultivares em uma ordem pré-estabelecida, e de um sistema binário proposto por Habgood (1970) que facilitasse o trabalho para a designação das raças, como forma de padronizar a nomenclatura das mesmas. Para *C. lindemuthianum* foi proposto o uso de 12 cultivares diferenciadoras pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em 1990. Para tanto, cada cultivar diferenciadora recebeu um valor binário, qual seja,  $2^{n-1}$ . O valor 2 representa o número de classes de reações consideradas (resistente ou suscetível) e n é função da ordem das diferenciadoras. As reações de resistência ou suscetibilidade apresentadas pelas

cultivares recebem respectivamente os valores zero e um (Quadro 1).

A obtenção do nome de uma nova raça se faz pela soma dos valores numéricos ( $2^{dn-1}$ ) de cada cultivar diferenciadora que é suscetível ao isolado do patógeno. Tal sistema tem sido utilizado em todo o mundo até os dias atuais.

Quadro 1 - Cultivares diferenciadoras utilizadas na classificação de raças de *C. lindemuthianum* em feijoeiro comum utilizando o sistema binário proposto por Habgood (1970)

Cultivares diferenciadoras	Valor binário	Valor numérico ( $2^{dn-1}$ )
1. Michelite	$2^0$	1
2. Michigan Dark Red Kidney	$2^1$	2
3. Perry Marrow	$2^2$	4
4. Cornell 49-242	$2^3$	8
5. Widusa	$2^4$	16
6. Kaboon	$2^5$	32
7. México 222	$2^6$	64
8. PI 207262	$2^7$	128
9. TO	$2^8$	256
10. TU	$2^9$	512
11. AB 136	$2^{10}$	1024
12. G 2333	$2^{11}$	2048

Depois de vários anos de estudos sobre o fungo *C. lindemuthianum*, pôde-se verificar sua ampla variabilidade patogênica e a dificuldade que essa representa para o controle da doença através da resistência genética. Uma vez que dentre as estratégias de manejo integrado de doenças, a resistência genética é considerada uma importante alternativa, por ser ecologicamente segura, além de contribuir para a manutenção da qualidade de vida (Costa e Rava, 2004).

### 2.3. Fontes de resistência

Uma vez que a obtenção das cultivares resistentes é a maneira mais eficaz e econômica para o controle da antracnose (Mahuku et al., 2002), o estudo de novas fontes de resistência e o estudo dos genes envolvidos no processo da resistência vem sendo há muito tempo estudado.

Até o presente momento 13 genes de resistência à antracnose foram caracterizados e identificados no feijoeiro comum (Kelly e Young, 1996; Bassett, 2004; Kelly e Vallejo, 2004, Gonçalves-Vidigal et al., 2008; Gonçalves-Vidigal et al., 2009). Os genes e seus alelos foram nomeados como *Co-1* (Mc Rostie, 1919), *Co-1<sup>2</sup>* (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1<sup>3</sup>* (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1<sup>4</sup>* (Alzate-Marin et al., 2003a), *Co-1<sup>5</sup>* (Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006), *Co-2* (Mastenbroek, 1960), *Co-3*, *Co-3<sup>2</sup>* (Bannerot, 1965; Fouilloux, 1976 e 1979), *Co-4* (Fouilloux, 1976 e 1979); *Co-4<sup>2</sup>* (Young et al., 1998); *Co-4<sup>3</sup>* (Alzate-Marin et al., 2007), *Co-5* (Young et al., 1998; Alzate-Marin et al., 2007), *Co-6* (Schwartz et al., 1982; Gonçalves-Vidigal, 1994; Kelly e Young, 1996), *Co-7* (Pastor-Corrales, et al., 1994; Young et al., 1998), *co-8* (Alzate-Marin et al., 1997), *Co-9* recentemente renomeado *Co-3<sup>3</sup>* (Geffroy et al., 1999; Rodríguez-Suárez et al., 2004, Mendez-Vigo et al., 2005; Alzate-Marin, 2007), *Co-10* (Alzate-Marin et al., 2003b), *Co-11* (Gonçalves-Vidigal et al., 2007a), *Co-12* (Gonçalves-Vidigal et al., 2008) e *Co-13* (Gonçalves-Vidigal et al., 2009) (Quadro 2).

Dos genes de resistência à antracnose identificados em *P. vulgaris*, 10 são de origem mesoamericana (*Co-2*, *Co-3/Co-9*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *co-8*, *Co-10*, *Co-11*) e três de origem andina (*Co-1*, *Co-12* e *Co-13*).

Os genes de resistência (R) são considerados componentes do mecanismo de resistência gene-a-gene proposto por Flor (1953). De acordo com esse mecanismo, para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona virulência. As plantas possuem muitos genes raça-específicos, os quais são mapeados em poucos locos, e que tais locos podem ser constituídos por genes isolados, por genes ligados e organizados de forma seqüencial e por genes que contêm diferentes alelos (Pryor e Ellis, 1993).

Quadro 2 – Genes de resistência e seus respectivos símbolos novos e originais, fontes genéticas, grupo gênico dos principais genes de resistência, marcadores moleculares, mapeamento dos genes maiores que condicionam resistência à antracnose (Kelly e Vallejo, 2004), com modificações

Símbolos dos genes		Fontes dos genes	Conjunto gênico	Marcadores genéticos	Localização no mapa	Referências
Novos	Original					
Co-1	A	MDRK	Andino	OF10 <sub>530</sub>	B1	McRostie (1919); Vallejo e Kelly (2002)
Co-1 <sup>2</sup>		Kaboon		SE <sub>ACT</sub> /M <sub>CCA</sub>		Melotto e Kelly (2000)
Co-1 <sup>3</sup>		Perry Marrow				Melotto e Kelly (2000)
Co-1 <sup>4</sup>		AND 277				Alzate-Marin et al. (2003a)
Co-1 <sup>5</sup>		Widusa		OA18 <sub>1500</sub>		Gonçalves-Vidigal e Kelly (2004)
Co-2	Are	Cornell 49-242	MA	OQ4 <sub>1440</sub>	B11	Masterbroek (1960)
				OH20 <sub>450</sub>		Adam-Blondon et al. (1994)
				B355 <sub>1000</sub>		Young e Kelly (1996b)
Co-3	Mexique 1	México 222	MA	NA	NA	Bannerot (1965)
Co-3 <sup>2</sup>		México 227				Fouilloux (1979)
Co-3 <sup>3</sup>		BAT 93		SB12	B4	Geffroy et al. (1999)
Co-4	Mexique 2	TO	MA	SAS13, SH18	B8	Fouilloux (1979); Awale e Kelly (2001);
Co-4 <sup>2</sup>		SEL1308		SBB14, OC8		Young et al. (1998)
Co-4 <sup>3</sup>		PI 207262 <sup>y</sup>		OY20		de Arruda et al. (2000)
Co-5	Mexique 3	TU	MA	OAB3 <sub>450</sub>	NA	Young et al. (1998); Vallejo e Kelly (2001);
		SEL1360		SAB3		Young e Kelly (1996a)
Co-6	Q	AB 136	MA	OAH1 <sub>780</sub>	B7	Gonçalves-Vidigal (1994)
				OAK20 <sub>890</sub>		Young e Kelly (1996b, 1997)
Co-7	NA <sup>z</sup>	MSU-7	MA	NA	NA	Young et al. (1998)
		G 2333 <sup>y</sup>				
co-8	NA	AB 136	MA	OPAZ20	NA	Alzate-Marin et al. (2001b)
Co-10	NA	Ouro Negro	MA	OF10	B4	Alzate-Marin et al. (2003b)
Co-11	NA	Michelite	MA		NA	Gonçalves-Vidigal et al. (2007a)
Co-12	NA	Jalo Vermelho	Andino		NA	Gonçalves-Vidigal et al. (2008)
Co-13	NA	Jalo Listras Pretas	Andino		NA	Gonçalves-Vidigal et al. (2009)

MDRK = Michigan Dark Red Kidney; MA = Mesoamericano;

<sup>y</sup> = Possui dois genes; G 2333 possui três genes <sup>z</sup>NA = Não nomeados anteriormente

Tais genes agrupados são chamados de “clusters” ou blocos gênicos e podem conferir resistência a diferentes patógenos (fungos, bactérias, vírus, nematóides) ou a diferentes raças do mesmo patógeno, o que têm sido descritos em muitas espécies (Michelmore e Meyers, 1998), incluindo o feijoeiro comum (Creusot et al., 1999; Geffroy et al., 1999; Ferrier-Cana et al., 2003). Em *P. vulgaris*, existem relatos de existência de regiões genômicas que concentram resistência a vários patógenos (Kelly et al., 2003).

A maioria dos genes R apresenta uma região rica em leucina que codifica uma proteína, conhecida com LRR (Leucine Rich Repeats), que estaria ligada à evolução do gene (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Geffroy et al., 1998; Michelmore e Meyers, 1998). Essa seqüência em vários “clusters” de genes R foram descritas no arroz (Song et al., 1997), tomate (Parniske et al., 1997), alface (Meyers et al., 1999), *Arabidopsis spp.* (Noël, et al., 1999) e feijão (Geffroy et al, 1999) e estão associadas a evolução dessas espécies (López et al., 2003).

## **2.4. Genes de resistência ao patógeno da antracnose do feijoeiro comum**

### **Locus Co-1**

O gene *Co-1*, conhecido anteriormente, como gene ‘A’, está presente na cultivar diferenciadora Michigan Dark Red Kidney e foi descoberto por Mc Rostie (1919). Apresenta uma série alélica denominada: *Co-1*<sup>2</sup> (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1*<sup>3</sup> (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1*<sup>4</sup> (Alzate-Marin et al., 2003a) e *Co-1*<sup>5</sup> (Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006), presente respectivamente nas cultivares Kaboon, Perry Marrow, AND 277 e Widusa. Por muito tempo, esse gene foi a única fonte de resistência andina à antracnose.

