



**CAROLINE MARCELA DA SILVA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO  
(*Phaseolus vulgaris* L) DURANTE INTERAÇÃO COM A RAÇA  
65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

**LAVRAS - MG  
2019**

**CAROLINE MARCELA DA SILVA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L)  
DURANTE INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Caroline Marcela da.

Expressão genica diferencial do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L)  
durante interação com a raça 65 *Colletotrichum lindemuthianum* /  
Caroline Marcela da Silva. - 2019.

92 p. : il.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. RT-PCR 2. cDNA-RAPD. 3. Race 65 -*Colletotricum*  
*lindemuthianum*. I. Pereira, Welison Andrade. II. Título.

**CAROLINE MARCELA DA SILVA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L)  
DURANTE INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

**DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF THE BEAN (*Phaseolus vulgaris* L)  
DURING INTERACTION WITH THE RACE 65 OF *Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 01 de março de 2019.

Dr. Evandro Novaes            UFLA  
Dra. Monik Evelin Leite      IFCE

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2019**

*A Deus, por Sua presença divina no mais íntimo do meu ser, por ser a luz que ilumina  
meu caminho e a força que me sustenta.*

*Ofereço*

*Aos meus pais, Rita e Marcelino, meu bem mais precioso.*

*Ao meu companheiro de vida, Rafael.*

*Com todo meu amor.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda glória! Agradeço a Ele pelo dom da vida, por ser a força e acalanto nos dias difíceis, pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, por fazerem dos meus sonhos, seus sonhos, e por não medirem esforços para a concretização deles. Por serem meu refúgio, meu aconchego, minha calma. Amo vocês até o infinito e além!

Ao Rafael, meu companheiro, meu amigo, meu amor... Obrigada por ser sempre tão dedicado e paciente, pelos abraços nos momentos difíceis, por todo o amor e carinho a mim dedicado. Você foi essencial para a conclusão desse trabalho. Te amo!

À minha sogra, Míriam, por todas as orações e energia positiva. Aos meus irmãos, à minha cunhada Joyce e familiares, por todo suporte e apoio. Às minhas amigas Lílian, Stephania, Helene, Júlia, Vanessa, e ao meu amigo Bruno, por sempre terem palavras de incentivo e apoio.

Ao meu professor e orientador, Welison Andrade Pereira, pela oportunidade e confiança. Pelos ensinamentos, pela amizade e por não medir esforços para me ajudar. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas de turma, por tornarem as manhãs de aulas mais leves e descontraídas. À Mariana, principalmente, pela cumplicidade, amizade e carinho de sempre!

Às minhas meninas, Fernanda, Luciana e Gabriela, por toda dedicação, por tornarem meus dias de trabalho mais fáceis e divertidos. Vocês são demais, obrigada! A todos os meus colegas do laboratório, em especial, Antônio e Rafael, pela parceria.

Aos técnicos Lamarthine, Gisele e Lílian, por não medirem esforços para me ajudarem sempre. Obrigada pela amizade e por todos os conselhos. A todos os funcionários do DBI, pela convivência e auxílio durante o curso.

Ao pessoal do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas. Aos professores Elaine A. Souza e Antonio Chalfun Jr., por disponibilizarem os laboratórios para o desenvolvimento de parte dessa dissertação. Em especial à Larissa, Carlos Cardon e André Almeida, pela ajuda para a construção da mesma.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o mestrado. A todos os professores do programa, pelo conhecimento adquirido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais essa conquista em minha vida.

**MUITO OBRIGADA!**

*“A persistência é o menor caminho do êxito.” (Charles Chaplin)*



## RESUMO

Conhecer o perfil transcricional de genótipos sob tratamentos específicos tem sido considerado como ferramenta de grande relevância para a compreensão molecular dos patossistemas, iluminando o conhecimento da resistência. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotricum lindemuthianum*, é uma das doenças mais importantes que afeta a cultura do feijoeiro, podendo causar perdas expressivas na produção, em condições favoráveis ao patógeno. Assim, este trabalho teve como objetivos: (i) investigar, por RT-qPCR, em genótipos contrastantes para a resistência à raça 65 de *Colletotricum lindemuthianum*, o nível de expressão de genes previamente selecionados na literatura, por sua provável associação com a resposta de resistência a antracnose e; (ii) verificar, pela técnica cDNA- RAPD, a existência de variabilidade de expressão, e obter informações acerca do transcriptoma de cultivares suscetíveis e resistentes a antracnose, quando inoculadas pelo agente patogênico. Os genes analisados, PVPOD, CBP, MAPKK e PGIA, apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos inoculados e o controle das linhagens, oferecendo informações sobre as vias de atuação para a resistência nesse patossistema. A utilização da técnica RAPD, em material expresso, permitiu a amplificação de 1.619 bandas em 251 locos, sendo cerca de 50% deles polimórficos, atestando a existência de variabilidade de expressão gênica, com a identificação de locos putativos de interesse, através de diferenças qualitativas e quantitativas observadas entre os tratamentos inoculados e não inoculados, de ambas as linhagens, mostrando variação na regulação gênica de acordo com o estímulo aplicado.

**Palavras-chave:** cDNA-RAPD. RT- q PCR. Raça 65. Feijoeiro. *Colletotricum lindemuthianum*.

## ABSTRACT

Knowing the transcriptional profile of genotypes under specific treatments has been considered as a tool of great relevance for the molecular understanding of the patossystems, illuminating the knowledge of resistance. The anthracnose caused by the fungus *Colletotricum lindemuthianum* is one of the most important diseases that affects the bean crop, which can cause significant losses in production under conditions favorable to the pathogen. The objective of this work was to: (i) investigate by RT-qPCR, in contrasting genotypes for resistance to race 65 of *Colletotricum lindemuthianum*, the level of expression of genes previously selected in the literature, for their probable association with the response of resistance to anthracnose, and (ii) to verify, by the cDNA-RAPD technique, the existence of variability of expression and to obtain information about the transcriptome of susceptible and anthracnose resistant cultivars when inoculated by the pathogen. Among the analyzed genes, PVPOD, CBP, MAPKK and PGIA presented differential expression between the inoculated treatments and the control of the lineages, offering information on the resistance pathways in this pathological system. The use of the RAPD technique in express material allowed the amplification of 1,619 bands in 251 loci, about 50% of them being polymorphic, attesting to the existence of variability of gene expression, with the identification of putative loci of interest, through qualitative and quantitative differences observed between inoculated and uninoculated treatments of both lines, showing variation in the gene regulation according to the applied stimulus.

**Keywords:** cDNA-RAPD. RT-PCR. Race 65. Common bean. *Colletotricum lindemuthianum*.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>13</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura do feijoeiro no Brasil</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Antracnose no feijoeiro</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Variabilidade do patógeno</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Variabilidade dentro da raça 65 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i></b> .....	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Controle genético da resistência a antracnose</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Resistência de plantas a patógenos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Interação molecular planta-patógeno</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Proteínas R</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Mecanismos pré e pós-formados</b> .....	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Análise de expressão gênica</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7.1</b>	<b>RT- qPCR</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7.2</b>	<b>cDNA-RAPD</b> .....	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS*</b> .....	<b>38</b>
	<b>ARTIGO 1 - Expressão gênica diferencial do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) durante interação com isolado da raça 65 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ....</b>	<b>39</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1</b>	<b>Material genético</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparo da suspensão de conídios e inoculação</b> .....	<b>43</b>
<b>2.3</b>	<b>Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas</b> .....	<b>43</b>
<b>2.4</b>	<b>Extração de RNA e produção do cDNA</b> .....	<b>44</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise da expressão de genes candidatos por RTqPCR</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6</b>	<b>PCR (Polymerase Chain Reaction) e RT-qPCR</b> .....	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Avaliação fenotípica</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Qualidade e quantificação de RNA total</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Especificidade dos <i>primers</i> para RT-qPCR</b> .....	<b>50</b>

3.4	Análise de expressão dos genes candidatos .....	50
4	DISCUSSÃO .....	55
5	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	ARTIGO 2 - Análise do perfil de expressão gênica de feijoeiro em interação com raça 65 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por marcadores RAPD .....	67
1	INTRODUÇÃO.....	68
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	70
2.1	Material vegetal .....	70
2.2	Preparo da suspensão de conídios e inoculação .....	70
2.3	Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas.....	71
2.4	Extração de RNA e produção do cDNA .....	72
2.5	Análises cDNA- RAPD .....	73
2.6	Análise de similaridade e dissimilaridade de expressão gênica.....	73
3	RESULTADOS .....	74
3.1	Avaliação fenotípica.....	74
3.2	Qualidade e quantificação de RNA total .....	75
3.3	Diversidade de expressão gênica utilizado a técnica cDNA-RAPD.....	76
4	DISCUSSÃO .....	82
5	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem importante papel na alimentação da população brasileira, sendo os seus grãos, fontes de proteínas e minerais, provedores de grandes quantidades de carboidratos, ferro e lisina (MAPHOSA; JIDEANI, 2017). Além de sua importância nutricional e social, a cultura do feijoeiro tem também um relevante papel na economia, contribuindo para a geração de emprego e renda, sendo que o Brasil é o maior produtor mundial, com 16,5% da produção, competindo com países como México, China, Estados Unidos, Índia e Mianmar (CONAB, 2018).

Embora o Brasil seja grande produtor mundial, suas condições climáticas, características de regiões tropicais e subtropicais, favorecem o desenvolvimento de fitopatógenos, causando doenças que resultam em danos expressivos na cultura, como a antracnose. Tendo como agente causal o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, a doença afeta a qualidade dos grãos e vagens e pode causar, sob as condições adequadas ao patógeno, perdas de até 100% em lavouras plantadas com cultivares suscetíveis (FIOREZE et al., 2018).

O controle da doença pode integrar diferentes práticas, sendo elas culturais, como o uso de sementes sadias e rotação de culturas; químicos, com o uso de fungicidas e; genético, com o uso de cultivares resistentes. Este último se destaca por ser um método eficiente e econômico (SARTORATO; RAVA, 1994), apesar de desafiador, dada a grande variabilidade do patógeno, o que torna a resistência uma característica efêmera (PADDER et al., 2016).

Além da variabilidade identificada em diferentes raças fisiológicas, estudos sugerem alta variabilidade patogênica dentro dos isolados de uma mesma raça (PADDER et al., 2017). A raça 65 se destaca por ser uma das raças mais frequentes no Brasil, por apresentar ampla distribuição, alta patogenicidade e elevado número de isolados diferentes, caracterizando sua variabilidade (COELHO et al., 2016).

O feijoeiro também apresenta diferentes respostas à infecção pelo patógeno. Mais de 20 locos associados com o controle da resistência a antracnose, já foram identificados e, alguns deles, mapeados em oito cromossomos do feijão (Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv07, Pv08, Pv09 e Pv11). Presença de alelismo múltiplo foi observada nos locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*, que compreendem, principalmente, genes de herança dominante. O mapeamento de alguns desses genes revelou que eles estão organizados em conjuntos complexos, onde os genes intimamente ligados conferem resistência a raças específicas (GEFROY et al., 2008; FERREIRA et al., 2013; CAMPA et al., 2014; ZUIDERVEEN et al., 2016; PADDER et al., 2016).

Em adição ao caráter qualitativo, já foram mapeados alguns locos quantitativos para resistência - QRL (ZUIDERVEEN et al., 2016). Para a raça 65 já foram verificados alguns genes de efeitos independentes para a resistência a antracnose, exibindo dentre eles, interação de genes duplicados (COSTA et al., 2017). Apesar da existência de estudos sobre o assunto, os mecanismos genéticos moleculares deste patossistema ainda não foram totalmente elucidados.

Os perfis transcricionais de genótipos sob tratamentos específicos se consolidam como importantes ferramentas para a compreensão molecular dos patossistemas. A verificação de perfis transcricionais tem sido realizada para diferentes culturas, respondendo a estímulos variados (QUE et al., 2015; BURKHARD; DAY, 2015). O mesmo se aplica ao patossistema feijoeiro-antracnose, envolvendo diferentes raças fisiológicas do patógeno (MELLOTO et al., 2005; BORGES et al., 2012; OBLESSUC et al., 2012; PADDER et al., 2016; FONTENELE et al., 2017), alcançando bons progressos no que se refere ao entendimento de genes induzidos e reprimidos em plantas hospedeiras, desafiadas pelo agente patogênico. Entretanto, as raças abordadas nestes estudos não contemplam o isolado de raça 65, amplamente distribuída no Brasil.

Estudos do transcriptoma, invariavelmente resultam em boas indicações dos genes induzidos em plantas inoculadas pelo patógeno. Estes genes podem ser investigados em estudos de expressão gênica, no intuito de validar sua participação no sistema imune da planta. Uma vez que para a interação entre *Phaseolus vulgaris* e *Colletotricum lindemuthianum* raça 65, ainda não se tem conhecimento de análises de transcriptoma, justifica-se a realização deste estudo.

Dentre as diversas possibilidades técnicas, ensaios de RT-qPCR podem ser explorados no intuito de verificar a taxa de transcrição de alguns genes candidatos em bibliotecas de cDNA, de cultivares suscetíveis e resistentes a antracnose. Para obtenção de transcriptomas, a adaptação de marcadores moleculares, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) aplicado sobre bibliotecas de cDNA, consiste em uma estratégia alternativa, considerando a relação custo/benefício.

Dessa forma, esse trabalho teve por objetivos: (i) investigar, por RT-qPCR, em genótipos contrastantes para a resistência à raça 65 de *Colletotricum lindemuthianum*, o nível de expressão de genes previamente selecionados na literatura, por sua provável associação com a resposta de resistência a antracnose e; (ii) verificar, pela técnica cDNA- RAPD, a existência de variabilidade de expressão, e obter informações acerca do transcriptoma de cultivares suscetíveis e resistentes a antracnose, quando inoculadas pelo agente patogênico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do feijoeiro no Brasil

O feijão comum é classificado como pertencente à família Fabacea, subfamília Faboidea, gênero *Phaseolus* L., espécie *Phaseolus vulgaris* L. Trata-se de uma espécie diploide, autógama e de ciclo anual (DE RON et al., 2015).

É considerado um dos principais componentes da dieta da população brasileira, sendo uma importante fonte de proteínas, carboidratos e ferro. Segundo Suárez-Martínez et al. (2016), a inclusão do feijão na dieta reduz o risco de obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e alguns cânceres. Além do valor nutricional e benefícios para saúde, a cultura apresenta grande relevância socioeconômica, considerando o vasto contingente de pequenos produtores, e a demanda de mão de obra em grandes plantações, principalmente durante a colheita.

A safra do grão pode ser realizada em três épocas dependendo da região. A safra das águas, com plantio nos meses de agosto a novembro e colheita de novembro a fevereiro. A safra das secas, com plantio realizado entre dezembro a março e colheita de março a junho. E a safra irrigada, com plantio de abril a julho e colheita de julho a outubro (SILVA; WANDER, 2013; MAPA, 2017). Devido ao alto índice pluviométrico na safra das águas, ocorre o favorecimento de doenças fúngicas, como por exemplo, a antracnose.

A cultura está presente em praticamente todos os estados brasileiros, sendo Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e São Paulo aqueles que mostraram maior produção (em mil toneladas) na safra 2017/18. No que se refere a produção mundial do feijão, 65% estão concentrados em apenas seis países, sendo eles Brasil, Índia, México, Mianmar, Estados Unidos e China. O Brasil lidera esse *ranking* de produção com 16,5%, seguido por Índia e México, com 16,4% e 9%, respectivamente (CONAB, 2018).

Devido a grande importância dessa leguminosa, justifica-se o investimento em estudos e pesquisas que contribuam para controle de prevenção e tratamento, visando evitar perdas no cultivo desse grão.

### 2.2 Antracnose no feijoeiro

A antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib, é uma das doenças mais importantes do feijoeiro em termos



econômicos, uma vez que as perdas ocasionadas em genótipos suscetíveis podem chegar até 100% do rendimento total (MOHAMMED et al., 2013). As condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento e estabelecimento da doença incluem alta umidade (92-100%) e temperaturas amenas, variando de 18 a 22 °C (KIMATI et al., 1997).

A alta umidade associada a temperaturas amenas, caracterizam, no geral, regiões tropicais e subtropicais, justificando seus maiores índices de ocorrência da doença (PASTOR-CORRALES, 1989). No Brasil, a antracnose ocorre na maioria dos estados produtores, prevalecendo em Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VIEIRA, 2005). Embora o patógeno seja capaz de infectar durante as três épocas de cultivo, estudos de análise temporal mostram maior ocorrência na safra das águas, pela formação de um microclima favorável (LOBO-JUNIOR, 2014).

A propagação do patógeno pode ocorrer tanto a longas distâncias, por meio de sementes contaminadas, quanto a curtas distâncias, através da disseminação de esporos, por respingo de chuva, insetos, animais, ação humana, ou por implementos agrícolas que entram em contato com plantas infectadas (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Além disso, o fungo pode sobreviver entre safras por meio de micélio dormente, no interior do tegumento de sementes ou em restos culturais (SARTORATO; RAVA, 1994).

O processo infeccioso inicia-se com a germinação dos conídios, em um período de 6 a 9 horas após o contato com o patógeno. Esse processo consiste na diferenciação da extremidade livre do conídio, formando um apressório, o qual se adere à superfície vegetal, atuando na penetração através da cutícula e epiderme (O'CONNELL et al., 1985). Para colonizar as plantas hospedeiras, o agente patogênico usa de um processo sequencial de infecção biotrófica e necrotrófica. A infecção se inicia pela fase biotrófica assintomática, caracterizada pelo desenvolvimento de hifas primárias espessas no espaço intracelular, e se desenvolve a partir da transição para a fase necrotrófica destrutiva, a qual apresenta hifas secundárias filamentosas, cerca de 120 horas após infecção (O'CONNELL et al., 1985; BHADARIA et al., 2011; GONZALES et al., 2015).

Os sintomas estão presentes em todos os estádios de crescimento da planta, podendo ser observados após o sexto dia da infecção, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes (CHAVES, 1980). Os primeiros sinais da infecção, geralmente aparecem na superfície inferior das folhas, ao longo das nervuras, com coloração variando de vermelho-alaranjado à púrpura, espalhando-se, posteriormente, para a superfície superior. No pecíolo e nas vagens pode-se desenvolver lesões, na forma de cancrios, de tamanhos variados, delimitadas por um anel preto, com borda laranja-avermelhada (PAULA JR.; ZAMBOLIM,

2006; MOHAMMED, 2013). A partir das vagens, o fungo pode atingir os cotilédones e o tegumento da semente em desenvolvimento. As sementes infectadas apresentam-se frequentemente descoloridas e com lesões na forma de cancrios (MOHAN et al., 1989).

O controle da doença pode ser feito preventivamente e de modo integrado, aliando controle químico, práticas culturais adequadas e controle genético. A utilização de fungicidas, como controle químico, encarece a produção, além de ser nocivo à saúde e causar danos ambientais. O uso de cultivares resistentes consiste em um método eficiente, por ser econômico e seguro. Entretanto, a complexidade que envolve a variabilidade patogênica desses fungos, dificulta tanto a obtenção quanto a duração de tais cultivares na condição de resistência (SARTORATO; RAVA, 1994; MOHAMMED, 2013; PADDER et al, 2017).

### 2.3 Variabilidade do patógeno

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* apresenta ampla variabilidade em relação à capacidade de causar doença em várias cultivares. Essa variabilidade é identificada como diferentes raças fisiológicas (PADDER et al., 2017).

Barrus (1911,1918) realizou os primeiros estudos a respeito dessa variabilidade, e nestes, identificou duas raças distintas do patógeno ao observar o comportamento diferente de cultivares de feijão, que foram inoculadas com patógenos provenientes de diferentes regiões produtoras. Pesquisadores em vários países, ao descobrirem novas raças, usaram códigos locais para a sua classificação, dificultando por muito tempo a troca de informações (MELOTTO et al., 2000).

Com o objetivo de facilitar o intercâmbio de informações, foi proposto e aprovado na Primeira Reunião Latino-Americana da Antracnose do Feijoeiro, realizada no CIAT (Cali, Colômbia), um sistema binário (HANDGOOD, 1970) sob um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras de feijão (PASTOR- CORRALES, 1991) para classificação das raças (TABELA 1). Por este sistema, a designação de uma raça é obtida pela soma dos valores numéricos de cada cultivar diferenciadora que é suscetível a essa raça (RAVA et al., 1994; ANDRADE et al., 1999; THOMAZELLA et al., 2000). Por exemplo, a raça 65 é assim designada por sua reação de virulência às cultivares Michelite e México, que apresentam o sistema binário  $2^0$  e  $2^6$ , respectivamente.

Tabela 1 - Cultivares, principal alelo de resistência, sistema binário e valor de cada cultivar utilizada na identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Adaptado de CIAT, 1990).

<b>Cultivares em ordem de utilização</b>	<b>Alelos de Resistência</b>	<b>Sistema Binário</b>	<b>Nome (Número) da Raça</b>
Michelite	Co-11	2 <sup>0</sup>	1
Dark Red Kidney	Co-1	2 <sup>1</sup>	2
Perry Marrow	Co-1 <sup>3</sup>	2 <sup>2</sup>	4
Cornell 49-242	Co-2	2 <sup>3</sup>	8
Widusa	Co-1 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	16
Kaboon	Co-1 <sup>2</sup>	2 <sup>5</sup>	32
México	Co-3	2 <sup>6</sup>	64
PI 207262	Co-4 <sup>3</sup> , Co-9/Co-3 <sup>3</sup>	2 <sup>7</sup>	128
TO	Co-4	2 <sup>8</sup>	256
TU	Co-5	2 <sup>9</sup>	512
AB 136	Co-6, co-8	2 <sup>10</sup>	1024
G 2333	Co-4 <sup>2</sup> , Co-5 <sup>2</sup> , Co-7/Co-3 <sup>5</sup>	2 <sup>11</sup>	2048

Fonte: Adaptado de CIAT (1990).

