



IGOR ALMEIDA LIMA

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA
REAÇÃO DO FEIJOEIRO AO MOFO BRANCO**

LAVRAS - MG

2014

IGOR ALMEIDA LIMA

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA REAÇÃO DO FEIJOEIRO AO
MOFO BRANCO**

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

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lima, Igor Almeida.

Mapeamento associativo para reação do feijoeiro ao mofo
branco / Igor Almeida Lima. – Lavras : UFLA, 2014.
64 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: João Bosco dos Santos.
Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3.
Desequilíbrio de ligação. 4. QTL's. 5. Modelos mistos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6523

IGOR ALMEIDA LIMA

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA REAÇÃO DO FEIJOEIRO AO
MOFO BRANCO**

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

APROVADA em 24 de julho de 2014.

Dr. Antônio Augusto Franco Garcia

ESALQ/USP

Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu

EMBRAPA

Dr. Márcio Balestre

UFLA

Dr. José Airton Nunes Rodrigues

UFLA

Dr. João Bosco dos Santos

Orientador

LAVRAS – MG

2014

*A DEUS, aos meus pais, Luiz e Mara, e aos meus irmãos,
André e Raíssa pelo amor, exemplo, motivação e amizade,
principalmente nos momentos mais difíceis.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar, em mais um importante passo da minha caminhada.

Aos meus pais, Luiz e Mara, e aos meus irmãos, André e Raíssa, pelo amor, exemplo, motivação e amizade, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realizar o doutorado, à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e as demais instituições de fomento CNPq e CAPES.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela orientação, serenidade, paciência, confiança, disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA, à pesquisadora Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu, pelos ensinamentos transmitidos, o bom humor e a amizade.

Ao professor Antônio Augusto pelos ensinamentos, amizade e experiência durante o semestre que cursei sua disciplina na ESALQ.

A todos os amigos do programa de genética e melhoramento de Plantas do núcleo de estudos GEN, pelo companheirismo nas tarefas de campo e nas festas, em especial aos do Laboratório de Genética Molecular do DBI/UFLA, Monik, Flávia, Melina, Letícia, Fernanda, Juliana, Gheysa, Paulo, Filipe, Renato, Marinei, Márcia, Wylcker, Danuza, Lucas, Paulo (Baiano) por toda a ajuda e amizade.

Ao amigo Lamartine, pela disposição, competência, amizade e por estar sempre pronto a me ajudar no laboratório e na vida.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelo carinho e ajuda na realização deste trabalho, especialmente, ao Léo, Lindolfo, Dona Irondina e Lílian.

À empresa Du Pont Pioneer HiBred, em especial ao Matheus Reis, por entender este momento e me ceder estes últimos dias para a finalização da tese.

Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO.

RESUMO

O mapeamento associativo pelo estudo do Desequilíbrio de Ligação com o auxílio das matrizes da estrutura da população e de parentesco relaciona regiões do DNA com caracteres de interesse. Entre as vantagens dessa técnica estão: a exploração de acessos de germoplasma e linhagens-elite sem a necessidade do desenvolvimento de populações controladas. É importante enfatizar que o mapeamento de Quantitative Trait Loci (QTL's) e o mapeamento associativo são metodologias complementares. Objetivou-se com este estudo confirmar/identificar novos QTL's para reação ao mofo branco diretamente nas linhagens dos ensaios de VCU e do programa ELITE de melhoramento do feijoeiro da Universidade Federal de Lavras. Foram analisadas 144 linhagens dos ensaios VCU e do programa ELITE em quatro ambientes para reação ao mofo branco. Para três safras em campo foi utilizado o delineamento látice quadrado triplo parcialmente desbalanceado, e para o quarto ambiente, em casa de vegetação, o delineamento de blocos casualizados com duas repetições. Para a análise associativa utilizou-se o modelo misto (Q + K). A matriz Q e matriz K são utilizadas para se contemplar a estrutura populacional e de parentesco respectivamente no grupo de indivíduos/linhagens de interesse. Essas matrizes foram estimadas por marcadores microssatélite SSR e AFLP. Confirmaram-se alguns marcadores ligados a QTL's para reação ao mofo branco, anteriormente identificados em cultivares exóticas, entre eles o SSR BMd15 e o BMd20. Identificou-se outros marcadores tais como EagcMcag810 e EaaaMcat655 para reação ao mofo branco. Todos esses marcadores foram identificados diretamente nas linhagens utilizadas no programa de melhoramento do estado de Minas Gerais. Dessa forma confirmou-se o mapeamento associativo como uma técnica de grande potencial para auxiliar na escolha de genitores para futuros cruzamentos, bem como ferramenta para obtenção de maiores ganhos genéticos para resistência ao mofo branco.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. *Sclerotinia sclerotiorum*. Desequilíbrio de ligação. QTL's. Modelos mistos.