Para o loco *Co-1*, somente dois marcadores RAPD foram descritos. Young e Kelly (1997) identificaram o marcador OF-10<sub>530</sub> em fase de repulsão ligado a 1,9 cM do gene *Co-1*. Gonçalves-Vidigal e Kelly (2004) identificaram o marcador OA18<sub>1500</sub> em fase de repulsão ligado a 1,2 cM, presente na cultivar diferenciadora Widusa (*Co-1*<sup>5</sup>). Outro marcador dominante foi encontrado por Mendoza et al. 2001. Esses autores identificaram três marcadores AFLP

ligados em fase de repulsão, na linhagem A193, possuidora *Co-1*.

O loco andino *Co-1* foi mapeado (Kelly et al., 2003) no grupo de ligação B1 (Freyre et al., 1998) utilizando o marcador  $SE_{ACT}/M_{CCA}$  em linhagens endogâmicas recombinantes Jalo EEP 558 x BAT 93, população de mapeamento.

### **Locus *Co-2 (Are)***

Esse gene está presente na cultivar diferenciadora mesoamericana Cornell 49-242 (Mastenbroek, 1960). O gene *Co-2* foi mapeado (Adam-Blondon et al., 1994) no grupo de ligação B11 (Freyre et al., 1998). Este gene representa uma das maiores fontes de resistência à antracnose nas áreas tropicais (Adam-Blondon et al., 1994).

Adam-Blondon et al. (1994), encontraram um marcador RAPD (OH-20<sub>450</sub>) fortemente ligado ao gene. O marcador encontrado foi transformado em um marcador SCAR. Ao marcador SCAR foi dado o nome de SH20. Esse marcador está localizado a 0,5 cM do gene e se mostrou altamente específico, podendo assim ser utilizado na seleção plantas portadoras ou não do gene de resistência. Young e Kelly (1996b) identificaram o marcador RAPD OQ-4<sub>1440</sub> flanqueando o gene *Co-2*. Awale et al. (2008) converteram o marcador RAPD em SCAR, denominando-o SQ4<sub>1440</sub>. Esse marcador encontra-se ligado ao cluster gênico *Co-2/Ur-11*, presente no grupo de ligação B11. Esse foi o primeiro registro no feijoeiro comum de marcador ligado a genes que conferem resistência a diferentes patógenos

### **Locus *Co-3/ Co-9 (Mexique1)***

Gene descoberto por Bannerot (1965) foi encontrado na cultivar mesoamericana México 222. Apresenta série alélica denominada *Co-3<sup>2</sup>* (Fouilloux, 1979) e *Co-3<sup>3</sup>* (Geffroy et al., 1999), presente respectivamente nas cultivares México 227 e BAT 93. Previamente, o alelo *Co-3<sup>3</sup>*, fora nomeado como gene *Co-9* e subsequentemente encontrado como sendo alelo do *Co-3* (Gonçalves-Vidigal et al., 2008; Rodríguez-Suárez et al., 2004; Mendéz-Vigo et al., 2005). Esse alelo também está presente na cultivar diferenciadora PI

207262 (Alzate-Marin et al., 2003d).

O gene *Co-3* e o alelo *Co-3*<sup>3</sup> foram mapeados e estão localizados no grupo de ligação B4 (Rodríguez-Suárez et al., 2004; Geffroy et al., 1999). Para esse loco foram encontrados os marcadores SW12<sub>700</sub> (Miklas et al., 2000; Singh et al., 2000; Rodríguez-Suárez, et al., 2008) e SB12<sub>350</sub> (Mendéz-Vigo et al., 2002).

#### **Locus *Co-4* (Mexique 2)**

Esse gene foi identificado por Bannerot, 1969 (Fouilloux, 1976, 1979), é encontrado na cultivar diferenciadora mesoamericana TO, e está localizado (Kelly et al., 2003) no grupo de ligação B8 (Freyre et al., 1998). Apresenta dois alelos: *Co-4*<sup>2</sup> (Young et al., 1998) e *Co-4*<sup>3</sup> (Alzate-Marin et al., 2002).

O gene *Co-4* tem recebido um grande destaque, pois apresenta ampla base genética de resistência. Esse gene está presente na cultivar diferenciadora TO e sua série alélica *Co-4*<sup>2</sup> (presente em G 2333 e Seleção 1308) e *Co-4*<sup>3</sup> (PI 207262). Dentre esses, o alelo *Co-4*<sup>2</sup>, destaca-se como um dos mais valiosos genes de resistência à antracnose. Esse gene, presente na linhagem Sel 1308, controla cerca 97% de todas as raças do patógeno identificadas e quando presente na cultivar diferenciadora G 2333, em combinação com os outros dois genes existentes, *Co-5* e *Co-7*, confere resistência a todas as raças descritas (Young et al., 1998). Além de sua grande importância no melhoramento genético esse locus tem sido geneticamente caracterizado e vários marcadores moleculares ligados ao mesmo já foram identificados (Young et al., 1998; Melotto e Kelly, 2000).

Apresenta dois marcadores SCAR ligados diretamente ao gene *Co-4* (SY20<sub>830</sub> e SC8<sub>910</sub>; Kelly et al., 2003; Queiroz et al., 2004). Também apresenta três marcadores ligados ao alelo *Co-4*<sup>2</sup>: SAS13<sub>950</sub> (Young et al., 1998; Kelly et al., 2003); SH18<sub>1100</sub> (Awale e Kelly, 2001; Kelly et al., 2003) e SBB14<sub>1150/1050</sub> (Awale e Kelly, 2001; Kelly et al., 2003).

#### **Locus *Co-5* (Mexique 3)**

Esse gene de resistência à antracnose, identificado por Bannerot em 1969 (Fouilloux 1976, 1979) é encontrado nas variedades diferenciadoras



mesamericanas TU e G 2333, SEL 1360 (Young et al., 1998). Vallejo e Kelly (2001) identificaram o marcador SAB3<sub>400</sub> ligado a 12,98 cM do gene *Co-5* em fase de acoplamento. Campa et al. (2005) mapearam esse gene no grupo de ligação B7. Os autores verificaram uma ligação forte entre o gene *Co-v* e faseolina, ambos presente no grupo de ligação B7, sugerindo assim uma possível alelismo ou uma ligação forte entre os genes *Co-v* e *Co-5*.

### **Locus Co-6**

Descoberto por Schwartz et al. (1982), o locus *Co-6* foi identificado na cultivar diferenciadora AB 136. Esse gene está localizado (Kelly et al., 2003; Mendéz-Vigo et al., 2002) no grupo de ligação B7 (Freyre et al., 1998). Apresenta os marcadores SZ4<sub>567</sub> e SAZ20<sub>845</sub> ligado em fase de repulsão e acoplamento, respectivamente (Kelly et al., 2003; Queiroz et al., 2004).

### **Locus Co-7**

Encontrado na cultivar diferenciadora G 2333, na qual apresenta mais dois genes independentes (*Co-4*<sup>2</sup>, *Co-5*) (Young et al., 1998).

### **Locus co-8**

Descrito por Alzate-Marin et al. (1997), o locus *co-8* encontra-se presente na cultivar diferenciadora AB 136. Dos genes de resistência à antracnose identificados até o momento, somente o gene *co-8* é recessivo. Esse locus apresenta o marcador OPAZ20<sub>950</sub>, ligado a 2.2cM do gene.

### **Locus Co-10**

Descrito por Alzate-Marin et al. (2003b) na cultivar Ouro Negro, o locus *Co-10* foi mapeado e está localizado no grupo de ligação B4 (Freyre et al., 1998). Apresenta o marcador SF10<sub>1072</sub> ligado em fase de acoplamento, e encontra-se distante aproximadamente  $6.0 \pm 1,3$ cM desse gene (Corrêa et al., 2000; Alzate-Marin et al., 2003b).

### **Locus Co-11**

O locus *Co-11* encontra-se presente na cultivar diferenciadora Michelite

(Gonçalves-Vidigal et al., 2007a).

### **Locus Co-12**

Gene descrito por Gonçalves-Vidigal (2008) e identificado na cultivar andina Jalo Vermelho. Esse gene foi a segunda fonte andina de resistência à antracnose.

### **Locus Co-13**

Gene identificado na cultivar andina Jalo Listras Pretas (Gonçalves-Vidigal et al., 2009), no qual elevou a quantidade de fontes de resistência andina para três.

## **2.5. Marcadores moleculares para resistência à antracnose do feijoeiro**

A utilização de marcadores genéticos tem sido proposta como uma ferramenta na identificação e caracterização de genótipos, avaliação de germoplasmas e populações de melhoramento, seleção indireta para o rastreamento de caracteres de interesse econômico, introgressão de genes via retrocruzamento e construções de mapas genéticos. Existem três tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos e moleculares, nos quais podem ser usados para estabelecer ligações a características agronômicas de interesse (Svetleva et al., 2003).

Até a década de 60 os marcadores utilizados em estudos de genética e de melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, com fenótipo de fácil identificação visual, como cor de sementes, pétalas e hipocótilo, morfologia floral e foliar, nanismo, deficiência clorofítica.

Esses marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, os mesmos são freqüentemente afetados pela ação gênica de dominância, efeito ambiental, pleiotropia e epistasia. Assim a possibilidade de encontrar relações significativas entre os marcadores morfológicos e caracteres agronômicos de

importância econômica era reduzida. Além disso, a disponibilidade de marcadores morfológicos era essencialmente restrita às poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelo para o estudo da genética, tais como milho, tomate e ervilha, onde a intensidade de estudos e disponibilidade de informações genéticas eram maiores.

Com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, o número de marcadores genéticos disponíveis e a aplicabilidade da técnica passaram a incluir potencialmente todas as espécies de plantas. O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982). As isoenzimas têm sido utilizadas no estudo de dispersão de espécies, na análise de filogenias, no melhoramento de plantas, na identificação de cultivares, na seleção indireta de caracteres agrônômicos, introgressão gênica e avaliação germoplasma. Porém, quando a investigação requer uma cobertura mais ampla do genoma, como no caso de mapeamento genético ou caracterização detalhada de germoplasma, as isoenzimas apresentam duas limitações básicas: o baixo número de locos que podem ser detectados no genoma e o baixo nível de polimorfismo genético detectável em cada loco.

