



LUCIANA APARECIDA MIGUEL

**META-QTLS PARA RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE
(*Colletotrichum lindemuthianum*) E EXPRESSÃO
DIFERENCIAL DE GENES DURANTE INTERAÇÃO COM A
RAÇA 65 NO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**LAVRAS - MG
2020**

LUCIANA APARECIDA MIGUEL

META-QTLS PARA RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE (*Colletotrichum lindemuthianum*) E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DURANTE INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 NO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência 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

Dr. Renato Coelho de Castro Vasconcellos
Coorientador

**LAVRAS -MG
2020**

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

Miguel, Luciana Aparecida.

Meta-QTLs para resistência a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e expressão diferencial de genes durante a interação com a raça 65 no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Luciana Aparecida Miguel. - 2020.

95 p.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Coorientador(a): Renato Coelho de Castro Vasconcellos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Melhoramento de Plantas. 2. Resistência a doenças. 3. Feijoeiro. I. Pereira, Welison Andrade. II. Vasconcellos, Renato Coelho de Castro. III. Título.

LUCIANA APARECIDA MIGUEL

META-QTLS PARA RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE (*Colletotrichum lindemuthianum*) E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DURANTE INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 NO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

META-QTLS FOR RESISTANCE TO ANTHRACNOSIS (*Colletotrichum lindemuthianum*) AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF GENES DURING INTERACTION WITH RACE 65 IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência 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 09 de outubro de 2020.

Dr. Evandro Novais UFLA

Dra. Monik Evelin Leite IFNMG

Prof. Dr. WelisonAndrade Pereira
Orientador

Dr. Renato Coelho de Castro Vasconcellos
Coorientador

**LAVRAS -MG
2020**

*Deus, com toda a minha gratidão e meu amor,
por ter me ajudado em todos os momentos, principalmente nos difíceis que considereii
impossíveis...*

Ofereço

*Dedico aos meus pais e à minha vó Jandira (in memorian)
por todo apoio e carinho durante toda essa trajetória. Por todo amor e atenção nessa etapa.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa conquista, pois sem Ele eu nada seria, por ser minha fortaleza durante os momentos de fraqueza. Gratidão infinita por poder conseguir chegar até aqui, onde eu sei que é o sonho de muitas pessoas. Obrigada por tudo.

Aos meus pais Maria e Luciano, por todo o incentivo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Por fazerem parte dos meus sonhos e me ajudarem a concretizar tudo que almejo na vida. Por serem meu refúgio e aconchego. Me faltam palavras para descrever o quanto eu amo vocês. Fica aqui um registro da minha gratidão.

À minha avó Jandira (*in memoriam*), que desde criança me incentivou a lutar com todas as garras e forças pelos meus sonhos. Onde quer que esteja continue olhando por mim, e saiba que é o motivo da minha saudade diária, te amo!

Aos meus amigos Mariana, Danielle, João Miller, Ana Rosa e Haiany, que merecem destaque por estarem juntinhos de mim, dispostos a ouvir todas as dificuldades e me incentivar. Pelas risadas, dramas, choros e festas, muito obrigada. Só se reconhece amigos verdadeiros perante as dificuldades e vocês são para todo o sempre.

Aos técnicos de laboratório Lamartine e Rafael, por compartilharem experiências e ensinamentos sobre a ciência e a vida, durante toda a trajetória, desde a graduação, e por não medirem esforços para me ajudar. A todos os funcionários do departamento, meu muito obrigada.

Ao professor e orientador Welison, pela oportunidade e ensinamentos. Pela experiência que certamente me proporcionou amadurecimento e crescimento profissional. Ao Renato que me coorientou e desde a graduação acompanha minha trajetória, meu muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular por todo companheirismo e apoio durante todos esses anos, em especial à Fernanda e ao Antonio, por me suportarem nos dias ruins, por toda ajuda e conselhos, queria guardar vocês dentro de um potinho. Vocês são a melhor família que eu poderia ter durante toda a caminhada que ocorreu até agora. Levarei eternamente comigo.

À Caroline, companheira de experimento, por tudo que fez por mim sem medir nenhum esforço durante todo esse período. Espero que um dia eu, ou a vida, possamos te retribuir em dobro toda esse ajuda. Meu muito obrigada pela sua dedicação e força de vontade, que certamente foi uma das contribuições mais necessárias para que eu chegasse até aqui.

Aos colegas de turma e amigos que fiz durante o curso, por tornar nossas aulas descontraídas e melhor de lidar, principalmente à Gabrielle e à Ana Flávia, por todas as risadas e desesperos que passamos juntas durante esse tempo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de crescimento cursando o mestrado. Aos professores do programa pelo conhecimento adquirido.

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

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos que contribuíram de certa forma para a concretização desta etapa na minha vida, fica aqui minha infinita gratidão.

Muito obrigada!

“O sucesso não consiste em não errar, mas em não cometer os mesmos equívocos mais de uma vez.” (George Bernard Shaw)

RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa importante para o consumo direto em diversas partes do mundo, e isso se deve ao fato de seus grãos fornecerem proteínas, minerais e carboidratos. A produção da cultura pode ser acometida por diferentes tipos de pragas e patógenos. A antracnose, doença fúngica causada pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, se destaca como uma das doenças economicamente importantes, podendo levar a perdas severas na produtividade, em condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo. Tendo em vista esta situação e considerando a quantidade de informações disponíveis sobre o controle genético da doença, o objetivo desse estudo foi: (i) realizar uma meta-análise de QTLs que conferem resistência a antracnose no feijoeiro, buscando genes de resistência no menor intervalo de confiança e; (ii) Validar dois genes putativos de resistência à doença, indicados para estudo, através da técnica PCR semiquantitativa. A meta-análise permitiu a reunião de informações sobre diversas cultivares que mostram resistência efetiva a várias raças do patógeno, mostrando QTLs estáveis distribuídos nos 11 cromossomos. Esta análise oferece informações importantes para que programas de melhoramento realizem piramidação de genes de resistência, importante técnica que objetiva a obtenção de resistência duradoura. É importante salientar, que esta análise de meta QTLs pode ser refinada com dados de estudos posteriores, para assim, contribuir para obtenção de novas cultivares resistentes a várias raças de antracnose. Na análise de expressão de dois genes candidatos à raça 65 do patógeno foi realizada via PCR- semiquantitativa e revelou que não houve diferencial de expressão entre cultivares resistentes e suscetíveis inoculadas com o *Colletotrichum lindemuthianum* para estes genes, demandando pesquisas de outros genes observados neste estudo. O ensaio consistiu em uma análise inicial, e se faz necessário a realização de mais ensaios utilizando técnicas mais sensíveis para quantificar a expressão gênica.

Palavras-chave: Meta-análise de QTLs; Expressão diferencial; PCR semiquantitativa; *Colletotrichum lindemuthianum*; *Phaseolus vulgaris* L. Raça 65

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important direct consumption legumes in different parts of the world, and this is due to the fact that its grain provides easy access to proteins and minerals, mainly in developing countries. Crop production can be affected by different types of pests and pathogens. Among them, Anthracnose, a fungal disease caused by *Colletotrichum lindemuthianum* and one of the most economically important diseases, which can lead to severe losses in productivity, under favorable conditions. Due this situation and considering the amount of available information for genetic control of the disease, the aim of this project was (i) To perform a meta-analysis of QTLs that confer resistance to anthracnose, searching for resistance genes in the smallest confidence interval and (ii) Validate the expression of two indicated disease resistance genes, using the semi-quantitative PCR technique. The meta-analysis was able to gather information on several cultivars that presented an effective resistance to different pathogen races, showing some stable QTLs distributed over the 11 chromosomes, however not all QTLs were considered. Also, from this study it is possible that breeding programs can perform a pyramiding of resistance genes, ensuring the long-lasting resistance. It is important to note that this QTLs meta-analysis can be refined with data from later studies, in order to contribute to obtain new resistant cultivars to various anthracnose races. Analysis of two candidate genes expression via semi-quantitative PCR revealed that there wasn't differential expression between the resistant and susceptible inoculated cultivars with *Colletotrichum lindemuthianum*, however, it is necessary to perform more in-depth studies using sensitive techniques to quantify gene expression.

Keywords: Meta-analysis of QTLs; Gene expression; Semi-quantitative PCR; *Colletotrichum lindemuthianum*; *Phaseolus vulgaris* L. Race 65

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 13
2	REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1	Cultura do feijoeiro no Brasil 15
2.2	Antracnose no feijoeiro 16
2.3	Variabilidade do fungo <i>c. lindemuthianum</i> 18
2.4	Variabilidade dentro da raça 65 de <i>colletotrichum lindemuthianum</i> 20
2.5	Controle genético da antracnose 21
2.6	Mapeamento de genes de resistência à antracnose 24
2.7	Análise de expressão gênica 27
2.8	Integração de QTLs via meta-análise 28
	REFERÊNCIAS 30
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS * 39
	ARTIGO 1 - META-QTLS PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE (<i>COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM</i>) NO FEJJOEIRO (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L). 40
1	INTRODUÇÃO 41
2	MATERIAL E MÉTODOS 42
3	RESULTADOS 46
3.1	Cromossomo Pv01 53
3.2	Cromossomo Pv02 54
3.3	Cromossomo Pv03 54
3.4	Cromossomo Pv04 54
3.5	Cromossomo Pv05 54
3.6	Cromossomo Pv06 55
3.7	Cromossomo Pv07 55
3.8	Cromossomo Pv08 55
3.9	Cromossomo Pv09 56
3. 10	Cromossomo Pv10 56
3.11	Cromossomo Pv11 56
4	DISCUSSÃO 57
5	CONCLUSÕES 65
	REFERÊNCIAS 67

	ARTIGO 2 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES PHVUL.004G001500 E PHVUL.011G200300 (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) DURANTE A INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 DE <i>COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM</i>	72
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1	Material genético	75
2.2	Preparo da suspensão de conídios e inoculação.....	76
2.3	Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas.....	76
2.4	Extração de RNA e síntese de cDNA	77
2.5	Análise da expressão gênica diferencial via PCR-semiquantitativa	78
3	RESULTADOS.....	81
3.1	Avaliação fenotípica	81
3.2	Qualidade e quantificação de RNA total	82
3.3	PCR semiquantitativa	83
4	DISCUSSÃO	85
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE	91

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes para o consumo humano no mundo. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, está entre as mais severas doenças do feijoeiro, e em condições favoráveis de desenvolvimento para o patógeno pode ocorrer perdas de até 100% da produção. A doença se encontra em todo território onde o feijão é cultivado e pode ser disseminada, de modo geral, através de sementes contaminadas e dispersão de esporos (AWORI *et al.*, 2018; PADDER *et al.*, 2017). O controle da doença é realizado de modo integrado e preventivo, unindo controle químico, tratos culturais adequados e controle genético, a partir do uso de cultivares resistentes, sendo esse último, uma forma de controle eficiente, econômica e ambientalmente sustentável (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MIKLAS *et al.*, 2006). Contudo, o fungo apresenta grande diversidade de virulência, com mais de 200 raças fisiológicas já identificadas em todo o mundo, o que dificulta a obtenção de cultivares com resistência durável (PADDER *et al.*, 2017). São predominantes no Brasil as raças 65, 73, 81 e 89 (CARBONELL *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2016; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007).

A alta especificidade da interação entre *P. vulgaris* e *C. lindemuthianum* tem sido fonte de referência para estudos de resistência raça-específica em plantas. Atualmente, mais de 20 locos multi-alélicos, de efeitos independentes, já foram identificados em cultivares resistentes, conferindo resistência a diferentes raças de *C. lindemuthianum* (COELHO *et al.*, 2013; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Esses genes são mapeados em diferentes grupos de ligação do feijoeiro, e a maioria deles é constituinte de *clusters* (blocos gênicos complexos), sendo que genes individuais conferem resistência a uma raça específica (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MEZIADI *et al.*, 2016; MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019). Até o presente momento, são dezessete locos independentes (*Co-1* a *Co-17*), os quais conferem resistência a diferentes raças do fungo, mapeados em oito cromossomos Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv07, Pv08, Pv09 e Pv11, com exceção de sete genes *Co-u*, *Co-w*, *Co-x*, *Co-y*, *Co-z*, *CoPv02c* e *CoPv09c*, mapeados para os mesmos cromossomos, no qual os locos numerados estão localizados.

São os genes dominantes que predominantemente conferem resistência em todos os locos, exceto o *co-8*, e múltiplos alelos foram identificados nos locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5* (ZUIDERVEEN *et al.*, 2016). A identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de

resistência a antracnose, tem sido amplamente estudada, apesar da resistência ser de caráter predominantemente qualitativo. Com isso, a disponibilidade de informações vem aumentando, possibilitando a realização de meta-análise para esta doença. Zuiderveen *et al.* (2016) relataram em seu trabalho, um importante QTL putativo para resistência à antracnose em grãos andinos e mesoamericanos, que foi identificado no Pv01, adjacente aos SNPs ss715645251 a 50,30 Mb na região de 58 kb (50,26 a 50,32 Mb) onde o *Co-x* foi mapeado.

O avanço das ferramentas tecnológicas de sequenciamento de nova geração e estudos sobre o genoma do feijoeiro (SCHMUTZ *et al.*, 2014; VLASOVA *et al.*, 2016), têm possibilitado a realização do mapeamento fino de genes responsáveis pela resistência a *C. lindemuthianum*. Esse tipo de mapeamento tem possibilitado a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse, facilitando a seleção assistida por marcadores moleculares (BURT *et al.*, 2015; MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019; RICHARD *et al.*, 2014; VALENTINI *et al.*, 2017).

O processo de genotipagem também pode oferecer bons indicativos de genes ativos que devem ser validados quanto a sua atuação nas vias metabólicas que conduzem o mecanismo de resistência. Essa validação pode ser realizada a partir de diferentes técnicas, como a PCR semiquantitativa, que permite a amplificação do gene alvo e é realizada concomitantemente ao gene controle, possibilitando fazer a comparação entre ambos, e a partir disso, avaliar a expressão do gene estudado.

Considerando todos esses aspectos de estudos do patossistema, este trabalho objetiva reunir informações a partir de uma meta-análise de QTLs que conferem resistência à antracnose no feijoeiro, buscando genes de resistência no menor intervalo de confiança, e também validar dois genes putativos de resistência à doença, através da técnica de PCR-semiquantitativa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do feijoeiro no Brasil

O feijoeiro é uma das leguminosas economicamente importantes, e seu fornecimento de nutrientes é diretamente consumido, participando da dieta proteica em países da América Latina, África, Oriente Médio e do Mediterrâneo (CORTÉS *et al.*, 2012). Além da sua importância nutricional, a cultura também apresenta apelo socioeconômico, gerando mão de obra, principalmente na colheita, e fonte de renda para pequenos produtores. Embora historicamente a cultura no Brasil seja voltada para a agricultura de subsistência, nas últimas décadas, o interesse de grandes produtores aumentou devido aos grandes avanços tecnológicos, fazendo com que esta se torne ainda mais importante no país (CARNEIRO; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2015).

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e consumidor mundial de feijão, com cerca de 3,07 milhões de toneladas produzidas em uma área de 3,6 milhões de hectares no período de 2019/2020 (CONAB, 2020). A maior produção ocorre no Paraná, acompanhado por Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Goiás, os quais respondem por cerca de 64% do total produzido no País (CONAB, 2020). Entretanto, a quantidade produzida aqui, não é suficiente para alimentar toda a população brasileira. Dessa forma, o país recorre a importação de aproximadamente 150 mil toneladas por ano, sendo o feijão tipo preto, principal produto importado, cujo fornecedor líder é a Argentina (RUAS, 2017).

O cultivo de feijão é realizado em várias regiões do Brasil, sendo que a produção ocorre praticamente em todos os meses do ano. De maneira geral, têm-se três safras bem definidas: a primeira, conhecida como ‘safra das águas’, é semeada entre outubro e novembro; a segunda, ‘safra da seca’, é semeada entre fevereiro e março; e a terceira safra, ‘safra de outono-inverno’, com semeadura entre os meses de junho e julho (BARBOSA; GONZAGA, 2012). De acordo com a CONAB (2020), o Distrito Federal e o estado de Goiás alcançaram uma produtividade de 3.000 Kg/ha na terceira safra de 2018/2019, o que é quase o triplo da produtividade nacional, de 1.056 Kg/ha neste mesmo período.

O uso de novas tecnologias, desde o manejo adequado até o uso de sementes melhoradas, tem proporcionado o aumento da produtividade nas últimas décadas. Entretanto, a produtividade nacional ainda está longe do esperado, porque a produção ocorre praticamente em todos os meses do ano em diversos ecossistemas, sendo submetidos a

diferentes sistemas de produção, causando exposição a diferentes fatores que podem influenciar na estabilidade da produção. Dentre esses fatores ocorrem as doenças fúngicas, que podem causar grande impacto na produção, podendo levar a perdas significativas (CARNEIRO; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2015; PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). Como alternativa para o controle de problemas fitossanitários e incrementos da produção, o uso de cultivares resistentes em conjunto com o manejo adequado tem se mostrado eficiente (XU; CROUCH, 2008; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MIKLAS *et al.*, 2006). Portanto, pesquisas relacionadas à resistência de cultivares contra patógenos são de extrema importância para que programas de melhoramento do feijoeiro possam avançar no país.

2.2 Antracnose no feijoeiro

A antracnose, doença causada pelo fungo *C. lindemuthianum*, é considerada a mais agressiva e importante para a cultura do feijoeiro, podendo comprometer até 100% da produção, quando utilizadas sementes contaminadas e/ou cultivares suscetíveis em condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da doença (BARBOSA; GONZAGA, 2012; BIANCHINI *et al.*, 2005; KIMATI *et al.*, 1997). Em ataques mais severos ocorre mancha nos grãos, tornando o produto final impróprio para consumo (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Trata-se de uma doença cosmopolita, com incidência em todas as regiões onde o feijoeiro é cultivado, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da África Central e América Latina, devido as condições climáticas serem favoráveis ao desenvolvimento da doença (MIKLAS *et al.*, 2006).

No Brasil, há alta incidência da doença nos estados que são os maiores produtores da cultura, sendo mais frequente em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Na primeira safra é quando se dá a maior incidência, devido ao favorecimento da temperatura entre 15 e 25 °C, combinado com a alta umidade relativa do ar (acima de 91%) e precipitação frequente (CARBONELL *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2001).

O patógeno causal da doença tem um processo sequencial de infecção para invadir e colonizar os hospedeiros vegetais. Esse processo envolve transição de uma fase biotrófica assintomática, caracterizada por hifas primárias intracelulares espessas, para uma fase destrutiva necrotrófica, caracterizada por hifas secundárias finas e filamentosas, cerca de 120 horas após a infecção. O processo de infecção se dá quando ocorre a germinação dos conídios, de seis a nove horas após o contato com o patógeno. Esse processo baseia-se na

diferenciação da extremidade livre do conídio, originando um apressório, o qual se prende à superfície vegetal, atuando na penetração através da cutícula e epiderme (O'CONNELL *et al.*, 1985). Com a ramificação das hifas extra e intracelularmente no tecido hospedeiro, as células do vegetal se rompem e os sintomas visíveis da doença começam a aparecer (PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001).

Os sintomas são de fácil reconhecimento, e de acordo com a intensidade da doença podem se manifestar em toda a parte aérea da planta, a partir do sétimo dia da infecção, como lesões necróticas de coloração marrom escura nas nervuras da parte abaxial das folhas. Em infestações mais severas, as lesões estendem-se ao limbo foliar, resultando em necrose de parte do tecido vegetal. As lesões que ocorrem no caule e nos pecíolos são escuras, alongadas e achatadas, com apresentação de cancrios ou não. Nas vagens, as lesões são circulares de cor marrom, com bordas escuras e altas, envoltas por um anel pardo avermelhado. Sob condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, pode ser observada uma massa rósea de esporos no centro das lesões. Sementes infectadas apresentam lesões deprimidas e escuras que são facilmente visualizadas em sementes de tegumentos claros (BARBOSA; GONZAGA, 2012; CARBONELL *et al.*, 2012; PADDER *et al.*, 2017).

A propagação do patógeno é feita a longas distâncias por sementes contaminadas, e a curtas distâncias por disseminação de esporos, através de respingos de chuva, ação humana, insetos ou implementos agrícolas que entram em contato com as plantas infectadas (BARBOSA; GONZAGA, 2012). O fungo pode sobreviver entre safras devido ao micélio dormente, localizado no interior do tegumento de sementes ou em restos culturais (SARTORATO; RAVA, 1994). O produtor brasileiro tem o costume de guardar sementes colhidas para a próxima safra, aumentando o risco de contaminação entressafras. O uso de plantio direto que é frequentemente utilizado no Brasil, quando não se utiliza rotação de culturas, favorecem o desenvolvimento de doenças de solo, como a antracnose (LIMA *et al.*, 2010; SARTORATO, 2006).