Atualmente, 182 raças no mundo foram identificadas a partir da inoculação de 1590 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* nas cultivares diferenciadores (PADDER et al., 2017). No Brasil, já foram identificadas cerca de 60 raças, sendo elas 0,1, 4, 5, 7, 8, 17, 21, 23, 31, 38, 52, 55, 64, 65, 66, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 86, 87, 89, 93, 95, 96, 97, 101, 102, 103, 105, 109, 111, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 131, 193, 217, 249, 320, 321, 337, 339, 343, 351, 453, 581, 585, 2047 (SOMAVILLA; PRESTES, 1999; THOMAZELLA, 2002; SILVA et al., 2007; GONCALVES-VIDIGAL et al., 2008; PINTO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016; PADDER et al., 2017). Dentre elas, destaca-se a raça 65, por apresentar grande variabilidade de isolados. Esta variabilidade existente pode ser explicada tanto por mecanismos que criam variabilidade (mutação), como por mecanismos que ampliam a variabilidade (recombinação sexual, heterocariose, parassexualidade, transposons, fatores citoplasmáticos, polimorfismo cromossômico, anastomose entre hifas e anastomose entre conídios) (SARTORATO; RAVA, 1994; ISHIKAWA et al., 2012). A partir destes fenômenos genéticos, surgem novas combinações alélicas nas populações, as quais sofrem seleção e dispersão com migrações de indivíduos de um local ao outro.

## 2.4 Variabilidade dentro da raça 65 de *colletotrichum lindemuthianum*

Além da variabilidade identificada em diferentes raças fisiológicas, estudos sugerem alta variabilidade patogênica dentro dos isolados de uma mesma raça (PADDER et al., 2017). No Brasil, a raça 65 se destaca nesse aspecto, estando presente em 12 de seus estados (DAVIDE; SOUZA, 2009; COÊLHO et al., 2016). Devido a sua importância e ampla distribuição, programas de melhoramento têm focado seus esforços em estudos dessa raça com o objetivo de controlar a antracnose.

Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006) e Alzate-Marin et al. (2007), mostraram em seus estudos, o comportamento diferencial da cultivar BAT 93 diante a dois isolados da raça 65, sendo resistente a um e suscetível a outro, indicando que diferenças dentro da raça não podem ser detectadas com eficiência pelo conjunto internacional de cultivares diferenciadores atual.

Para solucionar esta questão, foi proposto por Ishikawa, Ramalho e Souza (2011) um novo conjunto de cultivares diferenciadoras, capaz de discriminar a variabilidade existente dentro da raça 65 (TABELA 2). Esse conjunto pode ser utilizado de modo complementar ao conjunto internacional de cultivares diferenciadoras proposto por Pastor-Corrales (1991), permitindo uma melhor caracterização da raça.

Tabela 2- Cultivares e sistema binário, pertencentes ao conjunto de cultivares diferenciadoras para detectar variabilidade existente dentro da raça 65 de *Colletotricum Lindemuthianum*.

Cultivares	Sistema binário
Estilo	$2^0$
Majestoso	$2^1$
Supremo	$2^2$
União	$2^3$
Valente	$2^4$
Ouro Vermelho	$2^5$
Madrepérola	$2^6$
Talismã	$2^7$

Fonte: Conjunto proposto por Ishikawa, Ramalho e Souza (2011).

A classificação deste novo conjunto de cultivares é feita de modo semelhante ao sistema de classificação para raças, somando os valores numéricos de cada cultivar suscetível, e a designação é feita complementando a nomenclatura da raça. Por exemplo, o isolado LV 117, foi classificado como raça 65.9, pois causou reação de suscetibilidade nas cultivares Estilo e União ( $2^0$  e  $2^3 = 9$ ).

## 2.5 Controle genético da resistência a antracnose

A resistência do feijoeiro a antracnose é predominantemente vertical, sendo descrita pelo modelo gene-a-gene (FLOR, 1971). Locos multi-alélicos, de efeito independente, chamados *Co*, foram identificados e relacionados a esse patossistema.

Mais de 20 locos, entre diferentes genes, foram mapeados em oito cromossomos do feijoeiro, PV 01, PV 02, PV 03, PV 04, PV 07, PV 08, PV 09 e PV 11 (MEDIACCI et al., 2016; ZUIDDERVEN et al., 2016). Com exceção do loco *co-8*, todos os demais apresentam caráter de dominância. Esses genes estão associados a cultivares diferenciais andinas, mesoamericanas e a outros genótipos andinos e mesoamericanos (FERREIRA et al., 2013). Tanto o *pool* gênico quanto a localização desses locos são mostrados na Tabela 3.

A presença de alelismo múltiplo foi identificada nos locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*. O loco *Co-1* tem uma série alélica formada por quatro alelos *Co-1*<sup>2</sup>, *Co-1*<sup>3</sup>, *Co-1*<sup>4</sup> e *Co-1*<sup>5</sup>, presentes nas cultivares Kaboon, Perry Marrow, AND 277 e Widusa, respectivamente (MELLOTO et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2003; GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY et al., 2006). O loco *Co-3* possui o alelo *Co-3*<sup>2</sup>, identificado na cultivar México 227 (FOUILLOUX, 1979). Os genes *Co-7*, *Co-9* e *Co-10*, por sua vez, foram renomeados como alelos *Co-3*<sup>5</sup>, *Co-3*<sup>3</sup> e *Co-3*<sup>4</sup>, respectivamente, do gene *Co-3*. O loco *Co-4* apresenta dois alelos, o *Co-4*<sup>2</sup> encontrado nas linhagens SEL 1308 e G2333 (SILVÉRIO et al., 2002; YOUNG et al., 1998) e o alelo *Co-4*<sup>3</sup>, presente na cultivar diferenciadora PI 207262 (ALZATE-MARIM et al., 2007). O loco *Co-5* apresenta o alelo *Co-5*<sup>2</sup>, identificado nas cultivares G2333 e SEL 1360 (VALLEJO; KELLY, 2009; SOUSA et al., 2014).

O mapeamento de alguns desses genes revelou que eles estão organizados em conjuntos complexos, onde os locos intimamente ligados, conferem resistência a raças específicas (KELLY; VALLEJO, 2004; FERREIRA et al., 2013). Os locos *Co-1*, *Co-x* e *Co-w* estão associados no grupo de ligação Pv 01; locos *Co-5*, *Co-6* e *Co-v* no Pv 07; o loco *Co-13* no Pv 03 e o loco *Co-u* no Pv 02 (CAMPA et al., 2014). O mapeamento fino do loco *Co-4* (COK-4) revelou 18 cópias do COK-4 em um segmento de 325 kb do Pv 08 (OBLESSUC et al., 2015).

Tabela 3 - Referência, localização e centro de origem dos locos envolvidos com a resistência do feijoeiro a antracnose.

<b>Locos</b>	<b>Cromossomos</b>	<b>Origem</b>	<b>Referência</b>
<i>Co-1</i>	PV-01		McRostie, 1919
<i>Co-2</i>	PV-11	MA*	Mastenbroek, 1960
<i>Co-3</i>	PV-04	MA	Bannerot et al., 1971
<i>Co-4</i>	PV- 08	MA	Fouilloux, 1976
<i>Co-5</i>	PV-07	MA	Fouilloux, 1976
<i>Co-6</i>		MA	Alzate-marin et al., 1997; Gonçalves-vidigal et al., 2001
<i>Co-7/ Co-3<sup>5</sup></i>		MA	Young et al., 1998; Lima et al., 2008
<i>co-8</i>		MA	Alzate-marin et al., 1997
<i>Co-9/ Co-3<sup>3</sup></i>	PV-04	MA	Geffroy et al., 1999; Méndez- Vigo et al., 2005
<i>Co-10/ Co-3<sup>4</sup></i>	PV-04	MA	Alzate-marin et al., 2003; Coelho et al., 2013
<i>Co-11</i>		MA	Gonçalves-Vidigal et al., 2007
<i>Co-12</i>		AND*	Gonçalves-Vidigal et al., 2008
<i>Co-13</i>		AND	Gonçalves-Vidigal et al., 2009
<i>Co-14</i>		AND	Gonçalves-Vidigal et al., 2013
<i>Co-15</i>			Gonçalves et al., 2010
<i>Co-16</i>			Coelho et al., 2013
<i>Co-17</i>			Castro et al., 2014
<i>Co-u</i>	PV- 02	MA	Geffroy et al., 2008
<i>Co-v</i>		MA	Geffroy et al., 2008
<i>Co-w</i>	PV-01	AND	Geffroy et al., 2008
<i>Co-x</i>	PV-01	AND	Geffroy et al., 2008
<i>Co-y</i>	PV-04	MA	Geffroy et al., 1999
<i>Co-z</i>	PV-04	MA	Geffroy et al., 1999

\*AND - Centro de origem Andino e MA centro de origem Mesoamericano.

Fonte: Da autora (2019).

Costa et al. (2017) demonstraram que a especificidade pode ser encontrada não apenas entre as raças, mas também entre as cepas da mesma raça em alta frequência. Para a raça 65, foram encontrados 12 genes de efeitos independentes conferindo resistência a sete isolados (CI 1614, CI 1532, CI 1610, CI 1740, LV 134, LV 238 e LV 145), sendo dois genes por cepa, sugerindo que o controle da doença para as cepas utilizadas seja decorrente de genes duplicados (COSTA et al., 2017). Vieira et al. (2015), com o uso de marcadores SCARS, realizaram a caracterização fenotípica e molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto a resistência a antracnose, verificando a especificidade de alguns marcadores

com locos de resistência a antracnose, e obtiveram, assim como Alzate-Marin e Sartorato (2004), a associação dos locos *CO-4*, *CO-5* e *CO-6* com a resistência a essa raça.

Apesar do conhecimento estabelecido sobre os locos associados à resistência do feijoeiro às diferentes raças do patógeno, ainda falta o conhecimento dos genes encontrados nestes locos, assim como sua atuação nas vias de resposta da planta hospedeira ao patógeno. Acredita-se que, com o aumento no número de estudos referentes a expressão diferencial entre cultivares contrastantes no que se refere à resistência a antracnose, os mecanismos moleculares responsáveis por esta característica sejam cada vez mais elucidados.

## 2.6 Resistência de plantas a patógenos

### 2.6.1 Interação molecular planta-patógeno

A interação planta-patógeno consiste de uma relação evolutiva bidirecional, permitindo a seleção de combinações gênicas em ambos os lados. A planta deve ser capaz de reconhecer e se defender de um potencial patógeno, enquanto o patógeno, por sua vez, deve manipular a biologia da planta para criar um ambiente propício a seu crescimento e reprodução (BOYD et al., 2013). Para tal finalidade, as plantas dependem da imunidade inata de cada célula e dos sinais sistêmicos que emanam dos locais de infecção (JONES; DANGL, 2006).

O sistema imune das plantas apresenta dois ramos principais. O primeiro utiliza receptores de reconhecimento de padrões transmembranares (*Pattern Recognition Receptors - PRRs*), que reconhecem e respondem a padrões moleculares associados a microrganismos ou patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMPs*; *Microbe-Associated Molecular Patterns - MAMPs*). Esse reconhecimento é realizado antes mesmo do patógeno adentrar à célula, e se caracteriza por ser de amplo espectro, ou seja, não específico (BOUTROT; ZIPFEL, 2017). Outro grupo de receptores compreende as quinases associadas à parede (*wall-associated kinases- WAKs*), que atuam na detecção de padrões moleculares associados a danos celulares durante a infecção (*Damage-associated molecular pattern- DAMPs*) (BOYD et al., 2013). A reação desencadeada por esse reconhecimento é conhecida por imunidade desencadeada por PAMP (*PAMP Triggered Immunity - PTI*), e ativa uma série de reações, como explosão oxidativa, aumento no fluxo de íons, aumento na expressão de genes, fortalecimento de barreiras físicas e químicas, que impedem o estabelecimento do patógeno (NELSON et al., 2018).

Já o segundo ramo, corresponde ao reconhecimento específico do efector do patógeno por uma proteína R do hospedeiro dentro da célula. Flor (1956) explica tal reconhecimento a partir de um modelo teórico de interação gene-a-gene, o qual demonstra uma relação entre os sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno, de forma que cada gene de reação do hospedeiro, através de um alelo de dominância, interage com um gene de patogenicidade correspondente no patógeno, a partir de seu alelo dominante de avirulência (DE WIT, 2002; GOUVEIA et al., 2017; ANDERSEN et al., 2018).

As proteínas R são codificadas pela maioria dos genes R e apresentam em comum domínios ricos em repetições de leucina, os LRR (GURURANI et al., 2012). A imunidade desencadeada por efector ocorre em resposta a patógenos que vencem a imunidade desencadeada por PAMP, conseguindo introduzir seu efector na célula. Os alelos que codificam esses efetores são normalmente chamados de alelos de avirulência ou Avr (JONES; DANGL, 2006). O reconhecimento específico do efector desencadeia uma série de modificações nas células, que podem levar à morte celular, a partir da reação de hipersensibilidade.

## 2.6.2 Proteínas R

Existe uma variedade de proteínas R, codificadas por genes R, que reconhecem um grande número de patógenos. Apesar da diversidade, essas proteínas compartilham domínios estruturais conservados ricos em repetições de leucina (*Leucine rich repeats*- LRR). Essas estruturas têm importante papel no reconhecimento específico de patógenos (GURURANI et al., 2012).

Os produtos proteicos, a partir dessa homologia, podem ser classificados em famílias (DANGL; JONES, 2001). Oito classes já são conhecidas, classificadas com base na organização de aminoácidos e seus domínios de membrana (GURURANI et al., 2012; BOYD et al., 2013), como mostra a Tabela 4.

A maior classe compreende as NBS-LRRs. Essas proteínas contêm um domínio LRR em sua extremidade C-terminal, um sítio de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide-binding site*-NBS) em sua região central e, na extremidade N-terminal, um domínio de ligação a efector variável (DANGL; JONES, 2001; GUIMARÃES et al., 2005; TAMELING et al., 2007). A resistência a doenças foi relatada por algum tempo como a única função dessas proteínas (DANGL; JONES, 2001; MEYERS et al., 2005). Entretanto, estudos mostram que, além da sua função na percepção dos patógenos na célula, essa classe de proteínas também está



envolvida na sinalização de importantes cascatas para processos celulares adicionais, como tolerância a seca, desenvolvimento e fotomorfogênese (TAMELING et al., 2007).

As proteínas receptoras de membrana e NBS-LRR explicam interações verticais em diversos patossistemas. Esse fato leva melhoristas e fitopatologistas a investirem cada vez mais em pesquisas, visando elucidar interações complexas de genes responsáveis por resistência a fitopatógenos.

Tabela 4 - Classificação das proteínas associadas ao reconhecimento de patógenos, de acordo com seus domínios.

Classe	Domínios
I	NBS- LRR-TIR
II	NBS- LRR- CC
III	LRR- TrD
IV	LRR- TrD- KINASE
V	TrD- CC
VI	LRR- TrD- PEST- ECS
VII	TIR- NBS- LRR- NLS- WRKY
VIII	KINASE KINASE-KINASE HM1

\*LRR- *Leucine rich repeats*; NBS- *Nucleotide-binding site*; CC- *Coiled coil*; TrD- *Transmembrane domain*; TIR- *Toll-Interleukin receptor*; NLS- *Nuclear localization signal*; HM1- *Helminthosporium carbonum toxin reductase enzyme*; PEST- *Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine)*; ECS- *Endocytosis cell signaling domain*; WRKY- *Amino acid domain*.

Fonte: Da autora (2019).

### 2.6.3 Mecanismos pré e pós-formados

As proteínas de reconhecimento de PAMPs (PRR), de DAMPs (WAKs) e as proteínas NB-LRRs iniciam a sinalização para uma série de mecanismos que vão agir em prol da planta, em sua defesa (ANDERSEN et al., 2018).

Tais mecanismos podem ser classificados em: (I) passivos ou pré-formados ou; (II) ativos ou pós-formados. Ambos são divididos em estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais correspondem a barreiras físicas à penetração e/ou colonização dos patógenos, enquanto que os mecanismos bioquímicos se referem a substâncias capazes de inibir ou gerar condições adversas para o desenvolvimento do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Entre os mecanismos pré-formados estruturais enquadram-se cutículas, tricomas, estômatos e vasos condutores. Os mecanismos pré-formados bioquímicos incluem os fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores

proteicos, quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases. Já para as classes dos mecanismos pós-formados, papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça, camadas de abscisão, e tiloses, são classificados como mecanismos estruturais. Enquanto que as fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese e espécies ativas de oxigênio se enquadram na classe dos mecanismos pós-formados bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1994; STANGARLIN et al., 2011).

A reação de hipersensibilidade em plantas é um dos principais eventos de resposta de defesa, que ocorre de forma rápida e localizada no sítio de infecção do patógeno. De modo geral, constitui-se na primeira etapa da resposta da planta, sendo seguida pela produção de oxigênio reativo (ROS), modificação da parede celular, fechamento de estômatos ou produção de várias proteínas relacionados a patogênese (PR), destacando-se as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3- glucanases (BARROS et al., 2010; ANDERSEN et al., 2018). Essas proteínas foram classificadas, segundo Gorjanović (2009), em 17 categorias de acordo com suas estruturas e funções (TABELA 5).

Tabela 5 - Famílias de proteínas PRR relacionadas à patogênese.

<b>Categorias</b>	<b>Propriedades</b>
PR-1	Antifúngica
PR-2	$\beta$ - 1,3 – glucanase
PR-3	Quitinase I-II, IV, VII
PR-4	Quitinase I-II
PR-5	Osmotina
PR-6	Inibidores de Protease
PR-7	Endoproteinases
PR-8	Quitinase III
PR-9	Peroxidases
PR-10	Análogas a ribonuclease
PR-11	Quitinase V
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas relacionadas ao transporte de lipídeos
PR-15	Oxalato oxidases
PR-16	Análogas a oxalato oxidase
PR-17	Desconhecida

Fonte: Da autora (2019).

## 2.7 Análise de expressão gênica

A expressão gênica consiste no processo pelo qual a informação contida em um gene é traduzida em estruturas presentes em um determinado tipo celular, RNA mensageiro ou proteínas. Destes, a transcrição é o início da expressão gênica.

A análise do transcriptoma corresponde à identificação de todos os RNAs expressos em um dado organismo, permitindo a comparação do perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento. As informações adquiridas por esse tipo de análise permitem a identificação de genes e vias moleculares envolvidas em processos biológicos, além da obtenção de marcadores (YLMAZ et al., 2012).

Várias tecnologias foram desenvolvidas para deduzir e quantificar o transcriptoma, incluindo hibridações ou abordagens baseadas em sequências. As abordagens baseadas em sequências determinam diretamente a sequência de cDNA. Incluem técnicas como análise em série da expressão gênica (SAGE), análise de *cap* de expressão gênica (CAGE) e RNA-Seq. Embora SAGE seja mais comumente utilizado para traçar perfis transcricionais globais, o RNA-Seq oferece maior precisão de níveis de transcrições. Consiste em uma tecnologia estabelecida e, ao mesmo tempo, em ativo desenvolvimento, que vem ganhando espaço nos estudos de expressão gênica diferencial (WANG et al., 2009). Padder et al. (2016) traçaram o transcriptoma do patossistema *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 73, utilizando RNA-Seq.

As abordagens baseadas em hibridação também são comumente utilizadas devido ao seu alto rendimento e custo relativamente baixo. Incluem técnicas como microarranjos, hibridação subtrativa por supressão (SSH), Differential Display (DD), cDNA-AFLP, cDNA-RAPD e PCR quantitativa em tempo real RT-qPCR (WANG et al., 2009). Para os microarranjos, somente sequências conhecidas podem ser analisadas. A SSH tem a desvantagem de requerer grande quantidade de material biológico. Os métodos DD, cDNA-AFLP e cDNA-RAPD requerem menor quantidade de material biológico e são alternativas consideráveis. As duas últimas não requerem dados prévios da sequência e possibilitam a identificação visual de transcritos diferencialmente expressos (SHI et al., 2011). A transcrição reversa seguida da análise da reação quantitativa da reação em cadeia da polimerase é uma técnica sensível e de baixo custo, para se quantificar transcritos (SCHEFE, 2006).

O acúmulo exponencial de sequências gênicas e genomas depositados em bancos de dados públicos mundiais tem aumentado consideravelmente a demanda por metodologias que

permitam sua identificação funcional ou confirmação de homologia, além da elucidação dos padrões de expressão.

### **2.7.1 RT- qPCR**

Kary Mullis desenvolveu a reação em cadeia da polimerase (PCR) em 1983. A partir de então, diferentes técnicas foram adaptadas, melhoradas e inventadas utilizando-se desse princípio, como por exemplo, a PCR em tempo real (Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time - RT- qPCR) (YLMAZ et al., 2012). A técnica se baseia na quantificação do alvo durante o processo de amplificação do material genético. A incorporação de moléculas fluorescentes que são covalentemente ligadas a nucleotídeos permite a quantificação absoluta ou relativa do número de cópias de um fragmento de material genético ao longo do progresso dos ciclos de amplificação, durante a cinética da reação (HEID et al., 1996).

De modo geral, uma PCR pode ser dividida em quatro fases: fase linear, fase exponencial, fase log-linear e fase de platô (TICHOPAD et al., 2003). A substância alvo é amplificada através de um processo cíclico de aquecimento e resfriamento (TELLINGHUISEN et al., 2014). Na medida em que o material genético é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente. Assim, a detecção é realizada.

Suas aplicações incluem a quantificação de ácidos nucleicos obtidos de células ou tecidos, para comparação da variação do status de infecção, detecção de translocações cromossômicas, genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único e determinação do nível de expressão gênica de amostras (YLMAZ et al., 2012).

A técnica apresenta alta precisão para estudos de análise de expressão gênica, sendo usada muitas vezes para validar dados obtidos por outros métodos (KOZERA; RAPACZ, 2013). Com isso, vem sendo amplamente utilizada para estudos de interação entre diversos patossistemas, como da Antracnose-Feijoeiro (FRAIRE-VELÁZQUEZ; LOZOYA-GLORIA, 2003; ALVARADO-GUTIÉRREZ et al., 2008; BORGES et al., 2012; FONTENELLE et al., 2017).