Para modificar esse quadro, surgem as técnicas de biologia molecular, ou seja, as técnicas que visam à detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA. Para tanto, existem ilimitado número de marcadores moleculares que cobrem todo o genoma da espécie em estudo. Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein et al., 1980; Wyman e White, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats; Jeffreys et al., 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams et al., 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions; Paran e Michelmore, 1993); STS (Sequence Tagged Sites; Paran e Michelmore, 1993); Microsatélite (Litt e Luty, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al.,

1995). Esses marcadores surgiram nas décadas de 80 e principalmente de 90 e, desde então vêm gerando importante contribuição ao melhoramento genético (Williams et al., 1990; Michelmore et al., 1991; Miklas et al., 2000; Miklas e Kelly, 2002).

Dentre os marcadores moleculares aplicados na identificação de genes de resistência a doenças em feijão, o RAPD, tem sido extensivamente utilizado (Young e Kelly, 1996a). A técnica de RAPD baseia-se na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), a qual é caracterizada pela repetição cíclica de etapas de desnaturação, anelamento e extensão *in vitro* de muitas cópias de um segmento específico de DNA. O segmento de DNA é submetido a diferentes temperaturas, e a “primers” de seqüência arbitrária, de aproximadamente de 9 a 10 pb, resultando em grande quantidade de segmentos que podem ser facilmente visualizados como bandas em géis de agarose, sem a necessidade do conhecimento prévio das seqüências.

As vantagens freqüentemente apontadas para a técnica de RAPD, a simplicidade, rapidez, baixo custo na execução, exigência de quantidade mínima de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos, podem ser citadas (Lacerda, et al., 2002). Já entre as limitações da técnica, duas podem ser consideradas as mais importantes. Uma delas se refere à característica dominante dos marcadores RAPD que não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos e, conseqüentemente, a obtenção de outras informações relevantes para estudos genéticos. Outra limitação, bastante avaliada durante os primeiros anos de aplicação da técnica de RAPD, é a questão da baixa repetibilidade de algumas bandas (Lacerda et al., 2002).

Porém essa técnica possibilitou o desenvolvimento de muitos trabalhos na década de 90 e atualmente tem sido amplamente utilizado em estudos de genética de plantas. Em estudos genéticos com o feijoeiro, a técnica de RAPD tem sido utilizada para detecção de grau de parentesco (Bai et al., 1998), na divergência genética (Haley et al., 1994; Beebe et al., 2000; Franco et al., 2001; Korzun, 2002; Tar'an et al., 2002; Pedrosa et al., 2003); em avaliações de origem e estrutura genética de populações tradicionais (Cattan-Toupance et al.,

1998; Beebe et al., 2001), na identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência a doenças (Adam-Blondom et al., 1994; Young e Kelly, 1996b; Young et al., 1998; Alzate-Marin et al., 1999b, 2001b; De Arruda, et al., 2000; Faleiro et al., 2000; Melotto e Kelly, 2000; Mendoza et al., 2001; Méndez-Vigo et al., 2005; Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006); no mapeamento genético (Vallejos et al., 1992; Nodari et al., 1993; Freyre et al., 1998; Miklas et al., 1998; Beattie et al., 2003, Rodríguez-Suárez et al., 2007, 2008) e outras aplicações.

Nesse contexto, destaca-se a importância dessa técnica para o desenvolvimento de mapas genéticos (Freyre et al., 1998). A grande quantidade de marcadores RAPD identificados ligados a genes de resistência possibilitou o surgimento de mapas moderadamente densos ou saturados para espécies como o feijão.

## **2.6. Mapeamento genético**

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L., apresenta um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picograma de DNA por genoma haplóide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (Arumuganathan e Earle, 1991). Os trabalhos de mapeamento genético nessa cultura iniciaram-se na década de 60 por Lamprecht. Porém, muitos autores questionaram e levantaram dúvidas sobre as interpretações e a validade de alguns dados lançados por esse autor e consideraram como primeiro mapa de ligação o desenvolvido por Bassett (1991). Esse mapa foi construído usando marcadores morfológicos e isoenzimáticos separando os genes em 13 grupos de ligação.

Vallejos et al. (1992), utilizando marcadores morfológicos (cor de flor e semente), bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (RFLP e RAPD) agruparam genes em 11 grupos de ligação (Quadro 3). Esse mapa proporcionou uma cobertura de 960 cM, o que representa 80% do genoma do feijoeiro. No ano seguinte, Nodari e colaboradores também construíram um mapa bastante abrangente, no qual proporcionou a cobertura de 827 cM, cerca de 69% do genoma, com intervalo médio entre os marcadores de 6,5 cM. Diversos marcadores foram usados na construção desse mapa. Os autores analisaram a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos de RFLP, 8 locos RAPD, 7

locos isoenzimáticos e 19 locos correspondentes a 15 clones de genes conhecidos, um gene de resistência a vírus, um gene para cor de flor e um gene para cor de sementes. Nesse trabalho foram estabelecidos 15 grupos de ligação.

Em 1998, Freyre e colaboradores desenvolveram um mapa de ligação contendo 563 marcadores, incluindo 120 RFLPs, 430 RAPDs, além de alguns locus de isoenzimas e marcadores morfológicos, perfazendo um total 1226cM. No mesmo ano Miklas et al., mapearam 147 marcadores RAPD, 2 SCAR e 2 marcadores fenotípicos, sendo agrupado-os em 10 grupos de ligação para um comprimento total do mapa de 924cM.

No Brasil, Melo (2000) desenvolveu um trabalho empregando RAPD para identificar QTL's para diversos caracteres de importância agrônômicas. Esse mapa utilizou 63 marcadores que ficaram dispostos em 7 grupos de ligação abrangendo 785,7 cM do genoma. Beattie e colaboradores (2003) utilizando 105 marcadores, sendo 99 RAPDs, 3 SSRs e 3 STSs, obtiveram oito grupos de ligação. Esse mapa teve uma cobertura de 641 cM e a média de distância entre os marcadores foi de 6,6 cM.

Rodríguez-Suárez et al. (2007) construíram um mapa de ligação utilizando 197 marcadores, incluindo 152 RAPDs, 32 RFLPs, 12 SCARs e 1 marcador morfológico. Esse mapa cobriu 1.401,9 cM do genoma, com uma média de 7,1 cM entre os marcadores ligados a genes de resistência a antracnose, vírus do mosaico-comum, vírus do mosaico dourado, mofo branco e ferrugem.

Quadro 3 - Populações de feijoeiro mapeadas e seus caracteres segregantes (modificada de Kelly et al., 2003).

População (Geração)	Caracteres Segregantes	Fonte
XR-235-1' x Calima (RC e F <sub>2</sub> )	Faseolina	Vallejos e Chase (1991)
XR235-1-1 x DIACOL Calima (RC)	Reação a <i>Xanthomonas axonopodis</i>	Vallejos et al. (1992)
BAT93 x Jalo EEP558 (F <sub>2</sub> ) BAT93 x Jalo EEP558 (RI)	Reação ao <i>virus do mosaico comum</i> (BCMV), <i>X.axonopolis</i> , <i>C. lindemuthianum</i> , <i>U. appendiculatus</i> , <i>Rhizobium</i> spp, cor do tegumento	Gepts et al. (1993), Nodari et al. (1993) e Freyre et al. (1998)
Corel x EO2 (RC) Midas x G12873 (RI)	Reação ao <i>C. lindemuthianum</i> Síndromes de domesticação, hábito de crescimento, número de nós e vagens, peso de sementes e dormência	Adam-Blondon et al. (1994) Koinange et al. (1996)
BAC6 x HT7719 (RI) Dorado x XAN176 (RI)	Reação ao cretamento bacteriano comum e ferrugem Reação ao vírus do mosaico comum, cretamento bacteriano comum, ferrugem	Jung et al. (1996) Miklas et al. (1996) e Miklas et al. (2000)
PC-50 x XAN159 (RI)	Reação ao cretamento bacteriano comum , cor do tegumento, peso sementes, ferrugem e mofo branco	Jung et al. (1997), Park et al. (2000) e Park et al. (2001)
A55 x G122 (RI)	Performance nos cruzamentos andinos x mesoamericanos	Johnson et al. (1997) e Miklas et al. (2001a)
Belneb-RR-1 x A55 (RI)	Reação ao cretamento bacteriano comum , vírus do mosaico comum	Ariyaratne et al. (1999)
Carioca x Flor de Mayo (RI)	Peso de sementes, produtividade de grãos, reação ao oídio e à mancha angular e ciclo	Melo (2000)
BAT93 x Jalo EEP 558 (RI) Ouro Negro x US Pinto (F <sub>2</sub> ) Benton x NY6020-4 (RI) Montcalm x FR266 (RI) OAC Seaforth x OAC-95-4	- Reação à ferrugem Reação ao mofo branco Reação à podridão radicular por <i>Fusarium</i> Reação ao cretamento bacteriano comum, hábito de crescimento, dias para florescimento e para maturação, produtividade e peso de 100 sementes	Yu et al. (2000) Faleiro et al. (2000) Miklas et al. (2001b) Schneider et al. (2001) Tar'an et al. (2002)
BAT93 x Jalo EEP 558 (RI) Carioca x Flor de Mayo (RI) Montcalm x California DRK82(RI)	Cor do grão Época de florescimento Qualidade de enlatamento	Mc Clean et al. (2002) Melo et al (2002) Posa-Macalincag et al. (2002)

1 - RI - Linhagens recombinantes; RC – Retrocruzamentos

Quadro 3 - Cont.