O uso de sementes de alta qualidade ajuda no controle da doença, pois, quanto mais tardio o seu aparecimento, menor será a perda no rendimento da cultura. Práticas culturais, como eliminação de restos de cultura e rotação de culturas com plantas não hospedeiras, são medidas recomendadas para a redução da doença na entressafra (CARBONELL *et al.*, 2012; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; REIS; CASA; BIANCHIN, 2011). O uso de defensivos químicos no controle preventivo da doença é uma prática bem consolidada e eficiente, entretanto, aumentam os custos da produção e podem causar danos ambientais

(LIMA *et al.*, 2010; SARTORATO, 2006). Aliado às práticas mencionadas anteriormente, o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes, consiste em um método econômico e seguro, e, por isso, tem sido uma das estratégias mais eficientes no controle da antracnose. Porém, sua obtenção é dificultada pela capacidade de variação patogênica do agente causal (RAVA *et al.*, 2003; MIKLAS *et al.*, 2006; SINGH; SCHWARTZ, 2010).

2.3 Variabilidade do fungo *C. lindemuthianum*

Apesar do uso de cultivares resistentes ser considerado uma estratégia eficiente no controle da doença, o fungo apresenta grande variabilidade patogênica, caracterizada pelo elevado número de raças fisiológicas identificadas em todo o mundo, o que dificulta a obtenção de cultivares com resistência durável (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; PADDER *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2012). Barrus (1915) foi o primeiro a relatar a existência dessa variabilidade, observou diferentes reações das mesmas cultivares de feijão quando inoculadas com dois isolados diferentes de *C. lindemuthianum*, e os denominou como Alfa e Beta. A partir de então, em todo o mundo, começou-se a identificar raças patogênicas. No Brasil, o primeiro estudo para identificação de raças foi realizado por Kimati (1966). Neste estudo, foram coletados isolados identificados no estado de São Paulo, identificando duas raças desse patógeno, sendo que o autor verificou que elas pertenciam ao grupo Alfa, Delta e Mexicano II.

Nas primeiras identificações, cada pesquisador utilizava um conjunto local de linhagens para a diferenciação das raças. E quanto à nomenclatura das raças identificadas, cada pesquisador utilizava um código específico local (CARBONELL *et al.*, 1999). Para facilitar a troca de informações entre países e permitir a comparação dos resultados, foi realizada a Primeira Reunião Latino Americana da Antracnose do Feijoeiro, no CIAT (Cali, Colômbia), onde foi proposta por Pastor-Corrales (1991) uma padronização para a classificação de raças do patógeno, adotada desde então. Para essa classificação, os isolados são inoculados em um conjunto internacional de cultivares diferenciadoras, o qual engloba cultivares de origem andina (Michigan Dark Red Kidney, Perry Marrow, Widusa e Kaboon) e cultivares de origem mesoamericana (Michelite, Cornell 49-242, México 222, PI 207.262, TO, TU, AB 136 e G2333). Habgood (1970) propôs um sistema de denominação de raças no qual é atribuído um somatório dos valores binários de todas as cultivares para os quais o isolado é virulento. Por exemplo, a raça 65 é virulenta as cultivares Michelite (2⁰) e

México 222 (2^6), então pelo somatório, chega-se a sua nomenclatura, $2^0 + 2^6 = 65$.

Em todo o mundo são identificadas 182 raças, a partir da inoculação de 1590 isolados de *C. lindemuthianum* nas cultivares diferenciadoras (PADDER *et al.*, 2017). No Brasil, foram identificadas aproximadamente 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 e 2047 (SOMAVILLA; PRESTES, 1999; THOMAZELLA, 2002; SILVA *et al.*, 2011; GONCALVES-VIDIGAL *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2016, PADDER *et al.*, 2017). Assim, o monitoramento das raças patogênicas predominantes no ambiente onde o cultivo do feijão é prevalente, necessita ser constante, bem como a avaliação do germoplasma do feijoeiro inoculado com raças de *C. lindemuthianum* (BARCELOS *et al.*, 2013; SALA; ITO; CARBONELL, 2006).

Balardin, Jarosz e Kelly (1997) relataram que algumas raças ocorrem com frequência em determinadas regiões geográficas, a exemplo a 65 e 73, enquanto que outras são encontradas apenas em regiões mais específicas. Em estudos de levantamento de raças nas regiões onde o cultivo do feijoeiro é prevalente, têm-se com mais frequência as raças 65, 73, 81 e 89 (FERREIRA *et al.*, 2008; ISHIKAWA *et al.*, 2005; MAHUKU; RIASCOS, 2004; PINTO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2016; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Dentre elas, a raça 65 é a mais estável, com ampla distribuição nas regiões de cultivo.

Ainda que o sistema de classificação tenha facilitado a troca de informações entre diferentes pesquisadores, permitindo maior conhecimento e entendimento sobre a dinâmica da população de *C. lindemuthianum*, não forneceu informações sobre a variabilidade patogênica dentro de uma raça. Acontece que o conjunto de diferenciadoras não evidencia todos os alelos de resistência à antracnose presentes no hospedeiro, dificultando a identificação real da variabilidade entre isolados (DAVIDE; SOUZA, 2009; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al.*, 2005). Utilizando 200 isolados obtidos de diversos países, Mahuku e Riascos (2004), verificaram que todas as cultivares tiveram sua resistência quebradas por isolados de *C. lindemuthianum*.

A grande variabilidade patogênica encontrada no fungo *C. lindemuthianum* se deve a mecanismos que ampliam a variabilidade, como recombinação sexual, parassexualidade, formação de anastomose, dentre outros. No caso da antracnose, além da recombinação sexual por meiose, ocorre a formação de tubos de anastomose entre conídios (CATs) (ISHIKAWA *et al.*, 2012) e também anastomose de hifas e formação do heterocário, levando a ocorrência do

ciclo parassexual (CASTRO-PRADO *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2013) e, por consequência, ao polimorfismo cromossômico, descrito em linhagens de *C. lindemuthianum* (GONÇALVES, 2016; O`SULIVAN *et al.*, 1996).

Como visto, além da variabilidade entre raças diferentes, existe também variabilidade dentro, e isso se aplica às principais raças do patógeno, como 65, 71, 81 e 83 (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; ISHIKAWA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008), evidenciando a importância da descoberta de fontes de resistência, que diferenciem melhor a variação que existe dentro dessas raças (ISHIKAWA *et al.*, 2012; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011).

2.4 Variabilidade dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*

Como visto anteriormente, além da variabilidade patogênica existente entre raças fisiológicas, estudos demonstraram também a existência de variabilidade patogênica dentro de uma mesma raça, entre diferentes isolados (PADDER *et al.*, 2017). A raça 65 exemplifica bem essa situação, pois apresenta grande variabilidade de virulência entre seus isolados e por apresentar ampla distribuição, atualmente presente em 12 estados brasileiros (DAVIDE; SOUZA, 2009; COELHO *et al.*, 2016), se torna importante, sendo bastante utilizada como fonte de estudo por programas de melhoramento. Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006) e Alzate-Marin *et al.* (2007) identificaram o comportamento distinto da cultivar BAT 93 perante dois isolados da raça 65, resistente a um e suscetível a outro, mostrando que não é possível identificar diferenças dentro de raças utilizando o conjunto de diferenciador proposto por Pastor-Corrales (1991). Ishikawa, Ramalho e Souza (2011) propuseram então, um novo conjunto de cultivares diferenciadoras para solucionar o problema, permitindo a discriminação da variabilidade existente dentro da raça 65 (TABELA 1). Este pode ser utilizado em conjunto com as diferenciadoras internacionais propostas por Pastor-Corrales (1991).

Tabela 1 - Cultivares e sistema binário, pertencentes ao conjunto de cultivares diferenciadoras para detectar variabilidade existente dentro da raça 65 de *C. Lindemuthianum*, proposto por Ishikawa, Ramalho e Souza (2011).

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: Adaptado de Ishikawa, Ramalho e Souza (2011).

Este sistema de classificação é semelhante ao sistema de classificação para raças, utilizando a soma numérica de cada cultivar suscetível, e a denominação é realizada complementando a nomenclatura da raça. Como exemplo, o isolado LV 117, foi classificado como raça 65.9, pois causou reação de suscetibilidade nas cultivares Estilo e União (2⁰ e 2³= 9).

2.5 Controle genético da antracnose

Os alelos de resistência já identificados em diferentes cultivares, apresentam especificidade a diferentes raças. Isso porque o patógeno segue um modelo de herança qualitativa em que fenótipos de resistência e suscetibilidade são evidentemente diferenciados (CAMPA *et al.*, 2014; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Tal situação é classificada como resistência vertical, e, caracteristicamente, seu controle genético é dado por poucos genes de efeitos maiores (ROBINSON, 1971; VANDERPLANK, 1963) e de acordo com Flor (1956) compõe a teoria de gene a gene, onde um alelo de resistência no hospedeiro corresponde a um alelo de virulência no patógeno.

Através de análises genéticas clássicas, Bulkholder (1918) foi o primeiro a estudar a herança de resistência no feijoeiro contra *C. lindemuthianum*. Baseou-se na interpretação de resultados obtidos de uma população F2 advinda do cruzamento das cultivares White Marrow (resistente à raça Alpha) e Wells' Red Kidney (susceptível à raça Alpha). Observou nessa geração, 362 plantas resistentes e 111 plantas suscetíveis, preconizando um alelo com um gene dominante condicionando resistência a esta raça, mais tarde denominado como *Co-1*. O

controle genético para antracnose é amplamente estudado, propiciando a descoberta de vários alelos de resistência, advindos de diferentes genes (COSTA *et al.*, 2017; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; LACANALLO; GONÇALVES-VIDIGAL, 2015; SOUSA *et al.*, 2015).

Kelly e Young (1996), propuseram um sistema de identificação de alelos de resistência às raças de *C. lindemuthianum*, a partir da denominação *Co*, seguido do número ou letra para a denominação dos alelos. Atualmente, 23 alelos *Co*'s já foram identificados, provindos de genes diferentes (TABELA 2). Nos programas de melhoramento, visando a resistência à antracnose, o uso do alelo *Co-4*² é recorrente, por certificar resistência a todas as raças brasileiras identificadas. Nos locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*, tem sido identificada a presença de alelismo múltiplo (TABELA 1). Já foram identificados também vários marcadores ligados a esses alelos de resistência a antracnose, possibilitando a seleção assistida por marcadores (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; GONÇALVES-VIDIGAL, *et al.*, 2015; GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2011; KELLY; VALLEJO, 2004; MEZIADI *et al.*, 2016).

A maioria dos grupos *Cos* associados à resistência, apresenta genes (NLR- *NOD-like receptor*) que codificam proteínas de ligação nucleotídicas com repetições ricas em leucina, conhecidas como NB-LRR (MEYERS *et al.*, 2005). A presença destes grupos é difundida entre as plantas superiores, e os grupos de genes NLR também foram descritos no genoma do feijoeiro (SCHMUTZ *et al.*, 2014). Em particular, dois grandes grupos identificados nos cromossomos 4 e 11 poderiam co-localizar os genes de resistência à antracnose *Co-3* e *Co-2* previamente mapeados, respectivamente.

Tabela 2 - Alelos e genes de resistência a *C. lindemuthianum*, cultivar em que o alelo foi identificado e seu respectivo cromossomo. (continua)

Loco/Gene	Cultivar	Cromossomo	Referência
<i>Co-1</i>	MDRK	Pv01	(MCROSTIE, 1919)
<i>Co-1</i> ²	Kaboon	Pv01	(MELOTTO; KELLY, 2000)
<i>Co-1</i> ³	Perry Marrow	Pv01	(MELOTTO; KELLY, 2000)
<i>Co-1</i> ⁴	Widusa	Pv01	(GONÇALVES-VIDIGAL <i>et al.</i> , 2011)
<i>Co-1</i> ⁵	Widusa	Pv01	(GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006)
<i>Co-1</i> ^{65-X}	Xana	Pv01	(MURUBE <i>et al.</i> , 2019)
<i>Co-1</i> ⁷³	MDRK	Pv01	(BEAVER <i>et al.</i> , 2003)
<i>CoPa</i>	Paloma	Pv01	(ZUIDERVIN <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 2 - Alelos e genes de resistência a *C. lindemuthianum*, cultivar em que o alelo foi identificado e seu respectivo cromossomo. (continua)

Loco/Gene	Cultivar	Cromossomo	Referência
<i>Co-1^{HY}</i>	Hongyundou	Pv01	(CHEN <i>et al.</i> , 2011)
<i>CoPv01^{CDRK}</i>	CDRK	Pv01	(GONÇALVES-VIDIGAL <i>et al.</i> , 2020)
<i>Co-2</i>	Cornel 49-242	Pv11	(MASTENBROEK, 1960)
<i>Co-3</i>	México 222	Pv04	(BANNEROT, 1965)
<i>Co-3²</i>	México 226	Pv04	(FOUILLOUX, 1976, 1979)
<i>Co-3³ (Co-9)</i>	BAT 93	Pv04	(GEFFROY <i>et al.</i> 2008)
<i>Co-3⁴ Co-10</i>	Ouro Negro	Pv04	(VALENTINI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Co-3^{38-B}</i>	BAT 93	Pv04	(MURUBE <i>et al.</i> , 2019)
<i>Co-3^{3-X}</i>	Xana	Pv04	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Co-3^{7-X}</i>	Xana	Pv04	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Co-3^{19-X}</i>	Xana	Pv04	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Co-3^{449-X}</i>	Xana	Pv04	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Co-3^{453-X}</i>	Xana	Pv04	(CAMPA <i>et al.</i> 2014)
<i>Co-4</i>	TO	Pv08	(FOUILLOUX, 1976, 1979)
<i>Co-4²</i>	G2333	Pv08	(YOUNG <i>et al.</i> , 1998)
<i>Co-4³</i>	PI 207.262	Pv08	(ALZATE-MARIN <i>et al.</i> , 2007)
<i>Co-5</i>	TU	Pv07	(ALZATE-MARIN <i>et al.</i> , 2007)
<i>Co-5²</i>	G2333	Pv07	(VALLEJO; KELLY, 2009)
<i>Co-6</i>	AB 136	Pv07	(KELLY, J.D.; YOUNG, 1996)
<i>co-8</i>	AB 136	-	(ALZATE-MARIN <i>et al.</i> , 1997)
<i>Co-11</i>	Michelite	-	(GONÇALVES-VIDIGAL <i>et al.</i> , 2007)
<i>Co-12</i>	Jalo Vermelho	-	(GONÇALVES-VIDIGAL <i>et al.</i> , 2008)
<i>Co-13</i>	Jalo Listras Pretas	Pv03	(LACANALLO; GONÇALVES-VIDIGAL, 2015)
<i>Co-14</i>	Pitanga	-	(GONÇALVES-VIDIGAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>Co-15</i>	Corinthiano	Pv04	(SOUSA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Co-16</i>	Crioulo 159	Pv04	(COIMBRA-GONÇALVES <i>et al.</i> , 2016)
<i>Co-17</i>	Paloma	Pv01	(CASTRO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Co-u</i>	BAT 93	Pv02	(GEFFROY <i>et al.</i> , 2008)
<i>Co-v</i>	BAT 93	Pv07	GEFFROY, 1997)
<i>Co-x</i>	Jalo EEP 558	Pv01	(RICHARD <i>et al.</i> , 2014)
<i>Co-w</i>	Jalo EEP 558	Pv01	(GEFFROY <i>et al.</i> , 2008)
<i>Co-y</i>	Jalo EEP 558	Pv04	(GEFFROY <i>et al.</i> , 1999)
<i>Co-z</i>	Jalo EEP 558	Pv04	(GEFFROY <i>et al.</i> , 1999)

Tabela 2 - Alelos e genes de resistência a *C. lindemuthianum*, cultivar em que o alelo foi identificado e seu respectivo cromossomo. (conclusão)

Loco/Gene	Cultivar	Cromossomo	Referência
<i>CoPv02c</i>	Xana	Pv02	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)
<i>CoPv09c</i>	Cornell 49242	Pv09	(CAMPA <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: Adaptado de Costa et al. (2019).

Costa *et al.* 2017 demonstraram o controle genético da resistência de algumas linhagens de feijão mediante interação com 6 isolados diferentes da raça 65. Os autores verificaram diferentes padrões de reação para cada isolado da raça 65, e a segregação obtida foi de 15R:1S, na geração F2 de diversos cruzamentos, evidenciando que os alelos dominantes são provenientes de genes duplicados, podendo propiciar esta resistência específica a cada um dos isolados. Os resultados evidenciam que ocorre a especificidade da interação patógeno hospedeiro e também ocorre a nível do isolado dentro de uma determinada raça. Desta forma, grande quantidade de alelos provenientes de diferentes genes são responsáveis pela resistência à antracnose, o que dificulta a obtenção de cultivares com resistência durável.

Apesar da doença apresentar predominantemente herança de modo qualitativo, não exclui a possibilidade da existência da herança de modo quantitativo ou horizontal, controlada por muitos genes de pequeno efeito, não sendo específicos a raças do patógeno, favorecendo uma resistência mais duradoura (POLLAND *et al.*, 2008). Por apresentar distribuição de classes contínua, que varia desde a máxima e a mínima resistência, também é conhecida como resistência parcial. Estudos mostraram que dois ou mais QTLs envolvidos na resistência a um único isolado de *C. lindemuthianum* têm sido identificados (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; OBLESSUC *et al.*, 2014; PERSEGUINI *et al.*, 2016; ZUIDERVEEN *et al.*, 2016; GEFFROY *et al.*, 2000). QTLs com interações epistáticas, envolvidos na resistência do feijoeiro à *C. Lindemuthianum*, também têm sido relatados (GONZÁLEZ *et al.*, 2015), mostrando que a resistência à antracnose é um caráter controlado por interações gênicas complexas.

2.6 Mapeamento de genes de resistência à antracnose

Para melhor determinação dos genes de resistência é de grande importância saber sua localização no genoma da espécie, e sua relação com outros genes. Para determinar a posição relativa desses genes nos cromossomos e a distância entre eles, é necessário a construção de

mapas genéticos moleculares (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Para realização do mapeamento, no caso de plantas autógamas, como o feijão, precisa-se de populações F_2 , retrocruzamentos, ou, preferencialmente, Linhagens Endogâmicas Recombinantes (*Recombinant Inbreed Lines – RILs*). Nesses casos, as populações devem ser advindas do cruzamento entre linhagens contrastantes para as características de interesse. Dado que populações RILs são resultantes de várias gerações de autofecundação, isto favorece a quebra dos grupos de ligação, que, por consequência, favorecerá uma melhor qualidade de mapeamento, portanto, são mais apropriados para esse tipo de estudo. Porém, a obtenção dessa população requer vários anos para que as autofecundações sejam feitas, o que complica a utilização das mesmas (SEMAGN; BJORNSTAD; NDJIONDJOP, 2006).

Os marcadores moleculares podem ser ordenados no genoma de forma que favoreçam uma boa representação do mesmo, permitindo a identificação de genes de interesse, tanto de herança qualitativa como quantitativa (QTL – *Quantitative Trait Loci*), e sua utilização no melhoramento de plantas (SOUZA *et al.*, 2001). Dentre os marcadores disponíveis para o feijão, os microssatélites (*Simple Sequence Repeats - SSRs*) (BLAIR *et al.*, 2009, BLAIR *et al.*, 2012) e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) (GALEANO *et al.*, 2009) são amplamente utilizados na elaboração de mapas moleculares, na identificação de genes que controlam várias características, como a resistência a doenças. A forma mais numerosa de poliformismos de DNA no genoma de eucariotos são os SNPs (BROOKES, 1999). O sequenciamento de nova geração tem possibilitado o aumento do número de SNPs identificados (BLAIR *et al.*, 2013), permitindo a saturação de regiões genômicas, aumentando a qualidade do mapeamento dos genes de interesse.

No momento, já foram mapeados vários genes de resistência à antracnose em diferentes cultivares, os quais fornecem resistência raça-específica (TABELA 2), nos diferentes grupos de ligação presentes, principalmente nas extremidades dos cromossomos. Índícios moleculares mostram que esses genes de resistência, estão localizados em *clusters* (complexos blocos gênicos), cujos genes individuais conferem resistência a isolados raça/específicos (CAMPA *et al.*, 2014; CAMPA; TRABANCO; FERREIRA, 2017; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MEZIADI *et al.*, 2016; MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019; OBLESSUC; FRANCISCO; MELOTTO, 2015). Empregando o genoma de referência G19833, Richard *et al.* (2014) realizaram o mapeamento fino do alelo *Co-x* para uma região de apenas 58 Kb no cromossomo Pv01. O mapeamento também foi realizado para os alelos *Co-4* (BURT *et al.*, 2015), *Co-3⁴* (VALENTINI *et al.*, 2017) e recentemente, para

dois novos alelos mapeados no cluster *Co-3* no cromossomo Pv04 (MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019). A sequência de SNPs ligados ao feijoeiro tem possibilitado a construção de chips de genotipagem de alto rendimento, para elaboração de mapas de ligação (SONG *et al.*, 2015).

A resistência quantitativa também é relatada no patossistema *P.vulgaris* – *C. lindemuthianum*. Têm sido mapeados nos 11 cromossomos do feijoeiro, QTL's de grande e pequeno efeito, atribuindo resistência a diferentes raças de *C. lindemuthianum* (GONZÁLEZ *et al.*, 2015; OBLESSUC *et al.*, 2014; PERSEGUINI *et al.*, 2016). Além de mapeamento de QTL, também vem sendo utilizados estudos de associação genômica ampla (*Genome-Wide Association Studies* - GWAS), conhecido como mapeamento associativo ou mapeamento por desequilíbrio de ligação, empregando populações segregantes parentais, para genes de resistência a antracnose no feijoeiro (ZUIDERVEEN *et al.*, 2016). Por este método não é necessário que a população de mapeamento seja sintetizada, de modo que é utilizado um painel constituído por um grupo de diversos indivíduos, que equivalham a um germoplasma de interesse (MOGHADDAM *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2008).