### **2.7.2 cDNA-RAPD**

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, entre eles, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD; Williams et al., 1990), baseado na amplificação do

DNA, *in vitro*, utilizando PCR (*Amplified Polymorphism - Polymerase Chain Reaction* (WELSH; MCCLELLAND, 1990). Os *primers* utilizados são sequências curtas, determinadas de modo arbitrário, que permitem amplificação em função do anelamento entre *primer* e as sequências de DNA, não requerendo conhecimento prévio de sequências de interesse, podendo ser altamente úteis na identificação de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações de várias espécies.

A técnica cDNA-RAPD consiste em uma variação do protocolo de reação em cadeia da polimerase, utilizando *primers* RAPD, tendo como base cDNA ao invés de DNA (HU et al., 2012). O cDNA significa DNA complementar e é sintetizado a partir do *pool* de moléculas de RNA mensageiro, que já sofreram processamento completo, tendo o capacete 5' adicionado, íntrons retirados e cauda poli-A incorporada ao final da fita. A reação é catalisada pela enzima transcriptase reversa, com base na complementariedade de bases. Após a formação da primeira cadeia de cDNA, a DNA polimerase forma a cadeia complementar, dando estabilidade à molécula. O cDNA, dessa forma, é diretamente relacionado com expressão gênica.

Estudos utilizando *primers* RAPD em cDNA (TABELA 6) têm se mostrado uma alternativa para verificação de expressão gênica diferencial sob estresses bióticos e abióticos, em diferentes culturas, principalmente em função de seu baixo custo-benefício (SHUYE et al., 1999; CHEN et al., 2005; NIMBALKAR et al., 2006; PHANCHASRI et al., 2012; HU et al., 2012; TRIPATHI et al., 2013; BANDYOPADHYAY et al., 2013; GHAG et al., 2014; REN et al., 2016; APARNA et al., 2017; WAKEKAR et al., 2018).

Adequar essa técnica para patossistemas, como o Feijoeiro-Antracnose, que apresenta genes de efeito principal e resistência vertical, mostra-se uma estratégia interessante para o estudo de expressão diferencial, considerando sua praticidade e custo reduzido.

Tabela 6 - Alguns estudos utilizando a técnica cDNA- RAPD para análise de expressão gênica diferencial sob estresses bióticos e abióticos em diferentes culturas.

<b>Autor/ Ano</b>	<b>Título</b>
Shuye et al., 1999	Identification of differentially expressed genes in photo-period sensitive genic male sterile rice by randomly amplified cDNAs using RAPD <i>primers</i>
Chen et al., 2005	Transcription analysis of peloric mutants of <i>Phalaenopsis orchids</i> derived from tissue culture
Nimbalkar et al., 2006	Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant ( <i>Cicer arietinum L.</i> ) upon <i>Fusarium oxysporum</i> infection
Phanchaisri et al., 2012	Expression of OsSPY and 14-3-3 genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants
Hu et al., 2012	Identification of a novel Getah virus by Virus-Discovery-cDNA random amplified polymorphic DNA (RAPD)
Tripathi et al., 2013	Differential expression analysis of defense-related genes responsive to <i>Tilletia indica</i> infection in wheat
Bandyopadhyay et al., 2013	Characterization of RAM to SAM transitions in <i>Selaginella microphylla</i> grown in vitro
Ghag et al., 2014	Characterization of <i>Fusarium</i> wilt resistant somaclonal variants of banana cv. Rasthali by cDNA-RAPD
Ren et al., 2016	Identification of a novel phenamacrilresistance- related gene by the cDNA-RAPD method in <i>Fusarium asiaticum</i>
Aparna et al., 2017	Transcriptome profiling and identification of differentially expressed transcripts in response to mid season drought in groundnut <i>Arachis hypogaeae L</i>
Wakekar et al., 2018	Pollen Dysfunction Causes ‘Floral Bud Distortion’ in Indian Soybean ( <i>Glycine max</i> )

Fonte: Da autora (2019).

## REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Inheritance of Anthracnose Resistance in Common Bean Differential Cultivar AB 136. **Plant Breed.**, v. 81, p. 996–998, 1997.
- ALZATE-MARIN A.L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 47, p. 241-242, 2004.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-43* and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, v. 154, n. 1-2, p. 1-8, 2007.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, n. 165–169, 2003.
- ALVARADO-GUTIÉRREZ, A. et al. *Phaseolus vulgaris* EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against *Colletotrichum lindemuthianum* and by abiotic stress: sequences shared between interacting partners. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 4-6, p. 111-121, 2008.
- ANDERSEN, E. et al. Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, v. 9, p. 339, 2018.
- ANDRADE, E.M.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões brasileiras. Anais. Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão RENAPE. **Embrapa Arroz e Feijão**, v. 99, p. 242-244, 1999.
- BANNEROT, H., DERIEUX, M.; FOUILLOUX, G. Mise en évidence d'un second gene de résistance totale à l'anthracnose chez le haricot. **Ann Amélior Plantes**, v. 21, p. 83–85, 1971.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira. **Embrapa Arroz e Feijão**, p. 247- 272, 2012.
- BARROS, F. C. et al. Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BARRUS, M. F. Varietal susceptibility to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. And Magn.) B. and C. **Phytopatology**, v. 8, p. 589-610, 1918.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of bean in their susceptibility to anthracnose. **Phytopatology**, v. 1, p. 190-195, 1911.
- BHADAURIA, V. et al. Analysis identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **BMC Genomics**, v.12, n. 327, 2011. Disponível em :< <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-327>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 257–286, 2017.

- BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 12, p.1216-1220, 2012.
- BOYD, L.A. et al. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.
- BROUGHTON, W. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant Soil**, v. 252, p. 55–128, 2003.
- BURKHARDT, A.; DAY, B. Transcriptome and small RNAome dynamics during a resistant and susceptible interaction between cucumber and downy mildew. **The Plant Genome**, v. 9, p. 1–19, 2015.
- CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**., v. 14, p. 12, 2014.
- CASTRO, S. A. L. et al. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Paloma cultivar. **Annual Report Bean Improving Coop**, v. 57, p. 163–164, 2014.
- CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H.F.; GÁLVEZ, G.E. **Problemas de production del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***, 1980. p. 37-53.
- CHOUDHARY, N. et al. Gene/QTL discovery for Anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from North-western Himalayas. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191700>>. Acesso em: 12 dez. 2018.
- COELHO, R. T. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in the mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report Bean Improving Coop**, v.56, p. 43–44, 2013.
- COÊLHO, M. et al. Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 429-438, 2016.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2018/2019 segundo levantamento**, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> >. Acesso em 20 nov. 2018.
- COSTA, L.C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **Plos One**, v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173789>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001.



DAVIDE L.M.C; SOUZA E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 23-30, 2009.

DE RON, A. M. Common Bean. In: **Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding**, p. 1–36, 2015.

DE WIT, P. J. G. M. On guard. **Nature**, v. 416, p. 801-803, 2002.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organizations of genes conferring to anthracnose in common bean. In: VARSHNEY, R.K; TUBEROSA, R. (Ed.). **Translational genomics for crop breeding**. 2013. p. 151-176.

FIGUEROA, A. C C L. et al. Common bean landraces as potential sources of resistance to anthracnose. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 2, p. 126-133, 2018.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.

FOUILLOUX G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report Bean Improving Coop**, v. 19, p. 36–37, 1976.

FOUILLOUX, X G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DISEASES OF TROPICAL FOOD CROPS, Louvain-la-neuve. **Proceedings**, v.3, p. 221-235, 1979.

FONTENELLE, M. R. et al. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **European journal of plant pathology**, v. 147, n. 3, p. 653-670, 2017.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; LOZOYA-GLORIA, E. Differential early gene expression in *Phaseolus vulgaris* to Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in incompatible and compatible interactions. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 63, n. 2, p. 79-89, 2003.

GEFFROY. V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mol plant-microbe Interact**, v. 12, p. 774–784, 1999.

GEFFROY. V. et al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p.407–415, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J.D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, n. 3, p. 411- 419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. Resistance of Common Bean Cultivar AB 136 to Races 31 and 69 of *Colletotrichum lindemuthianum*: the Co-6 Locus. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 1, p. 99–104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. et al. 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**, v. 30, p. 589–593, 2007.

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, v. 49, p.133–138, 2009.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Genetic analysis of anthracnose resistance in “Pitanga” dry bean cultivar. **Plant Breeding**, v. 131, p. 423–429, 2012.

GONÇALVES A. M. O. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in andean common bean Corinthiano cultivar. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 53, p. 220–221, 2010.

GONZÁLEZ A. M. et al. Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. **Plant Science**, v. 6, p. 141, 2015.

GOUVEIA, B. C. et al. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2139, 2017.

GORJANOVIĆ, S.A. Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 4, p. 334–360, 2009.

GUIMARÃES, P. M. et al. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análogos a genes de resistência em *Arachis* spp. silvestres. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 663–667, 2005.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, v. 227, n. 5264, p. 1267-126, 1970.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986–94, 1996.

HU, T. et al. Identification of a novel Getah virus by Virus-Discovery-cDNA random amplified polymorphic DNA (RAPD). **BMC Microbiology**, v. 12, p. 305, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-305>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

ISHIKAWA F. H.; RAMALHO M. A. P.; SOUZA E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 461-464, 2011.

- ISHIKAWA F. H. Heterokaryon Incompatibility Is Suppressed Following Conidial Anastomosis Tube Fusion in a Fungal Plant Pathogen. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031175> >. Acesso em: 20 nov. 2018.
- JONES, J. D. G.; DANGI, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.
- KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 690.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.
- LIMA I. A.; SANTOS J. B.; RAMALHO M. A. P. Are the common bean *Co-3* and *Co-7* resistant alleles to anthracnose the same? **Annual Reports Bean Improving Coop.**, v. 51, p. 188–189, 2008.
- LOBO-JUNIOR, M. Fitossanidade. IN: RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; GUILHERME, S.R. (Ed.). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira**: 2015-2017, p. 106-163, 2014.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultura do Feijão**. 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao> >. Acesso em: 25 nov. 2018.
- MAPHOSA, Y.; JIDEANI, V. A. The Role of Legumes in Human Nutrition. In: **Functional Food-Improve Health through Adequate Food, 2017**. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/functional-food-improve-health-through-adequate-food/the-role-of-legumes-in-human-nutrition> >. Acesso em: 15 dez. 2018.
- MASTENBROEK C. A. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177–184, 1960.
- MCROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, v. 9, p. 141–148, 1919.
- MELOTTO M.; BALARDIN R. S.; KELLY J. D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: **Colletotrichum: Host Specific City, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**, p. 346–361, 2000.
- MÉNDEZ-VIGO B. et al. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, v. 141, p. 237–245, 2005.
- MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 129–134, 2005.

- MEZIADI, C. et al. Development of molecular indicators linked to resistance genes in common bean based on the sequence of the whole genome. **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016.
- MOHAMMED, A. An overview of distribution, biology and the management of common bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1-6, 2013.
- MOHAN, S. K.; BIANCHINI A.; MENEZES, J. R. de. **Doenças do feijoeiro no estado do Paraná: guia para identificação e controle**, v. 3, p. 56, 1989.
- NELSON, R. et al. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21, 2018.
- OBLESSUC, P. R.; FRANCISCO, C.; MELOTTO M. The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 COK-4 genes and is regulated by immune response in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 6, p. 1193-1208, 2015.
- O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75-98, 1985.
- PADDER, B.A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PLoS one**, v. 11, n. 11, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165823> > Acesso em: 15 out. 2018.
- PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317-330, 2017.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 1-52, 1994.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean Production Problems in the Tropics**, p. 77-104, 1989.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Estandarizacion de variedades diferenciales y de designacios de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 81, n. 6, p. 695, 1991.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIN L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, R.; BORÉM A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, 2006. p. 415-436.
- PELOSO, M.J. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, Phaseolus vulgaris, en América Latina**, 1992.
- PINTO J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v.102, p. 490-497, 2012.
- QUE Y. et al. A global view of transcriptome dynamics during *Sporisorium scitamineum* challenge in sugarcane by RNAseq. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118445> >. Acesso em: 10 nov. 2018.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

RIBEIRO T. et al. Classification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in differential cultivars of common bean. **Acta Scientiarum**, v. 38. p.179 -184, 2016.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Antracnose. In: **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**, p.17-39, 1994.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. **Journal of molecular medicine**, v. 84, n. 11, p. 901-910, 2006.

SHI, C. et al. Identification of candidate genes associated with CBB resistance in common bean HR45 (*Phaseolus vulgaris L.*) using cDNA- AFLP. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 1, p. 75-81, 2011.

SILVA M. G. D. M. et al. Association between RAPD marker OPAS13950 and anthracnose resistance allele *Co*-43 of common bean cultivar PI 207262. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p. 24-28, 2007.

SILVA, O. F. da; WANDER, A. E. O feijão comum no Brasil passado, presente e futuro. **Embrapa Arroz e Feijão**, 2013. Disponível em: <  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/89747/1/seriedocumentos-287.pdf> >  
Acesso em: 11 dez. 2018.

SILVÉRIO, L. et al. Genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* race 2047 in G 2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 45, p. 74-75, 2002.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SOMAVILLA L. L.; PRESTES A. M. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* pathotypes occurring in some bean production regions of Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 416-421, 1999.

SOUZA, L. L. et al. Genetic mappinh of the resistance allele *Co*-5<sup>2</sup> to *Colletotrichum lindemuthianum* in the common bean MSU 7-1 line. **Australian Jornal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 317-323, 2014.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E. et al. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. **CyTA - Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2016.

STANGARLIN, J.; KUHN, O.; TOLEDO, M. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

TAMELING, W. I.; JOOSTEN, M. H. The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 4-6, p. 126-134, 2007.

TELLINGHUISEN, J.; SPIESS, A. N. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. **Analytical Biochemistry**, v. 449, p. 76-82, 2014.

THOMAZELLA, C. et al. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 82- 83, 2000.

THOMAZELLA C. et al. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* races in Parana state, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, p. 55-60., 2002.

TRIPATHI, A.; AGGARWAL, R.; YADAV, A. Differential expression analysis of defense-related genes responsive to *Tilletia indica* infection in wheat. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 5, p. 606-613, 2013.

TICHOPAD, A. et al. Standardized determination of real- time PCR efficiency from a single reaction set- up. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 20, p. 122, 2003.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. New insights into the anthracnose resistance os common bean landrace G 2333. **The open Horticulture Journal**, v.2, n.1, p. 29-33, 2009.

VIEIRA, C. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**, p. 301-392, 2005.

VIEIRA, A. F. **Caracterização fenotípica e molecular de feijoeiro-comum quanto à resistência à antracnose e estudo de herança**. 2015. 7 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, 2015.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER; M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, 2009. Disponível em : <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>>. Acesso em: 28 dez. 2018.

YOUNG R.A. et al. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G 2333.” **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p.87–94, 1998.

YILMAZ, A. et al. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. In HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; RAMIREZ, G. A. **Polymerase Chain Reaction**. Rijeka: InTech. 566 p. ISBN 978-953-51-0612-8, 2012.

ZUIDERVEEN G.H.; PADDER B.A.; KAMFWA K.; SONG Q, KELLY J.D. Genome-Wide Association Study of Anthracnose Resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156391, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156391>>. Acesso em 28 dez. 2018.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS\***

**ARTIGO 1 - Expressão gênica diferencial do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) durante interação com isolado da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum***

**RESUMO**

A antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scribn, é uma doença de grande relevância econômica para a cultura do feijoeiro, podendo reduzir em até 100% a produção dessa leguminosa. Há grande variabilidade entre e dentro das raças do patógeno, que atua coevoluindo junto ao hospedeiro, permitindo a seleção de diferentes combinações gênicas. A raça 65 se destaca, devido sua ampla distribuição no Brasil e alta patogenicidade. Genes diferencialmente expressos têm sido de fundamental importância para o conhecimento das bases moleculares no patossistema feijoeiro- antracnose. Entretanto, nesse sentido, pouco se conhece sobre a raça 65. O presente trabalho teve por objetivo investigar em genótipos contrastantes para a resistência a raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, o nível de expressão de genes previamente selecionados na literatura, por sua provável associação com a resposta de resistência a antracnose. Para isso, dois experimentos foram realizados: (i) avaliação fenotípica das linhagens de feijoeiro BRS Esplendor e BRS Valente, inoculadas com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* e; (ii) análise de expressão dos genes *PROF*, *CBP*, *MAPKK*, *PVPOD*, *PVPR1*,  $\beta$ -1,3- glucanase, *CNGC-2*, *PGIA*, *PGL* e *PAL-2*, 72 horas após inoculação, em ensaios quantitativos da expressão gênica por RT-qPCR. A linhagem BRS Esplendor mostrou-se completamente resistente; e a BRS Valente mostrou-se suscetível à interação com o isolado utilizado. Quanto à expressão, os genes *PVPOD*, *CBP*, *MAPKK* e *PGIA* apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos inoculado e controle das linhagens, com diferentes padrões de expressão no tempo analisado, permitindo o entendimento da resposta desses genes e das possíveis vias atuantes na interação planta-patógeno envolvendo esse patossistema.

**Palavras-chave:** Antracnose. *Phaseolus vulgaris* L. RT-qPCR. Genes de resistência. Raça 65.

**ABSTRACT**

The anthracnose, caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scribn, is a disease of great economic importance for the bean crop, being able to reduce in up to 100% the production of this legume. There is great variability between and within the breeds of the pathogen, which acts co-evolving with the host, allowing the selection of different gene combinations. Race 65 stands out due to its wide distribution in Brazil and high pathogenicity. Differentially expressed genes have been of fundamental importance for the knowledge of the molecular bases in the bean-anthracnose patosystem. However, in this sense, little is known about race. The aim of the present work was to investigate in *Colletotrichum lindemuthianum*, the expression level of genes previously selected in the literature, because of their probable association with the resistance response to anthracnose. For this, two experiments were carried out: (i) phenotypic evaluation of BRS Esplendor and BRS Valente bean lines inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum* strain LV 238, and (ii) expression analysis of the genes *PROF*, *CBP*, *MAPKK*, *PVPOD*, *PVPR1*,  $\beta$ -1,3-glucanase, *CNGC-2*, *PGIA*, *PGL* and *PAL-2*, 72 hours after inoculation in quantitative



RT-qPCR gene expression assays. The BRS Esplendor strain was completely resistant and BRS Valente, susceptible to interaction with the isolate used. As for the expression, the *PVPOD*, *CBP*, *MAPKK* and *PGIA* genes presented differential expression between the inoculated and control treatments of the lines, with different expression patterns in the analyzed time, allowing the understanding of the response of these genes and of the possible routes acting in the plant- pathogen involving this pathological system.

**Keywords:** anthracnose. *Phaseolus vulgaris* L. RT-qPCR. resistance genes. race 65.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie anual, diploide ( $2n = 2x = 22$ ), e predominantemente autógama, com taxa de fecundação cruzada menor do que 5% (Pompeu, 1963; Ramalho e Dos Santos, 1982). Cultivada em todos os continentes, é uma das leguminosas mais importantes para o consumo humano, sendo os seus grãos fonte de proteínas e minerais (MAPHOSA; JIDEANI, 2017). Apesar de sua importância para o homem, vários fatores limitam drasticamente seu rendimento, como a ocorrência de doenças fúngicas. A antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scribn, é uma das doenças mais importantes para o feijoeiro, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (RICHARD et al., 2015).

O controle da antracnose deve ser feito de modo integrado, sendo a resistência genética um dos métodos mais eficientes e seguros (SARTORATO; RAVA, 1994). Sabe-se que a resistência do feijoeiro ao *C. lindemuthianum* é predominantemente vertical, sendo descrita pelo modelo gene-a-gene (FLOR, 1971), e, neste contexto, vários locos de efeito independente já foram identificados em genótipos resistentes (KELLY; VALLEJO, 2004). A obtenção de resistência genética neste patossistema é um processo complexo devido a diversidade de interação planta-patógeno, suprida pela ampla variabilidade patogênica, identificada na forma de diferentes raças fisiológicas. Além da variabilidade patogênica entre raças, há variabilidade também dentro, ou seja, entre isolados de uma mesma raça (PADDER et al., 2018). Neste sentido, a raça 65 se destaca por apresentar alta patogenicidade e ampla distribuição (COELHO et al., 2016).

O comportamento da resistência a antracnose vem sendo amplamente estudado. Mais de 20 locos multi-alélicos de efeitos independentes já foram identificados e mapeados em oito

cromossomos do feijoeiro (MEDIAZZI et al., 2016; ZUIDDERVEN et al., 2016), sendo eles *Co-1* (MCROSTIE, 1919), *Co-2* (MASTENBROEK, 1960), *Co-3* (BANNEROT et al., 1971), *Co-4* (FOUILLOUX, 1976), *Co-5* (FOUILLOUX, 1976), *Co-6* (Alzate-Marin et al., 1997; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2001), *Co-7 / Co-3<sup>5</sup>* (YOUNG et al., 1998; LIMA et al., 2008), *co- 8* (ALZATE-MARIN et al., 1997), *Co-9 / Co-3<sup>3</sup>* (GEFFROY et al., 1999; MÉNDEZ-VIGO et al., 2005), *Co-10/ Co3<sup>4</sup>* (ALZATE-MARIN et al., 2003; COELHO et al., 2013), *Co-11* (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007), *Co-12* (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008), *Co-13* (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009), *Co-14* (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2012), *Co-15* (GONÇALVES et al., 2010), *Co-16* (COELHO et al., 2013), *Co-17* (CASTRO et al., 2014), *Co-u*, *Co-v*, *Co-w*, *Co-x* (GEFFROY et al., 2008), *Co-y*, *Co-z* (GEFFROY et al., 1999). Com exceção do loco *co-8*, interação de dominância é predominante entre os locos. Foi verificado também presença de alelismo múltiplo nos locos *Co-1* (MELLOTO et al., 2000; ALZATE-MARIN et al., 2003; GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY et al., 2006), *Co-3* (FOUILLOUX, 1979), *Co-4* (SILVÉRIO et al., 2002; YOUNG et al., 1998) e *Co-5* (VALLEJO; KELLY, 2009; SOUSA et al., 2014). Doze genes de efeitos independentes estão relacionados ao controle genético da antracnose, para seis isolados da raça 65 (CI 1614, CI 1532, CI 1610, CI 1740, LV 134, LV 238 e LV 145), tendo para alguns deles, interação não alélica de genes duplicados (COSTA et al., 2017). Apesar do conhecimento estabelecido sobre os locos associados a resistência do feijoeiro às diferentes raças do patógeno, o conhecimento dos genes encontrados nestes locos e sua atuação nas vias de resposta da planta hospedeira ao patógeno, precisa se expandir, visto que os locos podem ser constituídos por extensos segmentos genômicos, onde podem estar localizados vários genes.