População (Geração)	Caracteres Segregantes	Fonte
OAC Seaforth x OAC 95-4 (F <sub>2:4</sub> )	Rendimento de sementes, componentes de rendimento e arquitetura da planta	Tar'an et al (2002)
DOR364 x G19864 (RI)	-	Blair et al. (2003)
Jalo EEP 558 x BAT 93		
Belneb RR-1 x A55 (RI)	Reação a Mancha bacteriana marrom (BBS)	Jung et al. (2003)
Ouro Negro x Rudá (RI)	Reação à ferrugem, mancha angular e antracnose	Faleiro et al. (2003a)
Ouro Negro x Rudá (RI)	Caracteres relacionados ao ciclo da planta e à produtividade	Faleiro et al. (2003b)
Bunsi x Newport (RI)	Reação ao Mofo branco	Kolkman e Kelly (2003)
WO3391 x OAC Speedvale (RI)	Arquitetura da planta e características relacionadas ao rendimento	Beattie et al. (2003)
Bayo Baranda x G 22837 (F <sub>2</sub> )	Cálcio, ferro, zinco nas sementes, tanino	Guzmán-Maldonado et al (2003)
Berna x EMP 419(RI)	Reação de resistência a peste <i>Empoasca fabae</i> , tamanho de sementes	Murray et al (2004)
Minnette x OSU 5630 (RI)	Características de feijão vagem	Myers et al (2004)
HR67 x OAC 95 (RI)	Reação ao crestamento bacteriano comum (CBB)	Yu et al (2004)
Aztec x ND88-106-04	Reação ao Mofo branco, ferrugem, zinco	Miklas et al (2005)
Bunsi x Raven (RI)	Reação ao Mofo branco, Reação ao vírus do mosaico comum	Ender e Kelly (2005)
Red Hawk x Negro San Luis (RC)	Podridão radicular	Román-Avilés e Kelly (2005)
Andecha x A321(RC)	Reação a antracnose	Méndez-Vigo, et al (2005)
Andecha x A493 (RC)		
Calima x Jamapa (F <sub>2</sub> )	Reação ao vírus do mosaico comum, e alguns outros potívirus relacionados e um comovírus	Vallejos et al (2006)
Andecha x A252 (F <sub>2</sub> )	Antracnose, vírus do mosaico comum, vírus do mosaico dourado, crestamento bacteriano comum e ferrugem	Rodríguez-Suárez et al (2007)
Jalo EEP 558 x BAT 93 (RI)	-	Grisi et al (2007)
Andecha x BRB130 (F <sub>2</sub> )	Hábito de crescimento	Pañeda et al (2008)
G5686 x Sprite (F <sub>2</sub> )	Reação a mancha angular	Mahuku et al (2009)

1 - RI - Linhagens recombinantes; RC – retrocruzamentos



## 2.7. Cultivar Andina Jalo Listras Pretas

Nos estudos realizados por Vidigal Filho et al. (2007) verificou-se que dentre os genótipos andinos que apresentaram maior resistência, a cultivar Jalo Listras Pretas (Figura 1) destacou-se como uma das mais importantes, apresentando um índice de resistência de 67%. Uma vez que, entre as 12 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* testadas, Jalo Listras Pretas apresentou resistência a oito delas (9, 31, 65, 69, 73, 81, 89 e 95).



Fonte: Nupagri

Figura 1 - Cultivar de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) Jalo Listras Pretas.

Os centros de origem Mesoamericano e Andino foram determinados considerando às diferenças nas características morfológicas (tamanho e coloração de sementes), tipo de crescimento, padrões eleforéticos de faseolina (Tipo R e T), variação isoenzimática e “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) (Singh et al., 1991b; Sicard et al., 1997). No entanto, o tamanho das sementes foi uma das características primordiais para a diferenciação dos centros de origem.

A cultivar Jalo Listras Pretas (JLP) apresenta sementes graúdas com coloração creme com listras pretas, sendo esta uma característica dos feijões andinos. Apresenta também um tipo de faseolina característica do centro andino, denominada de T, determinado pelo método SDS Page (Gonçalves-Vidigal et al., 2007b), apresenta hábito de crescimento tipo I e peso de 100 sementes de aproximadamente 40 g (Gonçalves-Vidigal, et al., 2009).

A diferenciação das cultivares Andinas e Mesoamericanas é de extrema importância para os programas de melhoramento genético do feijoeiro, uma vez que a medida de controle mais eficaz e econômica à antracnose é a utilização das cultivares resistentes (Mahuku et al., 2002). A utilização de diferentes fontes de resistência genética tem sido procurada em diversos programas de melhoramento (Paradela Filho et al., 1981; Menezes e Dianese, 1988).

Em geral, as cultivares de origem Andina são mais resistentes às raças Mesoamericanas, enquanto as mesoamericanas são mais resistentes às raças Andinas do *C. lindemuthianum*. Conforme Young e Kelly (1997) e Melotto e Kelly (2000), o gene *Co-1* de origem Andina confere resistência à raça 73 de origem Mesoamericana, enquanto o gene *Co-2*, de origem Mesoamericana confere resistência à raça 7, cuja origem é Andina. A combinação dos genes *Co-1* e *Co-2* em uma mesma cultivar é a melhor estratégia para o desenvolvimento de uma cultivar resistente a essas duas raças (Young e Kelly, 1997).

Dos 13 genes que conferem resistência à antracnose no feijoeiro comum, somente três são de origem Andina. Esses genes estão presentes nas cultivares Michigan Dark Red Kidney (*Co-1*), Jalo Vermelho (*Co-12*) e Jalo Listras Pretas (*Co-13*). O locus *Co-1* apresenta uma série alélica que permitiu a caracterização de diferentes alelos de resistência presentes nas cultivares Andinas Kaboon (*Co-1<sup>2</sup>*), Perry Marrow (*Co-1<sup>3</sup>*), AND 277 (*Co-1<sup>4</sup>*) e Widusa (*Co-1<sup>5</sup>*) (Melotto e Kelly, 2000; Alzate-Marin et al., 2003a; Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006; Vallejo et al., 2003). Portanto, evidenciando assim a necessidade da identificação de novas fontes de resistência Andina.

Gonçalves-Vidigal et al. (2009) verificaram que a cultivar JLP apresenta um gene de resistência dominante independente dos genes previamente identificados, nomeando-o como *Co-13*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Vegetal

As análises genéticas e moleculares foram conduzidas no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), utilizando a população F<sub>2</sub>, composta por 116 indivíduos, derivadas do cruzamento entre Jalo Listras Pretas (JLP) x Cornell 49-242.

A cultivar andina Jalo Listras Pretas apresenta sementes graúdas de cor creme com listras pretas e resistente à raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* (Vidigal-Filho et al., 2007). Já Cornell 49-242 é uma das doze cultivares diferenciadoras de origem mesoamericana, que apresenta sementes pequenas de cor preta, sendo suscetível à raça 73 do patógeno.

Para o mapeamento do gene *Co-13* no mapa consenso do feijoeiro comum foi utilizado uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's), constituída por 38 indivíduos, derivada do cruzamento entre Jalo EEP558 x BAT93 (Freyre et al., 1998). As sementes desse cruzamento foram obtidas após sete gerações pelo método Single Seed Descent (Brim, 1966) e foram cedidas pelo Bioagro, Universidade Federal de Viçosa.

#### 3.2. Preparo do inóculo, inoculação e incubação

As sementes da população F<sub>2</sub> foram semeadas em bandejas plásticas contendo substrato a base de turfa e vermiculita e mantidas em casa de vegetação até o surgimento total das folhas trifolioladas (estádio V<sub>3</sub>). Após esse período, um folíolo jovem de cada plântula foi coletado individualmente com auxílio de tubos plásticos tipo eppendorf, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-20 °C) para posterior extração de DNA.

Após a coleta, as plântulas foram inoculadas com suspensão de esporos da raça fisiológica 73 de *C. lindemuthianum*, a qual foi escolhida por causar reações diferentes nos genitores JLP (resistente) e Cornell 49-242 (suscetível) e por ser encontrada no Estado do Paraná (Thomazella et al., 2002).

O preparo do inóculo seguiu a metodologia proposta por Cárdenas et al (1964) que consiste na multiplicação dos esporos do patótipo de *C. lindemuthianum* em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio com ágar-água. Após a repicagem do fungo para as vagens, as mesmas foram incubadas por 14 dias a 20°C.

Decorrido o período necessário para o desenvolvimento do fungo, foi realizada a retirada das vagens de cada tubo, com o auxílio de uma pinça, para um becker contendo água destilada esterilizada, dando origem a uma suspensão de esporos, que logo em seguida foi filtrada através de uma dupla camada de gaze, obtendo-se assim uma suspensão líquida de esporos.

A determinação da concentração de esporos foi efetuada por meio de cinco contagens em microscópio, com o auxílio de hematocitômetro (câmara de Neubauer-Preciss). Após a contagem, a suspensão de esporos foi ajustada à concentração aproximada de  $1,2 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup> de água destilada esterilizada. A inoculação do patógeno foi realizada utilizando-se um atomizador De Vilbiss, número 15.

Após a inoculação, as bandejas contendo as plântulas foram incubadas em câmara de nebulização por 96 horas, a temperatura de  $20 \pm 2$  °C, controlando-se a luminosidade (12 horas de iluminação de 680 lux seguida por 12 horas de escuro) e com aproximadamente 90-100% de umidade relativa. Decorrido esse período, as bandejas foram transferidas para bancadas, em ambiente apropriado, com temperatura de  $22 \pm 2$ °C, sob luz artificial, onde permaneceram até o início das avaliações.

### **3.3. Método de avaliação dos sintomas**

As avaliações visuais dos sintomas em cada plântula foram realizadas dez dias após a sua inoculação, utilizando-se a escala de severidade proposta por Van Schoonhoven e Pastor-Corrales, 1987). As notas atribuídas às primeiras folhas trifolioladas, variaram de 1 a 9. As plantas que não apresentaram sintomas ou somente poucas lesões na nervura principal das folhas receberam notas de 1 a 3 e foram consideradas resistentes. Enquanto aquelas com notas de 4 a 9 foram consideradas como suscetíveis.

Após a avaliação as plantas resistentes foram transplantadas e conduzidas até F<sub>2:3</sub>. Um total de 37 famílias F<sub>2:3</sub> (com cerca de 15 plantas por família) foram semeadas em bandejas plásticas e inoculadas com a mesma raça utilizada na população F<sub>2</sub>. Esse procedimento foi realizado para a identificação de plantas F<sub>2</sub> homocigotas resistentes para serem utilizadas nas análises “Bulked Segregant Analysis” proposta por Michelmore et al., 1991.

### **3.4. Extração de DNA e construção dos bulks**

A extração do DNA foi efetuada com base na metodologia proposta por Afanador et al. (1993). O DNA extraído de plantas resistentes e suscetíveis oriundas das populações F<sub>2</sub> do cruzamento JLP x Cornell 49-242 foi utilizado como molde para as reações de amplificação.