A qualidade de um QTL mapeado é uma função do decaimento do desequilíbrio de ligação, que geralmente pode se estender por mais de 100kb em espécies autógamias, a exemplo do arroz e feijão (PERSEGUINI *et al.*, 2016; GARRIS *et al.*, 2005). Então, para uma alta resolução de mapeamento é necessária uma grande saturação de marcas envolvendo todo o genoma. Posterior ao sequenciamento do genoma do feijoeiro (SCHMUTZ *et al.*, 2014) e ao avanço de sistemas de genotipagem de alto rendimento (SONG *et al.*, 2015), vários estudos de mapeamento associativo têm sido realizados para várias características em feijoeiro (HOYOS-VILLEGAS; SONG; KELLY, 2017; KAMFWA; CICHY; KELLY, 2015; MOGHADDAM *et al.*, 2016; TOCK *et al.*, 2017). Persegui *et al.* (2016) empregaram essa abordagem de mapeamento para identificar QTLs associados à resistência a raça 4 de *C. lindemuthianum* e a raça 39 de *Pseudocercospora griseola*. Neste trabalho, foi empregado um grupo variado de 180 acessos de feijoeiro referentes ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cujos 24 eram de origem andina e 156 de origem mesoamericana. Com a utilização de 384 SNPs e 103 SSRs, foram encontrados 38 e 28 QTLs associados a *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, respectivamente, a maioria sendo de pequeno efeito, encontrados no genoma do feijão, mostrando um padrão de herança complexa e quantitativa para a resistência a ambas as doenças. Zuiderveen *et al.* (2016) utilizaram um painel de 230 linhagens referentes ao pool gênico andino de feijoeiro. Estas foram

genotipadas com *Illumina BARCBean6K_3 BeadChip* (SONG et al., 2015), com 5398 SNPs para identificar QTLs relacionados a resistência a diferentes raças de *C. lindemuthianum*. Foram identificados QTLs de grande efeito explicando até 31%, 36%, 37%, 28%, 33% e 36% da variação fenotípica considerando as raças 7, 39, 65, 73, 109, 3481, respectivamente, em vários cromossomos do feijoeiro.

Na comparação do mapeamento convencional de QTL com GWAS, é evidenciado que um painel de GWAS apresenta uma maior variação genética para as várias características de interesse a serem realizadas no mapeamento, além de apresentar maior qualidade. No painel é possível a exploração de um maior número de alelos quando há a utilização de marcadores multialélicos, como os SSRs. Porém, é importante reforçar que nas populações biparentais, o equilíbrio de ligação entre a marca e o QTL é remetido à ligação física, advinda do desequilíbrio gamético. Em GWAS existem outros elementos entre a marca e o QTL, e que contribuem para o desequilíbrio de ligação, dentre eles: seleção, deriva genética, migração, parentesco e estrutura populacional, causando falsas associações entre a marca e QTL. Na abordagem de modelos mistos que se considera a estrutura da população e o parentesco, podem ocorrer a atenuação de falsos-positivos (ZHANG *et al.*, 2010). Assim, GWAS e a utilização de populações biparentais no mapeamento, são os métodos mais utilizados e que podem ser complementares para uma melhor identificação de regiões ou genes alvo (LI *et al.*, 2016; NELSON *et al.*, 2018; TOCK *et al.*, 2017).

2.7 Análise de expressão gênica

A expressão gênica consiste no método a informação integrada em um gene que é traduzida em estruturas presentes em arranjos em determinados tipos celulares, RNA mensageiro ou proteínas, que são em forma de arranjos. A partir de então, a transcrição é o início da expressão gênica.

Várias tecnologias têm sido utilizadas em estudos de expressão gênica, incluindo hibridações ou abordagens embasadas em sequências. As abordagens embasadas 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. 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,

PCR quantitativa em tempo real RT-qPCR (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009) e PCR semiquantitativa (CROSS *et al.*, 1994).

Através da técnica de PCR semiquantitativa, na qual a amplificação do gene alvo é realizada concomitantemente com um gene controle também é possível validar os resultados dos estudos de expressão, sendo possível fazer a comparação entre ambos, e a partir disso avaliar a expressão do gene estudado. De acordo com Marone (2001) as análises de expressão gênica através da técnica de PCR semiquantitativa forneciam informações confiáveis para avaliar os níveis de expressão gênica. Em um estudo com a cultura de feijão-caupi, Silva *et al.* (2011) avaliando a expressão gênica, pela técnica de PCR semiquantitativa, submetida por estresse abiótico sobre nódulos, observaram indução de genes pertencentes a diferentes classificações funcionais, com os relacionados à biossíntese do ácido abscísico. Os resultados mostraram ainda expressão de genes em processos relacionados à proteção dos nódulos ao estresse abiótico.

2.8 Integração de QTLs via meta-análise

A melhoria do intervalo de confiabilidade de QTLs consegue ser alcançada sem incidir em um amplo aumento de recursos por meio do uso da integração de QTLs por meta-análise que agrupa e analisa as informações fenotípicas e genotípicas de vários estudos com QTLs coincidentes, porém, com intervalos de confiança divergentes, e removem redundâncias, possibilitando a identificação de QTLs mais seguros (SAID *et al.*, 2013). Agrupamento de QTLs via meta-análise é um método que permite definir QTLs de consenso dos diferentes estudos, validar os efeitos dos mesmos em diferentes origens genéticas e ambientais, e também para aprimorar posições destes em um mapa consenso. Esta abordagem necessita que os QTLs sejam individuais para a mesma característica advindas de diferentes locais, populações ou diferentes condições ambientais diferentes (GOFFINET; GERBER, 2000).

Esse recurso pode ser determinado em um método estatístico que se baseia em revisão quantitativa e resumida de resultados de diferentes estudos, porém relacionados (GLASS, 1976). Os principais objetivos são equiparar e associar os resultados de diferentes trabalhos, gerando alguma conclusão abrangente sobre o tema estudado. Analisando dados de diferentes estudos, essa análise pode ser eficaz em definir quantos QTLs verdadeiramente são representados por todos os QTLs identificados nos diferentes experimentos. Também é possível reduzir o intervalo de confiança, aumentando a precisão dos QTLs mapeados

(GOFFINET; GERBER, 2000).

Um dos principais problemas ao se utilizar a seleção assistida por marcadores (Marker assisted selection – MAS), nos programas de melhoramento é a identificação de QTLs estáveis, entre diferentes ambientes e genótipos, por essa razão para comparar diferentes QTLs descritos em várias populações, é preciso compreender por completo o comportamento de características complexas, assim como a resistência a antracnose, em diferentes ambientes.

É necessário notar que, os resultados da análise de meta-QTL são totalmente dependentes da qualidade e precisão do mapeamento de QTLs e de seus intervalos de confiança (GOFFINET; GERBER, 2000). Logo, se esses QTLs apresentarem informações iniciais de baixo nível, os resultados podem não ser os esperados. O agrupamento de QTLs por meta-análise pode resultar em maior precisão e poder para superar esta limitação com a inclusão de um número elevado populações e de QTLs iniciais na análise.

Para um melhor resultado de um meta-QTL estável e uma melhor correlação entre eles, é importante a validação destes para a busca de genes candidatos, que é um ponto importante para entender o funcionamento de características complexas e também colaborar para a efetividade da seleção assistida por marcadores.

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A.L. *et al.* Genetic characterization of anthracnose resistance genes Co-4 3 and Co-9 in common bean cultivar tlnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, [S.l.], v. 154, p. 1–8, 1 fev. 2007.
- AWORI, E.; KIRYOWA, M.; SOUZA, T.L.P.O.; VIEIRA, A.F.; NKALUBO, S.T. *et al.* Resistance Sources to Bean Anthracnose Disease in Uganda and Brazil. **J Agri Sci Food Res**, [S.l.], v. 9, p. 225, 2018.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.; KELLY, D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, [S.l.], v. 87, n. 12, p. 1184–1191, 1997.
- BANNEROT, H. Résultats de l' infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Annales de l'amelioration**, [S.l.], v. 15, p. 201–222, 1965.
- BARBOSA, F.R.; GONZAGA, A.C.O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.
- BARCELOS, Q.L. *et al.* Investigation of sources of resistance to anthracnose disease in *Phaseolus vulgaris* germplasm collection in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 56, p. 37–38, 2013.
- BARRUS, M.F. An anthracnose-resistant red kidney bean. **Phytopathology**, [S.l.], v. 5, 303–311, 1915.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. DOENÇAS DO FEIJOEIRO. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 333 349.
- BLAIR, M.W.M. Development of microsatellite markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on screening of non-enriched, small-insert genomic libraries. **Genome**, [S.l.], v. 52 p. 772–782, 2009.
- BLAIR, M.W.N. *et al.* New gene-derived simple sequence repeat markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mol. Ecol. Resour**, [S.l.], v. 12, p. 661–668, 2012.
- BLAIR, M.W. *et al.* A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor. Appl. Genet.**, [S.l.], v. 126, p. 535–548, 2013
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, [S.l.], v. 234: p. 177–186, 1999.
- BULKHOLDER, W.H. The production of na anthracnose resistant White Marrow bean. **Phytopathology**, [S.l.], v. 8, p. 353–359, 1918.

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**, [S.l.], v. 10, n. 10, 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**, [S.l.], v. 14, p. 12, jan. 2014.

CARBONELL, S.A.M. *et al.* Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologica Brasileira**, [S.l.], v. 24, p. 60–65, 1999.

CARBONELL, S.A.M. *et al.* **Antracnose**. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. ed. Viçosa: EPAMIG, 2012. p. 157.

CARNEIRO, J.E.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**: do Plantio a colheita. Viçosa: UFV, 2015.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Artigo de revisão Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, [S.l.], v. 61, n. 2, p. 89–100, 2002.

CASTRO, S.A. de L. *et al.* Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.

CASTRO-PRADO, M.A.A. *et al.* Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 634–642, 2007.

COELHO, R.T. *et al.* Characterization of the anthracnose e resistance gene in the mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 56, p. 43–44, 2013.

COÊLHO, M. *et al.* Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 429-438, 2016.

COIMBRA-GONÇALVES, K. *et al.* Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance Gene in Mesoamerican Common Bean Cultivar Crioulo 159. **Crop Science**, [S.l.], v. 56, n. 6, p. 2904, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento e Pecuária. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, safra 2019/2020, segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 jul. 2020.

COSTA, L.C. *et al.* Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

CORTÉS, A.J. *et al.* Molecular ecology and selection in the drought-related Asr gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genetics**, 2012.

CROSS, L.; POTTS, C.; ANSON, J.G. Sensitive and Rapid Detection and Quantification of Nucleic Acids. *In*: ROLFS, A.; WEBER-ROLFS, I.; FINCKH, U. (Eds.). **Methods in DNA Amplification**. Boston: Springer, 1994.

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**, [S.l.], v. 9, p. 23–30, 2009.

FERREIRA, J.J.; CAMPA, A.; KELLY, J.D. Organization of Genes Conferring Resistance to Anthracnose in Common Bean. *In*: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. (Org.). **Translational Genomics for Crop Breeding**. 1. ed. [S.l.], 2013. p. 151–176.

FERREIRA, J.J. *et al.* Reaction of a bean germplasm collection against five races of *Colletotrichum lindemuthianum* identified in northern Spain and implications for breeding. **Plant Disease**, [S.l.], v. 92, p. 705–708, 2008.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, [S.l.], v. 8, p. 29–54, 1956.

FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 19, p. 36–37, 1976.

FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. *In*: Proceedings of the International symposium on diseases of tropical food crops. **Louvain-la-Neuve**, Université Catholique de Louvain la Neuve, 1979. p. 221–35

GALEANO, C.H.A.C. *et al.* Single strand conformation polymorphism-based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, [S.l.], v. 10, 2009. 629 p.

GARRIS A.J. *et al.* Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, [S.l.], v. 169 p.1631–1638, 2005.

GEFFROY, V. *et al.* Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. **Mol Plant Microbe Interact.**, [S.l.], v. 13, p. 287–296, 2000.

GEFFROY, V. **Dissection génétique de la résistance à *Colletotrichum lindemuthianum*, agente de l'anthracnose, chez deux génotypes représentatifs des pools géniques de *Phaseolus vulgaris***. Thesis, Institut National Agronomique, 1997.

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 interactions**, [S.l.], v. 12, n. 9, p. 774–784, set. 1999.

GEFFROY, V. *et al.* Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and applied genetics**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 407–415, fev. 2008.

GOFFINET, B.; GERBER, S. Quantitative Trait Loci: A Meta-analysis. **Genetics**, [S.l.], v. 155, p. 463-473, 2000.

GLASS, G.V. Primary, secondary, and meta-analysis of research. **Educational Researcher**, [S.l.], v. 5, p. 3-8, 1976.

GONÇALVES, P.R.C. **Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isolados de lesões de antracnose no feijoeiro. 2016.** 96 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

GONÇALVES-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**, [S.l.], v. 127, n. 6, p. 592–596, dez. 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, James D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, [S.l.], v. 151, n. 3, p. 411–419, 29 set. 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. *et al.* Genetic analysis of anthracnose resistance in 'Pitanga' dry bean cultivar. **Plant Breeding**, [S.l.], v. 131, n. 3, p. 423–429, 12 jun. 2012.

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**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 589–593, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Inheritance of anthracnose resistance in common bean genotypes P.I. 207262 and AB 136. **Brazilian Journal of genetics**, [S.l.], p. 1–4, 2015.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. *et al.* Linkage mapping of the Phg-1 and Co-1(4) genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. **Theoretical and applied genetics**, [S.l.], v. 122, n. 5, p. 893–903, mar. 2011.

GONZÁLEZ, A.M. *et al.* Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. **Frontiers in plant science**, [S.l.], v. 6, p. 13, jan. 2015.

HABGOOD, R.M. Designation of Physiological Races of Plant Pathogens. **Nature**, [S.l.], v. 227, p. 1268– 1269, 1970.

HOYOS-VILLEGAS, V.; SONG, Q.; KELLY, J.D. Genome-wide Association Analysis for Drought Tolerance and Associated Traits in Common Bean. **The Plant Genome**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

ISHIKAWA, F.H. *et al.* Investigating variability within race 81 of *Colletotrichum lindemuthianum* strains from Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 55, p. 141–142, 2012.

ISHIKAWA, F.H. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum* exhibits different patterns of nuclear division at different stages in its vegetative life cycle. **Mycologia**, New York, v. 105, n. 4, p. 795-801, jul./aug. 2013.

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**, [S.l.], v. 93, n. 2, p. 461–464, 2011.

ISHIKAWA, F.H. *et al.* Levantamento de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, [S.l.]. **Anais...** [S.l.]. 2005. p. 501–504.

KAMFWA, K; CICHY, K. A.; KELLY, J.D. Genome-Wide Association Study of Agronomic Traits in Common Bean. **The Plant Genome**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 1–12, 2015.

KELLY, J.D.; YOUNG, R.A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 39, p. 20–24, 1996.

KELLY, J. D; VALLEJO, V.A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, [S.l.], 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.

LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Mapping of an andean gene for anthracnose resistance (Co-13) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo Listras Pretas landrace. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 9, n. 5, p. 394–400, 2015.

LI, X. *et al.* Combined Linkage and Association Mapping Reveals QTL and Candidate Genes for Plant and Ear Height in Maize. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 7, p. 1–11, 2016.

LIMA, P.R.A. *et al.* Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Cerrado Agrociências**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 54–59, 2010.

MAHUKU, G.S.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant pathology**, [S.l.], v. 110, n. 3, p. 253–263, 2004.

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; DE RITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Análise semiquantitativa de RT-PCR para avaliar os níveis de expressão de múltiplos transcritos da mesma amostra. **Biol Proced Online**, may. 2001.

MASTENBROEK, C. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 177–185, 1960.

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

- MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Curr Opin Plant Biol**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 129-34. Apr. 2005.
- MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, [S.l.], v. 73, p. 143–149, 2000.
- MEZIADI, C. *et al.* Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, [S.l.], v. 242, p. 351–357, 2016.
- MIKLAS, P.N. *et al.* Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, [S.l.], v. 147, n. 1–2, p. 105–131, jan. 2006.
- MOGHADDAM, S.M. *et al.* Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Loci Underlying Agronomic Traits in a Middle American Diversity Panel of Common Bean. **The Plant Genome**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 1–21, 2016.
- MURUBE, E.; CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. **PLoS ONE**, [S.l.], p. 1–17, 14 fev. 2019.
- NELSON, R. *et al.* Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21–33, 2018.
- OBLESSUC, P.R. *et al.* Quantitative analysis of race-specific resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Molecular Breeding**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 1313–1329, 2014.
- 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. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und angewandte Genetik**, [S.l.], v. 128, n. 6, p. 1193–1208, jun. 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**, Berlin, v. 27, p. 75-98, 1985.
- O'SULLIVAN D. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Curr Genet**, [S.l.], v. 33, p. 291–298, 1998.
- PADDER, B.A. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum*, the Causal Agent of Bean Anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 694, 1991.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2012.

- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. *In*: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BOREM, A. (Org.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 359–414.
- PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B. Genetic constitution of anthracnose-resistance in common bean lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 422–426, 2004.
- PEREIRA, R. *et al.* Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 53, p. 224–225, 2010.
- PERFECT, S.E.; GREEN, J.R.; O'CONNELL, R.J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant pathology**, [S.l.], v. 107, n. 8, p. 813–819, 2001.
- PERSEGUINI, J.M.K.C. *et al.* Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.
- PINTO, A.C.S. *et al.* Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 27, p. 392–398, 2001.
- PINTO, J.M.A. *et al.* Investigating Phenotypic Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. **Phytopathology**, [S.l.], v. 102, n. 5, p. 490–497, 2012.
- POLAND, A.J. *et al.* Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 14, p. 21–29, 2008.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 85–91, 2011.
- RIBEIRO, T. *et al.* Classification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in differential cultivars of common bean. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 179–184, 2016.
- RICHARD, M.M.S. *et al.* Fine mapping of Co-x, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.l.], v. 127, n. 7, p. 1653–1666, 2014.
- ROBINSON, R.A. Vertical Resistance. **Review of Plant Pathology**, [S.l.], v. 50, p. 233–239, 1971.
- RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C. *et al.* Anthracnose resistance spectra of breeding lines derived from the dry bean landrace Andecha. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, [S.l.], v. 48, p. 48–49, 2005.
- RUAS, J.F. Feijão. **CONAB: Perspectivas para agropecuária**, [S.l.], v. 5. p. 45–55, 2017.
- SALA, G.M.; ITO, M.F.; CARBONELL, S.A.M. Reação de genótipos de feijoeiro comum a quatro raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 32, n. 3, p. 286–287, 2006.

- SANTOS, J. *et al.* Virulência das raças 65, 73 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* (sacc. & magn.) scrib. e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris* L. **R. Bras. Agrobiologia**, [S.l.], v. 14, p. 115–124, 2008.
- SAID J.I.; LIN, Z.; ZHANG, X.; SONG, M.; ZHANG J.A comprehensive meta QTL analysis for fiber quality, yield, yield related and morphological traits, drought tolerance, and disease resistance in tetraploid cotton. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 14(1). p. 776, 2013.
- SARTORATO, A. Comunicação Científica Sensibilidade “in vitro” de Isolados De. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 211–213, 2006.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Antracnose. *In: Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: Embrapa, 1995. p.17-39.
- SCHMUTZ, J. *et al.* A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature genetics**, [S.l.], v. 46, n. 7, p. 707–713, jul. 2014.
- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å; NDJIONDJOP, M N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 5, n. 25, p. 2569–2587, 2006.
- SILVA, K.J.D.; SOUZA, E.A de; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, [S.l.], v. 155, n. 4, p. 241–247, abr. 2007.
- SILVA. H.A.P. *et al.* Expressão Gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, [S.l.], v. 47, n. 6, p. 791- 807, 2011.
- SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. **Crop Science**, [S.l.], 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**, [S.l.], v. 24, p. 416-421, 1999.
- SONG, Q. *et al.* SNP Assay Development for Linkage Map Construction, Anchoring Whole-Genome Sequence, and Other Genetic and Genomic Applications in Common Bean. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, [S.l.], v. 5, n. 11, p. 2285–2290, 2015.
- SOUSA, L.L. *et al.* Genetic Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance of Common Bean Landrace Cultivar Corinthiano. **Crop Science**, [S.l.], v. 55, n. 5, p. 1900, 2015.
- TOCK, A.J. *et al.* Genome-Wide Linkage and Association Mapping of Halo Blight Resistance in Common Bean to Race 6 of the Globally Important Bacterial Pathogen. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 8, p. 1–17, 2017.

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

VALENTINI, G. *et al.* High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.l.], v. 130, n. 8, p. 1705– 1722, 2017.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: Epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963.

VLASOVA, A. *et al.* Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biology**, [S.l.], v. 17, n. 32, p. 1–18, 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, [S.l.], v. 10, p. 57–63, 2009.

XU, Y.; CROUCH, J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Sci.**, [S.l.], v. 48, p. 391-407, 2008.

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

ZHANG, Z. *et al.* Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. **Nature Publishing Group**, [S.l.], v. 42, n. 4, p. 355–360, 2010.

ZHU, C. *et al.* Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome**, [S.l.], v. 1, p. 5– 20, 2008.