Genes relacionados a resistência, podem codificar proteínas de reconhecimento, que iniciam a sinalização e proteínas envolvidas em vias que resultam em uma série de mecanismos de defesa, que irão atuar em prol da planta (ANDERSEN et al., 2018). Estudos transcricionais têm sido desenvolvidos para diferentes raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, aumentando o conhecimento de genes envolvidos no processo de resistência, através de sequências expressas depositadas em bancos de dados públicos como o GenBank, National Center para Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Melloto et al. (2005), Borges et al. (2012), Oblessuc et al. (2012) e Padder et al. (2016), desvendaram perfis transcricionais para a raça 73, enquanto Fontenelle et al. (2017) concentraram esforços em estudos sobre a raça 89. O acúmulo de dados genômicos permite a realização de análises quantitativas de

genes candidatos e sua validação para o patossistema, através da técnica de PCR em tempo real, associada à enzima transcriptase reversa (RT-qPCR) (BORGES et al., 2012).

Considerando a falta de estudos transcricionais para a resistência à raça 65 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, sua importância para a cultura do feijoeiro no Brasil, assim como a disponibilidade de dados em recursos genômicos, o objetivo desse estudo foi investigar em genótipos contrastantes para a resistência a raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, o nível de expressão de genes previamente selecionados na literatura, por sua provável associação com a resposta de resistência a antracnose, por meio da técnica RT-qPCR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na inoculação e avaliação fenotípica de duas linhas linhagens de feijão, uma resistente e uma suscetível à raça 65 de *C. lindemurthianum*, com o objetivo de comprovar o contraste de resistência entre as linhagens. A segunda etapa foi realizada a partir da seleção de genes relacionados com a resposta de infecção ao patógeno para o patossistema Feijoeiro-Antracnose, via PCR semi-quantitativa, e pela análise de expressão dos mesmos.

### 2.1 Material genético

Foram selecionadas para esse estudo, as linhagens de feijoeiro BRS Esplendor e BRS Valente. Segundo Costa et al. (2017), estes genótipos diferem em um único loco para o controle da antracnose, quando considerado o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemurthianum*, sendo a BRS Esplendor resistente e a BRS Valente, suscetível à doença.

As sementes foram semeadas em bandejas de polietileno com células individualizadas, em substrato Rohrbacher®, e mantidas em casa de vegetação sob condições ótimas (UR de 95% e 24°C) para germinação e crescimento.

Dois bandejas foram utilizadas para o plantio, de forma que, em cada bandeja, ficaram acondicionadas 54 plântulas, sendo 27 plantas de cada linhagem. Na condução dos ensaios, uma das bandejas foi inoculada por aspersão por *spray*, procedimento descrito nas seções seguintes, e a outra constituiu o tratamento controle, sem inóculo.

## 2.2 Preparo da suspensão de conídios e inoculação

As linhagens monospóricas do isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, mantidas em placas com meio M3 foram repicadas para vagens estéreis contidas em tubos de ensaio (MATHUR et al., 1950), parcialmente cobertas em meio ágar-água (3,75 g. de ágar para 250 ml de água). Após a repicagem, o preparado foi mantido por um período de incubação de 10-15 dias, a 22 °C, no escuro.

Em seguida, a preparação do inóculo foi feita adicionando-se água destilada nos tubos, seguida pela raspagem dos conídios na superfície da vagem, com o auxílio de uma alça de platina. A suspensão formada foi filtrada através de uma câmara de gaze, para remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer, padronizando a concentração do inóculo para  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml (RAVA et al., 1993).

A suspensão de esporos então preparada, foi inoculada pulverizando ambas as faces das folhas e os talos, com pulverizador, até o ponto de escorrimento (BURT et al., 2015). A inoculação foi feita após o surgimento do primeiro trifólio, e as plantas foram mantidas em câmara de nebulização (UR de 100% e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 48 horas e, posteriormente, em casa de vegetação (UR de 95% e  $24^\circ\text{C}$ ), por aproximadamente 10 dias, para coleta e avaliação.

## 2.3 Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas

A coleta do material foliar foi realizada 72 horas após a inoculação (BORGES et al., 2012; FONTENELLE et al., 2016) de duas folhas por planta, retirando-se metade de cada folha, por um corte longitudinal, o que possibilitou a avaliação de sintomas posteriormente. Ao todo, foram coletadas 27 repetições de cada tratamento. As amostras foram abrigadas em microtubos de 2,0 mL, e submergidas em nitrogênio líquido. Em seguida, o material coletado foi armazenado em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até a validação dos sintomas. Uma vez que os sintomas foram sendo verificados, foi realizada a extração de RNA das amostras que apresentaram os sintomas compatíveis com seus tratamentos.

Para análise dos sintomas, cada planta (repetição) foi avaliada individualmente de acordo com a escala descritiva de notas de 1 a 9 (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987), (TABELA 1), 15 dias após a inoculação. Foram consideradas resistentes, plantas com nota menor/igual a três, e suscetíveis, aquelas com nota superior a três. Os dados foram submetidos ao teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade, com o objetivo de verificar se houve diferença entre as médias de severidade dos sintomas entre as linhagens.

Tabela 1 - Escala descritiva de notas para a avaliação da severidade da antracnose em plântulas de feijoeiro (SCHOONHOVEN; PASTOR CORRALES, 1987).

Nota	Descrição
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras principais apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
5	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas.
9	Plantas mortas.

Fonte: Adaptado de Schoonhoven; Pastor Corrales (1987).

## 2.4 Extração de RNA e produção do cDNA

O RNA Total foi extraído, utilizando-se o PureLink™ RNA Plant Extraction Kit, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante com pequenas modificações. A quantidade e pureza do RNA foi analisada por espectrofotômetro (NanoVuePlus™) e sua integridade verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

Em seguida, o RNA foi tratado com DNase (Turbo DNA-free Kit Invitrogen®), enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster da estrutura do DNA, eliminando qualquer tipo de contaminação por este ácido nucleico. Uma nova quantificação do RNA total foi realizada, a fim de verificar sua quantidade e pureza. Na sequência, o RNA foi usado para a produção da biblioteca de cDNA. A transcrição reversa que possibilitou essa síntese foi realizada com o kit Invitrogen® Super Script™ IV Reverse Transcriptase, utilizando oligod(T)<sub>20</sub> como *primer*. Finalmente, as amostras foram armazenadas em freezer - 20 °C até a fase seguinte da pesquisa.

## 2.5 Análise da expressão de genes candidatos por RTqPCR

Inicialmente, as sequências dos genes selecionados (TABELA 2), para este estudo, foram obtidas juntamente ao GenBank Home – NCBI e Phytozome. Estas sequências foram submetidas ao *software* on line *Primer 3Plus*, com a finalidade de proceder ao desenho dos *primers* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Como critério de qualidade foram respeitados os princípios de qualidade preestabelecidos, aferidos conforme *software* *OligoAnalyzer 3.1* on line (<HTTPS://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

## 2.6 PCR (Polymerase Chain Reaction) e RT-qPCR

Inicialmente, 16 pares de *primers* foram testados em ensaios de PCR convencional, com caráter semi-quantitativo, e o padrão de amplificação serviu para validar e selecionar os *primers* que seriam utilizados nos ensaios quantitativos da expressão gênica por RT-qPCR. Assim, os genes analisados por RT-qPCR foram aqueles que apresentaram um bom padrão de amplificação, com especial atenção àqueles com intensidade de amplificação diferencial entre os tratamentos.

As reações semi-quantitativas foram realizadas para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , utilizando 5  $\mu\text{L}$  de 5X Green Go Taq<sup>®</sup> Flexi Buffer, 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  do mix de dNTP's (10 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  de *primer* Forward e 1  $\mu\text{L}$  de *primer* Reverse (10  $\mu\text{M}$ ), 0,15  $\mu\text{L}$  de Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 u/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ). As reações foram realizadas em termociclador modelo SimpliAmp<sup>™</sup>, nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C a 30 segundos, finalizando a reação com uma etapa a 72 °C por 7 minutos e posterior manutenção das amostras a 4 °C. Os produtos de PCR foram analisados em seguida, por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

No que se refere às análises quantitativas da expressão gênica, foram realizadas qPCRs em termociclador modelo Rotor Gene-Q (Qiagen), utilizando-se o sistema de detecção SYBR-green e o método de quantificação relativa  $\Delta\Delta C_T$ , de acordo com Pfaffl (2001). As reações foram realizadas com um volume final de 15  $\mu\text{L}$ , composto por 7,5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green, 3  $\mu\text{L}$  de *primers* (1,5  $\mu\text{L}$  forward + 1,5  $\mu\text{L}$  reverse), 1,5  $\mu\text{L}$  de cDNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) e 3  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O RNase free. As reações foram realizadas em duplicatas técnicas para cada uma das três repetições biológicas, sob as seguintes condições: etapa inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 10 segundos a 60 °C. Por fim, a curva de

*melting* para análise da especificidade da reação foi realizada, com o aumento da temperatura de 60 a 95 °C, variando 1 °C a cada 5 segundos. As eficiências de amplificação de cada um dos *primers* foram verificadas por meio de curvas de diluição do cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125), e as diferenças relativas de expressão foram calculadas de acordo com o método do  $\Delta\Delta C_T$  (PFAFFL, 2001), utilizando a actina (ACT11) como gene de referência (BORGES et al., 2012), sendo calculada em relação a uma amostra calibradora, que foi selecionada de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes estudados.

Para cada gene, os dados de expressão relativa foram analisados via análise de variância usando-se o seguinte modelo:  $Y_{ij} = \mu + l_i + t_j + (lt)_{ij} + e_{ij}$ , em que  $Y_{ij}$  é a observação relativa a linhagem  $i$  na condição  $j$ ,  $\mu$  é a média geral,  $l_i$  é o efeito fixo da linhagem  $i$ ,  $t_j$  é o efeito fixo do tratamento  $j$ ,  $(lt)_{ij}$  é o efeito fixo da interação entre a linhagem  $i$  e tratamento  $j$  e  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do erro experimental,  $e_{ij} \cap N(0, \sigma_e^2)$ . As médias de expressão relativa das linhagens sob cada condição e condição dentro de linhagens foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Genes expressos em transcriptomas de feijão quando inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum*, e seus respectivos *primers forward e reverse*, selecionados por PCR semi-quantitativa.

ID	Sigla	Anotação (Eficiência de amplificação)	Referência	Primers q PCR
Phvul.008G011000	<i>ACT-11</i>	Actin	Borges et al., 2012	F- TGCATACGTTGGTGATGAGG R- AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG
Phvul.010G116000	<i>CBP</i>	Calcium binding protein with ef-hand motif (1,84)	Alvarado-Gutiérrez et al., 2008	F- AGAGGGCATGAGTATGGAGGA R- TCCAGCCATGACTCAGCATC
Phvul.009G256400	<i>β-GLUC</i>	Beta-1,3-glucanase (1,96)	Fontenelle et al, 2016	F- ATGCTCAAATCGGGGTGTGT R- AGCTGCTTGATTGGGATCGT
Phvul.010G163000	<i>MAPKK</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 4-related	Borges et al., 2012	F- CGAGAGGATCAACACGGACATA R- CCTGCCCATGTAGAACTCCA
Phvul.008G036200	<i>CNGC 2</i>	Cyclic nucleotide-gated ion channel 2 (1,96)	Borges et al., 2012	F- CTTCTCCCTCCTCTGGTGGA R- TACCGTGCTGCCAAATGGAT
Pvpep3010D06	<i>PGIa</i>	Polygalacturonase inhibitor-like protein (2,03)	Borges et al., 2012	F- CTGGCGGGATCTGGACTGTC R- CTGAACAGGCTCACGGGAAT
Phvul.007G150500	<i>PAL-2</i>	Phenylalanine ammonia-lyase 2 (1,95)	Fraire-Velázquez & Lozoya-Gloria, 2003; Borges et al., 2012	F- GGGGACTGACAGTTACGGTG R- GGTAGGGTGCAGTTGGACTC
Phvul.003G164600	<i>PvPOD</i>	Peroxidase (1,9)	Almagro et al. 2009	F- TCCTTTTCAGCACTTTCACT R- AGAAAGCAGTGTCTTGTGG
Phavul.003G109100	<i>PvPRI</i>	Pathogenesis-related protein 1 (1,91)	Fontenelle et al, 2016	F- GGTGTTGCCTTGCCAGAAAC R-TCATCTTCATTGGGTGGAGCA

Fonte: Da autora (2019).

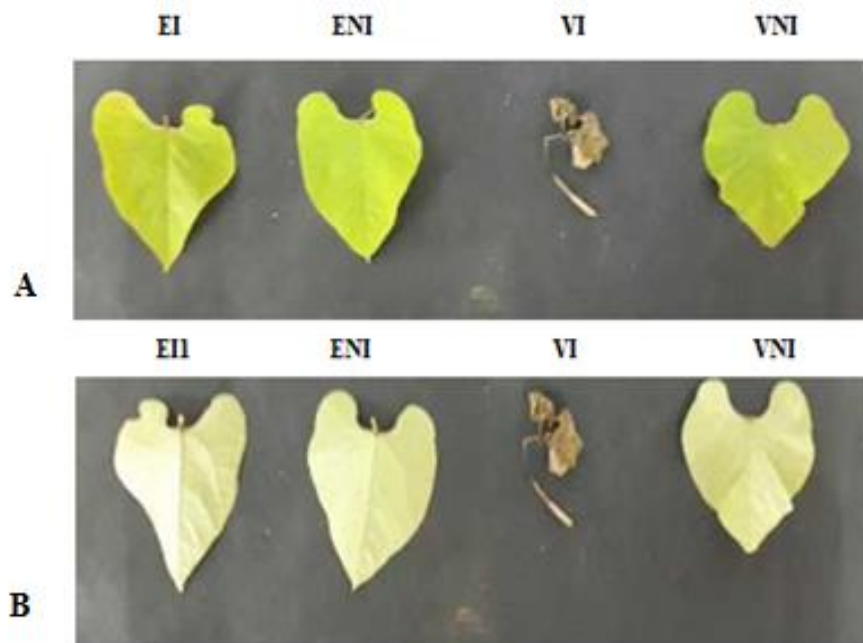


### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação fenotípica

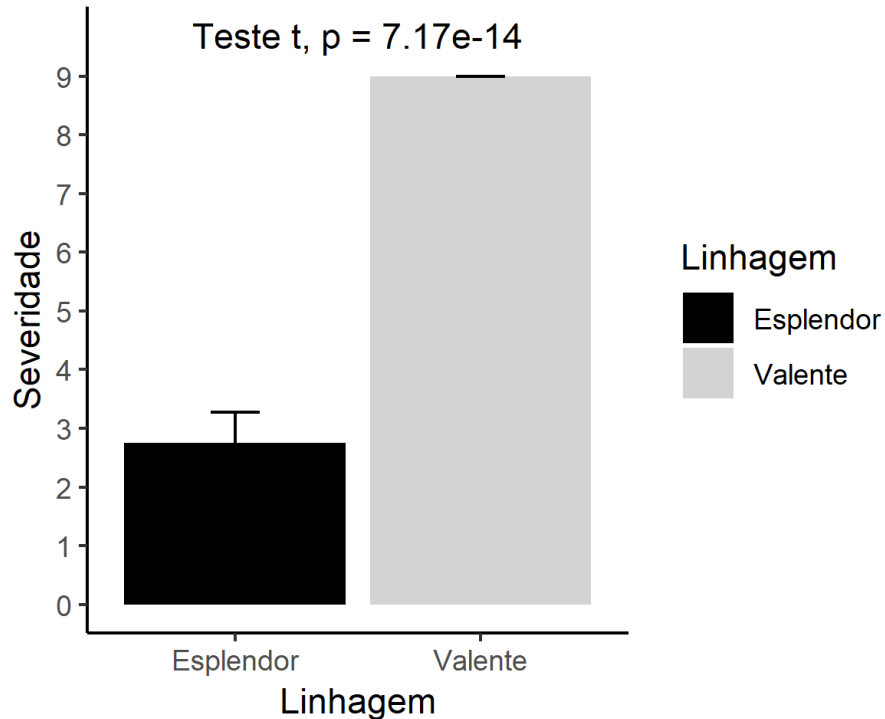
A avaliação fenotípica, das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor, em resposta a inoculação com o isolado LV 280 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, confirmou a reação de suscetibilidade e resistência, respectivamente, de acordo com a identificação dos sintomas e o teste t de Student (p-valor 7,17) a 95% de probabilidade (FIGURAS 1 e 2).

Figura 1- Avaliação fenotípica das linhagens decorrente da interação com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, 15 dias após inoculação. EI- BRS Esplendor inoculada. ENI- BRS Esplendor não inoculada. VI- BRS Valente inoculada. VNI- BRS Valente não inoculada. A- Superfície adaxial e B- Superfície abaxial.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 2 - Teste t entre as médias de severidade dos sintomas (nota) das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor inoculadas com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

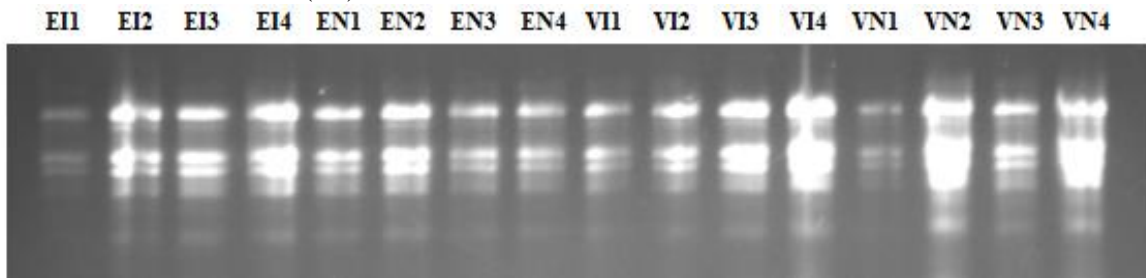


Fonte: Da autora (2019).

### 3.2 Qualidade e quantificação de RNA total

A quantificação do material extraído, de folhas cotiledonares com o PureLink™ RNA Plant Extraction Kit, feita no NanoVuePlus™, mostrou-se satisfatória, com concentrações altas, variando de 1246 a 3181 ng/μl entre os tratamentos. Sobre a qualidade, as amostras apresentaram relações de absorbâncias  $A_{260/280\text{nm}}$  e  $A_{260-230\text{nm}}$  variando entre 1,8 a 2,2 e 1,9 e 2,0, respectivamente, valores esses que indicam boa qualidade do RNA samples (JAZI et al., 2015). Por fim, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, corroborando com os resultados obtidos anteriormente, indicando qualidade adequada do RNA extraído das amostras estudadas (FIGURA 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de RNA total extraído de folhas do feijoeiro das linhagens BRS Esplendor (E) e BRS Valente (V) inoculadas (I) e não inoculadas (NI).



Fonte: Da autora (2019).

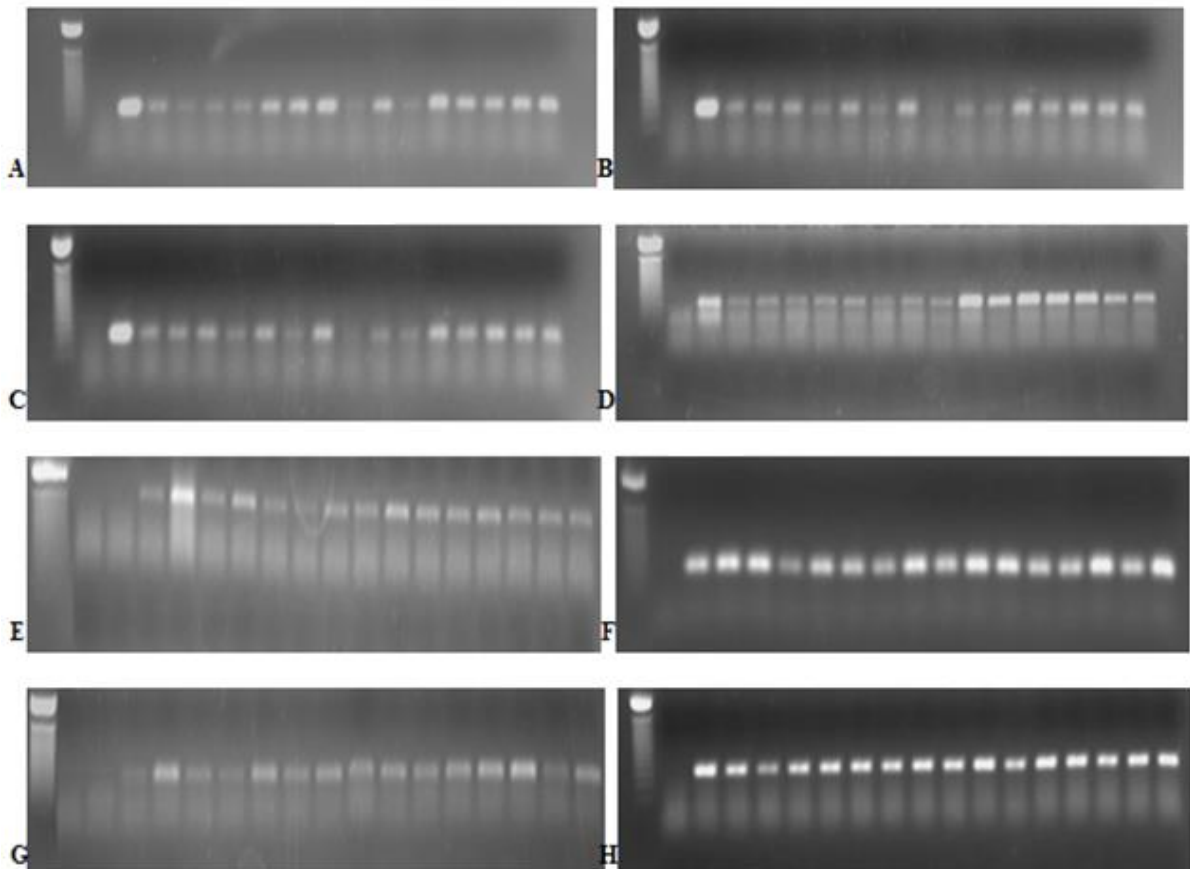
### 3.3 Especificidade dos *primers* para RT-qPCR

A alta especificidade dos *primers* dos genes selecionados (TABELA 2) e utilizados para validação da expressão no patossistema feijoeiro-antracnose/raça 65, foi verificada por meio da visualização de bandas únicas no gel de agarose, com seus devidos tamanhos dos fragmentos amplificados, como pode ser observado para alguns genes na Figura 4. Além disso, esta inferência também pôde ser feita por meio do ensaio de RT-qPCR, a partir da visualização de picos únicos no resultado das curvas de melting.