Neste procedimento, foram formados dois bulks contrastantes com seis plantas F<sub>2</sub> homocigotas dominantes (bulk resistente) e seis plantas homocigotas recessivas (bulk suscetível). O DNA de cada amostra utilizada no bulk e da população utilizada foi padronizado a 10ng.µL<sup>-1</sup>.

Um total de 34 primers (Operon Technologies) foram utilizados nas análises com os marcadores RAPD (Quadro 4). Cada reação (25 µL) continha: 50 ng de DNA; 1,25 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 µM do primer (Operon Technologies) e uma unidade de *Taq* polimerase (Invitrogen).

Os ciclos de amplificação foram constituídos das seguintes etapas: uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de ligação do primer ao DNA a 35°C por 30 segundos, e uma etapa de alongação da fita a 72°C por 60 segundos. Foram realizados 40 ciclos, seguindo mais uma etapa de alongação a 72°C por 5 minutos (Williams et al., 1990).

Concluída a amplificação os fragmentos de DNA foram fracionados em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídio (0,02%). Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografadas com o fotossistema Spectroline, e as imagens capturadas em câmera digital Canon Power Shot A620. Utilizou-se como padrão de tamanho o DNA *ladder* de 100pb

e a altura da banda encontrada foi determinada pelo programa computacional GeneLine, versão 2.0.

Quadro 4 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas seqüências

Iniciadores (Primers)	Distância(cM) e orientação	Gene de resistência	Seqüências (5'-3')	Referência
OA-13			"CAGCACCCAC"	
OA-17			"GACCGCTTGT"	
OA-18 <sub>830</sub>	17,4 – rep.	Co-4	"AGGTGACCGT"	de Arruda et al. (2000)
OA-18 <sub>1500</sub>	1,2 – rep.	Co-1 <sup>5</sup>		Gonçalves-Vidigal e Kelly (2004)
OA-19			"CAAACGTCCG"	
OB-12 <sub>350</sub>	3,4 – acop.	Co-9	"CCT TGACGCA"	Mendez-Vigo et al. (2002)
OB-15			"GGAGGGTGTT"	
OC-8 <sub>900</sub>	9,7 – acop.	Co-4	"TGGACCGGTG"	Alzate-Marin et al. (1999b)
OD-8			"GTGTGCCCCA"	
OE-4 <sub>500</sub>	5,8 – acop.	Resist à 63.39	"GTGACATGCC"	Ferreira et al. (1999)
OF-5			"CCGAATTCCC"	
OF-7			"CCGATATCCC"	
OF-10 <sub>530</sub>	1,9 – rep.	Co-1	"GGAAGCTTGG"	Young e Kelly (1997)
OF-16			"GGAGTACTGG"	
OG-5			"CTGAGACGGA"	
OG-17			"ACGACCGACA"	
OG-19			"GTCAGGGCAA"	
OH-18 <sub>830</sub>	9,2 - acop	Co-4 <sup>2</sup>	"GAATCGGCCA"	Alzate-Marin et al. (1999b)
OI-13			"CAGAAGCCCA"	
OI-19 <sub>460</sub>	0,0 – acop.	Ur-5	"AATGCGGGAG"	Haley et al. (1993)
OM-5			"GGGAACGTGT"	
OM-12			"GGGACGTTGG"	
OO-10			"TCAGAGCGCC"	
OO-16			"TCGGCGGTTC"	
OQ-4 <sub>1440</sub>	5,5 – acop.	Co-2	"AGTGCGCTGA"	Young e Kelly (1996b)
OR-20			"ACGGCAAGGA"	
OV-12			"ACCCCCACT"	
OV-20			"CAGCATGGTC"	
OW-7			"CTGGACGTCA"	
OX-11	5,8 – acop.	Ur-5 e Ur-11	"GGAGCCTCAG"	Faleiro et al. (2000)
OY-20 <sub>830</sub>	Sem recomb.	Co-4	"AGCCGTGGAA"	Alzate-Marin et al. (1999a)
OZ-4 <sub>560</sub>	2,5 - acop	Co-6	"AGGCTGTGCT"	Kelly et al. (2003)
OAA-3			"TTAGCGCCCC"	
OAD-4			"GTAGGCCTCA"	
OAD-17			"GGCAAACCCT"	

O marcador RAPD que apresentou polimorfismo entre os pais e os bulks segregantes foi testado nos indivíduos de cada bulk antes de testar na população completa (116 indivíduos). Após a identificação do marcador e análise da população segregante, o mesmo foi utilizado na população das RILS a fim de confirmar a ligação do marcador ao gene na população base de mapeamento (Jalo EEP 558 x BAT 93), conforme Freyre et al. (1998).

### **3.5. Análise estatística dos dados**

As análises de segregação das bandas heteromórficas encontradas na população e da resistência das plantas  $F_2$  foram realizadas pelo teste de qui quadrado ( $\chi^2$ ). As estimativas das freqüências de recombinação e das distâncias genéticas entre o marcador e o gene de resistência à antracnose (Co-13) foram obtidas com o auxílio do Programa Mapmaker/EXP 3.0 (Lander et al., 1987). A distância entre o *locus* em estudo foi calculada usando a função de mapeamento Kosambi (Kosambi, 1944).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 365 plantas F<sub>2</sub> do cruzamento entre Jalo Listras Pretas x Cornell 49-242, inoculadas com a raça 73 de *C. lindemuthianum*, propiciou uma segregação de 275 plantas resistentes para 90 plantas suscetíveis, cujo qui-quadrado foi de  $\chi^2 = 0,023$  e o valor de  $p = 0,88$ . Este dados, ajustaram-se à razão de 3:1, evidenciando uma herança monogênica da presença de um gene dominante, caracterizado por Gonçalves-Vidigal et al.(2009), como sendo *Co-13*.

Dos 34 marcadores analisados, dez apresentaram polimorfismo entre os parentais (resistente e suscetível). Desses, cinco foram polimórficos entre os parentais e bulks. Porém, somente o marcador OV-20<sub>700</sub> (5'CAGCATGGTC3'), manteve o polimorfismo entre os parentais, os bulks e os indivíduos constituintes de cada bulk.

O marcador OV-20 gerou uma banda heteromórfica de 700pb, em fase de acoplamento, estando esta presente no genitor resistente e em todos os indivíduos do bulk resistente, e não amplificando-se no genitor suscetível e nos indivíduos do bulk suscetível (Figura 2). Após esse resultado, o mesmo foi testado nos 116 indivíduos da população F<sub>2</sub> (Quadro 5).

Esse marcador mostrou-se intimamente ligado ao gene de resistência andino *Co-13*, presente em JLP. Na genotipagem de toda a população F<sub>2</sub> com o marcador OV-20<sub>700</sub>, somente dois indivíduos recombinantes (indivíduos 27 e 112) foram observados, determinando uma frequência de recombinação de 1,72%.

A análise das linhagens endogâmicas recombinantes (Jalo EEP558 x BAT 93) com o marcador OV20<sub>700</sub> ajustou-se a razão monogênica de 1:1, evidenciando a validação do marcador na genotipagem das linhagens endogâmias. Este resultado permitiu a inserção de mais um marcador no grupo de ligação B3.



Quadro 5 - Reação de resistência dos genótipos do cruzamento entre Jalo Listras Pretas x Cornell 49-242 inoculados com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* e fenotipagem da população com o marcador molecular OV20<sub>700</sub>

F <sub>2</sub>	Nota	Classificação	Presença do marcador
1	6	S	-
2	1	R	+
3	1	R	+
4	1	R	+
5	1	R	+
6	1	R	+
7	1	R	+
8	1	R	+
9	2	R	+
10	2	R	+
11	6	S	-
12	8	S	-
13	6	S	-
14	1	R	+
15	1	R	+
16	8	S	-
17	1	R	+
18	1	R	+
19	2	R	+
20	1	R	+
21	2	R	+
22	1	R	+
23	2	R	+
24	8	S	-
25	8	S	-
26	2	R	+
27	8	S	+
28	2	R	+
29	2	R	+
30	1	R	+
31	1	R	+
32	8	S	-
33	1	R	+
34	1	R	+
36	1	R	+
37	8	S	-
38	1	R	+
39	8	S	-
40	1	R	+
41	1	R	+
42	6	S	-
43	1	R	+
44	1	R	+
45	1	R	+
47	1	R	+
48	1	R	+
49	1	R	+
52	1	R	+

Quadro 5 - Cont.

F <sub>2</sub>	Nota	Classificação	Presença do marcador
53	1	R	+
54	1	R	+
55	1	R	+
57	8	S	-
58	8	S	-
59	1	R	+
60	1	R	+
61	1	R	+
62	1	R	+
63	1	R	+
64	1	R	+
65	6	S	-
66	1	R	+
67	3	R	+
68	1	R	+
69	1	R	+
70	1	R	+
71	2	R	+
72	6	S	-
73	8	S	-
74	1	R	+
75	3	R	+
76	3	R	+
77	1	R	+
78	1	R	+
79	2	R	+
80	2	R	+
81	1	R	+
82	1	R	+
83	1	R	+
84	1	R	+
85	1	R	+
86	1	R	+
87	1	R	+
88	1	R	+
89	2	R	+
90	1	R	+
91	1	R	+
92	1	R	+
93	1	R	+
95	1	R	+
96	1	R	+
97	1	R	+
98	8	S	-
99	8	S	-
100	1	R	+
101	8	S	-
102	8	S	-
103	8	S	-
104	1	R	+
105	2	R	+

Quadro 5 – Cont.

F <sub>2</sub>	Nota	Classificação	Presença do marcador
108	4	S	-
109	8	S	-
110	8	S	-
111	1	R	+
112	6	S	+
113	1	R	+
114	2	R	+
115	1	R	+
116	1	R	+
117	8	S	-
118	2	R	+
119	1	R	+
120	1	R	+
121	1	R	+
122	2	R	+
123	8	S	-
124	8	S	-

(R) resistente; (S) suscetível; (+) presença do marcador; (-) ausência do marcador

Marcadores moleculares, principalmente do tipo RAPD, ligados a genes de resistência têm sido identificados, tornando disponível o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças do feijoeiro. Os genes *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-8*, *Co-9* e *Co-10* apresentam diferentes marcadores moleculares identificados, porém até o presente momento nenhuma pesquisa de mapeamento dos alelos *Co-1*<sup>3</sup> e *Co-1*<sup>4</sup> e dos genes *Co-7*, *Co-11* e *Co-12* foi realizada (Kelly e Vallejo, 2004).