ZUIDERVEEN, G.H. *et al.* Genome-Wide Association Study of Anthracnose Resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). **PloS one**, [S.l.], v. 11, n. 6, p. 1–17, jan. 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS *

ARTIGO 1 - META-QTLS PARA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE (*COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*) NO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.).

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa muito importante para o consumo direto. Seus grãos fornecem proteínas e minerais com fácil acesso, principalmente nos países em desenvolvimento. A cultura pode ser acometida por diferentes tipos de pragas e patógenos, como o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose. Esse fungo pode levar a perdas severas na produtividade, principalmente se as condições de cultivo forem favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Tendo em vista esta situação e considerando a quantidade de informações disponíveis sobre o controle genético da doença, o estudo tem como objetivo fornecer uma meta-análise de QTLs estáveis para a antracnose e buscar genes candidatos em um menor intervalo de confiança, de forma a validar o resultado da análise e permitir o entendimento de características complexas, como a resistência à antracnose. Este trabalho constituiu-se de uma pesquisa bibliográfica de estudos recentes sobre locos contendo genes de resistência a diversas raças do patógeno. E destes, foram extraídos os dados para a realização de uma meta-análise de QTLs associados com a resistência à antracnose. Os resultados indicaram a presença de meta-QTLs nos cromossomos, Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv05, Pv07, Pv08 e Pv09, entretanto, não foram todos os meta-QTLs nestes cromossomos que apresentaram um intervalo de confiança consistente. Alguns genes de resistência se encontraram dentro do intervalo dos meta-QTLs, outros se encontraram apenas dentro de alguns QTLs. Em geral o maior número de locos associados à resistência a antracnose, está presente nos cromossomos Pv03 e Pv08 e nos telômeros enriquecidos com estes genes nos cromossomos Pv06, Pv07 e Pv11. A dificuldade de encontrar a posição física de marcadores ligados aos genes de resistência existente na literatura, impede descoberta da co-localização final dos genes. Por fim, foi possível encontrar QTLs estáveis para antracnose e alguns genes candidatos dentro do intervalo dos meta-QTLs. As informações aqui reunidas podem servir para estudos futuros sobre mapeamento de locos de resistência à antracnose, e também para a piramidação de genes de resistência. À medida que forem surgindo informações sobre mais locos de resistência, esta meta-análise poderá ser refinada.

Palavras chaves: Meta-análise; QTLs; Piramidação; *Colletotrichum lindemuthianum*; *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a very important legume for direct consumption. Its grains provide proteins and minerals with easy access, mainly in developing countries. The crop can be affected by different types of pests and pathogens, such as the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, which causes anthracnose. This fungus can lead to severe losses in productivity, especially if the cultivation conditions are favorable to the development of the pathogen. In view of this situation and considering the amount of information available on the genetic control of the disease, the study aims to provide a meta-analysis of stable QTLs

for anthracnose and search for candidate genes in a smaller confidence interval, in order to validate the result of the analysis and allow understanding of complex characteristics, such as resistance to anthracnose. This work consisted of a bibliographic research of recent studies on loci containing genes of resistance to several races of the pathogen. And from these, data were extracted to perform a meta-analysis of QTLs associated with resistance to anthracnose. The results indicated the presence of meta-QTLs on the chromosomes, Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv05, Pv07, Pv08 and Pv09, however, not all meta-QTLs on these chromosomes showed a consistent confidence interval. Some resistance genes were found within the range of meta-QTLs, others were found only within some QTLs. In general, the largest number of loci associated with resistance to anthracnose is present in chromosomes Pv03 and Pv08 and in telomeres enriched with these genes in chromosomes Pv06, Pv07 and Pv11. The difficulty of finding the physical position of markers linked to resistance genes in the literature, prevents the discovery of the final co-location of the genes. Finally, it was possible to find stable QTLs for anthracnose and some candidate genes within the range of meta-QTLs. The information gathered here can be used for future studies on mapping loci of resistance to anthracnose, and also for the pyramiding of resistance genes. As information becomes available about more loci of resistance, this meta-analysis can be refined.

Keywords: Meta-analysis; QTLs; Pyramiding; *Colletotrichum lindemuthianum*; *Phaseolus vulgaris* L.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa cujo grão constitui-se de proteínas, carboidratos e minerais, para o consumo direto em diversas partes do mundo (DE RON *et al.* 2015). A cultura pode ser acometida por diferentes tipos de pragas e patógenos causadores de graves doenças como a antracnose, doença fúngica causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Essa doença é de grande importância econômica, já que pode levar a perdas severas na produtividade, em condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (PADDER *et al.*, 2017).

O controle da doença é feito de modo integrado e preventivo. Nesse contexto, a obtenção de cultivares resistentes é considerada uma estratégia indispensável devido ao seu baixo custo e segurança (SARTORATO; RAVA, 1994). Entretanto, a alta variabilidade de virulência entre e dentro de raças de *C. lindemuthianum* é um obstáculo para a durabilidade da resistência de cultivares obtidas em programas de melhoramento genético do feijoeiro. Atualmente, são identificadas mais de 180 raças distintas ao redor do mundo (KELLY; VALLEJO, 2004; FERREIRA *et al.*, 2013; PADDER *et al.*, 2017).

A forte interação entre *P. vulgaris* e *C. lindemuthianum* torna esse patossistema um

modelo referência para estudos da resistência específica de plantas a patógenos (CAMPA; FERREIRA, 2017). Já foram identificados 23 locos *Cos* associados à resistência à antracnose no feijoeiro, e na maioria dos casos, o alelo dominante é quem confere resistência (FERREIRA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2017). Através da seleção assistida por marcadores (SAM), foi possível também identificar alguns marcadores ligados a esses alelos (MEZIADI *et al.*, 2016; KELLY; BORNOWSKI, 2018). A maioria dos alelos já identificados está disposta em vários grupos de ligação do feijoeiro, e estes estão organizados em *clusters*, ou seja, em blocos gênicos fortemente ligados, principalmente no final dos cromossomos, em regiões teloméricas ou subteloméricas (DAVID *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013; MEZIADI *et al.*, 2016; MURUBE *et al.*, 2019). Também já foram identificados locos de caráter quantitativo (QTL), conferindo resistência parcial a diferentes raças de *C. lindemuthianum* (OBLESSUC *et al.*, 2014; GONZÁLEZ *et al.*, 2015; CHOUDHARY *et al.*, 2018).

Estudos de mapeamento para genes de resistência à antracnose foram realizados por análise de ligação, em populações biparentais (FERREIRA *et al.*, 2013). Entretanto, a abordagem por associação genômica ampla (GWAS), permitiu a exploração dos eventos de recombinação de várias gerações, mediante um conjunto diversificado de indivíduos (ZHU *et al.*, 2008). Apesar da resistência à antracnose se apresentar predominantemente como um caráter qualitativo, a resistência quantitativa tem sido relada neste patossistema. Foram encontrados, recentemente, QTLs de resistência para diferentes raças de antracnose, usando esta abordagem (PERSEGUINI *et al.*, 2016; ZUIDERVEEN *et al.*, 2016), possibilitando uma maior qualidade no mapeamento de QTLs. A partir do mapeamento de QTLs, independentemente da abordagem, é possível reunir informações em uma análise integrada de estudos coincidentes, ou seja, uma meta-análise, identificando aqueles QTLs que são consenso e estáveis, provenientes de diferentes estudos, nos quais ambientes, locais e populações são diversos, diminuindo o intervalo de confiança e aumentando a precisão dos QTLs mapeados (GOFFINET; GERBER, 2000; VASCONCELLOS *et al.*, 2017).

Dessa forma, considerando a vasta disponibilidade de informações sobre o controle genético da doença, o objetivo desse estudo foi identificar QTLs estáveis para resistência do feijoeiro à antracnose, a partir de uma meta-análise, e buscar genes candidatos em um menor intervalo de confiança, de forma a validar o resultado da análise e permitir o entendimento de características complexas, como a resistência à antracnose em feijão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A base desta pesquisa constituiu-se de uma revisão bibliográfica de 8 estudos mais recentes sobre os locos gênicos encontrados em diferentes genótipos do feijoeiro, relacionados com a sua resistência às diversas raças e sub-raças do patógeno fúngico *C. lindemuthianum* (TABELA 1). Destes estudos foram extraídos dados de 70 QTLs para a realização de uma meta-análise de QTLs, associados com a resistência à antracnose. A busca realizada na literatura retornou inúmeros estudos, além dos mencionados na Tabela 1, que não puderam fazer parte do acervo bibliográfico por não apresentarem os valores de LOD e r^2 ou os dados utilizados não continham marcadores do tipo SSR e SNPs, inviabilizando sua utilização na análise dos dados. A análise foi realizada seguindo a abordagem de Goffinet e Gerber (2000), a partir do software BioMercator v4.2 (ARCADE *et al.*, 2004; SOSNOWSKI *et al.*, 2012). Foram preparados arquivos para o software de acordo com seus requisitos que englobam os seguintes dados: nome do QTL, grupo de ligação, cromossomo, valor de LOD, r^2 , pico do QTL, e a posição de início e fim do QTL.

O método utilizado do programa foi o Meta-analysis (VEYRIERAS; GOFFINET; CHARCOSSET, 2005), que possui dois passos baseados no número QTLs, que, de fato, são reais nos diferentes experimentos, através das variações do IC ou r^2 . O primeiro passo cria vários arquivos para a segunda etapa; um dos arquivos designa o melhor modelo de acordo com vários critérios. Estes arquivos contêm todas as informações dos QTLs. O segundo passo exibe o mapa do meta-QTL de acordo com o modelo Akaike escolhido. Para a análise de meta-QTL foi utilizado o mapa de ligação para a população F2 proveniente do cruzamento Stampede x Red Hawk, a partir de 7.040 marcadores SNPs com 1474 posições genéticas únicas (SONG *et al.*, 2015). As posições genéticas dos SNPs de cada arquivo foram convertidas para centimorgan (cM) no mapa de referência Stampede x Red Hawk baseado na posição física do genoma de referência. Para aqueles QTLs que não tinham uma posição de pico, esta foi calculada como a posição média diretamente entre os dois marcadores de flanco que definiram o intervalo de QTL.

Alguns dos estudos utilizados para a análise apresentaram apenas o valor de r^2 , sendo necessário fazer a inferência do valor de LOD, já que estes dois valores são correlacionados. Os QTLs dos diferentes estudos para as mesmas posições físicas com intervalos de confiança sobrepostos foram considerados estáveis e foram usados pelo software para integrar o QTL em um meta-QTL de consenso. Os intervalos de confiança não foram calculados, foram utilizados dos próprios QTLs. O modelo (de quatro gerados) com o menor valor de critério de

informação de Akaike (AIC) foi usado para prever a(s) posição(ões) mais provável(is) de meta-QTL para cada grupo de ligação. Posteriormente à análise, foi realizada uma busca de genes candidatos dentro do intervalo dos meta-QTLs encontrados no Phytozome(phytozome.org). Essa busca consistiu em baixar o genoma do feijão no Phytozome e verificar se os do arquivo GFF, possuíam o ID igual aos genes do arquivo de anotação. Posteriormente, foram utilizadas as posições físicas dos intervalos para verificar no arquivo de anotações os genes presentes no intervalo dos meta-QTLs. Na Tabela 1A (APÊNDICE) estão localizados os QTLs e suas respectivas informações. Só foram considerados meta-QTLs a partir da análise, aqueles em que haviam dois ou mais QTLs sobrepostos.

Tabela 1 - Conjunto de dados utilizados para a meta- análise, incluindo o tipo de população/RIL, número de linhas/parentais, números de marcadores, raças de *C. lindemuthianum* alvo do estudo e referência utilizada para obtenção dos dados.

Populações	Número de linhas	Nº de marcadores utilizados	Tipos de marcadores	Raças de <i>C. lindemuthianum</i>	Referência	QTLs	
Elite-germoplasma	60	*	SNP	*	Fritsche-Neto <i>et al.</i> , 2019.	2	
Jamu e Caxemira	96	91	SSR	*	Choudhary <i>et al.</i> , 2018.	4	
Feijão Andino	226	50	SNP	7,39, 65, 73, 109, 2047, 3481	Zuiderveen, 2016	14	
Germoplasma IAC	180	103	SNP e SSR	23 ,65, 73, 1545,	Perseguidi <i>et al.</i> , 2016	9	
RIL	Parentais			Nº de RILs			
UC	IAC-UNA × CAL 143	94	SCAR e SNP	380	4,38, 55, 2041	Oblessucetl <i>et al.</i> , 2014.	15
RIL F7	PMB0225 x PHA1037	*	SCAR, AFLP, SNP e SSR	187	17, 73, 448, 1545(andinas) 7, 23, 39, 55 e 102(mesoamericanas)	González, 2015.	26
RIL diferencial	Náutica x B09197	3	SCAR e SNP	94	73	Burt, 2015.	4
RIL F10	IAC-UNA × CAL 143	200	SSR	380	6, 31, 38, 39, 65, 357	Baroni, 2010.	23

*não encontrados no artigo.

Fonte: Da autora (2020).

3 RESULTADOS

Os mapas de ligação baseados em SNP gerados nas análises dos diversos estudos são mostrados na Figura 1, incluindo todos os QTLs e grupos de ligação. No total foram encontrados 24 meta-QTLs, mais especificamente nos cromossomos Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv05, Pv07, Pv08 e Pv09. Na Tabela 2 pode-se observar os meta-QTLs encontrados e suas informações dos genes candidatos de resistência à antracnose encontrados dentro de seus respectivos intervalos.

Figura 1 - Mapa dos grupos de ligação com seus respectivos meta-QTLs nomeados, nos onze cromossomos do feijão. MQ= Meta-QTL; ANT=Antracnose. (continua)

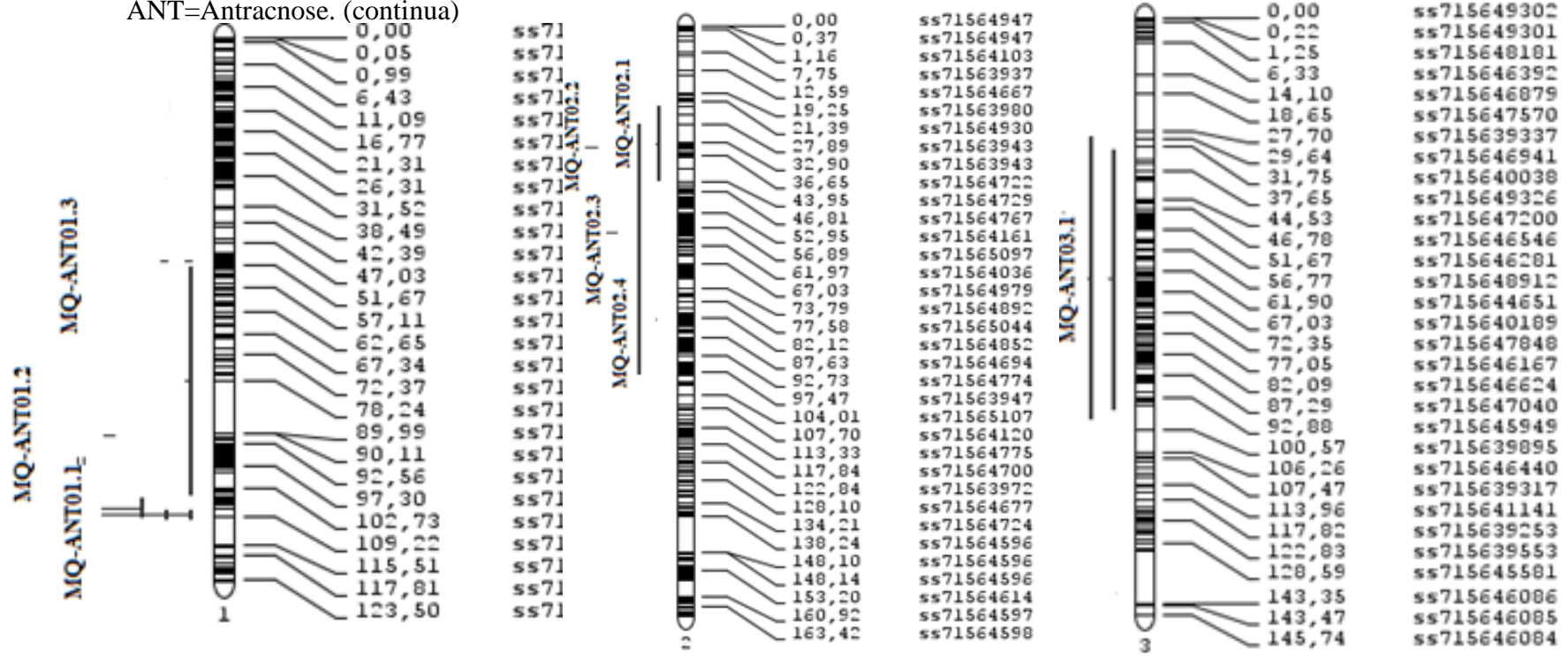


Figura 1 – Mapa dos grupos de ligação com seus respectivos meta-QTLs nomeados, nos onze cromossomos do feijão. MQ=Meta-QTL; ANT=Antracnose. (continua).

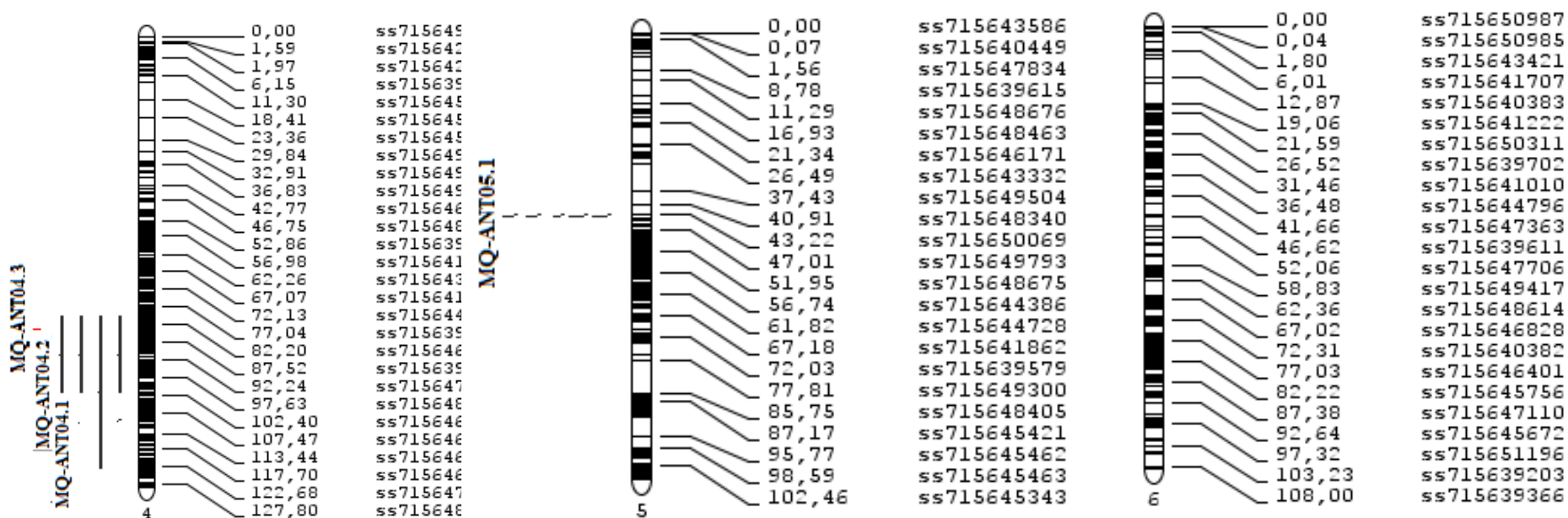


Figura 1 - Mapa dos grupos de ligação com seus respectivos meta-QTLs nomeados, nos onze cromossomos do feijão. MQ= Meta-QTL; ANT=Antracnose. (continua)