### 3.4 Análise de expressão dos genes candidatos

Reações convencionais de PCR foram realizadas para todos os genes analisados, e padrões diferenciais de bandas foram observados em alguns casos, podendo ser correlacionados com os valores quantitativos de expressão obtidos com a RT-qPCR. Os genes *CBP*, *MAPKK*, *PGIa* e *CNGC-2* se enquadraram nessa situação. Os genes *CBP* (FIGURA 4A) e *MAPKK* (FIGURA 4B) mostram a partir do gel de eletroforese a 1%, réplicas dos tratamentos controles de BRS Esplendor e BRS Valente com um padrão de bandas mais intenso. A partir da análise visual do gene *PGIa* (FIGURA 4D) foi notória a maior intensidade das bandas equivalentes aos tratamentos da linhagem BRS Valente. O gene *CNGC-2* (FIGURA 4E) mostrou um padrão consistente de bandas entre os tratamentos analisados.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1% das reações de PCR convencional a partir do cDNA obtido do RNA total extraído de folhas do feijoeiro das linhagens BRS Esplendor (E) e BRS Valente (V) inoculadas (I) e não-inoculadas (NI). A- Gene *CBP*, B- Gene *MAPKK*, C- Gene  $\beta$ - *GLUC*, D- Gene *PGIA*, E- Gene *CNGC-2*, F- Gene *PvPOD*, G- Gene *PAL 2* e H- Gene *PvPRI*. No gel, as amostras estão disponibilizadas na seguinte ordem: Ladder, Controle Negativo (sem material genético), controle positivo (Com DNA da linhagem Esplendor), EI1, EI2, EI3, EI4, EN1, EN2, EN3, EN4, VI1, VI2, VI3, VI4, VN1, VN2, VN3 e VN4.



Fonte: Da autora (2019).

A expressão média de oito genes foi verificada para tratamentos inoculados com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* e seus grupos controles, sem inoculação, das linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, 72 horas após a inoculação. Nesse tempo, todos os genes analisados mostraram algum nível de expressão em pelo menos um dos tratamentos (FIGURA 5).

O gene *CNGC-2* não apresentou expressão diferencial entre os tratamentos da mesma linhagem, bem como entre as linhagens resistente e suscetível, mostrando níveis semelhantes de expressão entre todos os tratamentos (FIGURA 5A).

O gene *PvPOD* mostrou diferença significativa de expressão entre os tratamentos inoculados e não inoculados (FIGURA 5B) dentre de cada linhagem, sendo mais expresso nos

tratamentos controles, para ambas as linhagens, indicando que o gene *PvPOD* tem sua taxa de expressão reduzida após o procedimento de inoculação, independentemente da linhagem em questão.

A respeito do gene *PAL-2* foi possível observar que a linhagem BRS Esplendor, quando inoculada, apresentou o menor nível de expressão entre todos os tratamentos (FIGURA 5C). Considerando a linhagem BRS Esplendor, a redução no nível de expressão foi significativa, enquanto que para a linhagem BRS Valente, parece existir alguma tendência de redução no nível de expressão, porém, não significativa.

O gene *CBP* apresentou expressão diferencial para os tratamentos das duas linhagens, pelo teste de Tukey a 5%. Por mais uma vez, a linhagem BRS Esplendor apresentou o menor nível de expressão deste gene quando inoculada. O mesmo fenômeno foi observado para linhagem BRS Valente, no entanto, comparando ambas inoculadas, a primeira apresentou nível de expressão mais baixo (FIGURA 5D).

O gene *MAPKK* mostrou um padrão similar de expressão tanto para a linhagem resistente quanto para a linhagem suscetível, com as amostras controle apresentando expressão superior mais de duas vezes, quando comparadas com as amostras não-inoculadas (FIGURA 5E).

Amostras inoculadas da linhagem suscetível apresentaram expressão de aproximadamente quatro vezes maior do que amostras inoculadas da linhagem resistente para os genes *PvPRI* (FIGURA 5F) e  $\beta$ -*GLUC* (FIGURA 5G). Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O gene *PGIa* foi relativamente mais expresso na linhagem BRS Valente, sendo até 68 vezes mais expresso nessa linhagem quando comparado com a BRS Esplendor. Mais uma vez, a linhagem BRS Esplendor apresentou o menor nível de expressão destes genes após a inoculação. Houve redução significativa na expressão desse gene na BRS Valente, após a inoculação, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (FIGURA 5H).

Figura 5 - Expressão média dos genes candidatos em tratamentos inoculados e não inoculados das BRS Esplendor e BRS Valente, com isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Letras maiúsculas comparam linhagem dentro de cada condição (I- inoculado, NI- não inoculado); as letras minúsculas comparam as condições dentro de cada linhagem (BRS Esplendor e BRS Valente). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. (continua...)

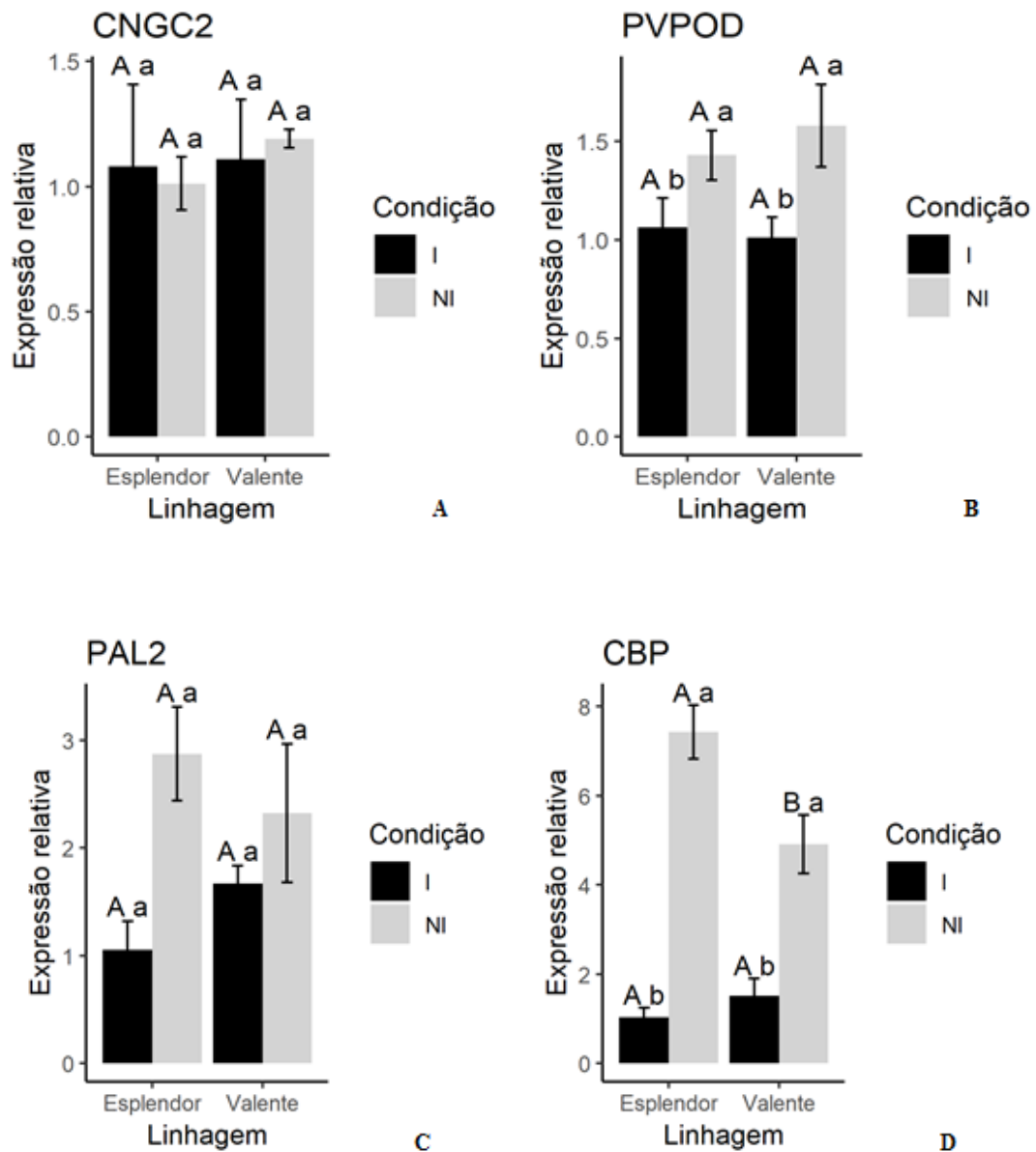
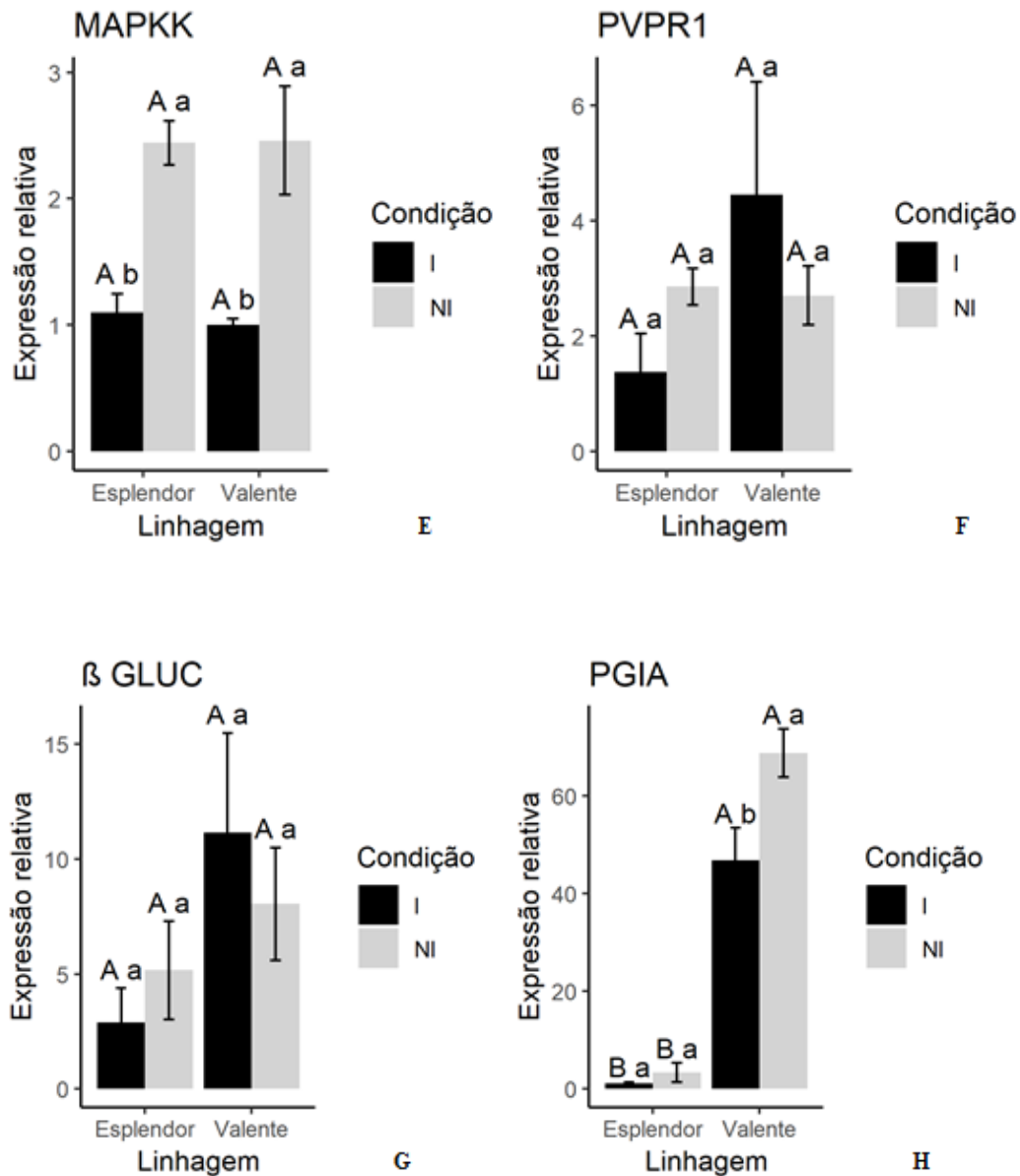


Figura 5 - Expressão média dos genes candidatos em tratamentos inoculados e não inoculados das BRS Esplendor e BRS Valente, com isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Letras maiúsculas comparam linhagem dentro de cada condição (I- inoculado, NI- não inoculado); as letras minúsculas comparam as condições dentro de cada linhagem (BRS Esplendor e BRS Valente). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. (conclusão)



Fonte: Da autora (2019).

## 4 DISCUSSÃO

A raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* apresenta grande importância para a cultura do feijoeiro no Brasil, e isso se deve ao fato dela ser comumente encontrada na maioria dos estados produtores, sendo assim, considerada de ampla distribuição (DAVIDE et al., 2009). Outro fator importante se constitui na sua alta patogenicidade, representada pelo grande número de isolados dentro da raça. Variabilidade esta, que vem sendo mostrada em diversos estudos, como os de Ishikawa et al. (2008), Davide et al. (2009), Ishikawa et al. (2011), Coelho et al. (2016) e Costa et al. (2017). Devido sua ampla distribuição e alta patogenicidade, a obtenção de cultivares resistentes às diferentes raças do patógeno, como no caso da 65, é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do feijoeiro para resistência a antracnose. Nesse contexto, a elucidação dos caminhos envolvidos nesse processo, assim como a identificação de possíveis fontes de resistência, se mostra valiosa no estudo do patossistema.

A avaliação dos sintomas apresentados após a inoculação do isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* seguiu o padrão observado por Costa et al. (2017) que também demonstrou o comportamento das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor, entre outras linhagens (FIGURA 1). Campa et al. (2014) enfatizaram a interação específica entre genótipos de *P. vulgaris* e *C. lindemuthianum*, seguindo o modelo de interação gene-a-gene proposto por Flor (1956).

Alguns autores trabalham na elucidação do controle genético para resistência à raça 65, em diferentes linhagens de feijoeiro avaliadas, tendo já descoberto os locos *Co-1* (MCROSTIE, 1919), *Co-2* (MASTENBROEK, 1960), *Co-3* (BANNEROT et al., 1971), *Co-4* e *Co-5* (FOUILLOUX, 1976) mapeados nos grupos de ligação Pv 01, Pv 11, Pv 04, Pv 08 e Pv 07, respectivamente (FERREIRA et al., 2013; CAMPA et al., 2014). Segundo Alzate-Marin e Sartorato (2004), os locos *Co-4*, *Co-5* e *Co-6*, associados ou individuais, são responsáveis pela resistência a antracnose, no Brasil. Vieira et al. (2015), utilizando marcadores SCARS para uma mistura de raças, incluindo a raça 65, verificaram a amplificação dos locos *Co-3<sup>4</sup>* na linhagem BRS Valente e os locos *Co-3<sup>4</sup>* e *Co-5*, na BRS Esplendor, o que sugere esse último como responsável a resistência considerando essas duas linhagens. Costa et al. (2017) associaram dois genes de efeitos independentes e interação não alélica de genes duplicados, durante a interação entre isolado LV 238 e as linhagens supracitadas. Nesse caso, um dos genes duplicados poderia funcionar como um gene de



reposição e poderia ser transformado para o reconhecimento de proteínas diferentes de avirulência, aumentando a gama de atividades celulares envolvidas nesses mecanismos.

Embora se tenha conhecimento do controle genético e dos locos atuantes nesse patossistema, envolvendo a raça 65, ainda não se conhece sobre os genes envolvidos no processo, suas funções celulares e seu padrão de expressão. Vários estudos neste sentido vêm sendo realizados para outras raças, validando genes expressos durante a interação planta-patógeno, como os de Faleiro et al. (2003), Meloto et al. (2005), Borges et al. (2012) e Fontenelle et al. (2017).

No presente estudo foram selecionados na literatura, 8 genes identificados em estudos abordando outras raças de *C. lindemuthianum*, para verificação na raça 65. Para o controle interno da normatização dos dados quantitativos para o método de RT-qPCR, foi utilizado o gene actina, que segundo Borges et al. (2012) possui alta estabilidade de expressão gênica durante interação de incompatibilidade envolvendo a parte aérea do feijoeiro comum e o patógeno da antracnose, o que o torna mais indicado nesse tipo de análise.

Os genes da classe *CNGC* podem ser relacionados às respostas iniciais de defesa das plantas devido a mudanças no fluxo de íons, incluindo influxo de  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  e efluxo de  $Cl^-$  (ATKINSON et al., 1996). Borges et al. (2012) mostraram uma resposta mais rápida e precoce em folhas, indicando a importância dos canais iônicos durante o início da resposta de resistência de plantas. Neste estudo, não foi observado diferença significativa de expressão do gene *CNGC-2* para os tratamentos a 72 hpi. Mayo et al. (2016) também não observaram diferença significativa na expressão desse gene em plantas de feijão inoculadas com *R. Solani* e seus controles. A expressão não diferencial entre os tratamentos sugere uma expressão constitutiva em certo nível entre as linhagens, que pode ser aumentada quando há o estímulo do patógeno, durante as respostas iniciais.

As peroxidases (*PvPOD*) são proteínas envolvidas em vários processos metabólicos, como metabolismo de auxinas, formação de compostos que atuam como barreiras contra patógenos, como a lignina e suberina, na síntese de fitoalexinas e no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (ALMAGRO et al. 2009). Padder et al. (2016), observaram regulação positiva em linhagens de feijoeiro resistentes inoculadas com a raça 73 de *C. lindemuthianum*, e Leite et al. (2014) apresentaram dados com maior expressão dessa enzima em feijoeiro, 120 horas após a inoculação com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Diferentemente da literatura, nesse trabalho observou-se 72 hpi, maior expressão nos tratamentos controles. Esse resultado indica que para o patossistema

envolvendo a raça 65, outras vias, ou outras peroxidases, que podem estar associadas a produção de substâncias que irão atuar na eliminação do patógeno.

A expressão do gene *PAL2* não diferiu significativamente entre os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 %, e esse resultado pode ser associado ao grande erro padrão das estimativas. Entretanto, foi possível visualizar maior expressão no tratamento controle da linhagem resistente. Esse resultado pode ser associado ao tempo analisado, considerando que o gene *PAL2* é responsável pela codificação da enzima inicial da via dos fenilpropanóides, que levam a formação de fitoalexinas e à biossíntese de ácido salicílico. Segundo Mert-Türk (2002) plantas resistentes e suscetíveis produzem fitoalexinas, mas o seu *timing* parece ser relevante para uma resposta eficiente no local da infecção. Ao analisar a expressão em diferentes tempos, Borges et al. (2012), observaram um acúmulo de transcritos de *PAL2* a 24 hpi no tratamento inoculado, diminuindo em períodos posteriores. Oblessuc et al (2012) observaram baixo nível de expressão desse gene em tecidos inoculados 65 hpi, e Velázquez e Lozoya-Gloria (2003) verificaram maior expressão entre 1 e 4 hpi.

O gene *CBP* codifica para uma proteína de ligação ao cálcio, e neste trabalho teve sua expressão regulada de forma negativa nas amostras inoculadas, sendo mais expresso nos controles experimentais. Diferentemente desse resultado, Alvarado-Gutiérrez et al. (2008) constataram superexpressão desse gene em plantas de feijoeiro inoculadas com o fungo *C. lindemuthianum*, 6 hpi. Segundo os autores, essa proteína está envolvida na sinalização precoce induzida pelo cálcio, que leva ao início da resposta de defesa da planta, considerando que, logo após o reconhecimento do patógeno, ocorre um aumento do fluxo interno de  $Ca^{+}$  (SANDERS et al., 2002; WHITE; BROADLEY, 2003). A expressão precoce desse gene pode explicar o resultado no presente trabalho. A coleta foi realizada às 72 hpi, constituindo numa possível explicação do fato de não ter sido possível detectar nenhuma alteração na expressão do gene em questão. É possível que tenha ocorrido uma transição de genes entre o intervalo observado, deixando o gene *CBP* de ser expresso para dar lugar a outros; convenientemente relacionados com os processos decorrentes daquele momento na célula. Além disso, Alvarado- Gutiérrez et al. (2008) analisaram, além da reação da planta ao patógeno, o efeito do estresse por temperatura e de transição luz-escuro, e segundo Yoshioka et al. (2001), Jambunathan et al. (2003), Izaguirre et al. (2003) e Yoshioka et al. (2006), alguns genes de resposta de defesa são transcricionalmente ativados por patógenos, bem como por diferentes formas de estresse ambiental, sugerindo um compartilhamento dos componentes de sinalização por diferentes vias, sendo as respostas sobrepostas.