O conjunto gênico mesoamericano apresenta maior variabilidade genética quando comparado ao conjunto gênico andino Singh et al., (1991a), Beebe et al. (2000), visto que dos 13 genes identificados 10 são de origem mesoamericana. Desse modo, a identificação de genes e de marcadores moleculares ligados aos mesmos é facilitada. Dos genes de origem andina somente o *Co-1* foi mapeado no grupo de ligação B1 (Kelly et al., 2003).

O marcador OV-20<sub>700</sub> se encontra previamente descrito no grupo de ligação B3 (Kelly e Vallejo, 2004), sendo, portanto, um forte indicativo de que o gene presente em Jalo Listras Pretas encontra-se neste grupo de ligação (Figura 2). Até o presente momento nenhum dos genes caracterizado de resistência à antracnose foi identificado nesse bloco gênico.

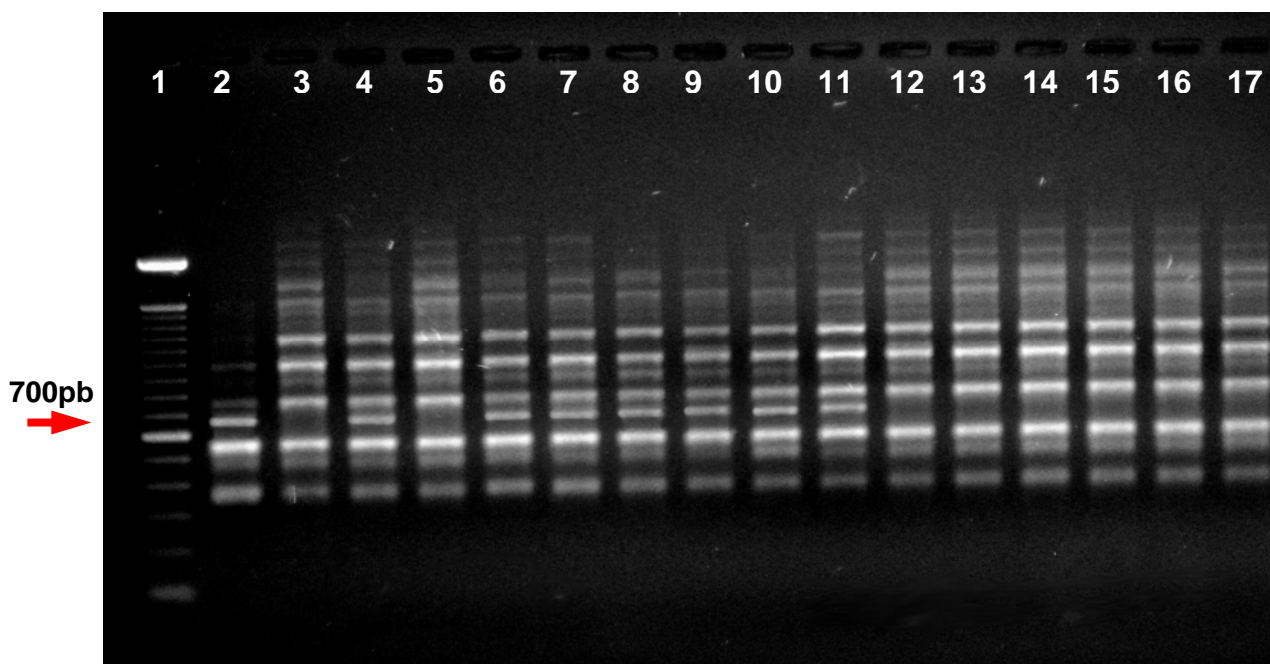


Figura 2 - Amplificação do DNA genômico usando o primer RAPD OV-20<sub>700</sub> para: 1- Marcador de 100 pb, 2- Jalo Listras Pretas (parental resistente), 3- Cornell 49-242 (parental suscetível), 4- bulk resistente, 5- bulk suscetível, 6- 11 plantas F<sub>2</sub> resistentes à raça 73, 12 – 17 plantas F<sub>2</sub> suscetíveis à raça 73. A seta indica a banda em fase de acoplamento ao gene de resistência em Jalo Listras Pretas.

Porém, por meio de análise do mapa genético do feijoeiro atualizado nos permite identificar a presença de cluster envolvendo genes de antracnose (ANT<sub>BJ</sub>); crestamento bacteriano comum (CBB<sub>S95</sub>) e mancha bacteriana (BBS<sub>BA</sub>), presente nesse grupo de ligação.

Estudos recentes demonstram a existência de regiões genômicas organizadas para antracnose do feijoeiro. Esses estudos revelaram a existência de famílias de genes análogos (RGAs) e/ou genes de resistência organizados em clusters ao redor dos genes *Co-2* (Geffroy et al., 1998; Creusot et al., 1999), *Co-4* (Melotto e Kelly, 2001; Melotto et al., 2004), e *Co-3/Co-9* (Geffroy et al., 1999; Ferrier-Cana et al., 2003, 2005).

A elucidação desse cluster envolvendo diferentes genes de resistência a diferentes patótipos poderá auxiliar programas de seleção assistida por marcadores moleculares. Principalmente para introgressão do gene *Co-13* em cultivares suscetíveis, além de ser utilizado na piramidação de genes em

programas de melhoramento do feijoeiro, visando à obtenção de cultivares com amplo espectro de resistência.

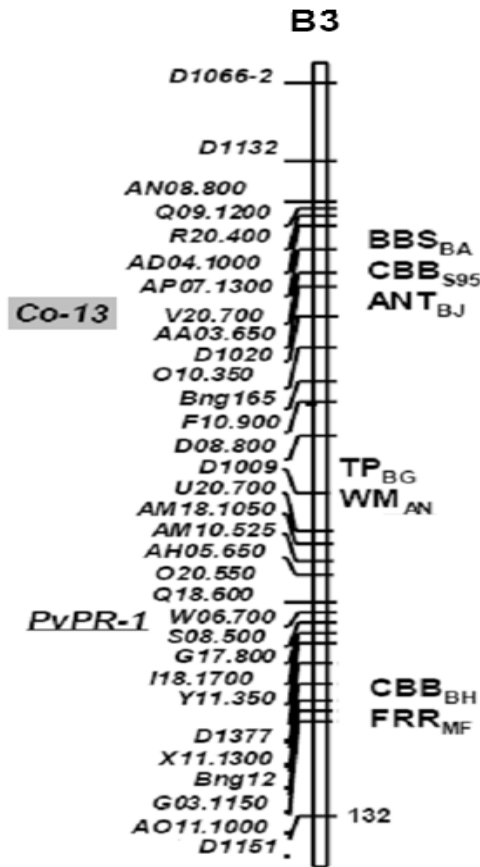


Figura 2 – Mapa genético parcial (grupo de ligação B3) do feijoeiro comum, mostrando a posição relativa do gene *Co-13*, construído no cruzamento entre Jalo Listras Pretas e Cornell 49-242.

A cultivar Jalo Listras Pretas é uma importante fonte de resistência à antracnose do feijoeiro comum causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, uma vez que apresenta o gene andino *Co-13*, o qual confere resistência às principais raças que ocorrem no Estado do Paraná.

A utilização desse marcador molecular ligado ao gene de resistência andino *Co-13* consiste em uma valiosa ferramenta para os programas de melhoramento genético do feijoeiro. Uma vez que esse gene é dominante e o marcador encontrado co-segregou em fase de acoplamento. Segundo Tingey e Tufo (1993), marcadores dominantes em fase de repulsão fornecem pouca informação para a estimativa da distância genética, enquanto que marcadores em fase acoplamento são tão eficientes para mapeamento genético como os marcadores co-dominantes.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1 – As análises moleculares permitiram a identificação do marcador OV-20<sub>700</sub> ligado ao gene andino *Co-13*, presente na cultivar Jalo Listras Pretas.

2 – O marcador encontrado ligado ao gene está presente no grupo de ligação B3 do mapa consenso do feijoeiro comum Jalo EEP558 x BAT 93.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON, A.F.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:865-870, 1994.

AFANADOR, L.K.; HALEY, S.D.; KELLY, J.D. Adoption of a “miniprep” DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 36:10-11, 1993.

ALZATE-MARIN, A.L.; BAIA, G.S.; PAULA JÚNIOR., T.J.; CARVALHO, G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. **Plant Disease**, 81:996-998, 1997.

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 AB 136, TO and G 2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:13-14, 1999a.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G.A. DE; PAULA JUNIOR, T.J. DE; BARROS, E.G. DE; 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, 1999b.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:25-133, 2001a.

ALZATE-MARIN, A.L., DE ALMEIDA, K.S.; BARROS, E.G. DE; MOREIRA, M.A. Identification of a recessive gene conferring resistance to anthracnose in common bean lines derived from the differential cultivar AB 136. **Annual**

**Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:117-118, 2001b.

ALZATE-MARIN, A.L., MORAIS SILVA, M.G. DE; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. DE. Inheritance of anthracnose resistance genes of common bean cultivar PI 207262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:112-113, 2002.

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

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003b.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; MENARIM, H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Herança da resistência à antracnose na cultivar de feijoeiro comum Cornell 49-242. **Fitopatologia Brasileira**, 28:302-306, 2003c.

ALZATE-MARIN, A.L., MORAIS SILVA, M.G. DE; OLIVEIRA, E.J. DE; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of the second anthracnose resistant gene present in the common bean cultivar PI 207262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:177-178, 2003d.