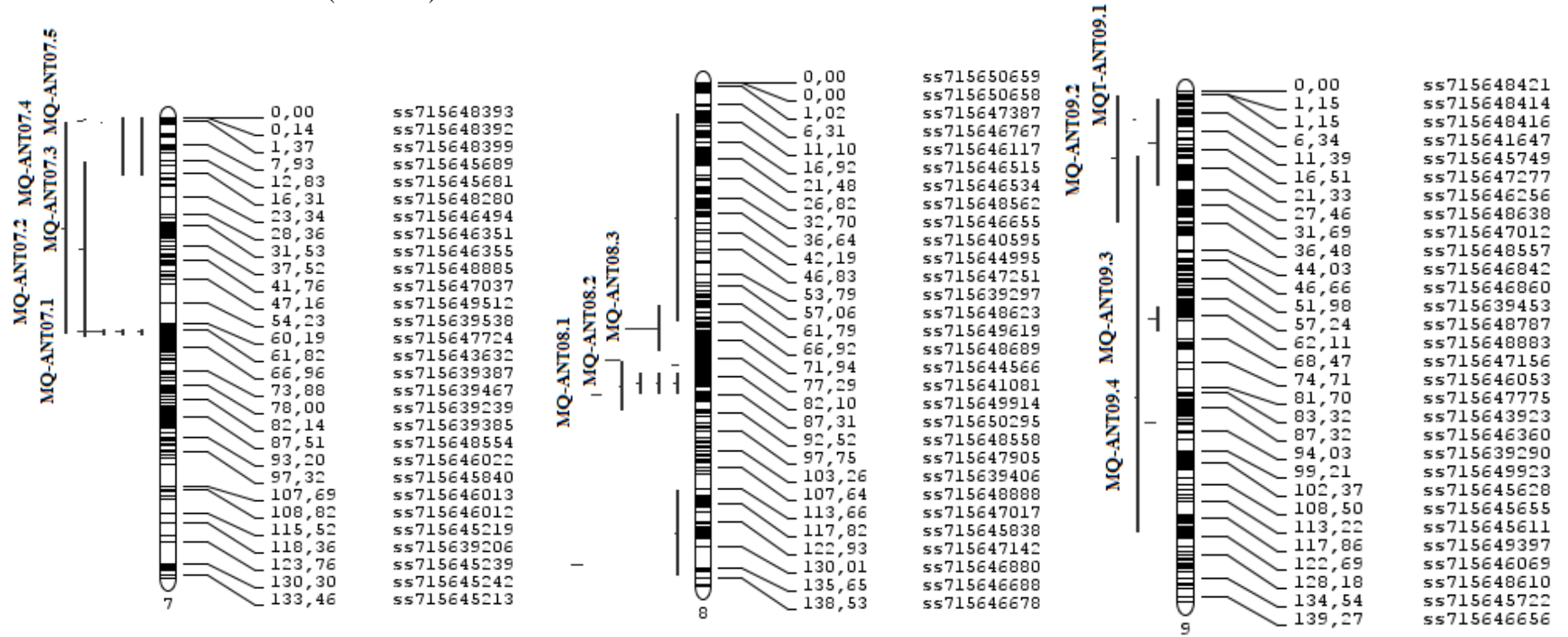
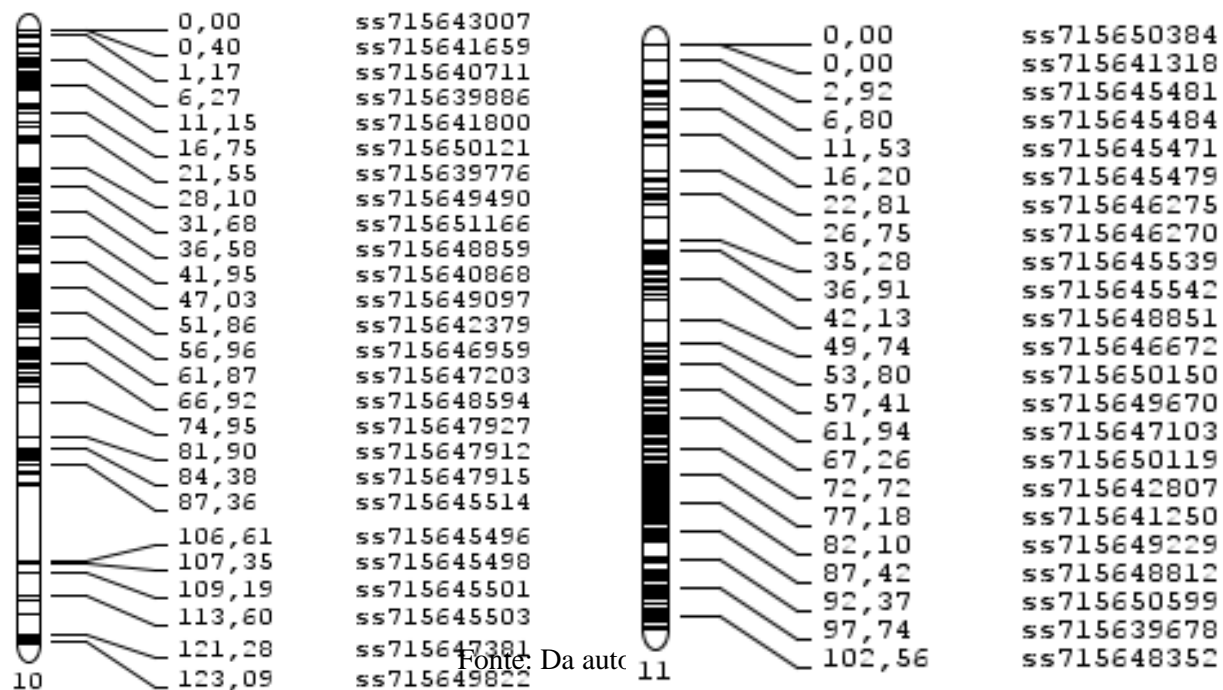


Figura 1 - Mapa dos grupos de ligação com seus respectivos meta-QTLs nomeados, nos onze cromossomos do feijão. MQ= Meta-QTL; ANT=Antracnose. (continua)



Fonte: Da autc

Tabela 2 - Meta-QTLs encontrados na análise e suas respectivas informações de r^2 , grupo de ligação pertencente, posições de início, fim, pico (em Mb), quantidade de genes encontrados dentro de cada intervalo e as raças em que esses meta-QTLs foram identificados. (continua).

Meta-QTLs	GL	R ² (%)	Início	Fim	Pico	Genes	Raças
MQ-ANT01.1	Pv01	10	50,30	50,54	50,42	1	23 e 7
MQ-ANT01.2	Pv01	26	48,07	48,08	48,07	0	4
MQ-ANT01.3	Pv01	13	30,51	41,00	37,52	403	1545
MQ-ANT02.1	Pv02	15	24,79	2484	24,81	36	4*
MQ-ANT02.2	Pv02	30	77,79	13,67	13,31	22	4
MQ-ANT02.3	Pv02	14	11,678	12,31	11,83	0	4
MQ-ANT02.4	Pv02	5	21,03	23,64	22,01	2	4*
MQ-ANT03.1	Pv03	38	29,38	30,25	29,93	35	1545
MQ-ANT04.1	Pv04	16	46,29	52,46	49,15	26	4 e 23
MQ-ANT04.2	Pv04	4	25,77	27,02	26,08	8	23 e 55
MQ-ANT04.3	Pv04	33	26,02	26,46	26,08	3	4,23 e 55
MQ-ANT05.1	Pv05	22	34,46	35,34	34,52	4	1545
MQ-ANT07.1	Pv07	16	21,28	21,69	21,66	0	4 e 38

Tabela 2 - Meta-QTLs encontrados na análise e suas respectivas informações de r^2 , grupo de ligação pertencente, posições de início, fim, pico (em Mb), quantidade de genes encontrados dentro de cada intervalo e as raças em que esses meta-QTLs foram identificados. (conclusão).

Meta-QTLs	GL	R ² (%)	Início	Fim	Pico	Genes	Raças
MQ-ANT07.2	Pv07	18	41,96	47,42	46,25	77	4 e 38
MQ-ANT07.3	Pv07	16	81,97	11,53	94,44	0	4,38 e 1545
MQ-ANT07.4	Pv07	10	14,80	22,05	19,05	11	55 e 1545
MQ-ANT07.5	Pv07	41	14,80	19,05	16,93	0	4,38,55 e 1545
MQ-ANT08.1	Pv08	18	12,88	20,71	17,83	153	4,1545
MQ-ANT08.2	Pv08	49	50,04	50,17	50,12	6	4
MQ-ANT08.3	Pv08	15	50,51	51,57	51,16	39	4 e 1545
MQANT09.1	Pv09	37	18,38	52,91	31,33	104	4,38 e 23
MQANT09.2	Pv09	13	31,33	71,55	66,10	81	38 e 23
MQANT09.3	Pv09	23	21,10	23,82	23,00	0	4,23,38 e 55
MQANT09.4	Pv09	27	29,68	29,78	29,73	0	4,23 e 38

Fonte: Da autora (2020).

3.1 Cromossomo Pv01

No cromossomo Pv01 foram mapeados 12 QTLs para resistência à antracnose, sendo eles relacionados às raças 7, 23, 73, 1545 e 2041, podendo inclusive ocorrer mais de um QTL para uma mesma raça. Na realização da meta-análise, foram encontrados três meta-QTLs (MQ-ANT01.1; MQ-ANT01.2; MQ-ANT01.3) (FIGURA1), que conferem resistência às raças 7, 23 e 1545 (TABELA 2).

Neste cromossomo foi encontrado um QTL, no qual apresenta alguns genes de resistência citados na literatura, dentre eles o loco *Co-1*, responsável por conferir resistência à raça 73 (*Co-1*⁷³), e um segundo gene, não nomeado, associado à resistência à raça 1545. Genes envolvidos com a resistência à raça 65 também estejam incluídos nessa região. Nenhum loco *Co* foi encontrado dentro do intervalo destes meta-QTLs.

Durante a busca por genes candidatos, foram encontrados no intervalo do MQ-ANT01.3 e merecem destaque, como o gene Phvul.001G115100. Este gene é responsável pela codificação de uma família de proteínas com domínio LRR, que está envolvido no reconhecimento de proteínas produzidas pelo patógeno durante um processo de infecção (BRUTUS *et al.*, 2010). Em geral, este grupo de ligação apresentou muitos genes que codificam proteínas desta família. Outro gene que merece destaque é o Phvul.001G128500 que codifica a proteína beta-1,3-glucanase 1, também presente no mesmo intervalo meta-QTL. Estas proteínas atuam degradando polissacarídeos da parede celular de patógenos invasores, principalmente de fungos (BERTOLDO; MAZARO, 2018).

O próximo gene que pode ser considerado importante é o Phvul.001G132980, ainda no intervalo do MQ-ANT01.3, é responsável pela produção da classe de proteínas TIR-NBS-LRR, que são responsáveis por resistência a doenças. Consistente com a necessidade de uma resposta rápida ao ataque de patógenos, cujos genes responsáveis pela produção dessa proteína são expressos constitutivamente em níveis baixos em tecido saudável. Entretanto, como são regulados positivamente, em resposta ao ataque de patógenos, as plantas estabelecem um estado de sensibilidade elevada (McHALE *et al.*, 2006).

3.2 Cromossomo Pv02

No cromossomo Pv02, foram mapeados 10 QTLs para resistência a antracnose, sendo eles associados às raças 4, 38 e 55. A partir da meta-análise, foram encontrados quatro meta-QTLs (MQ-ANT02.1; MQ-ANT02.2; MQ-ANT02.3 e MQ-ANT02.4) (FIGURA1). Nenhum loco *Co* foi encontrado dentro do intervalo deles. Os meta-QTLs encontrados conferem resistência à raça 4 (TABELA 2).

No intervalo do MQ-ANT02.2, foi encontrado o gene Phvul.002G021700, cuja função é a mesma citada anteriormente no cromossomo 1 para o gene Phvul.001G132980.

3.3 Cromossomo Pv03

No cromossomo Pv03 foram mapeados 5 QTLs para resistência à antracnose, especificamente para as raças 4, 55 e 1545. Na meta-análise, foi encontrado um meta-QTL (FIGURA1), o MQ-ANT03.1. Nenhum gene de resistência foi encontrado dentro desse meta-QTL. Este meta-QTL confere resistência a raça 1545 (TABELA 2).

3.4 Cromossomo Pv04

No cromossomo Pv04 foram mapeados 7 QTLs de resistência à antracnose, particularmente às raças 4, 23, 38 e 55. A partir da meta-análise, foram encontrados três meta-QTLs (MQ-ANT04.1; MQ-ANT04.2e MQANT04.3) (FIGURA 1). Estes meta-QTLs conferem resistência às raças 4, 23 e 1545 (TABELA 2). Nenhum gene de resistência foi encontrado nos referidos meta-QTLs, entretanto, pode-se observar que apresentaram mais concentrados em região mais próxima ao telómero, local propício e dinâmico para que sejam encontrados genes de resistência a algumas raças.

3.5 Cromossomo Pv05

No cromossomo Pv05, foram mapeados 8 QTLs de resistência à antracnose, conferindo resistência às raças 4, 23, 55, 2041 e 1545. A partir da meta-análise, foi encontrado um meta-QTL (FIGURA 1), MQ-ANT05.1. Este confere resistência à raça 1545

(TABELA 2). Nenhum loco *Co* foi encontrado no intervalo deste.

3.6 Cromossomo Pv06

No cromossomo Pv06 foram mapeados 4 QTLs de resistência à antracnose, associados à resistência do feijoeiro às raças 4, 55, 2041 e 1545. Na análise não foram encontrados meta-QTLs (FIGURA1).

3.7 Cromossomo Pv07

No cromossomo Pv07 foram mapeados 10 QTLs de resistência à antracnose, conferindo resistência às raças 4, 23, 38, 55 e 1545. A partir da meta-análise, foram identificados cinco meta-QTLs (MQ-ANT07.1; MQ-ANT07.2; MQANT07.3; MQ-ANT07.4 e MQ-ANT07.5) (FIGURA1). Estes meta-QTLs conferem resistência a estas raças citadas acima do mapeamento de QTL (TABELA 2). As regiões de meta-QTLs encontradas não abrigam nenhum dos genes ou locos *Cos* descritos na literatura.

Foi encontrado no intervalo do MQ-ANT07.4 o gene Phvul.007G052500, cuja proteína codificada é (RLK rica em cisteína, semelhante ao recetpor 20) uma quinase receptora rica em cisteína. A formação destas proteínas é induzida por infecção de patógenos e tratamento com espécies reativas de oxigênio ou ácido salicílico e estão envolvidos na reação de hipersensibilidade (MIYAKAWA *et al.*, 2009).

3.8 Cromossomo Pv08

No cromossomo Pv08 foram previamente mapeados 13 QTLs de resistência à antracnose, os quais encontram-se relacionados à resistência do feijoeiro às raças 4, 23, 73 e 1545 de *C. lindemuthianum*. A partir da meta-análise de QTLs, foram identificados três meta-QTLs (MQ-ANT08.1; MQ-ANT08.2e MQANT08.3) (FIGURA1). O loco/ cluster *Co-4* não foi localizado no intervalo de nenhum deles. Os meta-QTLs identificados conferem resistência às raças 4 e 1545 (TABELA 2).

Foi encontrado no intervalo do MQ-ANT08.1 o gene Phvul.008G188000, cuja proteína codificada é da superfamília da taumatina relacionada à patogênese e é responsável

pelas respostas de defesa desencadeadas devido à presença de um corpo estranho ou à ocorrência de uma lesão, que resultam em restrição de dano ao organismo atacado ou prevenção/recuperação da infecção causada pelo ataque. Também neste mesmo intervalo o gene Phvul.008G191500, merece destaque por codificar a proteína MAP kinase 20, responsável por desencadear uma cascata de transdução de sinal a partir da infecção do patógeno (NÜRNBERGER; SCHEEL, 2001).

3.9 Cromossomo Pv09

No cromossomo Pv09 foram mapeados 9 QTLs de resistência à antracnose, relacionados à resistência do feijão às raças 4, 23, 38, 55 e 2041. A partir da meta-análise, foram encontrados quatro meta-QTLs (MQ-ANT09.1; MQ-ANT09.2; MQANT09.3 e MQ-ANT09.4). Estes conferem resistência as raças 4,23, 38 e 55 (TABELA 2). No meta-QTL MQ- ANT09.1 está contido o gene *CoPv09c^{453-C}*, localizado entre os marcadores BM202 e ATA217, sendo este o primeiro, e até o momento, único gene descrito neste cromossomo.

Na busca de genes candidatos, foi encontrado no intervalo do MQ- ANT09.1 o gene Phvul.009G017700 que também codifica uma proteína da taumatina relacionada a patogênese, já relatado no GL anterior. E no intervalo do MQ-ANT09.2 foi encontrado o gene de destaque Phvul.009G025700, também responsável pela codificação de uma proteína da família MAPK, também descrita no GL anterior.

3.10 Cromossomo Pv10

No cromossomo Pv10, nenhum meta-QTL foi localizado (FIGURA 1).

3.11 Cromossomo Pv11

No cromossomo Pv11 foram mapeados dois QTLs de resistência à antracnose, ambos relacionados à resistência do feijoeiro à raça 4. A partir da meta-análise, não foi encontrado nenhuma meta-QTL (FIGURA1).

4 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, vários QTLs, foram detectados em diferentes estudos. No cromossomo 1, de acordo com o mapeamento realizado, o gene *Co-I*^{65X} foi localizado na cultivar Xana. Assim como os genes *Co-I*⁴, *Co-x*, *Co-14*, *Co-I*^{HY} e *CO-PA* (GONZÁLES *et al.*, 2015). Este está associado aos marcadores scaffold00024_916410 e PvM97, encontrados por PERSEGUINI *et al.* (2016) nos seus estudos. Estes genes também se encontram no QTL encontrado conferindo resistência à raça 73.

Murube *et al.* (2019) encontraram resultados mostrando que os genes *Co-I*⁴ e *Co-x*, estão ligados ao marcador CV542014, sendo que o mesmo, flanqueia o alelo *Co-I*⁴ na população proveniente do cruzamento AND277 × Ouro Negro (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2011). Este marcador também se apresentou ligado ao gene *Co-14* na população proveniente de Pitanga × AB136 (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2016). E também genes de resistência (*Co-I*^{65-X}, *Co-x*) mapeados na região terminal do grupo de ligação (LG) Pv01.

Estes autores ainda relatam que estudos genéticos embasados por teste de alelismo ou análise de ligação em diferentes genótipos, mostram um cenário em que diferentes genes de resistência à antracnose, foram revelados em posições genéticas semelhantes, ainda que a organização dos grupos de genes específicos para a raça da antracnose tenha sido bem estabelecida. Entretanto, Persegui *et al.* (2016) sugerem que os genes de resistência relatados em seu trabalho (*Co-I*^{65-X}, *Co-I*⁴, *Co-14*, *Co-x*, *Co-Pa*, *Co-I*^{HY}), encontrados em diferentes genótipos do feijoeiro e posicionados na extremidade distal deste cromossomo, estejam localizados em uma pequena região genômica, onde o agrupamento de genes de resistência formado é o loco *Co-I*.

Campa *et al.* (2014), também mostraram que no genótipo Kaboon, este loco é organizado em *cluster*, incluindo genes de resistência para as raças 31, 81 e 1545. Este loco é de importância exclusiva dos criadores de pirâmides gênicas, combinando genes complementares de pool gênico andino e mesoamericano (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2011).

Um gene que confere resistência a raça 1545 (KELLY; YOUNG, 1996; Campa, Giraldez e Ferreira (2009), encontrado na cultivar MDRK, está vinculado a um marcador mapeado neste mesmo LG (CAMPÁ *et al.*, 2009). Sem evidências de pertencerem à série alélica *Co-I*, existem três genes de resistência, localizados na região terminal do Pv01, a

saber. i) *Co-x*, presente na cultivar Jalo EEP558, o qual confere resistência à raça 100 de *C. lindemuthianum*, mapeado na posição distal (GEFFROY *et al.*, 1999; RICHARD *et al.*, 2014); ii) *Co-Pa*, encontrado na cultivar Paloma, e iii) *Co-14*, identificado na cultivar Pitanga (GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2012; GONÇALVES-VIDIGAL *et al.*, 2016). Este LG então contém um cluster de resistência com os genes *Co-1*, *Co-14*, *Co-x* e *Co-w*, e também um gene de resistência à ferrugem (*Ur-9*) e outro à macha angular (*Phg-1*). Zuiderveen *et al.* (2016) descobriram que a resistência às raças 65, 73 e 3481, foi significativamente associada ao SNP ss715645251, apontado que a região desempenha um papel importante para desencadear a resistência à antracnose. No mapa físico, esse SNP está localizado dentro da região em que se encontra o *Co-x*.

Na cultivar Paloma, o gene *Co-Pa* foi mapeado em um aglomerado de genes densos, associados à resistência ao *C. lindemuthianum*. Estes genes estão estritamente ligados no genoma do feijoeiro, e codificam, principalmente, proteínas NB-LRR (*Leucine Repeat*). Estão localizados no braço inferior do cromossomo Pv01, juntamente com os genes *Co-14*, *Co-x* e *Co-w*, *Co-1* e seus alelos. A resistência da cultivar Paloma às raças 23, 55, 65 e 73 é de extrema importância para programas de melhoramento no Brasil, principalmente nos locais com alta frequência dessas raças. Esta cultivar também é resistente às raças mesoamericanas altamente virulentas, 2047 e 3041.

A raça 2047 supera 11 das 12 cultivares diferenciadoras, e assim, consegue superar a resistência tanto do loco *Co-1* e quatro de seus alelos, quanto de outros locos, como *Co-2*, *Co-3*, alguns alelos dos locos *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-11*, *Co-12*, *Co-13*, bem como os quatro genes (*Co-w*, *Co-x*, *Co-y* e *Co-z*) relacionados à resistência à antracnose presentes na cultivar Jalo EEP 558. A cultivar G2333 foi a única cultivar diferenciadora resistente à raça 2047. Enquanto que, para a raça 3041, apenas as cultivares AND277 (*Co-1⁴*) e Paloma (*Co-Pa*) foram resistentes (CASTRO *et al.*, 2017). Dessa forma, fica perceptível a diversidade que esse LG apresenta em relação aos genes de resistência, podendo ter a mesma origem em nível molecular.

Gonçalves-Vidigal *et al.* (2020), demonstraram em seus estudos, que a cultivar CDRK é resistente as raças encontradas na Argentina, Brasil, Colômbia, todas as raças da América Central e também de raças presentes na África e Europa. Ainda estabeleceram que esta cultivar confere resistência as raças 73, 2047, e 3481.