O gene *MAPKK* foi cerca de duas vezes mais expresso no controle quando comparado com o tratamento inoculado, para as duas linhagens. Borges et al. (2012) encontraram padrões similares em folhas do feijoeiro e maiores níveis de expressão em outros órgãos da planta. De modo similar, Oblessuc et al. (2012) também encontraram regulação negativa em feijoeiro quando inoculado com a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Embora a classe de proteínas quinases, ativadas por mitógenos (MAPK), seja associada à transdução de sinais e requerida a partir do reconhecimento de PAMPs (NÜRNBERGER et al., 2001), é possível ocorrer sua supressão em decorrência do desencadeamento de outras moléculas inibidoras originadas a partir da infecção do patógeno, como ácido salicílico e ácido jasmônico, que podem interagir e bloquear suas vias de ação (FELTON et al., 1999).

Quando inoculadas por patógenos, as plantas acumulam grande número de proteínas relacionadas à patogênese como consequência da resposta sistêmica de resistência desenvolvida (BREEN et al., 2017). Novamente, a ausência de significância na diferença de expressão pode estar associada ao elevado erro padrão das amostras. As proteínas relacionadas à patogênese 1 (*PvPRI*) na linhagem suscetível, foram reguladas positivamente a partir do tratamento de inoculação com a raça 65 a 72 hpi. Segundo Padder et al. (2016), durante a fase biotrófica, genes relacionados a patogenicidade são expressos em maior extensão nas cultivares suscetíveis. Borges et al. (2012) também obtiveram maiores taxas de expressão desse gene no tratamento controle, em folhas, 72 e 96 hpi, para a raça 73. Entretanto Fontenelle et al. (2017) observaram a expressão dessas proteínas em bibliotecas de 72 a 120 hpi durante interação incompatível com raça 89.

Outras proteínas relacionadas à patogênese são as  $\beta$ -1,3-glucanase (PR-2), que atuam degradando polissacarídeos da parede celular de patógenos invasores, principalmente de fungos (BERTOLDO; MAZARO, 2018). Fontenelle et al. (2017) detectaram expressão de  $\beta$ -*GLUC* após três dias de infecção durante interação incompatível com o patógeno, para a raça 89. Em contrapartida, para a raça 65 observou-se nesse estudo, redução na expressão desse gene com a inoculação na BRS Esplendor, e de modo contrário, aumento, após inoculação na BRS Valente, suscetível ao patógeno. Padrão similar foi encontrado para sarna da maçã, causada pelo patógeno *Venturia inaequalis*, por Balete e Boyraz (2017). Com isso, pode-se sugerir para essas situações, acúmulo constitutivo dessa proteína em cultivares resistentes, necessitando da indução em cultivares suscetíveis.

Já as proteínas inibidoras de poligalacturonase (*PGIa*) são capazes de inibir a ação de enzimas produzidas por patógenos que podem degradar o componente poligalacturonano das

paredes celulares das plantas (KALUNKE et al., 2015). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão desse gene para a linhagem resistente. Esse resultado pode ser associado ao tempo e tecido coletado. Borges et al. (2012) encontraram menores índices de expressão de *PGIa* em folhas 72 hpi, entretanto, verificaram padrões de expressão em tecidos de hipocótilo e epicótilo, indicando a participação desse gene nos mecanismos de defesa do feijoeiro. Adicionalmente, Guerrero-González (2011) demonstrou que os transcritos de *PGIA* acumularam precocemente (8 hpi) na infecção de raízes de feijoeiro suscetíveis pelo fungo *R. solani*.

Além das variações de expressão entre patossistemas que envolvem raças diferentes, justificadas pela variabilidade entre e dentro de raças do patógeno, diversos fatores abióticos podem afetar a expressão dentro de um mesmo patossistema, incluindo o período de coleta do material a ser analisado. A penetração de fungos na célula hospedeira ocorre dentro de 54 hpi e a proporção de células afetadas aumenta com o tempo. Células necróticas aparecem em folhas de feijão 72-96 hpi com uma raça incompatível do fungo (SKIPP et al., 1972; OBLESSUC et al., 2012). Com isso, é provável que no tempo de 72 hpi possa estar ocorrendo uma transição entre as fases do ciclo de vida do patógeno, biotrófica e necrotrófica, sendo essa transição sensível a diferentes condições ambientais e até mesmo ao desenvolvimento de diferentes raças do patógeno. A transição envolve também mudança nos padrões de expressão gênica, podendo se dar comportamentos inesperados até que a mudança entre fases seja completamente estabilizada.

Esse estudo apresenta um panorama inicial sobre os atuantes e mecanismos envolvidos na defesa. A expressão de genes mais exclusivos da interação do feijoeiro com a raça 65, elicitando vias alternativas de resposta podem existir. Esse cenário pode ser associado à diversidade encontrada de raças, sugerindo diversidade também nas respostas desenvolvidas pelas plantas, diante interação, em caráter evolutivo que ocorre com o patógeno. Dessa forma, estudos adicionais sobre o transcriptoma envolvendo tal patossistema, podem auxiliar na elucidação dessa problemática.

## 5 CONCLUSÕES

Os genes selecionados apresentaram diferentes padrões de expressão durante interação incompatível e compatível entre linhagens de BRS Esplendor e BRS Valente e a raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* a 72 hpi. Genes relacionados a patogênese, como *PGIA* e  $\beta$ -

*GLUC* mostraram padrões semelhantes, apontando para a necessidade de se investigar mais genes envolvidos na resposta da planta ao patógeno neste patossistema.

\* Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ATKINSON, M. M. et al. Syringolide 1 triggers Ca<sup>2</sup> influx, K efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease-resistance gene Rpg4. **Plant Physiology**, v. 112, n. 297–302, 1996.
- ALMAGRO, L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2008.
- ALVARADO-GUTIÉRREZ, A. et al. *Phaseolus vulgaris* EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against *Colletotrichum lindemuthianum* and by abiotic stress: sequences shared between interacting partners. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 4-6, p. 111-121, 2008.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Inheritance of Anthracnose Resistance in Common Bean Differential Cultivar AB 136. **Plant Breed.**, v. 81, p. 996–998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, n. 165–169, 2003.
- BELETE, T.; BOYRAZ, N. Critical Review on Apple Scab (*Venturia*) Biology, Epidemiology, Economic Importance, Management and Defense Mechanisms to the Causal Agent. **Journal of Plant Physiology Pathology**, v. 5, n. 2, p. 3-11, 2017.
- BANNEROT, H., DERIEUX, M.; FOUILLOUX, G. Mise en évidence d'un second gène de résistance totale à l'antracnose chez le haricot. **Ann Amélior Plantes**, v. 21, p. 83–85, 1971.
- BERTOLDO, E.; MAZARO, S. M. β-1, 3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.
- BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 12, p. 1216-1220, 2012.
- BREEN, S. et al. Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. **Trends in plant science**, v. 22, n. 10, p. 871-879, 2017.
- BURT, A. J. et al. A Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. **PLoS one**, v. 10, n. 10, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139450> >. Acesso em: 08 jan. 2019.
- CASTRO, S. A. L. et al. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Paloma cultivar. **Annual Report Bean Improving Coop**, v. 57, p. 163–164, 2014.
- CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 12, 2014.

- COELHO, R. T. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in the mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report Bean Improving Coop**, v.56, p. 43–44, 2013.
- COELHO, M. et al. Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 429-438, 2016.
- COSTA, L.C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **Plos One**, v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173789>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001.
- DAVIDE L.M.C.; SOUZA E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 23-30, 2009.
- FALEIRO, F. G. et al. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2003.
- FELTON, G. W.; KORTH, K. L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 309-314, 2000.
- FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organizations of genes conferring to anthracnose in common bean. In: VARSHNEY, R.K; TUBEROSA, R. (Ed.). **Translational genomics for crop breeding**, p. 151-176, 2013.
- FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.
- FONTENELLE, M. R. et al. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **European journal of plant pathology**, v. 147, n. 3, p. 653-670, 2017.
- FOUILLOUX G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report Bean Improving Coop**, v. 19, p. 36–37, 1976.
- FOUILLOUX G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: INTERNATIONAL SYMPSIUM ON DISEASES OF TROPICAL FOOD CROPS, Louvain-la-neuve. **Proceedings**, v.3, p. 221-235, 1979.
- FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; LOZOYA-GLORIA, E. Differential early gene expression in *Phaseolus vulgaris* to Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in incompatible and compatible interactions. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 63, n. 2, p. 79-89, 2003.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mol plant-microbe Interact**, v. 12, p. 774–784, 1999.

GEFFROY, V. et al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p.407–415, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. Resistance of Common Bean Cultivar AB 136 to Races 31 and 69 of *Colletotrichum lindemuthianum*: the Co-6 Locus. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 1, p. 99–104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, Wageningen, v. 151, n. 3, p. 411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. et al. 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**, v. 30, p. 589–593, 2007.

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

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. et al. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, v. 49, p.133–138, 2009.

GONÇALVES-VIDIGAL M. C. et al. Genetic analysis of anthracnose resistance in “Pitanga” dry bean cultivar. **Plant Breeding**, v. 131, p. 423–429, 2012.

GONÇALVES A. M. O. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in andean common bean Corinthiano cultivar. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 53, p. 220–221, 2010.

GUERRERO-GONZÁLEZ, M. L. et al. Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1755-1767, 2003.

JAZI, M. M.; RAJAEI, S.; SEYEDI, S. M. Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 4, p. 597-603, 2015.

JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. **Plant cell reports**, v. 30, n. 8, p. 1465-1473, 2011.

JAMBUNATHAN, N.; MCNELLIS, T. W. Regulation of Arabidopsis COPINE 1 gene expression in response to pathogens and abiotic stimuli. **Plant physiology**, v. 132, n. 3, p. 1370-1381, 2003.



KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004.

LEITE M. E. et al. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal Plant Pathology**, v.138, p. 391–404, 2014.

LIMA I. A.; SANTOS J. B. & RAMALHO M. A. P. Are the common bean *Co-3* and *Co-7* resistant alleles to anthracnose the same? **Annual Reports Bean Improving Coop**, v.51, p.188–189, 2008.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAPHOSA, Y.; JIDEANI, V. A. The Role of Legumes in Human Nutrition. In: **Functional Food-Improve Health through Adequate Food**, 2017. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/functional-food-improve-health-through-adequate-food/the-role-of-legumes-in-human-nutrition> >. Acesso em: 15 dez. 2018.

MASTENBROEK C. A. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177–184, 1960.

MATHUR, R. S.; BARNETT H. L.; LILLY, V. G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v.40, p. 104–114, 1950.

MCROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, v. 9, p. 141–148, 1919.

MAYO, S. et al. Development of a qPCR Strategy to Select Bean Genes Involved in Plant Defense Response and Regulated by the *Trichoderma velutinum* – *Rhizoctonia solani* Interaction. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1109, 2016.

MELOTTO M.; BALARDIN R. S.; KELLY J. D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*, in **Colletotrichum: Host Specific City, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**, p. 346–361, 2000.

MELOTTO, M. et al. Comparative bioinformatic analysis of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, v. 48, n. 3, p. 562-570, 2005.

MÉNDEZ-VIGO B. et al. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, v. 141, p. 237–245, 2005.

MERT-TÜRK, F. Phytoalexins: defence or just a response to stress. **Journal Cell Molecular Biology**, v. 1, p. 1-6, 2002.

MEZIADI, C. et al. Development of molecular indicators linked to resistance genes in common bean based on the sequence of the whole genome. **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016.

NÜRNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in plant science**, v. 6, n. 8, p. 372-379, 2001.

OBLESSUC, P. R. et al. Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43161, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043161> >. Acesso em: 07 jan. 2019.

PADDER, B.A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PloS one**, v. 11, n. 11, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165823> > Acesso em: 15 out. 2018.

PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317-330, 2017.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 45, 2001.

POMPEU, A. S. Polinização cruzada natural no feijoeiro. **Bragantia** [online], v. 22, p. 53-58, 1963. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051963000100005> > Acesso em: 20 jan. 2019.

PORTER, K.; DAY, B. From filaments to function: the role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. **Journal of integrative plant biology**, v. 58, n. 4, p. 299-311, 2016.

RAMALHO, M. A. P.; DOS SANTOS, J. B. Melhoramento do feijão. **Informe agropecuário**, v. 8, n. 90, p. 16-19, 1982.

RAVA, C. A. et al. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 388-391, 1993.

SANDERS, D. et al. Calcium at the crossroads of signaling. **The Plant Cell**, v. 14, n. suppl 1, p. 401- 417, 2002.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Antracnose. In: **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa, 1994. p.17-39.

SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 411-415, 2002.

SCHÜTZ, I.; GUS-MAYER, S.; SCHMELZER, E. Profilin and Rop GTPases are localized at infection sites of plant cells. **Protoplasma**, v. 227, n. 2-4, p. 229-235, 2006.

SILVÉRIO, L. et al. Genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* race 2047 in G 2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 45, p. 74-75, 2002.

SONG, X., MA, Q., HAO, X.; LI, H. Roles of the actin cytoskeleton and an actin-binding protein in wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 99-106, 2012.

- SOUZA, L. L. et al. Genetic mappinh of the resistance allele *Co-5<sup>2</sup>* to *Colletotrichum lindemuthianum* in the common bean MSU 7-1 line. **Australian Jornal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 317-323, 2014.
- SUN, T.; LI, S.; REN, H. Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 512, 2013.
- VALLEJO, V.; KELLY, J. J.; YOUNG, A. Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathigen metapopulation. **Journal of Ecology**, v. 89, n. 5, p.736-748, 2001.
- VIEIRA, A. F. **Caracterização fenotípica e molecular de feijoeiro-comum quanto à resistência à antracnose e estudo de herança**. 2015. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG, 2015.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of botany**, v. 92, n. 4, p. 487-511, 2003.
- YOSHIOKA, K. et al. Environmentally sensitive, SA- dependent defense responses in the cpr22 mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 26, n. 4, p. 447-459, 2001.
- YOSHIOKA, K. et al. The chimeric Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. **The Plant Cell**, v. 18, n. 3, p. 747-763, 2006.
- YOUNG R. A. et al. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G 2333.” **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87–94, 1998.
- ZUIDERVEEN G. H. et al. Genome-Wide Association Study of Anthracnose Resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156391>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

**ARTIGO 2 - Análise do perfil de expressão gênica de feijoeiro em interação com raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por marcadores RAPD**

**RESUMO**

A resistência genética, atrelada a práticas culturais adequadas, permite o controle de doenças fúngicas, como a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn), que prejudica a produção de feijão. A existência de variabilidade patogênica entre e dentro de raças desse fungo, dificulta a obtenção de novas cultivares com resistência definitiva a antracnose. No Brasil, a raça 65 tem se destacado devido sua ampla distribuição geográfica e ao grande número de isolados existentes. Apesar do conhecimento já obtido sobre interações compatíveis e incompatíveis entre cultivares de feijão e raças do *C. lindemuthianum*, é importante avançar cada vez mais na investigação das bases moleculares da interação planta-patógeno. Mecanismos moleculares envolvidos nesta interação consistem em uma rede complexa e dinâmica, apresentando expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de defesa e patogenicidade. Com isso, o objetivo foi verificar a existência de variabilidade de expressão, e obter informações, a partir da técnica cDNA-RAPD, acerca dos transcriptomas de linhagens resistente (BRS Esplendor) e suscetível (BRS Valente) inoculadas com o isolado LV 238, da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Para essa finalidade foram utilizados 60 *primers* RAPD em PCRs convencionais sobre bibliotecas de cDNA, na expectativa de encontrar marcas associadas à expressão gênica. O perfil encontrado nos géis foi codificado em zero e um, para ausência e presença de bandas, e análises de polimorfismos e similaridade foram realizadas. Ao todo, foram observadas 1.619 bandas em 240 locos, sendo 167 deles polimórficos (69,6%). A análise de agrupamento permitiu verificar a consistência do padrão de bandas amplificadas pelos *primers* aleatórios nos diferentes tratamentos, podendo relacionar essas bandas ao estímulo de inoculação, resultando indicações visuais de locos putativos para a resistência. Diferenças qualitativas e quantitativas foram computadas entre os tratamentos inoculados e não inoculados de ambas as linhagens, mostrando variação na expressão gênica, de acordo com o estímulo aplicado.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum lindemuthianum*. Raça 65. cDNA-RAPD. Perfil transcricional.

**ABSTRACT**

Genetic resistance, coupled with adequate cultural practices, allows the control of fungal diseases, such as anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn), which harms bean production. The existence of pathogenic variability among and within breeds of this fungus makes it difficult to obtain new cultivars with definitive resistance to anthracnose. In Brazil, race 65 has been outstanding due to its wide geographic distribution and the large number of existing isolates. Despite the knowledge already gained about compatible and incompatible interactions between bean cultivars and *Colletotrichum lindemuthianum* breeds, it is important to advance more and more in the investigation of the molecular bases of plant-pathogen interaction. Molecular mechanisms involved in this interaction consist of a complex and dynamic network, presenting differential expression of genes involved in the processes of defense and pathogenicity. The aim of this study was to

verify the existence of variability of expression and to obtain information from the cDNA-RAPD technique on the transcripts of resistant (BRS Esplendor) and susceptible (BRS Valente) strains inoculated with the isolated LV 238 strain 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. For this purpose 60 RAPD primers were used in conventional PCRs on cDNA libraries, in the expectation of finding tags associated with gene expression. The profile found in the gels was coded at zero and one, for absence and presence of bands, and analyzes of polymorphisms and similarity were performed. In all, 1,619 bands were observed in 240 loci, of which 167 were polymorphic (69.6%). The grouping analysis allowed to verify the consistency of the pattern of bands amplified by the random primers in the different treatments, being able to relate these bands to the inoculation stimulus, resulting visual cues of putative loci for the resistance. Qualitative and quantitative differences were computed between inoculated and uninoculated treatments of both strains, showing variation in gene expression according to the applied stimulus.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*; race 65; cDNA-RAPD; Transcriptional profile.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um dos principais componentes da dieta da população brasileira. Além de fornecer grandes quantidades de carboidratos, ferro e lisina, estudos associam o consumo de seus grãos à redução do risco de obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e até mesmo alguns cânceres (SUÁREZ- MARTÍNEZ et al., 2016). A cultura do feijoeiro no Brasil é referência na produção mundial, sendo atualmente o maior produtor, com 16,5% da produção (CONAB, 2018). Doenças fúngicas, como a antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn), provocam danos consideráveis em lavouras de feijoeiro, afetando a produção em até 100% do rendimento total, em cultivares suscetíveis e condições favoráveis de clima e umidade (SINGH; SCHWARTZ, 2010).

O controle da doença deve ser preventivo e pode envolver diferentes esferas, como práticas culturais, controle químico e resistência genética. O uso de cultivares resistentes é considerado o mais seguro e eficaz, além de reduzir os custos da produção (FERREIRA et al., 2013). Entretanto, a obtenção de cultivares com resistência definitiva é dificultada pela grande variabilidade patogênica entre raças e entre isolados de uma mesma raça (SARTORATO; RAVA, 1994; PADDER et al., 2017). Essa variabilidade é explicada por vários mecanismos biológicos como mutação, recombinação sexual, parassexualidade, heterocariose,

transposons, fatores citoplasmáticos, polimorfismo cromossômico, anastomose entre hifas e anastomose entre conídios (SARTORATO; RAVA, 1994; ISHIKAWA et al., 2011). No Brasil, a raça 65 tem se destacado devido sua ampla distribuição geográfica e alta patogenicidade (DAVIDE; SOUZA, 2009; COELHO et al., 2016).

Já foram identificados mais de 20 locos multi-alélicos de efeitos independentes, mapeados em oito cromossomos do feijoeiro (MEDIACCI et al., 2016), caracterizados, em sua maioria, por apresentar interação de dominância entre os locos. Para o patossistema feijoeiro-antracnose envolvendo a raça 65, 12 locos de efeitos independentes são associados ao controle genético da resistência do feijão em interações incompatíveis com os isolados CI 1614, CI 1532, CI 1610, CI 1740, LV 134, LV 238 e LV 145 do patógeno, tendo para alguns desses genes, interação não alélica de genes duplicados (COSTA et al., 2017).

Eventos de reconhecimento e defesa do hospedeiro, bem como a habilidade do patógeno em superar a defesa das plantas, implicam em uma rede de interação molecular dinâmica e complexa, e nesse contexto, genes podem ser variavelmente regulados, de acordo com a necessidade (NIMBALKAR et al., 2006). A expressão diferencial desses genes pode ser investigada por meio de estudos transcricionais, resultando na identificação de genes relacionados a defesa da planta (ROS et al., 2004). A validação, via RT-qPCR, de genes selecionados por sua atuação em outros patossistemas Feijoeiro-Antracnose, foi realizada com a raça 65, e os resultados indicaram que vias alternativas de resposta podem existir, e ao comparar com resultados de outros autores pode-se verificar que existe uma diversidade de respostas que podem estar relacionadas a raças diferentes do patógeno, ou mesmo à fonte de resistência utilizada (Dados não publicados). Neste contexto, a técnica cDNA-RAPD surge como alternativa, visto que permite a detecção de expressão diferencial de genes, de modo menos dispendioso quando comparado com outras técnicas, para a mesma finalidade (GUPTA et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho consistiu na utilização dessa técnica para o patossistema Feijoeiro-Antracnose, para verificar a existência de variabilidade de expressão e obter informações acerca dos transcriptomas de linhagens resistente (BRS Esplendor) e suscetível (BRS Valente), inoculadas com o isolado LV 238, da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu no plantio, inoculação e avaliação fenotípica, realizada em casa de vegetação, com suporte do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças. A extração de RNA, produção de cDNA e ensaios cDNA-RAPD, consistiram na segunda etapa, realizada no Laboratório de Genética Molecular.