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

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



- ANDRADE, E.M.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões brasileiras. In: VI RENAFAE - REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. Salvador, 1999. **Resumos Expandidos...** Salvador: Embrapa Arroz e Feijão, 1999, p.242-244.
- ANSARI, K.I.; PALACIOS, N.; ARAYA,C.; LANGIN,T.; EGAN,D.; DOOHAN, F.M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology**, 53:635-642, 2004.
- ARIYARATHNE, H. M.; COYNE, D. P.; JUNG, G.; SKROCH, P. W.; VIDAVER, J. R.; STEADMAN, A. K.; MIKLAS, P. N.; BASSETT, M. J. Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. **Journal American Society for Horticultural Science**, 124: 654-662, 1999.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, 9:208-218, 1991.
- ASSIS, O.B.G. Tratamentos de silanização em grãos de feijão por hexametildessilazana: resultados preliminares. **Ciência Rural**, 35:219-222, 2005.
- AWALE, H.E.; KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to Co-4<sup>2</sup> gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:119-120, 2001.
- AWALE, H.E.; ISMAIL, S.M.; VALLEJO, V.A.; KELLY, J.D. SQ4 marker linked to the Co-2 gene on B11 appears to be linked to the UR-11 gene. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:174-175, 2008.
- BAI, Y.; MICHALS, T.E.; PAULS, P. Determination of genetic relationships among *Phaseolus vulgaris* populations in a conical cross from RAPD marker analyses. **Molecular Breeding**, 4:395-406, 1998.

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

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

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

BARRUS, M.F. **Bean anthracnose**. Ithaca: Cornell University Agricultural Experiment Station, 42:101-215, 1921.

BASSETT, M.J. A revised linkage map of common bean. **HortScience**, 26:834-836, 1991.

BASSETT, M.J. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:1-24, 2004.

BEATTIE, A.D.; LARSEN, J.; MICHAELIS, T.E. PAULS, K.P. Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype. **Genome**, 46:411- 422, 2003.

BEEBE, S.E.; SKROCH, P.W.; TOHME, J.; DUQUE, M.C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, 40:264-273, 2000.

BEEBE, S.J.; RENGIFO, E.G.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. **Crop Science**, 41:854-862, 2001.

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.

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

BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybean. **Crop Science**, 6:220, 1966.

CAMPA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PAÑEDA, A., GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. The bean anthracnose resistance gene *Co-5*, is located in linkage group B7. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 48:68-69, 2005.

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

CÁRDENAS, F.; ADAMS, M.W.; ANDERSEN, A. The genetic system for reaction of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to infection by three physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Euphytica**, 13:178-186, 1964.

CATTAN-TOUPANCE, I.; MICHALAKIS, Y.; NEEMA, C. Genetic structure of wild bean population in their South-Andean center of origin. **Theoretical and Applied Genetics**, 96:844-851, 1998.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT, **Annual Reported Bean Program**. Cali; CIAT, 1990. p.70-125.

CHAVES, G. La Antracnosis. In: SCHWARTZ, H.F.; GALVEZ, G.E. (Eds.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980.

Companhia Nacional de Abastecimento. **Quarto Levantamento de Avaliação da Safra 2006/2007**. 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4levsafra.pdf>, acessado em 10 de novembro de 2008.

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

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Reação de acessos de feijoeiro comum à antracnose, mancha-angular e crestamento bacteriano comum. **Fitopatologia Brasileira**, 29 (Suplemento), 2004. p.63.

CREUSOT, F., MACADRE, C., FERRIER CANA, E., RIOU, C., GEFFROY, V., SEVIGNAC, M., DRON, M.; LANGIN, T. Cloning and molecular characterization of three members of the NBS-LRR subfamily located in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris*. **Genome**, 42:254-264, 1999.

DAMASCENO E SILVA, K.J.; SOUZA, E.A.; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, 155:241-247, 2007.

DE 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. **Phytopathology**, 90:758-761, 2000.

DEL PELOSO, M.J.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; FARIA, L.C. de. **Cultivo do feijoeiro comum**. 2003. Disponível em <http://www.cnaf.embrapa.br/>. Acesso em: 24 novembro, 2007.

ENDER, M.; KELLY, J.D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, 45:2482–2490, 2005.

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

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

FALEIRO, R.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, 2003b.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, VA; MOREIRA, MA; BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose - Breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose aided by molecular markers. **Euphytica**, 138:213-218, 2004.

FAO. **Faostat database gateway**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 1, novembro, 2008.

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, VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, Salvador, BA, 60-61, 1999.

FERRIER-CANA, E.; GEFFROY, V.; MACADRE, C.; CREUSOT, F.; IMBERT-BOLLORE, P.; SEVIGNAC, M.; LANGIN, T. Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:251-261, 2003.

FERRIER-CANA, E.; MACADRÉ, C.; SÉVIGNAC, M.; DAVID, P.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene *JA1tr* of *Phaseolus vulgaris*. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:895–905, 2005.

FLOR, H.H. Epidemiology of flax rust in the North Central States. **Phytopathology**, 43:624-628, 1953.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; TSAI, S.M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:381-385, 2001.

FOUILLLOUX, G. Bean anthracnose. New genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:36-37, 1976.

FOUILLLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DISEASES OF TROPICAL FOOD CROPS. Louvain la Neuve, 1979. **Proceedings...** Louvain la Neuve: Université Catholique de Louvain, 221-235, 1979.

FREYRE, R., P.W. SKROCH, V. GEFFROY, A.-F. ADAM-BLONDON, A. SHIRMOHAMADALI, W.C. JOHNSON, V. LLACA, R.O. NODARI, P.A. PEREIRA, S.-M. TSAI, J. TOHME, M. DRON, J. NIENHUIS, C.E. VALLEJOS, AND P. GEPTS. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:847-856, 1998.

GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SEVIGNAC, M.; ADAM-BLONDON, A.-F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics** 96:494-502, 1998.

GEFFROY, V.; DELPHINE, S.; OLIVEIRA, J.C.F.; SÉVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 12:774-784, 1999.

GEPTS, P. A Middle American and an Andean common bean gene pool. In: P. GEPTS (Ed.). **Genetic resources of *phaseolus* beans; their maintenance,**

**domestication, and utilization.** London: Kluwer, 375-390, 1988.

GEPTS, P.; NODARI, R.; TSAI, S. M.; KOINANGE, E. M. K.; LLACA, V.; GILBERTSON, R.; GUZMAN, P. Linkage mapping in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 36: xxiv-xxxvii, 1993.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. **Herança da resistência às raças alfa, delta e capa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 52p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, J.D. RAPD Marker linked to *Co-1*<sup>5</sup> anthracnose resistance Gene in Widusa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:135-136, 2004.

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

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C., COSTA, M.R.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A.; SANSIGOLO, A.L. Molecular characterization of common bean cultivars by phaseolin and RAPD markers. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 50:71-72, 2007b.

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; P.S. VIDIGAL FILHO, A.F. MEDEIROS E M.A.

PASTOR-CORRALES. Common Bean Landrace Jalo Listras Pretas is the Source of a New Andean Anthracnose Resistance Gene. **Crop Science**, 49:133-138, 2009.

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

GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; MARTÍNEZ, O.; ACOSTA, J.A.; GUEVARA-LARA, F.; PARADES-LÓPEZ, O. Putative quantitative trait loci for physical and chemical components of common bean. **Crop Science**, 43:1029–1035, 2003.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, 227:1267-1269, 1970.

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**, 88:505-512, 1993.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 119:122-125, 1994.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48:575-607, 1997.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hipervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, 314: 67-73, 1985.

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.; SKROCK, P. W.; NIENHUIS, J.; ARNAUDSANTANA, E.; BOKOS, J.; ARIYARATHNE, H. M.; STEADMAN, J. R. BEARVER, J. S.; KAEPLER, S. M. Molecular marker associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of American Society of Horticultural Science**, 121: 794-803, 1996.

JUNG, G.; SKROCH, P. W.; COYNE, D. P.; NIENHUIS, J.; ARNAUDSANTANA, E.; ARIYARATHNE, H. M.; KAEPLER, S. M.; BASSETT, M. J. Molecular-marker-based genetic analysis of therapy bean-derived common bacterial blight resistance of different stages of common bean. **Journal of American Society Horticultural Science**, 122: 329-337, 1997.

JUNG, G.; ARIYARATHNE, H. M.; COYNE, D. P.; NIENHUIS, J. Mapping QTL for bacterial brown spot resistance under natural infection in field and seeding stem inoculation in growth chamber in common bean. **Crop Science**, 43:350-357, 2003.

KELLY, J.D.; AFANADOR, L.; CAMERON, L.S. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Michigan and implications in dry bean resistance breeding. **Plant Disease**, 78:892-894, 1994.

KELLY, J.D.; YOUNG, R.A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 39:20-24, 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**, 82:135-154, 2003.

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

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro – *Phaseolus vulgaris*. In: GALLI, F (Eds). **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. p.297-318.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia – doenças de plantas cultivadas**. 3ª Edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. 774p.

KOINANGE, E. M. K.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common-bean. **Crop Science**, Madison, 36:1037-1045, 1996.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, 43:539-548, 2003.

KORZUN, V. Use of molecular markers in cereal breeding. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 7:811-820, 2002.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annual of Eugenics**, 12:172-175, 1944.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; FILHO J. P. L; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, 3(2):87-92, 2002.

LANDER, E.S.; et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, 1:174-181, 1987.

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.

LÓPEZ, C.E.; ACOSTA, I.F.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; GALLEGOS, G.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, 93:88-95, 2003.

- MAHUKU, G.S.; JARA, C.E.; CAJIAO, C.; BEEBE, S. Sources of resistance to *C. lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, 86:1383-1387, 2002.
- MAHUKU, G.S.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, 110:253-263, 2004.
- MAHUKU, G. S.; IGLESIAS, A. M.; JARA, C. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. **Euphytica**, 167:381–396, 2009.
- MASTENBROEK, C. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, 9:177-184, 1960.
- MC CLEAN, P., LEE, R., OTTO, C., GEPTS, P., BASSETT, M. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, 93, 148–152, 2002.
- McROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.
- MELO, L. C. **Mapeamento de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes**. 2000. 148 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MELO, L.C., SANTOS, J.B., FERREIRA, D.F. Mapeamento de QTLs para florescimento do feijoeiro com marcadores RAPD em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, 26:768-779, 2002.
- MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus for anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, 116:143-149, 2000.

MELOTTO, M., KELLY, J.D. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4 that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, 103, 508–517, 2001.

MELOTTO, M.; COELHO, M.F.; PEDROSA-HARAND, A.; KELLY, J.D.; CAMARGO, L.E.A. The anthracnose resistance locus Co-4 of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:690–699, 2004.