Ainda neste estudo, a análise de segregação adicional em populações derivadas do

cruzamento de CDRK com duas cultivares de feijão andino, com diferentes genes de resistência cada uma, mostrou que a resistência de CDRK a antracnose é atribuída por um novo loco que é diferente dos locos de resistência *Co-1* e *Co-AC* relatados no feijão. Com base nessa informação, os autores sugerem que o símbolo para o loco de resistência à antracnose no cultivar CDRK seja denominado *CoPv01^{CDRK}*. O loco *CoPv01^{CDRK}* foi encontrado em uma região genômica flanqueada pelos marcadores ss715645251 e ss715645248 no Pv01. Neste mesmo estudo ainda relataram que a natureza dominante da resistência no cultivar CDRK sugere que esta resistência é transferível para cultivares comerciais.

Alzate-Marin *et al.* (2003) mostraram que o gene *Co-1⁴*, encontrado em populações F₂ segregantes da cultivar resistente AND277, confere resistência às raças 73 e 2047, e algumas cultivares suscetíveis, incluindo a Ouro Negro. Em estudos subsequentes, GONÇALVES-VIDIGAL *et al.* (2012) revelaram forte ligação entre esse gene (*Co1⁴*) e o *Phg-1*, na cultivar AND277. O gene *Co-1⁴* é considerado muito eficaz contra raças patogênicas da América Central e do Brasil, incluindo as mais frequentes e virulentas, a saber, 65, 73, 81 e 89. Sugeriram então, que a combinação entre o gene *Co-Pa* e os genes de resistência das cultivares mesoamericanas, reunidos em uma única cultivar, poderiam conferir resistência efetiva e durável a todas as raças do patógeno. Porém, existem mecanismos do fundo que geram variabilidade e dificultam a obtenção de uma resistência durável e efetiva nas cultivares. González *et al.* (2015) localizaram neste cromossomo, QTLs de efeito principal co-localizados em um cluster de 17 genes NL (repetições de leucina) na parte inferior do cromossomo. No LG01 observamos uma ampla variabilidade de genes de resistência, advindo de várias cultivares de origens distintas.

Na literatura, foram descritos dois principais genes de resistência nesse cromossomo, como o *Co-u* (BAT 93), na região terminal do Pv02 (Geffroy *et al.*, 2008), *CoPv02* (Cultivar Xana) (CAMPA *et al.*, 2014), e o QTL ANT2.1 (OBLESSUC *et al.*, 2014), controlando resistência às raças 38 e 55, e que de acordo com Zuiderveen *et al.* (2016), também pode estar relacionado ao gene *Co-u*. Nenhum destes genes foi encontrado dentro dos meta-QTLs, porém, como eles apresentam intervalos de confiança menores, é possível encontrar outros genes candidatos à resistência à antracnose. Neste mesmo estudo, foi obtido um SNP (ss715648451), associado à resistência a estas raças, fato considerado importante, pois, estas

raças são andinas agressivas, e, como tal, é de fundamental relevância para futuros esforços de criação de fontes de resistência a esta doença.

Foram descritos na cultivar Xana, genes de resistência às raças 3, 7, 19 e 449 no cromossomo Pv02, que possuem um modo de ação suplementar e apresentam especificidades de resistência a vários patógenos e vírus (CAMPA *et al.*, 2014). Porém, Zuiderveen *et al.* (2016) relataram que esses locais de resistência parecem ser regiões separadas deste grupo de ligação. Persegini *et al.* (2016) encontraram em seus estudos um marcador (PvM13), co-localizado com o QTL ANT02.4UC encontrado por Oblessuc *et al.* (2014) e Choudhary *et al.* (2018) descreveram um marcador (Bmd02) encontrado neste grupo de ligação próximo a um QTL de resistência à antracnose.

O cromossomo Pv03 abriga os locos *Co-13* e *Co-4* (LACANALLO *et al.*, 2015), e sendo esse último resultante de uma complexa série alélica composta por 5 cópias do gene *COK-4*, no genótipo SEL 1308 (MELOTTO *et al.*, 2004).

Foram identificados 19 genes agrupados com o *COK-4*, neste mesmo cromossomo, porém, nenhum deles com alguma similaridade com os genes de *Phaseolus vulgaris* depositados no banco de dados. Foram feitas análises de transcrição desses genes e constatou-se que são expressos em baixos níveis (MELOTTO *et al.*, 2004). Persegini *et al.* (2016) encontraram em seu estudo, marcadores (SSR-IAC167 e PvM95), neste grupo de ligação associado a resistência à antracnose e mancha angular.

Murube *et al.* (2019) relatam que o grupo de ligação Pv04 apresenta na região distal um gene não nomeado conferindo resistência as raças 6, 38 e 357 e que está fortemente ligado ao marcador SNP04_027. Em relação à raça 38, um importante gene de resistência (*Co-3^{38-B}*) foi localizado na região distal deste cromossomo na cultivar BAT 93. A resistência às raças 6 e 357 co-segregou com a resistência à raça 38, indicando que genes ligados ou o mesmo gene controlam a reação. Murube *et al.* (2019) também sugerem que para as raças 6 e 38, o mesmo gene ou genes intimamente ligados conferem resistência a ambas as raças. Os meta-QTLs se apresentaram concentrados na região mais próxima ao telômero, local propício e dinâmico para que sejam encontrados genes de resistência a algumas raças.

Zuiderveen *et al.* (2016) encontraram SNPs, ss715642306 e ss715649432, associados à resistência as raças 7 e 109, respectivamente. Os autores também afirmam que foram encontrados níveis adicionais de resistência à raça 7, condicionados à locos encontrados nos

cromossomos 10 e 11, e o alelo que confere resistência a esta raça é o *Co-3*⁴. O gene *Co-3* tem sido frequentemente relatado em estudos sobre resistência a antracnose (VALENTINI *et al.*, 2015), o que é importante para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento no germoplasma mesoamericano. Este gene está presente na região subtelomérica, e foi descrito na cultivar México 222. Mas, apesar dele se encontrar na região dos meta-QTLs, ele não está dentro de nenhum deles, e, de acordo com Murube *et al.* (2019), ele é flanqueado pelos marcadores Pv-ctt001 e SW12⁷⁰.

Foram propostos quatro alelos para o *Co-3* por Fouilloux (1979) na cultivar Mexico 227, a saber: *Co3*²; *Co3*³ (denominado anteriormente como *Co9*); *Co3*⁴ (denominado anteriormente *Co-10*) na cultivar Ouro Negro (ALZATE-MARIN *et al.*, 2003); e *Co-3*⁵, previamente identificado como *Co-7* em G2333 (SOUSA *et al.*, 2014). Os genes ligados *Co-z* e *Co-y* do genótipo Jalo EEP558 (GEFFROY *et al.*, 1999; GEFFROY *et al.*, 2008), *Co-15*, de Corinthiano (SOUSA *et al.*, 2015), e *Co-16*, relatado na cultivar Crioulo 159 (COIMBRA-GONÇALVES *et al.*, 2016), também foram mapeados neste mesmo grupo de ligação. Considerando posições físicas de marcadores utilizados por Murube *et al.* (2019), infere-se que o grupo de ligação do Pv04 contém duas regiões na região distal deste cromossomo que são as principais ao considerar resistência, sendo uma com o *cluster Co-3* e a outra região contendo o gene *Co-15*. Devido aos estudos de investigação de herança para resistência à antracnose, a raça 73 tem sido muito utilizada. Contra esta raça, há um gene de resistência na cultivar BAT 93, denominado *Co-3*^{73-B}.

O gene ou loco *Co-3*⁴ foi inicialmente ligado ao marcador SCAR SF10, no genótipo Ouro Negro, e, posteriormente, mapeado a 0 cM do marcador g2303, utilizando as raças 7 e 73 do patógeno como inóculos. Entretanto, na cultivar Ouro Vermelho, este loco se apresentou flanqueado pelos marcadores KASP152 e KASP153. O loco *Co-15*, encontrado na cultivar Corinthiano, foi vinculado ao marcador g2685, e o gene *Co-16*, originalmente reconhecido na cultivar Crioulo 159, foi associado ao marcador g2467. Na cultivar Xana, foram realizados estudos para localização de genes de resistência à antracnose, na qual foram localizados cinco genes de resistência no Pv04 (*Co-3 c*^{3-X}, *Co-3 c*^{7-X}, *Co-3 cI*^{19-X}, *Co-3 c*^{449-X} e *Co-3 c*^{453-X}), todos eles mostrando uma ação complementar (CAMPA *et al.*, 2014). Geffroy *et al.* (2008) relataram que aglomerados presentes nas cultivares BAT93 e Jalo EEP558 são complexos e compostos por genes de resistência específicos, que são estreitamente ligados. Um QTL de efeito principal contra a raça 45 também foi relatado pelo

mesmo autor. González *et al.* (2015) relataram que os QTLs de efeito principal para a raça 23 foram posicionados em um agrupamento importante de 41 genes NL neste cromossomo.

De acordo com Meziad *et al.* (2016), o *cluster* de genes de resistência presente nesse cromossomo, originou-se do cluster *Co-2* por recombinação (Pv11), entre cromossomos não homólogos em regiões subteloméricas. Na cultura do feijoeiro, estas regiões são ricas em *Knobs*, blocos heterocromáticos que abrangem repetições em tandem no satélite Khipu, que por sua vez, auxiliam na amplificação de genes de resistência através de trocas desiguais (DAVIDE; SOUZA, 2009). Murube *et al.* (2019) relataram que a região distal deste cromossomo é uma região complexa, formada por diversas cópias do gene R, levando a um problema na montagem, anotação e alinhamento de sequências, devido a repetição dos mesmos. Portanto, a identificação de duas regiões aproximadas pode ser resultado da existência de dois genes de resistência complementares, cada um contribuindo uma parte para expressão da resistência.

González *et al.* (2015), em seus estudos sobre a arquitetura genética da resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, relataram para o grupo de ligação Pv05 um QTL de efeito principal para a resistência no pecíolo, caule e folhas do hospedeiro, para a raça 1545 de *C. lindemuthianum*. Um gene de resistência foi encontrado na região de 1,2 Mb desse grupo de ligação para a raça 1545, mas ainda assim, não específico para os órgãos vegetais avaliados. Para a raça 23 também foram encontrados dois QTLs de efeitos principais, mas, ainda não existem relatos de genes de resistência neste grupo de ligação. Oblessuc, Francisco e Melotto (2015) identificaram correspondência do gene *Co-4* neste grupo de ligação, porém, não foi encontrado nenhum marcador fortemente ligado ao *Co-4* no Pv05. Persegui *et al.* (2016) encontraram dois marcadores associados a resistência à antracnose, PvM07 e scaffld00062_295319, sendo o primeiro associado a genes putativos de resistência ao zinco.

No grupo de ligação Pv06, ainda não foi encontrado nenhum loco de resistência à antracnose no Pv06, mesmo tendo associados cinco marcadores neste cromossomo (PERSEGUINI *et al.*, 2016).

Oblessuc *et al.* (2014) relataram dois principais locos no grupo de ligação Pv07 (*Co-5* e *Co-6*), conferindo resistência à raça 38. Posteriormente, também foi associado a esse cromossomo, o gene *Co-v*, assim como a formação de grupos de genes específicos de raça estreitamente ligados. Um QTL conferindo resistência à raça 4, também foi encontrado. Para

resistência à raça 1545, foram detectados dois QTLs de efeitos principais (GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Nos estudos de Melotto *et al.* (2004), está descrito que o loco *Co-4* foi mapeado no grupo de ligação Pv08 e é conhecido por ser multialélico. É considerado um loco valioso, pois, os alelos encontrados nesta região são conhecidos por controlarem 97% das raças conhecidas de *C. lindemuthianum*. Ainda neste estudo, os autores relataram que o loco *Co-4* é o único conhecido neste LG, sendo assim, o único com efeito significativo, segregando para a raça 73 na população oriunda do cruzamento Nautica x B09197. Este loco apresenta uma característica interessante, que é a presença de retroelementos agrupados. Estes são relacionados com genes de resistência e defesa, podendo estar envolvidos no surgimento de novas especificidades de resistência. Ainda neste mesmo estudo, concluíram que este loco é um complexo gênico que possui genes clássicos de resistência do tipo NBS-LRR e RLK, e genes potenciais de atividade β -glucanase, que podem desempenhar um importante papel na indução da resistência contra patógenos fúngicos invasores (BURT *et al.*, 2015). González *et al.* (2015) relataram a presença de QTL de efeito principal na região distal deste cromossomo em um cluster de 17 genes (NB- LRR), onde está localizado o loco *Co-4*.

Oblessuc *et al.* (2014) também identificaram três QTLs de resistência a antracnose neste grupo de ligação, ANT08.1, ANT08.2 e ANT08.3, respectivamente às raças 4, 38 e 55. Oblessuc, Francisco e Melotto (2015), em uma análise de ligação realizada em seus estudos, mostraram dois marcadores, PvTA25 e PvSNPCOK-4, estreitamente ligados ao *Co-4*, assim como o SAS13. Estes marcadores podem ser importantes ferramentas moleculares para o desenvolvimento de cultivares resistentes, contendo o loco *Co-4*. Estes autores ainda afirmam que os estudos fornecem fortes evidências de que o *COK-4* é capaz de estar envolvido na resposta imune basal a diferentes patógenos. Na realização de seleção assistida por marcadores (MAS) foi identificado que o marcador associado Bmd25 representa a mesma região genômica que abriga o gene da antracnose *Co-4* e o QTL para antracnose ANT08.1. O outro marcador associado BM165 no cromossomo PV08 representa a região QTL (ANT08 .2) já identificada para resistência à antracnose (CHOUDHARY *et al.*, 2018).

O gene *CoPv09c^{453-C}* localizado no meta-QTL MQ-ANT09.1 foi descrito na literatura por Campa *et al.* (2014), presente na cultivar Cornell 49242, localizado no cromossomo Pv09, conferindo resistência à raça 453 de *C. lindemuthianum*.

Os estudos de Zuiderveen *et al.* (2016) no grupo de ligação Pv10 revelaram a existência de um QTL de resistência à raça 7 de *C. lindemuthianum*, que está localizado próximo ao SNP ss715648754, porém com uma localização não bem definida. E ainda neste estudo, o gene Phvul.010G025500, cuja proteína ainda possui função desconhecida, foi mapeado na região terminal do cromossomo, no genótipo andino G19833.

O loco *Co-2* é relatado no grupo de ligação Pv11, e de acordo com Zuiderveen *et al.* (2016), consiste em fonte de resistência a raça 7 do patógeno, na cultivar G19833. Neste mesmo estudo, os autores encontraram um prévio QTL de resistência para a raça 385, em uma região distinta do *cluster Co-2*.

Perseguini *et al.* (2016) encontraram um marcador (PvM98) co-localizado com o QRL ANT11.1UC, em resistência a raça 4 de *C. lindemuthianum*, posicionado na parte distal do cromossomo. Campa *et al.* (2014) descobriram que a cultivar Cornell 49242 carregava um *cluster* complexo de genes, presente na região terminal deste cromossomo, que corresponde ao *Co-2*. Quatro genes de resistência foram mapeados nesse cluster (*Co-2*^{6-C}, *Co-2*^{38-C}, *Co-2*^{39-C} e *Co-2*^{357-C}), que estão intimamente ligados aos marcadores SQ4 e SCAreoli. E ainda a partir da análise de subpopulações, foram encontrados seis genes de resistência: *Co-2*^{3-C}, *Co-2*^{7-C}, *Co-2*^{19-C}, *Co-2*^{65-C} e *Co-2*^{449-C}, bem como *Co-2*^{453-C}, na posição deste mesmo cluster, possuindo um modo de ação complementar, mostrando que o gene original descritos em Cornell 49242 é de fato um agrupamento de genes de resistência ligados, cada um condicionando resistência a uma raça de *C. lindemuthianum* presente no genótipo A252, conferindo resistência às raças 6, 31, 38, 39 e 65.

Por fim, Zuiderveen *et al.* (2016) relatam que a falta de posição física de marcadores ligados aos genes de resistência na literatura, impede a co-localização final destes. Entretanto, novas fontes de resistência foram encontradas no feijão andino em seu estudo, possibilitando assim, o desenvolvimento de cultivares altamente resistentes e estáveis.

No geral, os marcadores ligados à resistência a antracnose encontram-se distribuídos em todos os cromossomos do feijão, mostrando o maior número de locos associados à resistência à antracnose nos cromossomos Pv03 e Pv08. Os telômeros também parecem ser enriquecidos para locos associados à doença nos cromossomos Pv06, Pv07 e Pv11 (PERSEGUINI *et al.*, 2016).

Ocorre variação entre os genes de resistência identificados entre os genótipos, e isso é devido à grande variedade entre e dentro das raças do patógeno, que são suplementadas por

diferentes mecanismos do fungo, como a heterocariose, a mutação, a recombinação sexual, a parassexualidade e os transposons. Estes fatores são responsáveis por aumentar a variabilidade patogênica do fungo, tanto entre as raças como dentro raças (DA SILVA *et al.*, 2020). Outra observação relevante é que os genes e/ou QTLs de resistência se apresentam em regiões subteloméricas dos grupos de ligação, o que pode ser explicado, pela alta taxa de recombinação dessas regiões quando comparadas com as taxas das regiões pericentroméricas (TALBERT; HENIKOFF, 2006; VITTE *et al.*, 2014).

Além disso, são conhecidos mecanismos epigenéticos que permitem o silenciamento de genes próximos a regiões heterocromáticas, como a região telomérica e a repetição de sequências através da metilação, que fará com que surjam novas recombinações, formando novos genes de resistência. Portanto, o ambiente genômico nessa região favorece a proliferação de aglomerados grandes de genes R (YI; RICHARDS, 2007). As regiões subteloméricas são vistas como locos que possuem famílias gênicas em rápida evolução, envoltas em processos adaptativos. Esta plasticidade subtelomérica tem sido relatada em vários organismos, principalmente em fungos e leveduras (MEZIADI *et al.*, 2016).

Campa *et al.* (2014) confirmaram uma grande interação planta-patógeno e a atuação de até 22 genes específicos para a resistência a 11 isolados. Ainda neste estudo, os autores afirmam que este fato pode acontecer devido ao *splicing* alternativo gerar múltiplas variantes de transcrição a partir de genes únicos. É importante também ressaltar, o uso de mapas genéticos de ligação saturados, o que facilita a localização precisa do gene de resistência e também permite a identificação de novos locos de resistência. No entanto, o uso do mapeamento é limitado, devido a interações epistáticas que ocorrem entre esses genes. González *et al.* (2015) relataram a importância dos estudos sobre os efeitos epistáticos na resistência genética à antracnose. Portanto, os efeitos de interações epistáticas e principais de genes e/ou QTLs, devem ser analisados para uma aplicação efetiva da SAM, facilitando a utilização da pirâmidação como uma estratégia de obtenção de resistência durável.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que um mapeamento preciso desses meta-QTLs utilizando marcadores desenvolvidos a partir de genes candidatos encontrados nos intervalos desses meta-QTLs, pode ser útil para o melhoramento assistido e pirâmidação de genes de

resistência à antracnose. A presença de grupamentos de genes em alguns meta-QTL indica uma resposta coordenada de muitos genes para alcançar a resistência à antracnose. É importante salientar, que esta análise de meta-QTLs pode ser refinada com dados de estudos posteriores, para assim, contribuir para a obtenção de novas cultivares resistentes a várias raças de antracnose.

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A.L. *et al.* Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, [S.l.], 2003.
- ARCADE, A.; LABOURDETTE, A.; FALQUE, M.; MANGIN, B.; CHARDON, F.; CHARCOSSET, A. *et al.* BioMercator: Integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. **Bioinformatics**, [S.l.], 2004.
- BERTOLDO, E.; MAZARO, S. M. β -1, 3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.
- BRUTUS, A.; SICILIA, F.; MACONE, A.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. **Proc Natl Acad Sci**, [S.l.], 2010.
- 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**, [S.l.], v. 10, n. 10, 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**, [S.l.], v. 14, p. 12, jan. 2014.
- CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Gene coding for an elongation factor is involved in resistance against powdery mildew in common bean. **Theor Appl Genet** **130**, [S.l.], p. 849–860, 2017.
- CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDRK and TU. **Theor Appl Genet**, [S.l.], v. 119, p. 1–11, 2009.
- CASTRO, S.A. de L. *et al.* Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHOUDHARY, N.; BAWA, V.; PALIWAL, R.; SINGH, B.; BHAT, M.A.; MIR, J.I. *et al.* Gene/QTL discovery for Anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from North-western Himalayas. **PLoS ONE**, [S.l.], 2018.
- COIMBRA-GONÇALVES, K. *et al.* Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance Gene in Mesoamerican Common Bean Cultivar Crioulo 159. **Crop Science**, [S.l.], v. 56, n. 6, p. 2904, 2016.
- DA SILVA, L.L.; MORENO, H.L.A.; CORREIA, H.L.N. *et al.* *Colletotrichum*: complexos de espécies, estilo de vida e peculiaridades de algumas fontes de variabilidade genética. **Appl Microbiol Biotechnol**, [S.l.], p. 104, 1891–1904, 2020.

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**, [S.l.], v. 9, p. 23–30, 2009.

DE RON, A.M. Common Bean. *In: Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding.* Common Bean Publisher. New York: Springe, 2015.