### 2.1 Material vegetal

As linhagens de feijoeiro selecionadas, BRS Esplendor e BRS Valente, apresentam comportamento diferencial em interação com o isolado LV 238, da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo a primeira resistente e a segunda suscetível (COSTA et al., 2017).

A semeadura foi realizada em bandejas de polietileno com células individualizadas, em substrato Rohrbacher®, e mantidas em casa de vegetação, em condições adequadas (UR de 95% e 24 °C) para a condução dos procedimentos de inoculação. Foram utilizadas duas bandejas para o plantio, de forma que, em cada bandeja, ficaram acondicionadas 27 plântulas de cada linhagem. Na condução dos ensaios, uma bandeja foi inoculada por aspersão por spray (BURT et al., 2015), enquanto que a outra constituiu o grupo controle, sem inóculo. Posteriormente à inoculação, as plantas dos quatro tratamentos (2 linhagens x 2 condições de inoculação) foram aleatorizadas de acordo com um delineamento inteiramente casualizado.

### 2.2 Preparo da suspensão de conídios e inoculação

A inoculação foi realizada com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Para isso, linhagens monospóricas mantidas em meio M3 foram repicadas em vagens estéreis contidas em tubos de ensaio (MATHUR et al., 1950), parcialmente cobertas em meio ágar-água, e mantidas incubadas por 15 dias, a 22 °C no escuro.

Após esse período, foi realizada a preparação do inóculo, adicionando água destilada nos tubos de ensaio, seguida pela raspagem dos conídios, com o auxílio de uma alça de platina, na superfície da vagem. A suspensão formada foi filtrada, através de uma câmara de gaze, para a remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em

câmara de Neubauer, padronizando a concentração do inóculo em  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml (Rava et al., 1993).

A suspensão de esporos foi inoculada, após o surgimento do primeiro trifólio, pulverizando ambas as faces das folhas e os talos, com pulverizador, até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara de nebulização (UR de 100% e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 48 horas e, posteriormente, em casa de vegetação (UR de 95% e  $24^\circ\text{C}$ ), por aproximadamente 10 dias, para coleta e avaliação.

### **2.3 Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas**

O tempo de coleta do material foliar foi de 72 horas após inoculação (BORGES et al., 2012; FONTENELLE et al, 2016). O procedimento de coleta consistiu na realização de um corte longitudinal em metade de uma folha, seguido por seu acondicionamento em microtubo de 2,0 mL e congelamento imediato em nitrogênio líquido. Após a coleta, os microtubos contendo as amostras foliares foram armazenados em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até a extração do RNA.

Cada planta foi avaliada individualmente, 15 dias após inoculação, de acordo com a escala descritiva de notas de um a nove, proposta por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987), descrita para antracnose (TABELA 1). Foram consideradas resistentes, as plantas com notas menores ou iguais a três ( $\leq 3$ ), e suscetíveis, as plantas com notas maiores que três ( $>3$ ). Os dados coletados foram submetidos ao teste t, ao nível de 5% de probabilidade.



Tabela 1 - Escala descritiva de notas para a avaliação da severidade da antracnose em plântulas de feijoeiro.

Nota	Descrição
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras principais apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
5	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas.
9	Plantas mortas.

Fonte: (SCHOONHOVEN; PASTOR CORRALES, 1987).

## 2.4 Extração de RNA e produção do cDNA

O RNA Total foi extraído utilizando o PureLink™ RNA Plant Extraction Kit, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante, com modificações. O material extraído, teve sua quantidade e pureza verificadas em espectrofotômetro (NanoVuePlus™) e sua integridade analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Em seguida, foi realizado o tratamento com DNase (Turbo DNA-free Kit Invitrogen®) e uma nova quantificação.

A produção do cDNA foi realizada com o kit Invitrogen® Super Script™ IV Reverse Transcriptase, sendo a síntese da primeira fita do cDNA feita com *primer* oligod(T)<sub>20</sub>. As amostras foram armazenadas em freezer - 20 °C até o momento de análise.

## 2.5 Análises cDNA- RAPD

Para a análise de diversidade de expressão entre os tratamentos deste estudo, foram investigadas 12 bibliotecas de cDNA obtidas a partir de plantas das cultivares BRS Esplendor e BRS Valente, inoculadas, ou não, com o isolado da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo três repetições biológicas por tratamento.

Um conjunto de 60 *primers* aleatórios RAPD (família OPA, OPB e OPC) foi utilizado em ensaios de PCR convencional. Para cada reação de 12 µL de volume final, foram adicionados 2,4 µL do 5x FIREPol® Master Mix (12,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 M Tris- HCL, 0,1 M. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% w/v Tween-20 e 1 mM dNTPs de cada nucleotídeo), 0,72 µL do *primer* RAPD (10 mM), 7,88 µL de H<sub>2</sub>O nuclease free e 1,0 µL de cDNA (20 ng/µL). As reações foram distribuídas em microtubos 0,2 mL e conduzidas ao termociclador SimpliAmp™, programado com as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 35 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com 72 °C por 10 minutos e 4 °C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 1%.

## 2.6 Análise de similaridade e dissimilaridade de expressão gênica

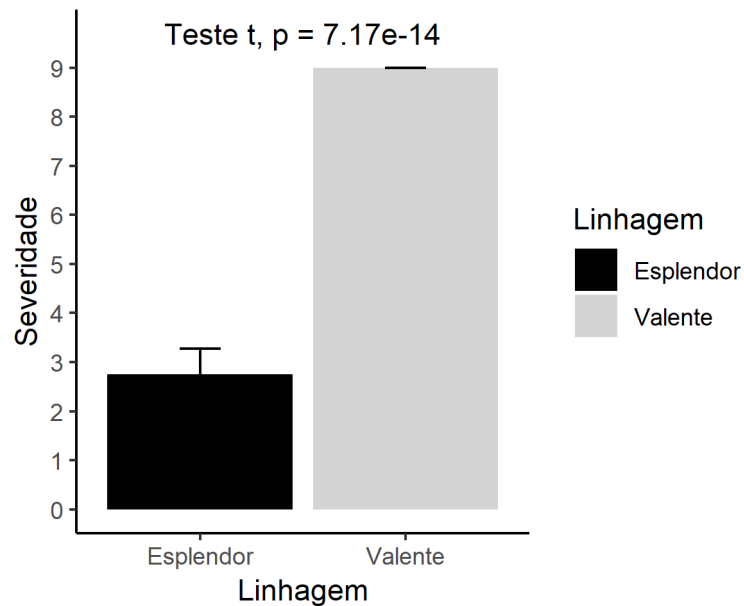
Os fragmentos gerados pelas PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e registrados por fotodocumentador. Os mesmos foram analisados e codificados com notas 0 ou 1 para ausência ou presença, respectivamente. A partir da construção de uma planilha de dados contendo a codificação 0 e 1 de cada *primer*, análises de polimorfismos e de similaridade foram executadas no software R. Da análise de similaridade entre os tratamentos inoculados e não inoculados, das linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, foi elaborado um dendograma de acordo com o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) e coeficiente de dicer. Este tipo de análise permite confirmar a repetibilidade das marcas, a partir da similaridade de expressão.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação fenotípica

A partir da análise dos dados pelo teste t a 5% de probabilidade, verificou-se diferença significativa entre as médias obtidas com a avaliação dos sintomas das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor, quando inoculadas com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* (FIGURA 1). Considerando a média das plantas avaliadas, a linhagem BRS Esplendor mostrou-se resistente ao isolado LV 280, enquanto a BRS Valente foi suscetível (FIGURA 2).

Figura 1 - Teste t entre médias de severidade dos sintomas da doença das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor, quando inoculadas com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 2 - Avaliação sintomática das linhagens BRS Valente e BRS Esplendor, 15 dias após inoculação com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. A- Linhagem BRS Valente não inoculada (controle experimental), B- Linhagem BRS Esplendor não inoculada (controle experimental), C- Linhagem BRS Valente inoculada e D- Linhagem BRS Esplendor inoculada.

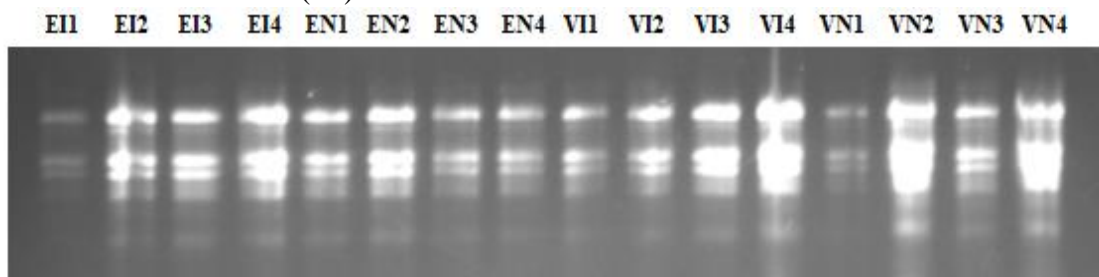


Fonte: Da autora (2016).

### 3.2 Qualidade e quantificação de RNA total

A quantificação do RNA extraído, via espectrofotômetro NanoVuePlus™, indicou concentrações satisfatórias para todas as amostras e tratamentos, variando de 1.246 a 3.181 ng/μl. A relação de absorvância  $A_{260/280 \text{ nm}}$  ficou próxima a 2,0, enquanto que a relação  $A_{260/230 \text{ nm}}$  ficou entre 2,0 e 2,5, atestando a pureza do material extraído (JAZI et al., 2015). O gel de agarose a 1% corroborou com estes indicativos, apontando boa integridade do RNA total das amostras (FIGURA 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de RNA total extraído de folhas do feijoeiro das linhagens BRS Esplendor (E) e BRS Valente (V) inoculadas (I) e não inoculadas (NI).



Fonte: Da autora (2019).

### 3.3 Diversidade de expressão gênica utilizado a técnica cDNA-RAPD

Dos 60 *primers* adotados, 44 apresentaram algum padrão de amplificação (TABELA 2). Ao todo, foram identificadas 1.619 bandas, com amplitude de variação de 4 a 126 bandas por *primer* (média 36,41). Os tamanhos dos fragmentos variaram de 100 a 1000 pares de bases (pb). De um total de 240 locos, 167 (69,6%) foram polimórficos. A relação de polimorfismo encontrada para cada *primer* é apresentada na Tabela 2.

O diferencial de expressão neste estudo foi classificado em quantitativo ou qualitativo. No primeiro caso, diferentes intensidades de amplificação de bandas monomórficas entre os tratamentos foram notadas, podendo ser categorizadas em mais ou menos fortes, putativamente referidas como regulação positiva (FIGURA 4E) ou regulação negativa (FIGURA 4F), respectivamente. No segundo caso, o diferencial de expressão é caracterizado pela presença e ausência de bandas em determinados tratamentos (FIGURA 4A).

O padrão de amplificação encontrado pelos 44 *primers* utilizados foi submetido à análise de cluster. As réplicas biológicas das linhagens que receberam o mesmo tratamento, exceto réplica 3 da linhagem BRS Esplendor não inoculada, apresentam um perfil transcricional consistente, permitindo o agrupamento por tratamento. Um resultado que demonstrou coerência para os dados obtidos foi a alta similaridade de expressão gênica entre os tratamentos de uma mesma linhagem, logo, sua classificação em clado isolado (FIGURA 5).

Tabela 2 - Dados obtidos pela amplificação por PCR a partir de *primers* RAPD sobre bibliotecas de cDNA de amostras foliares das Linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, nas condições de inoculação e controle não inoculado pelo isolado da raça 65 do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. (continua)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>	<b>TL</b>	<b>LM</b>	<b>LP</b>	<b>% P</b>
OPA-01	CAGGCCCTTC	10	5	5	50,0
OPA-02	TGCCGAGCTG	2	2	0	0,0
OPA-03	AGTCAGCCAC	10	2	8	80,0
OPA-04	AATCGGGCTG	1	0	1	100,0
OPA-05	AGGGGTCTTG	10	3	7	70,0
OPA-06	GGTCCCTGAC	8	3	5	62,5
OPA-08	GTGACGTAGG	1	1	0	0,0
OPA-09	GGGTAACGCC	8	6	2	25,0
OPA-10	GTGATCGCAG	1	1	0	0,0
OPA-11	CAATCGCCGT	2	0	2	100,0
OPA-12	TCGGCGATAG	5	2	3	60,0
OPA-13	CAGCACCCAC	3	0	3	100,0
OPA-14	TCTGTGCTGG	13	5	8	61,5
OPA-15	TTCCGAACCC	4	4	0	0,0
OPA-17	GACCGCTTGT	10	2	8	80,0
OPA-18	AGGTGACCGT	1	1	0	0,0
OPA-19	CAAACGTCGG	3	0	3	100,0
OPA-20	GTTGCGATCC	5	2	3	60,0
OPB-02	TGATCCCTGG	4	0	4	100,0
OPB-03	CATCCCCCTG	11	3	8	72,7
OPB-04	GGA CTGGAGT	2	1	1	50,0
OPB-05	TGCGCCCTTC	1	1	0	0,0
OPB-08	GTCCACACGG	1	0	1	100,0
OPB-09	TGGGGGACTC	11	4	7	63,6
OPB-10	CTGCTGGGAC	8	6	2	25,0
OPB-11	GTAGACCCGT	8	0	8	100,0
OPB-15	GGAGGGTGTT	1	0	1	100,0
OPB-16	TTTGCCCGGA	13	1	12	92,3
OPB-17	AGGGAACGAG	20	5	15	75,0
OPB-18	CCACAGCAGT	3	0	3	100,0
OPB-19	ACCCCGAAG	1	0	1	100,0
OPB-20	GGACCCTTAC	4	0	4	100,0
OPC-01	TTCGAGCCAG	2	1	1	50,0
OPC-02	GTGAGGCGTC	1	0	1	100,0
OPC-03	GGGGTCTTT	2	1	1	50,0

Tabela 2 - Dados obtidos pela amplificação por PCR a partir de *primers* RAPD sobre bibliotecas de cDNA de amostras foliares das Linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, nas condições de inoculação e controle não inoculado pelo isolado da raça 65 do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. (conclusão)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>	<b>TL</b>	<b>LM</b>	<b>LP</b>	<b>% P</b>
OPC- 05	GATGACCGCC	1	0	1	100,0
OPC- 06	GAACGGACTC	6	1	5	83,3
OPC- 07	GTCCCGACGA	5	1	4	80,0
OPC- 09	CTCACCGTCC	1	0	1	100,0
OPC- 10	TGTCTGGGTG	2	0	2	100,0
OPC- 11	AAAGCTGCGG	9	2	7	77,8
OPC- 12	TGTCATCCCC	1	0	1	100,0
OPC- 13	AAGCCTCGTC	1	0	1	100,0
OPC- 14	TGCGTGCTTG	8	0	8	100,0
OPC- 15	GACGGATCAG	6	2	4	66,7
OPC- 16	CACACTCCAG	10	5	5	50,0

LM: Locos Polimórficos

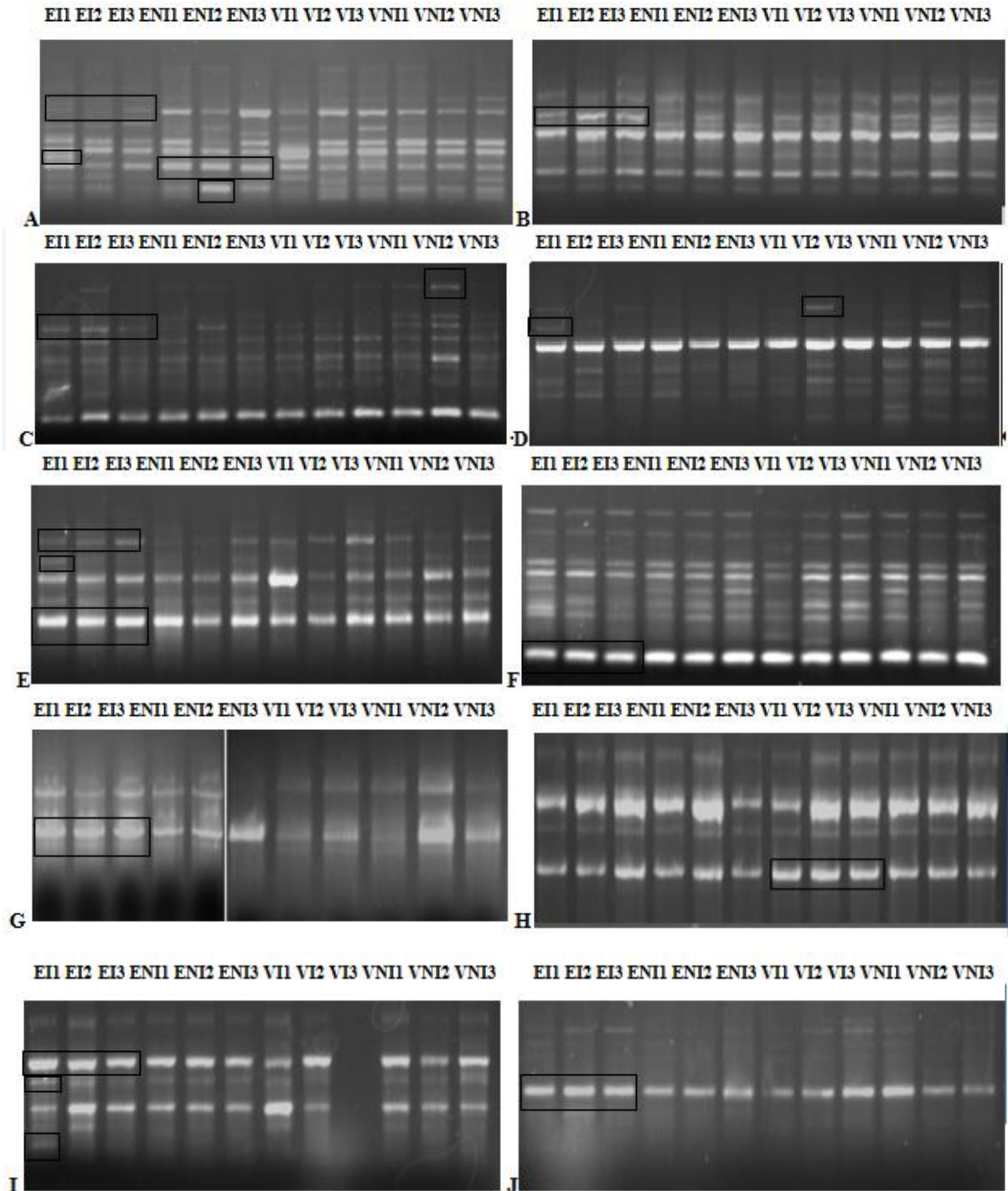
LP: Locos Monomórficos

TL: Total de Locos

% P: % Polimorfismo

Fonte: Da autora (2019).

Figura 4 - Representação dos padrões de amplificação encontrados com alguns *primers* RAPD em amostras inoculadas (I) e não inoculadas (N) de cDNA das linhagens BRS Esplendor (E) e BRS Valente (V). As setas correspondem aos fragmentos diferencialmente expressos. A- *Primer* OPA-09, B- *Primer* OPA-13, C- *Primer* OPB-04, D- *Primer* OPA-18, E- *Primer* OPB 10, F- *Primer* OPB-17, G- *Primer* OPA-02, H- *Primer* OPA-15, I- *Primer* OPC-11, J- *Primer* OPC-12.

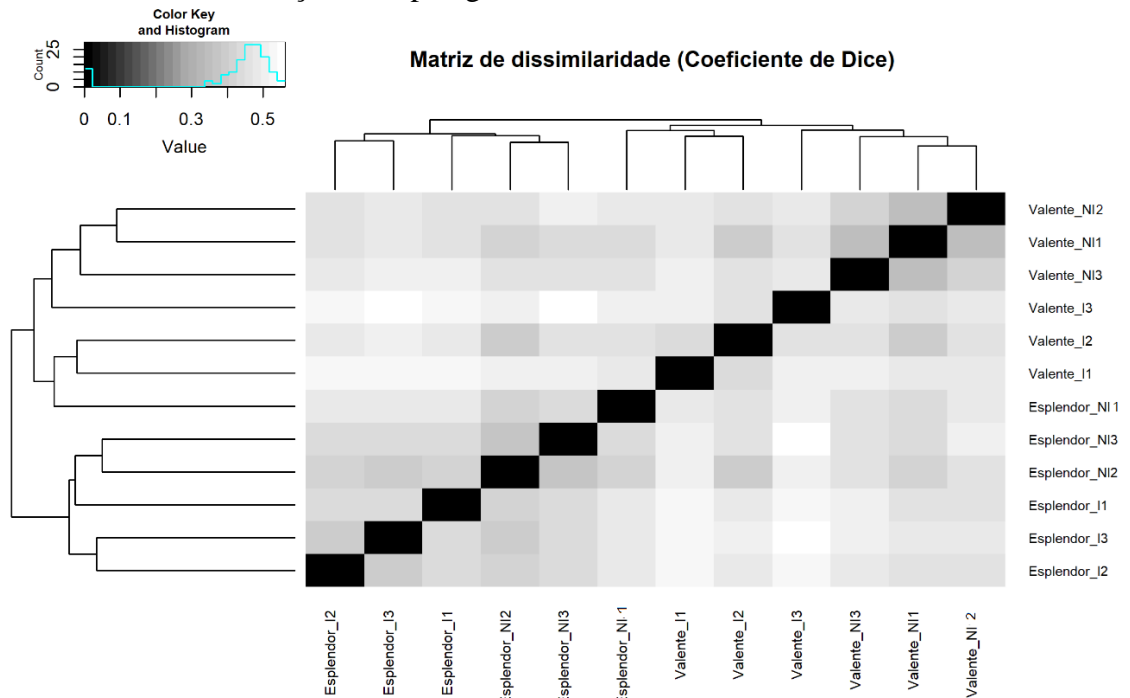


Fonte: Da autora (2019).