MÉNDEZ-VIGO, B.; RODRIGUEZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Development of a SCAR marker linked to Co-9 in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:116-117, 2002.

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

MENDOZA, A.; HERNANDEZ, F.; HERNANDEZ, S.; RUIZ, D.; MARTINEZ DE LA VEGA, O.; DE LA MORA, G.; ACOSTA, J.; SIMPSON, J. Identification of Co-1 anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. **Plant Disease**. 85:252-255, 2001.

MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 78:650-655, 1988.

MEYERS, B. C., DICKERMAN, A. W., MICHELMORE, R. W., SIVARAMAKRISHNAN, S., SOBRAL, B. W.; YOUNG, N. D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant Journal**, 20:317-332, 1999.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, J.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington,

88:9828-9832, 1991.

MICHELMORE, R.W.; MEYERS, B.C. Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. **Genome Research**, 8:1113–1130, 1998.

MIKLAS, P. N.; JOHNSON, E.; STONE, V.; BEAVER, J. S.; MONTOYA, C.; ZAPATA, M. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, 36:1344-1351, 1996.

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.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, M. J.; STAVELY, J. R.; STEADMAN, J. R.; BASSETT, M. J.; BEAVER, J. S. Bacterial, fungal, virus disease loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado/XAN176'). **Journal American Society of Horticultural Science**, Alexandria, 125: 476-481, 2000.

MIKLAS, P. N.; JOHNSON, W. C.; DELORME, R.; GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science**, 41:309-315, 2001a.

MIKLAS, P. N.; RILEY, R. H.; GRAFTON, K. F.; GEPTS, P. Quantitative trait loci (QTL) conditioning resistance to white mold in common bean. In: **Proceedings of the workshop on AXI International Sclerotinia**, York, July 8-12, 59-60, 2001b.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D. The use of MAS to develop pinto bean germplasm possessing *Co-4<sup>2</sup>* gene for anthracnose resistance. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 45:68-69, 2002.

MIKLAS, P.N.; GRAFTON, K.F.; BOSAK, K.M. Molecular breeding for resistance to white mold in common bean. In: 3rd USDA-ARS, Sclerotinia Initiative Workshop, 19–20 January 2005, Minneapolis, MN, 2005.

- MOSS, D.W. **Isoenzymes**. Capman &Hall, London & New York, 1982.
- MURRAY, J.D.; MICHAELS, T.E.; CARDONA, C.; SCHAAFSMA, A.W.; PAULS, K.P. Quantitative trait loci for leafhopper (*Empoasca fabae* and *Empoasca kraemeri*) resistance and seed weight in the common bean. **Plant Breeding** 123:474–479, 2004.
- MYERS, J.R.; DAVIS, J.; YORGEY, B.; KEAN, D. Mapping quantitative trait loci for green bean traits of horticultural importance. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, 47:75–76, 2004.
- NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GETPS. P. Towards an integrated linkage map of common bean, 2. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 85:513-520, 1993.
- NOËL, L., MOORES, T. L., VAN DER BIEZEN, E. A., PARNISKE, M., DANIELS, M. J., PARKER, J. E.; JONES, J. D. Pronounced intraspecific haplotype divergence at the *RPP5* complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 11:2099-2112, 1999.
- PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; CAMPA, A.; FERREIRA, J.J.; GIRALDEZ, R. Molecular markers linked to the *fin* gene controlling determinate growth habit in common bean. **Euphytica**, 162:241-248, 2008.
- PARADELA FILHO, O.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S. Novas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. **Summa Phytopathologica**, 7:20, 1981.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.
- PARK, S. O.; COYNE, D. P.; JUNG, G.; SKROCH, P. W.; ARNAUDSANTANA, E.; SETADMEN, J. R.; ARIYARATHNE, H. M.; NIENHUIS, J. Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean. **Journal American Society of Horticultural Science**, 125:466-475, 2000.

PARK, S. O.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**, 41:1253-1262, 2001.

PARNISKE, M., HAMMOND-KOSACK, K. E., GOLSTEIN, C., THOMAS, C. M., JONES, D. A., HARRISON, K., WULFF, B. B.; JONES, J. D. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. **Cell**, 91:821-832, 1997.

PASTOR-CORRALES, M.A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (ed). **La antracnosis del frijól común, *Phaseolus vulgaris*, em América Latina**, Documento de Trabajo nº 113, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia, p.212-239, 1988.

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

PASTOR-CORRALES, M.A. Estandarización de cultivares diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, 81:694, 1991.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. **Plant Disease**, 78:959-962, 1994.

PASTOR-CORRALES, M.A. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant Disease**, 7:63-67, 1995.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C. E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:205-212, 2003.

POSA-MACALINCAG, M.C.T.; HOSFIELD, G.L.; GRAFTON, K.F.; UEBERSAX, M.A.; KELLY, J.D. Quantitative trait loci (QTL) analyses of canning quality in

kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal American Society of Horticultural Science**, 127:608-615, 2002.

PRYOR, T.; ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, 10:281-305, 1993.

QUEIROZ, V.T., C.S. SOUSA, M.R. COSTA, D.A. SANGLAD, K.M.A. ARRUDA, T.L.P.O. SOUZA, V.A. RAGAGNIN, E.G. BARROS; M.A. MOREIRA. 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.

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.

REY, M.S.; BALARDIN, R.S.; PIEROBOM, C.R. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira Agrociência**, 11:113-116, 2005.

RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M.T.; MARTINEZ DE LA VEGA, O.; SIMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, 52:228-235, 2003.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C., PAÑEDA, A.; FERREIRA, J.J.; GIRALDEZ, R. Allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:145-146, 2004.

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

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA, J.J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between



anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico222 and Widusa. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:807-814, 2008.

ROMÁN-AVILÉS, B.; KELLY, J.D. Identification of Quantitative Trait Loci Conditioning Resistance to Fusarium Root Rot in Common Bean. **Crop Science**, 45:1881-1890, 2005.

SANSIGOLO, A. **Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do Feijoeiro Comum no Estado do Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 59p. Dissertação (Genética e Melhoramento).

SARTORATO, A. Doenças causadas por fungos. **Informe Agropecuário**, 11:76-77, 1985.

SARTORATO, A. **Principais doenças do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2003. Disponível em: [www.agromil.com.br/doe\\_fej.html](http://www.agromil.com.br/doe_fej.html). Acesso em: 23, outubro, 2008.

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

SCHWARTZ, H. F.; PASTOR CORRALES, M. A. (eds). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, p. 105-157, 1989.

SCHNEIDER, K. A.; GRAFTON, K. F.; KELLY, J. D. QTL analyses of resistance to *Fusarium* root rot in bean. **Crop Science**, 41:535-542, 2001.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 87:807-813, 1997.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 45:379-396, 1991a.

SINGH, S. P.; GUTIERREZ, J. A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean – II: marker based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, 31: 23-29, 1991b.

SINGH, S.P., MORALES, F.J.; MIKLAS, P.N.; TERÁN, H. Selection for bean golden mosaic resistance in intra- and inter-racial bean populations. **Crop Science** 40:1565-1572, 2000.

SONG, W. Y., PI, L. Y., WANG, G. L., GARDNER, J., HOLSTEN, T.; RONALD, P. C. Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family. **Plant Cell** 9:1279-1287, 1997.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAYLEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, p. 1-26, 1992.

SVETLEVA, D.; VELCHEVA, M.; BHOWMIK, G. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. **Euphytica**, 131:189-200, 2003.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijão comum. **Summa Phytopathologica**, 30:371-375, 2004.

TAR'AN, B.; MICHAELS, T. E.; PAULS, K. P. Genetic mapping of agronomic traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Crop Science**, 42:544-556, 2002.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; NUNES, W.M.C.; VIDA, J.B. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* in Paraná state, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2:55-60, 2002.

TINGEY, S.V.; TUFO, J.P. DEL. Genetics Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Plant Physiology**, 101:349-352, 1993.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the Co-5

locus in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:121-122, 2001.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. **The use of AFLP analysis to tag the Co-1<sup>2</sup> gene conditioning resistance to bean anthracnose.** Disponível em: [http://www.intlag.org/pag/10/abstracts/PAGX\\_P233.html](http://www.intlag.org/pag/10/abstracts/PAGX_P233.html). Plant and Animal Genome X Conference 2002, San Diego, CA, 2002.

VALLEJO, V.A.; AWALE, H.E.; KELLY, J.D. Characterization of the anthracnose resistance in the Andean bean cultivar Jalo EEP 558. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:179-180, 2003.

VALLEJOS, C.E.; ASTUA-MONGE, G.; JONES, V.; PLYLER, T.R.; SAKIYAMA, N.S.; MACKENZIE, S.A. Genetic and Molecular Characterization of the I Locus of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, 172: 1229–1242, 2006.

VALLEJOS, C.E.; CHASE, C.D. Extended map for the phaseolin linkage group of *Phaseolus vulgaris* L\*. **Theoretical and Applied Genetics**, 82:353-357, 1991.

VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulagris* L. **Genetics**, 131: 733-740, 1992.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. *Standart system for the evaluation of bean gemplasm.* **CIAT**, CALI, Colômbia. 1987. 54 p.

VIDIGAL FILHO, P.S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, J.D.; KIRK, W.W. Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. **Journal of Phytopathology**, 155:108–113, 2007.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro.** Viçosa: Imprensa Universitária, 1983.231p.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. de O. **Produção de sementes de feijão.** Viçosa: EPAMIG, 1993. 131 p.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In

BORÉM, A. (Eds). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999, p. 273-349.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. VAN DE; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23: 4407-4414, 1995.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80:650-654, 1996a.

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

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Tests of allelism for the anthracnose resistance *Co-1* gene. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 40:128-129, 1997.

YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G 2333". **Theoretical and Applied Genetics**, 96:87-94, 1998.

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

YU, K.; PARK, S. J.; ZHANG, B., HAFFNER, M.; POYSA, V. An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. **Euphytica**, 138:89–95, 2004.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

WYMAN, A.R., WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 77:6754-6758, 1980.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Doenças do Feijoeiro e seu Controle. In: **Informe Agropecuário**, 4:50-52, 1978.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington, USDA, 1957. p. 5-15.