FERREIRA, J.J.; CAMPA, A.; KELLY, J.D. Organization of Genes Conferring Resistance to Anthracnose in Common Bean. *In: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. (Org.). Translational Genomics for Crop Breeding.* 1. ed. [S.l.], 2013. p. 151–176.

FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. *In: Proceedings of the International symposium on diseases of tropical food crops. Louvain-la- Neuve*, Universite Catholique de Louvain la Neuve, 1979. p. 221-35

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 interactions**, [S.l.], v. 12, n. 9, p. 774–784, set. 1999.

GEFFROY, V. *et al.* Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and applied genetics**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 407–415, fev. 2008.

GOFFINET, B.; GERBER, S. Quantitative Trait Loci: A Meta-analysis. **Genetics**, [S.l.], v. 155, p. 463-473, 2000.

GONÇALVES, P.R.C. **Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isolados de lesões de antracnose no feijoeiro.** 2016. 96 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. *et al.* Genetic analysis of anthracnose resistance in ‘Pitanga’ dry bean cultivar. **Plant Breeding**, [S.l.], v. 131, n. 3, p. 423–429, 12 jun. 2012.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; GILIO, T.A.S.; VALENTINI, G. VAZ-BISNETA, M.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SONG, Q. *et al.* New Andean source of resistance to anthracnose and angular leaf spot: Fine-mapping of disease-resistance genes in California Dark Red Kidney common bean cultivar. **PLoS ONE**, [S.l.], 2020.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. *et al.* Linkage mapping of the Phg-1 and Co-1(4) genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. **Theoretical and applied genetics**, [S.l.], v. 122, n. 5, p. 893–903, mar. 2011.

GONZÁLEZ, A.M. *et al.* Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. **Frontiers in plant science**, [S.l.], v. 6, p. 13, jan. 2015.

KELLY, J.D.; BORNOWSKI, N. “Marker-Assisted Breeding for Economic Traits in Common Bean” *In: Biotechnologies of Crop Improvement*. [S.l.], v. 3, 2018.

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

LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Mapping of an andean gene for anthracnose resistance (Co-13) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo Listras Pretas landrace. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 9, n. 5, p. 394–400, 2015.

McHALE, L. *et al.* “Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards.” **Genome biology** [S.l.], v. 7, n. 4, p. 2006.

MELOTTO, M.; COELHO, M.F.; PEDROSA-HARAND, A.; KELLY, J.D.; CAMARGO, L. The anthracnose resistance locus *Co-4* of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. **Theor Appl Genet.**, [S.l.], 2004.

MEZIADI, C. *et al.* Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, [S.l.], v. 242, p. 351–357, 2016.

MIYAKAWA, T.; MIYAZONO, K.; SAWANO, Y.; HATANO, K.; TANOKURA, M. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. **Proteins**, [S.l.], v. 77, p. 247-51, 2009.

MURUBE, E. *et al.* Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. **PLoS ONE**, [S.l.], p. 1–17, 14 fev. 2019.

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

OBLESSUC, P.R. *et al.* Quantitative analysis of race-specific resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Molecular Breeding**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 1313–1329, 2014.

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. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und angewandte Genetik**, [S.l.], v. 128, n. 6, p. 1193–1208, jun. 2015.

PADDER, B.A. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum*, the Causal Agent of Bean Anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017.

- PERSEGUINI, J.M.K.C. *et al.* Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.
- RICHARD, M.M.S. *et al.* Fine mapping of Co-x, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.l.], v. 127, n. 7, p. 1653–1666, 2014.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Antracnose. *In: Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: Embrapa, 1994. p.17-39.
- SONG, Q. *et al.* SNP. Assay Development for Linkage Map Construction, Anchoring Whole-Genome Sequence, and Other Genetic and Genomic Applications in Common Bean. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, [S.l.], v. 5, n. 11, p. 2285–2290, 2015.
- SOUSA, L.L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; VIDIGAL FILHO, P.S. Genetic mapping of the resistance allele Co-5 2 to *Colletotrichum lindemuthianum* in the common bean MSU 7-1 line. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 8, p. 317-323, 2014.
- SOSNOWSKI, O.; CHARCOSSET, A.; JOETS, J. Biomecator V3: An upgrade of genetic map compilation and quantitative trait loci meta-analysis algorithms. **Bioinformatics**, [S.l.], 2012.
- SOUSA, L.L. *et al.* Genetic Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance of Common Bean Landrace Cultivar Corinthiano. **Crop Science**, [S.l.], v. 55, n. 5, p. 1900, 2015.
- TALBERT, P.B.; HENIKOFF, S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. **Nat. Rev. Genet.** [S.l.], v. 7, 2006.
- VALENTINI, G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CREGAN, P.; SONG, Q.; PASTOR CORRALES, M.A. Using SNP genetic markers to elucidate the linkage of the Co-34/Phg-3 anthracnose and angular leaf spot resistance gene cluster with the Ur-14 resistance gene. **Bean Improvement Cooperative Annual Report.**, [S.l.], v. 58, p. 21-22, 2015.
- VASCONCELLOS, R.C.C.; ORAGUZIE, O.B.; SOLER, A.; ARKWAZEE, H.; MYERS, J.R.; FERREIRA, J.J. *et al.* Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. e0171685, 2017.
- VEYRIERAS, B.; GOFFINET, A.; CHARCOSSET. Meta-analysis of QTL Mapping Experiments. **BMC Bioinformatics**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 49, 2005.
- VITTE, C.; FUSTIER, M.A.; ALIX, K.; TENAILLON, M.I. The bright side of transposons in crop evolution, Briefings Funct. **Genomics**, [S.l.], v. 13, 2014.

YI, H.; RICHARDS E.J. A cluster of disease resistance genes in *Arabidopsis* is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing, [*S.l.*], v. 19, 2007.

ZHU, C. *et al.* Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome**, [*S.l.*], v. 1, p. 5– 20, 2008.

ZUIDERVEEN, G.H. *et al.* Genome-Wide Association Study of Anthracnose Resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). **PloS one**, [*S.l.*], v. 11, n. 6, p. 1–17, jan. 2016.

ARTIGO 2 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES PHVUL.004G001500 E PHVUL.011G200300 (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) DURANTE A INTERAÇÃO COM A RAÇA 65 DE *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*

RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos componentes da dieta na alimentação humana. Entretanto, fatores como algumas doenças fúngicas afetam a sua produção, dentre elas, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, que em situações favoráveis para seu desenvolvimento, pode afetar até 100% da produção. Devido a isso, este trabalho teve por objetivo validar padrões de expressão gênica via PCR semiquantitativa, de dois genes preliminarmente aprontados na literatura por Costa (2019) e Campa e Ferreira (2017) para uma possível relação com a resposta de genótipos resistentes de feijoeiro. Para a realização deste estudo foram utilizadas duas linhagens de feijoeiro (BRS Estilo e Ouro Vermelho) e duas linhagens da raça 65 do fungo *C. lindemuthianum* (Lv134 e Lv238). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação para a germinação das linhagens, após 10 dias foram inoculadas, permanecendo em câmara de nebulização por 48 horas. Novamente foram levadas para casa de vegetação para coleta do material genético, no caso, metade das folhas das linhagens, e avaliação 10 dias após a inoculação. Posteriormente, foram realizados ensaios de PCR-semiquantitativa para análise diferencial de expressão. Os resultados mostraram que não foi possível realizar a diferença de expressão desses dois genes por essa técnica, sendo necessário a utilização de técnicas mais sensíveis como a RT-qPCR.

Palavras chaves: PCR-semiquantitativa; *Phaseolus vulgaris*; Antracnose; Expressão diferencial.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the components of the diet in human food. However, factors such as some fungal diseases affect its production, among them, anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, which in situations favorable to its development, can affect up to 100% of production. Because of this, this work aimed to validate patterns of gene expression via semiquantitative PCR, of two genes preliminarily prepared in the literature by Costa (2019) and Campa and Ferreira (2017) for a possible relationship with the response of resistant bean genotypes. For the performance of this study two lineages of common bean (BRS Estilo and Ouro Vermelho) and two lineages of breed 65 of the fungus *C. lindemuthianum* (Lv134 and Lv238) were used. The experiments were carried out in a greenhouse for the germination of the strains, after 10 days they were inoculated, remaining in a nebulization chamber for 48 hours. Again, they were taken to a greenhouse to collect genetic material, in this case, half the leaves of the strains, and evaluation 10 days after inoculation. Subsequently, semi-quantitative PCR assays were performed for differential expression analysis. The results showed that it was not possible to make the difference in expression of these two genes by this technique, requiring the use of

more sensitive techniques such as RT-qPCR.

Keywords: PCR-semiquantitative; *Phaseolus vulgaris*; Anthracnose; Differential expression.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos componentes da dieta na alimentação humana. Seus grãos constituem-se de proteínas, carboidratos e minerais, e estão relacionados a estudos que associam o consumo de seus grãos à redução da diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e alguns cânceres, além da presença de minerais e proteínas de fácil acesso (SUÁREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2016; BROUGHTON *et al.*, 2003; DE RON *et al.*, 2013). Porém, a cultura vem sendo acometida por doenças fúngicas, como a antracnose causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum*, que causa danos consideráveis podendo ocasionar perdas de até 100% da produção em cultivares suscetível e na presença de condições favoráveis de umidade e clima (SINGH; SCHWARTZ, 2010).

O controle da doença deve ser preventivo, envolvendo esferas como controle químico, práticas culturais e a resistência genética, sendo esta última, a estratégia mais efetiva. Entretanto, com a variabilidade patogênica deste fungo, a resistência é facilmente quebrada (SARTORATO; RAVA, 1994; PADDER *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2013). No Brasil, a raça 65 é a que vem se destacando devido sua ampla distribuição geográfica e alta patogenicidade. Mais de 20 locos *Cos* relacionados com a resistência ao patógeno foram identificados e descritos atualmente, cujo alelo que confere resistência é em geral o dominante (DAVIDE; SOUZA, 2009, COELHO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2017). Para o patossistema antracnose–feijoeiro, envolvendo os isolados CI 1614, CI 1532, CI 1610, CI 1740, LV 134, LV 238 e LV 145 da raça 65, existem 12 genes de efeitos independentes associados ao controle genético da resistência no feijoeiro (COSTA *et al.*, 2017).

A maioria dos alelos de resistência descritos nas espécies de plantas codifica proteínas conhecidas como NBS-LRR (*Nucleotide-Binding Site- Leucine-rich repeat*) (NELSON *et al.*, 2018). Essas proteínas são responsáveis pelo reconhecimento de vários patógenos, como vírus, bactérias, fungos e nematoides. Os genes codificadores dessas proteínas estão constantemente reunidos em *clusters* (SCHMUTZ *et al.*, 2014). Dentre estes genes está o

Phvul.004G001500, que codifica um fator de alongamento e que tem sido associado à resistência do feijoeiro ao Oídeo. Este gene possui um SNP ss715649771, associado à resistência ao LV134, isolado da raça 65 de *C. lindemuthianum* (COSTA *et al.*, 2019; CAMPA; FERREIRA, 2017); e o gene Phavul.011G200300, cuja proteína hipotética é um membro de uma família de proteínas resistentes, que também está localizado próximo ao SNP ss715648093, associado à resistência ao isolado CL1532. Dois grandes *clusters* foram encontrados nos grupos de ligação Pv04 e Pv11 abrigando diversos genes para proteínas NBS-LRR que se co-localizam com alguns alelos precedentes de resistência à antracnose, mapeados nesses respectivos grupos de ligação (MEZIADI *et al.*, 2016).

Estudos de expressão gênica têm sido importantes ferramentas na identificação de genes atuantes em determinadas situações e na validação da expressão destes em diferentes patossistemas, atuando de modo complementar a estudos de genotipagem para essa finalidade. A expressão gênica consiste pelo processo em que a informação incluída num gene é traduzida em estruturas presentes em determinados tipos celulares, RNA mensageiro ou proteínas, que são em forma de arranjos. A partir de então, a transcrição é o início da expressão gênica.

Diversas tecnologias vêm sendo utilizadas em estudos de expressão gênica, dentre elas hibridações ou abordagens embasadas em sequências. As abordagens embasadas em sequências define diretamente a sequência de cDNA. Envolvem técnicas como análise em série da expressão gênica (SAGE), análise de *cap* de expressão gênica (CAGE) e RNA-Seq. As abordagens baseadas em hibridação são comumente utilizadas devido ao seu alto rendimento e custo relativamente baixo. Englobam técnicas como microarranjos, onde somente sequências conhecidas podem ser analisadas, hibridação subtrativa por supressão (SSH), Differential Display (DD), cDNA-AFLP, cDNA- RAPD, PCR quantitativa em tempo real RT-qPCR (WANG *et al.*, 2009) e PCR semiquantitativa (CROSS *et al.*, 1994).

A técnica de PCR semiquantitativa, permite a amplificação do gene alvo concomitantemente com um gene controle. Assim, é possível validar os resultados dos estudos de expressão, realizando a comparação entre ambos, e a partir disso, avaliar a expressão do gene estudado. Marone (2001) relata que as análises de expressão gênica através da técnica de PCR semiquantitativa fornecem informações confiáveis para avaliar os níveis de expressão gênica.

Diante do exposto, e, considerando a relevância da cultura do feijoeiro para a

alimentação humana, ampliar estudos transcricionais relacionado a resistência da raça 65 de *C. lindemuthianum*, pode trazer contribuições importantes para o melhoramento da cultura. Portanto, este estudo teve como finalidade validar padrões de expressão gênica via PCR semiquantitativa, de dois genes preliminarmente citados na literatura por Costa (2019) e Campa e Ferreira (2017) pela sua possível relação com a resposta de genótipos resistentes de feijoeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu em duas etapas. A primeira foi a avaliação fenotípica de duas linhagens (BRS Estilo e Ouro Vermelho) com reações de resistência contrastantes a dois isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum*, e em seguida, a análise de expressão gênica semiquantitativa de dois genes candidatos a resistência de tais cultivares aos isolados utilizados.

2.1 Material genético

Foram utilizadas para este estudo, as linhagens Ouro Vermelho e BRS Estilo. Estas linhagens foram inoculadas com dois isolados da raça 65, LV134 e LV238. De acordo com Costa *et al.* (2019) a linhagem Ouro Vermelho apresenta reação de suscetibilidade ao isolado LV134 e resistência ao isolado LV238, enquanto que para a linhagem BRS Estilo, a recíproca é verdadeira, apresentando reação de resistência ao LV134 e suscetibilidade ao LV238.

As linhagens foram semeadas em bandejas de polietileno com células individuais, preenchidas com substrato Rohrbacher®, permanecendo em casa de vegetação em condições ótimas (95% de umidade e 24 °C) para germinação e crescimento. Foram utilizadas três bandejas para o plantio, sendo que em cada bandeja ficaram acondicionadas 63 plantas de cada linhagem (BRS Estilo e Ouro Vermelho), sendo divididas em dois tempos para coleta (0 e 120 horas após a inoculação), cada tempo foi composto de 14 repetições. Duas bandejas foram inoculadas durante o ensaio, por aspersão por spray, uma com o isolado LV134 e outra com o isolado LV238. A terceira bandeja compôs o tratamento controle, sem inóculo.

2.2 Preparo da suspensão de conídios e inoculação

As linhagens dos isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum*, foram mantidas em cultura monospórica em placas com meio M3 e repicadas para vagens estéreis, colocadas em tubos de ensaio (MATHUR *et al.*, 1950), cobertas em meio ágar-água parcialmente (3,75 g de ágar para 250 ml de água). Após a repicagem para as vagens, os tubos foram mantidos por um período de incubação entre 10 a 12 dias, a 22 °C no escuro.

No preparo do inóculo foi adicionado água destilada nos tubos, seguida da raspagem dos conídios na superfície das vagens, com o auxílio de uma alça de platina. Logo após a suspensão foi filtrada por meio de uma câmara de gaze, para remoção das porções miceliais. Os conídios foram contados na câmara de Neubauer, padronizando a concentração do inóculo para $1,2 \times 10^6$ conídios/ml (RAVA *et al.*, 1993).

A suspensão de esporos foi inoculada, sendo pulverizadas ambas as faces das folhas e talos, com pulverizador, até o ponto de escorrimento (BURT *et al.*, 2015). A inoculação foi realizada 12 dias após o plantio e posteriormente foram colocadas em câmara de nebulização (UR de 100% e 25 ± 2 °C) durante 48 horas, e posteriormente, colocadas em casa de vegetação (UR de 95% e 24 °C), por aproximadamente 10 dias, para coleta e avaliação.

2.3 Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas

O material foliar foi coletado em dois tempos diferentes após a inoculação (0 hpi e 120 hpi) (FAROOQ *et al.*, 2019) (TABELA 1) de duas folhas por planta, cortando a metade de cada folha em um corte longitudinal, que, posteriormente, possibilitou a avaliação dos sintomas. Foram coletadas ao todo 28 repetições de cada tempo (0 e 120hpi), para cada isolado. As amostras foram mantidas em microtubos de 2,0 mL e colocadas imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material coletado foi armazenado em freezer, até a avaliação dos sintomas. Visto que os sintomas se confirmaram, foi extraído o RNA das amostras que mostraram sintomas compatíveis com seus tratamentos.

Para avaliação dos sintomas, cada planta foi analisada individualmente de acordo com a escala de notas descritiva de 1 a 9 (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987), 8 dias após a inoculação. As plantas resistentes receberam notas menor/igual a três, e suscetíveis aquelas com notas superiores a três. Com o objetivo de verificar se houve

diferença entre as médias de severidade dos sintomas entre as linhagens, foi realizado um teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foi realizada a extração do RNA Total de 12 (2 linhagens x 2 tempos de coleta x 3 réplicas biológicas) utilizando o reagente PureLink™ RNA Plant Extraction Kit, seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade e pureza do RNA foi analisada por meio de 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 (DNase I | Kit Sigma- Aldrich®), enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster da estrutura do DNA, eliminando qualquer tipo de contaminação por este ácido nucleico. Novamente foi realizada uma quantificação, a fim de analisar a pureza e sua quantidade. Posteriormente, o RNA foi usado para a produção da biblioteca de cDNA. A transcrição reversa que promoveu a síntese foi realizada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit, Applied Biosystems™. Por último, as amostras foram armazenadas em freezer – 20 °C até a fase seguinte.

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

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: Da autora (2020).

2.5 Análise da expressão gênica diferencial via PCR-semiquantitativa

Os genes selecionados (TABELA 2) para este estudo foram obtidos através do trabalho de Costa *et al.* (2019). Estas sequências foram submetidas ao software on-line Primer3Plus, 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 pré-estabelecidos, aferidos conforme software OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Tabela 2 - Genes candidatos a resistência aos isolados LV134 e LV 238 da raça 65 de *C. lindemuthianum* e seus respectivos *primers forward* e *reverse*.

ID	Sigla	Função	Referência	Primers q PCR
Phvul.008G011000	ACT-1	Actin	Borges et al., 2012	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG AACTCGTGCCTTCTGATGCT
Phvul.004G001500	q4gE F- G1	Proteína que codifica um fator de alongamento- resistência ao oídeo	Campa e Ferreira, 2017	TACTTGCGGAGTCGTCCTTC
Phvul.011G200300	q11G PP- G2	Proteína putativa	Costa et al., 2019	GAGTGCTACTAACAAGGTGT CTAGGTCTTCAGTGACTTGT

Fonte: Da autora (2020).

Inicialmente, foram utilizados dois pares de primers para testar a viabilidade do cDNA. Posteriormente, os seguintes passos foram elaborados para a realização da PCR semiquantitativa: o primeiro passo foi o preparo da diluição seriada do cDNA a 10 micromolar, (1:5, 1:25 e 1:625) com 5 uL de cDNA + 20 uL de H₂O para cada diluição. Em seguida foram preparados três *pools*, cada 1 de uma diluição seriada, de amostras para um ensaio de PCR, todos os *pools* continham 1µL de cada parcela experimental, no final totalizando um volume de 24 µL cada. Os *pools* só foram utilizados para o teste de ciclos.

Os ensaios de PCR foram realizados em três ciclos diferentes (25x, 30x e 35x), sendo que em todos eles a actina foi utilizada como gene de referência juntamente com a amplificação de outros dois genes de interesse descritos na Tabela 2. Para todos os ciclos seguiu-se o mesmo protocolo de PCR e cada amostra continha 1µL do *pool* de cDNA do seu respectivo diluído, 2 µL de primers (1µL Forward e 1µL Reverse), 2,4 µL do Master Mix Firepol, 6,6 µL de H₂O, totalizando um volume final de 12 µL. As reações foram acompanhadas de um controle de contaminação, ausente de material genético e realizadas de acordo com a seguinte programação: 1ª Etapa – Desnaturação inicial: 94 °C por 3 minutos (1 ciclo); 2ª Etapa – Desnaturação: 94 °C por 45 segundos; Anelamento dos primers: 58°C por 45 segundos; Extensão: 72 °C por 30 segundos (25x, 30x e 35x); 3ª Etapa – Extensão final: 72 °C por 10 minutos (1 ciclo) e 4ª Etapa – 4 °C até o infinito.