A partir da matriz de dissimilaridade de expressão, obtida por meio do coeficiente de Dice, foi possível confirmar o padrão encontrado no agrupamento. Comparando os tratamentos dois a dois, pode-se visualizar que a intensidade na coloração no histograma, (FIGURA 4), formando quatro blocos principais, onde a parte mais clara compreende a comparação das linhagens BRS Esplendor, diretamente com tratamentos da BRS Valente, mostrando maior dissimilaridade. A comparação entre as réplicas de um mesmo tratamento, assim como entre tratamentos diferentes da mesma linhagem, apresentou tons mais escuros, ou seja, menores valores do coeficiente de dissimilaridade de Dice.

Figura 5 - Agrupamento UPGMA com informações do coeficiente de dissimilaridade de Dice obtida pela amplificação por PCR de *primers* RAPD em cDNA de amostras das Linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, nas condições de inoculadas e não inoculadas com a raça 65 do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.



Fonte: Da autora (2019).

### 3.4 Identificação de fragmentos diferencialmente expressos

Os *primers* OPA-02, OPB-10, OPA-15, OPC-11, OPC-12, OPA-13, OPA-09, OPB-17 e OPB-04 foram selecionados e utilizados em reações de re-amplificação para 25  $\mu$ L. A partir da reamplificação, os *primers* OPA-02, OPA-15, OPC-12, OPB-04 e OPC-11

mostraram consistência do padrão de expressão, principalmente em padrões monomórficos, comparado com as reações iniciais.

Com o *primer* OPA-09 obteve-se bandas, de 800 pb, expressas em todos os tratamentos, exceto nas repetições de BRS Esplendor inoculada, indicando que há uma regulação negativa desse gene após o tratamento de inoculação. Uma banda na amostra EI1, de 500 pb, representa o padrão de expressão qualitativo encontrado nesse gel, indicando um fragmento diferencialmente expresso com o tratamento de inoculação. Também foi possível a observação de bandas consistentes entre as amostras não inoculadas da linhagem resistente e bandas diferenciais de aproximadamente 400 pb e 200 pb em EN2, respectivamente (FIGURA 4A).

Amostras diferenciais, de 600 pb, consistentes entre as repetições do tratamento inoculado da linhagem resistente foram obtidas a partir da amplificação com o *primer* OPA-13 (FIGURA 4B), indicando possível associação desse gene com a resistência ao patógeno.

Da mesma forma, com o *primer* OPB-04 encontrou-se nas amostras inoculadas de BRS Esplendor fragmentos diferencialmente expressos de aproximadamente 800 pb, e em amostras não inoculadas de BRS Valente, fragmentos de 900 pb (Figura 4C).

A Figura 4D mostra, além de um forte padrão monomórfico entre os diferentes tratamentos, quando testados com o *primer* OPA 18, padrões de expressão qualitativa em amostras de BRS Esplendor inoculada, de 700 pb, e de BRS Valente inoculada, de 900 pb, indicando possíveis locos que podem estar associados ao tratamento de inoculação em ambas as linhagens.

O padrão de bandas obtido pela amplificação do *primer* OPB-10 em amostras de BRS Esplendor indicou diferença quantitativa, com bandas mais intensas, de 350pb, e consistentes entre as repetições que receberam o tratamento de inoculação. Ainda nesses tratamentos, diferenças qualitativas foram representadas por bandas de 700 e 900 pb (FIGURA 4E).

É possível observar com o *primer* OPB-17, regulação negativa do gene na linhagem resistente, quando inoculada, através de uma menor intensidade no padrão de amplificação nessas amostras, através de bandas de 250 pb (FIGURA 4F).

O *primer* OPA-02 apresentou padrão consistente de bandas, 250pb, entre as réplicas biológicas de BRS Esplendor (figura 4G), inoculada e controle, diferindo do padrão observado nos tratamentos da linhagem suscetível.

De modo contrário, amostras de BRS Valente apresentaram maior intensidade e consistência em suas bandas de 1000 pb com o *primer* OPA-15 (FIGURA 4H).

Além de diferenças quantitativas em bandas monomórficas (1000 pb), o *primer* OPC-11 apresentou diferença qualitativas (cerca de 350 pb), no padrão observado em uma réplica de amostra inoculada de BRS Esplendor, como indicado pelo quadro na Figura 4I.

O *primer* OPC-12 mostrou padrão de expressão consistente nas amostras inoculadas das plantas resistentes, com fragmentos de aproximadamente 450 pb, indicando possível associação do loco marcado com resistência à raça 65 de *C. lindemuthianum* (FIGURA 4J).

#### 4 DISCUSSÃO

A avaliação dos sintomas realizada no presente estudo corroborou com o encontrado por Costa et al. (2017) para as linhagens BRS Esplendor e BRS Valente quando inoculadas com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, em condições de casa de vegetação (FIGURA 2). A raça 65 tem sido reportada por sua estabilidade entre diferentes linhagens por mais de três décadas. Este fato, aliado à sua ampla distribuição no Brasil, a torna alvo de estudos em programas de melhoramento visando resistência a antracnose (SILVA et al., 2007; DAVIDE et al., 2009). Já Vieira et al. (2015), a partir de marcadores SCARS, verificaram que a amplificação dos locos *Co-3<sup>4</sup>* na linhagem BRS Valente e os locos *Co-3<sup>4</sup>* e *Co-5*, na BRS Esplendor, para uma mistura de raças, incluindo a raça 65, sugerindo esse último como responsável a resistência a antracnose. Já Costa et al. (2017) também demonstraram que o controle genético da resistência das linhagens supracitadas ao isolado 65 está associado a dois genes de efeitos independentes que apresentam interação não alélica de genes duplicados. Considerando o contexto que guia as interações planta-patógeno, os autores sugeriram a hipótese de que um desses genes duplicados, poderia, evolutivamente, codificar para potenciais proteínas de reconhecimento ou proteínas patogênicas, como já observado para o alelo *Co-4* (OBLESSUC et al., 2015). Dessa forma, justifica-se o que presente estudo se propôs, explorar os padrões de expressão. Também se torna crucial o conhecimento dos genes envolvidos no processo, bem como suas possíveis funções celulares nesse patossistema.

A análise de transcriptoma compreende a identificação de todos os RNAs expressos em um dado organismo, permitindo a comparação do perfil de expressão em diferentes condições, como em condições de inoculação ou controle não inoculado, como relatado no presente trabalho. Dentre diversas possibilidades técnicas utilizadas para a finalidade de se investigar transcriptomas, o cDNA-RAPD surge como alternativa interessante. Entre suas vantagens, pode-se listar: (1) o fato de não requerer conhecimento prévio de sequências do

genótipo estudado; (2) custo relativamente baixo; (3) menor demanda por amostras biológicas em quantidade e; (4) observação direta em géis de agarose de transcritos diferencialmente expressos (YLMAZ et al., 2012). Vários estudos sobre transcriptoma e identificação de genes diferencialmente expressos vêm sendo desenvolvidos utilizando-se a técnica para diferentes culturas e circunstâncias. Como exemplo, Shuye et al. (1999) utilizaram esta técnica para identificar genes diferencialmente expressos em resposta ao fotoperíodo em arroz; Tripathi et al. (2013) analisaram a expressão diferencial de genes relacionados a resposta de defesa das plantas de trigo ao patógeno *Tilletia indica*; Aparna et al. (2017) desenvolveram o perfil do transcriptoma e identificação de transcritos diferencialmente expressos em resposta à seca em amendoim. Para o patossistema feijoeiro/antracnose existem estudos transcricionais envolvendo as raças 73 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum*, que mostram a atuação de diferentes genes e vias de respostas associadas ao estímulo de inoculação (MELLOTO et al., 2005; BORGES et al., 2012; OBLESSUC, 2012; PADDER et al., 2017; FONTENELLE et al., 2017). Entretanto, para a raça 65, com grande importância para o Brasil, os estudos são bastante limitados.

A análise de similaridade, calculada pelo coeficiente de Sorensen-Dice permite comparar a similaridade dois a dois e agrupar indivíduos em classes, de modo que os mais semelhantes permaneçam unidos. De fato, as amostras foram agrupadas em grupos coerentes aos quatro tratamentos deste estudo: BRS Esplendor inoculada, BRS Esplendor não inoculada, BRS Valente inoculada e BRS Valente não inoculada. Este resultado é bastante interessante, pois indica reprodutibilidade entre réplicas biológicas e corrobora com a expectativa de que alguns genes relacionados com as respostas das plantas à inoculação e sua relação com o patógeno, possam ser identificados pela técnica cDNA-RAPD. Embora marcadores RAPD sejam associados a baixa reprodutividade, a maioria dos locos de resistência a antracnose foram identificados a partir de marcadores RAPD em DNAs, o que evidencia sua importância, especialmente na identificação de genes de resistência a antracnose (VIEIRA et al., 2015).

No entanto, de acordo com o método de agrupamento UPGMA, uma réplica biológica da linhagem BRS Esplendor não inoculada foi agrupada no cluster superior juntamente com as amostras da linhagem BRS Valente inoculada. Esse padrão inesperado pode estar associado ao número de *primers* utilizados. No entanto, considerando que BRS Esplendor é uma linhagem resistente e BRS Valente é suscetível ao patógeno, alguns genes expressos por BRS Esplendor não inoculada e BRS Valente inoculada, podem não estar diretamente relacionados

com a resposta da planta ao patógeno. Estudos complementares podem esclarecer esta singular classificação inesperada. Johns et al. (1997) obtiveram em seu estudo, o mesmo padrão de agrupamento para linhagens de feijoeiro considerando 50 bandas e 106 bandas em estudo de diversidade genética, mas pouco se sabe sobre os padrões quando é considerada a expressão gênica.

A base da diversidade genética consiste na variação da sequência em pares de bases de DNA (NIENHUIS et al., 1995). *Primers* RAPD, há tempos, são utilizados em estudos sobre diversidade genética em feijoeiro (DUARTE et al., 1999; FRANCO et al., 2001; EMYGDIO et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2003; CHIORATO et al., 2007), permitindo a obtenção de polimorfismos, obtenção de similaridade e agrupamento de linhagens, acessos e cultivares. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que a utilização desses *primers*, quando aplicados em material expresso, seja interessante para a avaliação da diversidade em nível de expressão gênica, representado pela obtenção de polimorfismos entre os tratamentos inoculados e não inoculados das linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, ressaltando diferenças na intensidade e no perfil de expressão (FIGURA 4). Vera et al. (1999) e Emygdio et al. (2003) encontraram 83,2% e 85,6% de polimorfismo usando *primers* RAPD em DNA, respectivamente. Para o perfil de expressão foram observados cerca de 50% de locos polimórficos, valor menor ao comumente encontrado para feijoeiro. Essa diferença pode ser associada ao fato de marcadores RAPD poderem estar relacionados a regiões que não codificam genes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; PATEL et al., 2018) nos estudos de diversidade genética, regiões estas excluídas, quando se trata de cDNA.

A identificação visual de transcritos diferencialmente expressos, de modo quantitativo e/ou qualitativo (FIGURA 4), sugere a participação dos referidos locos quanto a interação entre as linhagens BRS Esplendor e BRS Valente, com o isolado LV 238 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Primers* foram selecionados a partir do perfil apresentado em suas ampliações, nos diferentes tratamentos, não necessariamente considerando sua porcentagem de polimorfismos. A partir de reamplificação desses *primers* observou-se semelhança no padrão produzido por seis dos nove primers utilizados. A reprodutibilidade desses *primers* é associada, principalmente, aos padrões monomórficos amplificados por eles. Patel et al. (2018) também verificaram o mesmo perfil de amplificação em condições adequadas de PCR para alguns *primers* testados.

Entre os fragmentos indicados como diferencialmente expressos incluiu-se bandas exclusivas de repetições de um tratamento específico, como por exemplo na Figura 4B. Esse

padrão indica que a sequência ali flanqueada possa estar associada a um gene que começa ser expresso a partir do momento da interação com patógeno, sendo ele importante para reconhecimento e sinalização de padrões associados a patógenos, ou para participação de processos metabólicos, formação de compostos que atuam como barreiras contra patógenos, como a lignina e suberina, síntese de fitoalexinas e no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). De modo contrário, bandas que foram negativamente reguladas nos tratamentos inoculados da linhagem resistente (Figura 4A) quando comparado com todos os outros, também chama atenção. Conhecer esse gene, que teve sua expressão suprimida com a invasão do patógeno, pode oferecer informações interessantes sobre os mecanismos envolvidos nas vias de atuação de resistência. Bandas monomórficas, com padrões consistentes de intensidade entre as repetições de determinado tratamento também foram consideradas (FIGURAS 4A, 4E e 4F), pois podem mostrar um cenário de regulação positiva ou negativa a partir do estímulo inoculação, de um gene que tenha, por exemplo, expressão constitutiva em ambas as linhagens.

Estudos adicionais que permitam explorar esses fragmentos, visando sua identificação e possível atuação nas vias de resistência, assim como a validação dos padrões de expressão, via RT-qPCR, nos tratamentos inoculados e não inoculados, em ambas as linhagens, são relevantes para entender, de fato, a atuação dos fragmentos diferencialmente expressos encontrados nesse estudo.

## 5 CONCLUSÃO

*Primers* RADP possibilitaram análises de diversidade em nível de expressão gênica entre tratamentos inoculados e não inoculados de linhagens resistentes e suscetíveis a antracnose, fornecendo informações acerca da presença de locos polimórficos entre os tratamentos. O estudo do padrão de expressão permitiu também, a identificação visual de fragmentos, qualitativos e quantitativos, diferentemente transcritos entre os tratamentos das linhagens BRS Esplendor e BRS Valente.

\* Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Inheritance of Anthracnose Resistance in Common Bean Differential Cultivar AB 136. **Plant Breed.**, v. 81, p. 996–998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4*<sup>3</sup> and *Co-9* in common bean cultivar tlanepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, v. 154, n. 1-2, p. 1-8, 2007.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, n. 165–169, 2003.
- APARNA, E. et al. Transcriptome profiling and identification of differentially expressed transcripts in response to mid season drought in groundnut *Arachis hypogaeae* L. **Canadian Journal of Biotechnology**. v. 1, p. 197-197, 2017.
- BANDYOPADHYAY, S.; NANDAGOPAL, K.; JHA, T. B. Characterization of RAM to SAM transitions in *Selaginella microphylla* grown in vitro. **Biologia plantarum**, v. 57, n. 3, p. 597-600, 2013.
- BANNEROT, H.; DERIEUX, M.; FOUILLOUX, G. Mise en évidence d'un second gène de résistance totale à l'antracnose chez le haricot. **Ann Amélior Plantes**. v. 21, p. 83–85, 1971.
- BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 12, p.1216-1220, 2012.
- BURT, A. J et al. Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. **PLoS one**, v. 10, n. 10, p. e0139450, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139450>>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- CASTRO S. A. L. et al. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Paloma cultivar. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 57. p. 163–164, 2014.
- CHEN, Y. H. et al. Transcription analysis of peloric mutants of *Phalaenopsis orchids* derived from tissue culture. **Cell research**, v. 15, n. 8, p. 639, 2005.
- CHIORATO, A. F. et al. Diversidade genética em acessos de feijoeiro avaliado por meio de dados morfoagronômicos e de RAPD. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 3, p. 256-262, 2007.
- COELHO R. T. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in the mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 56, p. 43–44, 2013.
- COELHO, M. et al. Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 429-438, 2016.

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: **grãos, safra 2018/2019, Segundo levantamento**, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- COSTA, L.C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **Plos One**, v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173789>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- DAVIDE, L.M.C.; SOUZA, E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 23-30, 2009.
- DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B.; MELO, L. C. Divergência genética entre cultivares de feijoeiro de diferentes raças baseadas em marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 419-426, 1999.
- EMYGDIO, B. M. et al. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1165-1171, 2003.
- FRANCO, M. C. et al. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 381-385, 2001.
- FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organizations of genes conferring to anthracnose in common bean. In: VARSHNEY, R.K.; TUBEROSA, R. (Ed.). **Translational genomics for crop breeding**, p. 151-176, 2013.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Embrapa-Cenargen, 1995.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report Bean Improving Coop**, v. 19, p. 36-37, 1976.
- FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DISEASES OF TROPICAL FOOD CROPS, **Louvain-la-neuve Proceedings**, v. 3, p. 221-235, 1979.
- FONTENELLE, M. R. et al. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **European journal of plant pathology**, v. 147, n. 3, p. 653-670, 2017.
- GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular plant-microbe Interact**, v. 12, p. 774-784, 1999.
- GEFFROY, V. et al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p.407-415, 2008.



GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Characterization of Fusarium wilt resistant somaclonal variants of banana cv. Rasthali by cDNA-RAPD. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 12, p. 7929-7935, 2014.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J.D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, n.3, p.411- 419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. Resistance of Common Bean Cultivar AB 136 to Races 31 and 69 of *Colletotrichum lindemuthianum*: the Co-6 Locus. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 1, p. 99–104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. 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**, v. 30, p. 589–593, 2007.

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, v. 49, p.133–138, 2009.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Genetic analysis of anthracnose resistance in “Pitanga” dry bean cultivar. **Plant Breeding**, v. 131, p. 423–429, 2012.

GONÇALVES, A. M. O. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene in andean common bean Corinthiano cultivar. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 53, p. 220–221, 2010.

GUPTA, M.; PANDEY, C. cDNA- RAPD analysis in *Oryza sativa* and *Brassica juncea* under Arsenic stress. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 6, p. 489-492, 2013.

HU, T. et al. Identification of a novel Getah virus by Virus-Discovery-cDNA random amplified polymorphic DNA (RAPD). **BMC Microbiology**, v. 12, p. 305, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-305>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO M. A. P.; SOUZA E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 461-464, 2011.

JAZI, M. M.; RAJAEI, S.; SEYEDI, S. M. Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 4, p. 597-603, 2015.

JIANG, S.; CHEN, Q.; FANG, X. Identification of differentially expressed genes in photo-period sensitive genic male sterile rice by randomly amplified cDNAs using RAPD primers. **Chinese science bulletin**, v. 44, n. 4, p. 348-351, 1999.

- LIMA, I. A.; SANTOS, J. B.; RAMALHO M. A. P. Are the common bean *Co-3* and *Co-7* resistant alleles to anthracnose the same? **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 51, p. 188–189, 2008.
- MATHUR, R. S.; BARNETT, H. L.; V.G. LILLY. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v. 40, p. 104–114, 1950.
- MASTENBROEK, C. A. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177–184, 1960.
- MCROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, v. 9, p. 141–148, 1919.
- MELOTTO, M.; BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*, in **Colletotrichum: Host Specific City, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**, p. 346–361, 2000.
- MELOTTO, M. et al. Comparative bioinformatic analysis of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, v. 48, n. 3, p. 562-570, 2005.
- MÉNDEZ-VIGO, B. et al. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, v. 141, p. 237–245, 2005.
- MEZIADI, C. et al. Development of molecular indicators linked to resistance genes in common bean based on the sequence of the whole genome. **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016.
- NIENHUIS, J. et al. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, p. 300-306, 1995.
- NIMBALKAR, S. B. et al. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4-6, p. 176-188, 2006.
- OBLESSUC, P. R. et al. Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43161, 2012. Disponível em :< <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043161> >. Acesso em: 07 jan. 2019.
- PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317-330, 2017.
- PATEL, P. et al. Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 153-159, 2018.
- PHANCHAISRI, B. et al. Expression of OsSPY and 14-3-3 genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 734, n. 1, p. 56-61, 2012.

- RAVA, C.A. et al. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 388-391, 1993.
- REN, W. et al. Identification of a novel phenamacril- resistance- related gene by the cDNA- RAPD method in *Fusarium asiaticum*. **Pest management science**, v. 72, n. 8, p. 1558-1565, 2016.
- ROS, B.; THÜMMLER, F.; WENZEL, G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 3, p. 191-201, 2004.
- SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M.A Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. **CIAT**. 1987.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Antracnose. In: **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa, p.17-39, 1994.
- JIANG, S.; CHEN, Q.; FANG, X. Identification of differentially expressed genes in photo-period sensitive genic male sterile rice by randomly amplified cDNAs using RAPD primers. **Chinese science bulletin**, v. 44, n. 4, p. 348-351, 1999.
- JOHNS, M.A. et al. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, v. 37, p. 605-613, 1997.
- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.155, p. 241-247, 1997.
- SILVÉRIO, L. et al. Genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* race 2047 in G 2333. **Annual Reports Bean Improving Coop**, v.45, p. 74-75, 2002.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. **Crop Science**, v. 50, p. 2199-2223, 2010.
- SOUZA, L. L. et al. Genetic mappinh of the resistance allele *Co-5<sup>2</sup>* to *Colletotrichum lindemuthianum* in the common bean MSU 7-1 line. **Australian Jornal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 317-323, 2014.
- SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. **Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 131-137, 2016.
- TRIPATHI, A.; AGGARWAL, R.; YADAV, A. Differential expression analysis of defense-related genes responsive to *Tilletia indica* infection in wheat. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 5, p. 606-613, 2013.
- VALLEJO, V.; KELLY, J. J.; YOUNG, A. Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathigen metapopulation, **Journal of Ecology**, v. 89, n. 5, p.736-748, 2001.

VERA, C. M.; PAREDES, M. C.; BECERRA, V. V. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPDs dentro y entre clases comerciales de fréjol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultura Técnica**, v. 59, n. 4, p. 247-259, 1999.

VIEIRA, A. F. **Caracterização fenotípica e molecular de feijoeiro-comum quanto à resistência à antracnose e estudo de herança**. 2015. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG, 2015.

WAKEKAR, R. S. et al. Pollen Dysfunction Causes ‘Floral Bud Distortion’ in Indian Soybean (*Glycine max*). **Agricultural Research**, v. 7, n. 1, p. 10-24, 2018.

YOUNG, R.A. et al. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G 2333.” **Theoretical Applied Genetics**, v. 96, p. 87–94, 1998.

YILMAZ, A. et al. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. In: HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; RAMIREZ, G. A. **Polymerase Chain Reaction**. Rijeka: InTech. 2012. p. 566.

ZUIDERVEEN, G.H. et al. Genome-Wide Association Study of Anthracnose Resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156391>>. Acesso em: 07 jan. 2019.