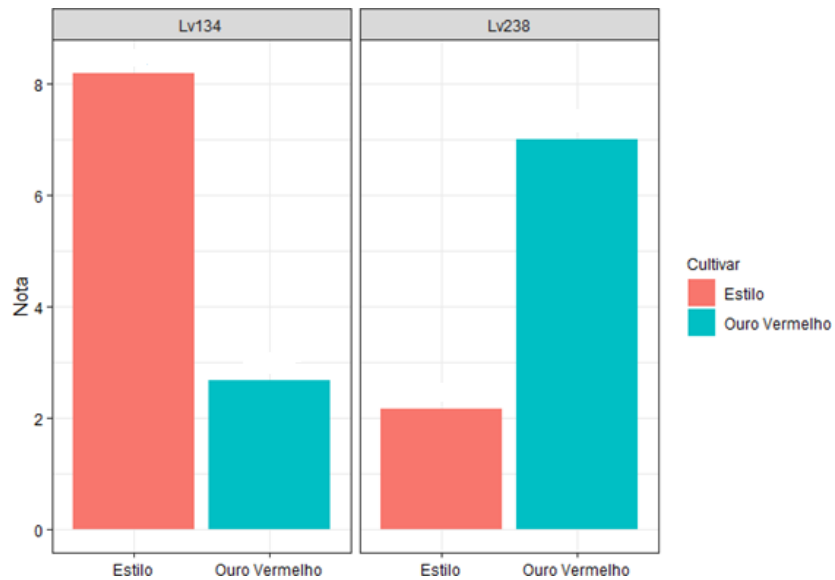
Posteriormente a esse ensaio, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,0% pelo período de 30 minutos a 80V, utilizando o mesmo protocolo de reação dos testes e a mesma programação. Após a realização da eletroforese, as imagens dos géis foram capturadas por fotodocumentador sob luz UV. Todos os parâmetros e condições experimentais utilizados foram mantidos constantes ao longo do estudo. A magnitude de expressão de cada gene foi avaliada por meio de densitometria das bandas amplificadas, a partir da utilização do software ImageJ-Fiji, desenvolvido por Rasband (2013), sendo a média da intensidade de bandas da Actina, a referência para prosseguir as análises. Posteriormente realizou-se uma ANOVA para poder avaliar os dados.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação fenotípica

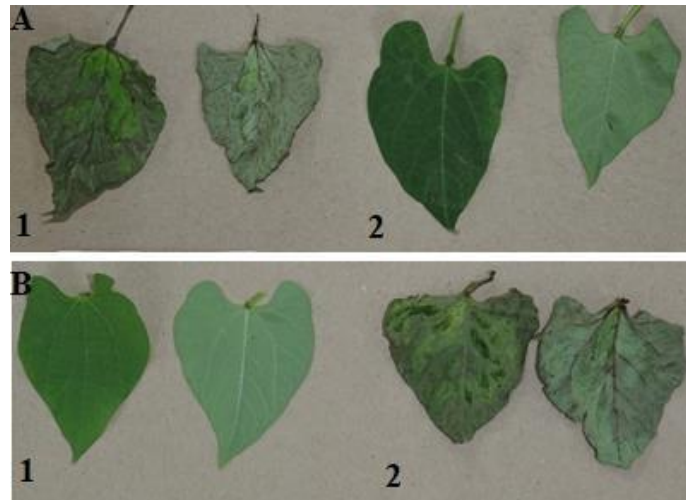
Com base na avaliação fenotípica, as linhagens BRS Estilo e Ouro Vermelho, em resposta a inoculação com os isolados LV134 e LV238 da raça 65 de *C. lindemuthianum*, se apresentaram suscetível e resistente, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey a 95% de probabilidade (FIGURA 1).

Figura 1 - Teste de Tukey entre as médias de severidade dos sintomas (nota) das linhagens BRS Estilo e Ouro Vermelho inoculadas com o isolado Lv 238 e Lv134 da raça65de*C.lindemuthianum*.



Fonte: Da autora (2020).

Figura 2 - Avaliação fenotípica das linhagens decorrente da interação com os isolados LV 134 e Lv238 da raça 65 de *C. lindemuthianum*, 10 dias após a inoculação. A- 1 linhagem BRS Estilo inoculada com isolado Lv134 e A-2 linhagem Ouro Vermelho inoculada com isolado Lv134. B-1 linhagem BRS Estilo inoculada com isolado Lv238 e B-2 linhagem Ouro Vermelho inoculada com isolado Lv238.

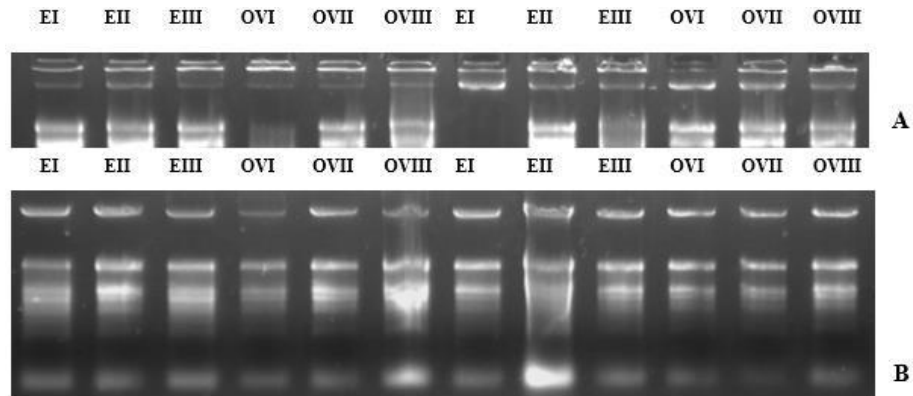


Fonte: Da autora (2020).

3.2 Qualidade e quantificação de RNA total

A quantificação do material extraído, de folhas cotiledonares com o Concert™ Plant RNA Reagent mostrou-se satisfatória, com concentrações altas, variando de 1002 a 32541 ng/ μ l 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. Finalmente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, comprovando os resultados anteriores, comprovando 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. A: inoculação com isolado Lv 238, sendo as seis primeiras amostras coletadas a 0 hpi e as outras seis 120 hpi (E= BRS Estilo; OV= Ouro Vermelho) B: inoculação com isolado Lv 134, sendo as seis primeiras amostras coletadas a 0 hpi e as outras seis 120 hpi.

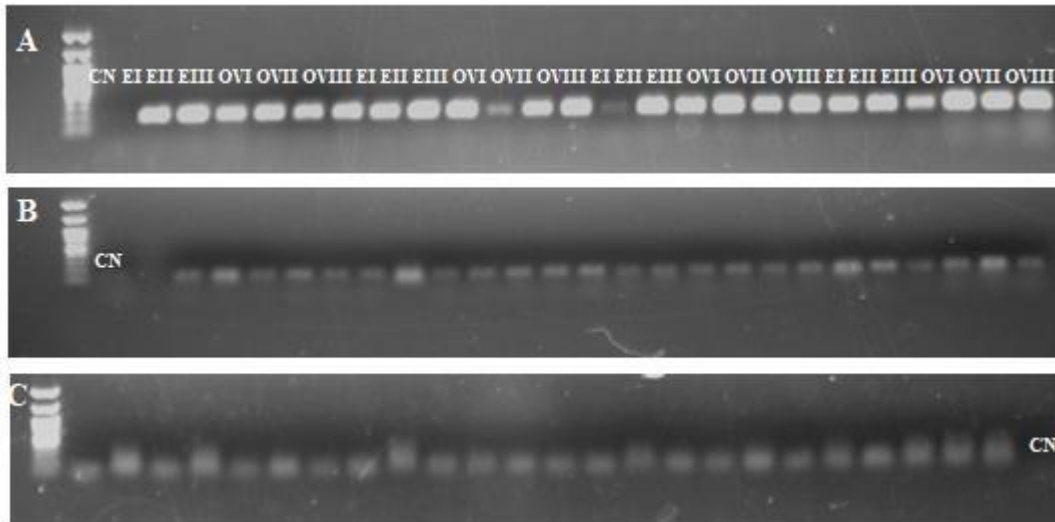


Fonte: Da autora (2020).

3.3 PCR semiquantitativa

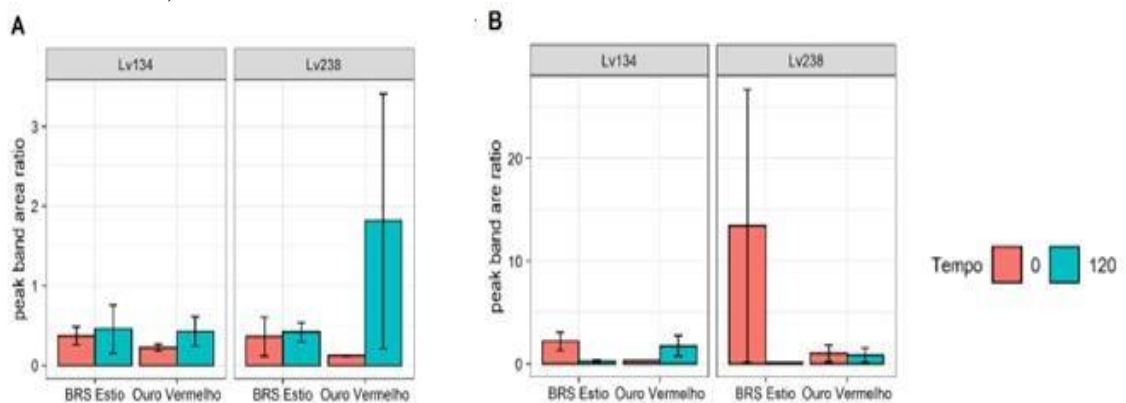
Na PCR semiquantitativa, o padrão de expressão obtido para ambos genes é mostrado na Figura 4. Pode-se observar que tanto para o, quanto para Gene 1(Phvul.004G001500) e Gene 2 (Phvul.011G200300), não é possível visualizar diferença de expressão entre os tempos de coleta. Após a análise de imagem, foram obtidos os dados referentes a intensidade das bandas, utilizando a Actina como gene de referência. Os dados foram submetidos a ANAVA e graficamente são mostrados na Figura 5.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de cDNA. As primeiras 12 amostras são inoculadas com o isolado Lv134 (as seis primeiras a 0 hpi e as outras seis 120 hpi). As outras 12 amostras são inoculadas com o isolado Lv238 (as seis primeiras a 0 hpi e as outras seis 120 hpi). E= BRS Estilo e OV= Ouro Vermelho; I, II e III= repetições biológicas. CN= controle negativo. A: eletroforese do primer actina. B: eletroforese do primer G1. C: eletroforese do primer G2.



Fonte: Da autora (2020).

Figura 5 - Gráficos referentes a média da razão das intensidades de bandas juntamente com o erro padrão da média das cultivares BRS Estilo e Ouro Vermelho durante a interação com os isolados Lv134 e Lv238 da raça 65 de *C. lindemuthianum*. A: Gene 1; B: Gene 2



Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

A variabilidade dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* vem sendo revelada em uma gama de estudos, como Davide *et al.* (2009), Ishikawa *et al.* (2008), Ishikawa *et al.* (2011); Coelho *et al.* (2016), Costa *et al.* (2017). Devido a sua abrangente distribuição e alta patogenicidade, a obtenção de cultivares resistentes às diferentes raças do patógeno, como o da 65, é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do feijoeiro para resistência à antracnose. Portanto, o esclarecimento dos caminhos envolvidos no processo, bem como a identificação e validação de prováveis fontes de resistência é de extrema importância no estudo do patossistema.

Os sintomas avaliados após a inoculação com os isolados LV134 e LV238 da raça 65 de *C. lindemuthianum* (FIGURA 1), seguiu o padrão apresentado por Costa *et al.* (2019), onde a linhagem Ouro Vermelho demonstrou-se resistente ao isolado LV134, enquanto que a linhagem BRS Estilo mostrou-se totalmente suscetível a este isolado. Assim também foi para o isolado LV238, enquanto a linhagem Ouro Vermelho mostrou-se totalmente suscetível a linhagem BRS Estilo foi resistente.

Alguns autores já descobriram alguns locos associados ao controle genético para a raça 65, *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). Todavia, necessita-se entender sobre os genes presentes nesses locos que estão envolvidos no processo de resistência, aplicabilidades celulares e padrão de expressão. Análises de ligação e estudos de mapeamento associativo vêm ganhando , e trazendo boas indicações de genes associados aos locos de resistência. Costa *et al.* (2019) indicaram, por esses tipos de estudos, genes associados a locos quantitativos e qualitativos associados ao patossistema. Dentre eles, dois genes de efeito maior Phvul.004G001500 e Phvul.011G200300, associados com a resistência aos isolados LV 134 e LV 238, presentes nos cromossomos PV04 e PV11, respectivamente. A verificação do padrão de expressão desses genes candidados a resistência a raça 65 permite a validação da sua real atuação para essa finalidade no patossistema.

No presente estudo, foram avaliados os genes Phvul.004G001500 e Phvul.011G200300 quanto a diferença de expressão em genótipos resistentes e suscetíveis, quando inoculados com os isolados LV134 e LV 238. Os resultados obtidos para ambos os

genes não apresentou efeito significativo, o que indica que a técnica PCR semiquantitativa não permitiu capturar expressão gênica diferencial entre as linhagens resistentes e suscetíveis inoculadas com os isolados LV 134 e LV 238, nem tão pouco, entre os dois tempos analisados, controle de 0 hpi e 120 hpi (FIGURA 5). O gene Phvul.004G001500 mostrou um diferencial de expressão 72 hpi do fungo *Erysiphe polygoni*, causador do oídeo no feijoeiro. O nível de expressão foi significativamente regulado para cima no genótipo resistente Porrilo Sintético, de acordo com Campa e Ferreira (2017). Talvez o tempo de coleta utilizado nesse estudo não tenha sido capaz de capturar tal variação no patossistema feijoeiro-antracnose. Já para o segundo gene avaliado Phvul.011G200300 não foi encontrado nenhum resultado preliminar de expressão. O fato de não ter encontrado nenhum resultado sobre esse gene e principalmente não ter sua função descrita em outros patossistemas, nos leva a inferir que alguns fatores bióticos, abióticos, além da variação de expressão dentro das mesmas raças podem ter levado a este resultado. Estes resultados preliminares indicam a necessidade de maiores avaliações para que inferências mais precisas acerca do envolvimento desses genes possam ser realizadas.

Também como já dito no capítulo anterior, as regiões subteloméricas são vistas como locos que possuem famílias gênicas em rápida evolução, envoltas em processos adaptativos (MEZIADI *et al.* 2015), visto que os genes de resistência à antracnose estão em maior parte resididos nessas regiões, pode-se ter a hipótese de que esses genes não estão tão presentes durante a interação com a raça 65. Entretanto, são questões que devem ser investigadas mais profundamente, verificando a presença de outros genes durante a interação e usar de técnicas mais sensíveis para quantificar o nível de expressão.

5 CONCLUSÕES

Os genes indicados para o estudo de expressão durante a interação com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e as linhagens BRS Estilo e Ouro Vermelho não foram capazes de diferir os padrões de expressão via PCR semiquantitativa. Entretanto, é necessário realizar uma investigação mais profunda, aliando técnicas mais sensíveis na quantificação da expressão destes genes, e testar mais tempos de inoculação, de modo a obter maiores informações sobre o perfil transcricional de ambos os genes.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- BANNEROT, H.; DERIEUX, M.; FOUILLOUX, G. Mise en évidence d'un 2^e second gene de résistance totale à l'antracnose chez le haricot. **Ann Amélior Plantes**, [S.l.], v. 21, p. 83–85, 1971.
- BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M. *et al.* Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 252, p. 55–128, 2003.
- 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**, [S.l.], v. 10, n. 10, 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.
- CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Gene coding for an elongation factor is involved in resistance against powdery mildew in common bean. **Theor Appl Genet**, [S.l.], p. 130, 849–860, 2017.
- CASTRO, S.A.L. *et al.* Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.
- COÊLHO, M. *et al.* Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [S.l.], 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, p. 1–15, 2017.
- COSTA, L.C. *et al.* **Mapeamento de genes de resistência a diferentes isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e seleção recorrente visando à resistência a antracnose do feijoeiro**. 2019. 109 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- CROSS, L.; POTTS, C.; ANSON, J.G. Sensitive and Rapid Detection and Quantification of Nucleic Acids. *In*: ROLFS, A.; WEBER-ROLFS, I.; FINCKH, U. (Eds.). **Methods in DNA Amplification**. Boston: Springer, 1994.
- 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**, [S.l.], v. 9, p. 23–30, 2009.
- DE RON, A.M. Common Bean. *In*: **Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding**. Common Bean Publisher. New York: Springer, 2015.

FAROOQ-MAHIYA *et al.* Temporal expression of candidate genes at the Co-1 locus and their interaction with other defense related genes in common bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [S.l.], v. 108, 2019.

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.

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

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; DE RITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Análise semiquantitativa de RT-PCR para avaliar os níveis de expressão de múltiplos transcritos da mesma amostra. **Biol Proced Online**, may. 2001.

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**, [S.l.], v.40, p. 104–114, 1950.

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

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

OBLESSUC, P.R.; BARONI, R.M.; GARCIA, A.A.F. *et al.* Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. **BMC Genet**, [S.l.], v. 13, n. 50, 2012.

PADDER, B.A. *et al.* Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PloS one**, [S.l.], v. 11, n. 11, 2016.

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

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

PADDER, B.A. *et al.* Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PloS one**, [S.l.], v. 11, n. 11, 2016.

PADDER, B.A. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum*, the Causal Agent of Bean Anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017.

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

SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol**. Cali: Ciat, 1987.

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

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, [S.l.], v. 10, p. 57–63, 2009.

APÊNDICE

Tabela 1- QTLs com suas respectivas informações. (continua)

QTLs	GL	Raça	LOD	R²
1	2	4	1.57	0,02
2	1	4	3.45	0.05068
3	1	4	2.3	0.02975
4	2	4	4.28	0.0656
5	3	4	1.59	0.0246
6	5	4	3.71	0.0475
7	6	4	3.54	0.0405
8	7	4	7.10	0.0754
9	8	4	5.74	0.0671
10	8	4	2.62	0.0361
11	11	4	3.27	0.0486
12	11	4	2.78	0.0363
13	1	2041	2.53	0.0472
14	1	2041	3.03	0.0345
15	5	2041	4.06	0.0522
16	6	2041	2.72	0.043
17	9	2041	3.87	0.1423
18	1	4	2.17	0.0140
19	2	4	2.30	0.0150
20	4	4	4.18	0.0280
21	7	4	19.37	0.3286
22	7	4	6.78	0.0436
23	8	4	3.13	0.0207
24	9	4	5.70	0.0772
25	2	38	8.17	0.1198

Tabela 1- QTLs com suas respectivas informações. (continua)

QTLs	GL	Raça	LOD	R²
26	7	38	3.08	0.0534
27	7	38	6.06	0.0730
28	9	38	3.74	0.0598
29	1	55	2.72	0.3072
30	2	55	7.56	0.1045
31	3	55	2.69	0.0342
32	5	55	2.27	0.0185
33	6	55	2.21	0.0180
34	7	55	7.22	0.0826
35	7	55	8.14	0.0861
36	1	73	3.65	0.4717
37	2	4, 38 e 55	4.98	0.032
38	4	4, 38 e 55	4.67	0.027
39	7	4, 38 e 55	10.92	0.095
40	7	4, 38 e 55	2.57	0.033
41	8	4, 38 e 55	7.00	0.039
42	9	4, 38 e 55	3.91	0.022
42	1	7	0.5223	0.79
44	1	7	0.2791	0.64
45	1	23	8.90	0.079
46	4	23	9.92	0.0303
47	3	1545	8.64	0.0497
48	5	1545	26.54	0.1424
49	8	1545	13.73	0.0468
50	4	1545	9.17	0.0264

Tabela 1- QTLs com suas respectivas informações. (continua)

QTLs	GL	Raça	LOD	R²
51	5	23	25.92	0.1332
52	8	1545	9.45	0.0433
53	1	1545	9.98	0.0559
54	5	1545	18.49	0.1022
55	1	1545	10.54	0.0503
56	3	1545	8.42	0.0408
57	5	1545	15.73	0.0828
58	3	1545	9.10	0.0445
59	4	23	9.73	0.033
60	5	23	14.07	0.0598
61	9	23	14.93	0.1143
62	5	23	32.45	0.1675
63	7	1545	10.39	0.0149
64	8	1545	9.42	0.0398
65	4	1545	8.90	0.0306
66	5	23	13.33	0.0436
67	9	23	14.72	0.1019
68	5	23	33.39	0.1675
69	7	1545	11.22	0.0165
70	8	1545	8.33	0.038
71	2	38	11.21	0.103
72	2	55	15.97	0.141
73	2	38 e 55	4.98	0.032
74	2	4	2.96	0.017
75	2	4	3.42	0.017

Tabela 1- QTLs com suas respectivas informações. (conclusão)

QTLs	GL	Raça	LOD	R²
76	6	55	16.24	0.146
77	7	4	3.62	0.039
78	7	38	6.82	0.066
79	7	55	10.92	0.095
80	7	4,38 e 55	2.57	0.033
81	7	4	6.92	0.061
82	7	38	4.43	0.048
83	7	55	5.86	0.057
84	7	4,38 e 55	4.16	0.053
85	8	4	5.62	0.062
86	8	4	6.92	0.036
87	8	38	2.57	0.022
88	8	55	3.09	0.033
89	8	4, 38 e 55	7.00	0.0039
90	8	38	2.52	0.022
91	9	4	4.25	0.023
92	9	4	3.18	0.016
93	9	55	2.49	0.019
94	9	4 e 55	3.91	0.022
95	11	4	5.53	2.9

Fonte: Da autora (2020).