ABSTRACT

The associative mapping by the Linkage Disequilibrium study with the aid of the matrices of population structure and parentage related regions of DNA with interest traits. Among the advantages of this technique are: access exploration of germplasm and lines-elite without the need of the development of controlled populations. It is important to emphasize that the mapping of QTL's and the association mapping are complementary methodologies. The objective of this study was to confirm/identify new QTL's for reaction to white mold directly on the lines of VCU trials and ELITE program of bean breeding of the Federal University of Lavras. For reaction to white mold were analyzed 144 lines of the assays: VCU and the ELITE program in four environments. For three crops in the field, it was used design triple square lattice partially unbalanced, and for the fourth environment, in the greenhouse, the randomized block design with two replications. For associative analysis, it was used the mixed model (Q + K). The matrices Q and K are used to contemplate the population structure and parentage respectively in the group of individuals/lines of interest. These matrices were estimated by microsatellite SSR and AFLP markers. It was confirmed some markers linked to QTL's for reaction to white mold, previously identified in exotic cultivars, including SSR BMd15, BMd20. It was identified other markers such as EageMcag810 and EaaaMcat655 for reaction to white mold. All these markers were identified directly in the lines used in the breeding program of the Minas Gerais state. Thus, it was confirmed the associative mapping as a technique with great potential to assist in the choice of genitors for future crosses, as well as a tool for achieving greater genetic gains for white mold resistance.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., *Sclerotinia sclerotiorum*. Linkage disequilibrium. QTL's. Mixed models.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa das mesorregiões do estado de Minas Gerais, destacado, em cinza, as principais mesorregiões produtoras de feijão 16
- Figura 2 Comportamento da produção de feijão nas três safras anuais em Minas Gerais entre 1977 a 2012..... 17
- Figura 3 Comportamento da produtividade de feijão nas três safras anuais plantadas em Minas Gerais entre os anos de 1977 a 2012..... 17
- Figura 4 Queda do desequilíbrio de ligação conforme a distância genética (cM) entre pares de marcadores utilizados no mapeamento associativo 44
- Figura 5 Teste de atribuição para as linhagens do VCU e ELITE aos subgrupos ($k=3$). Os diferentes genótipos estão representados por linhas verticais, sendo os de mesma cor pertencentes ao mesmo grupo. Diferentes cores na linha vertical (mesmo indivíduo) indicam a porcentagem do genoma compartilhado com os demais grupos. 46
- Figura 6 Valores de Δs para cada valor de s . O maior valor de Δs corresponde ao número ótimo de subgrupos..... 46

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1 | Produção, área semeada e produtividade das mesorregiões produtoras de feijão em Minas Gerais..... | 16 |
| Tabela 2 | Codificação das linhagens utilizadas dos programas VCU e ELITE.. | 32 |
| Tabela 3 | Interpretação Bayesiana dos P-valores..... | 43 |
| Tabela 4 | Resumo das análises de variância individuais e conjunta para resistência fisiológica ao mofo branco | 48 |
| Tabela 5 | Análise Associativa para seleção ao Mofo branco..... | 50 |
| Tabela 6 | Efeito dos alelos dos marcadores de QTL's para resistência fisiológica das linhagens de feijoeiro ao mofo branco na média ajustada das notas (1 a 9) das inoculações de mofo branco via straw test das análises de variância conjunta e da casa de vegetação das linhagens..... | 53 |
| Tabela A1 | Análise do Conteúdo Informativo do Polimorfismo (PIC) dos marcadores SSR..... | 633 |
| Tabela A2 | Análise do Conteúdo Informativo do Polimorfismo (PIC) dos marcadores AFLP..... | 644 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 | Origem e domesticação do feijão | 14 |
| 2.2 | Aspectos gerais da cultura do feijoeiro | 15 |
| 2.3 | Mofo branco | 18 |
| 2.4 | Arquitetura da planta | 19 |
| 2.5 | Melhoramento genético do feijoeiro na UFLA | 20 |
| 2.6 | Marcadores moleculares | 21 |
| 2.7 | Seleção assistida por marcadores moleculares e mapas genéticos | 23 |
| 2.8 | Mapeamento associativo | 26 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 | Linhagens utilizadas para o mapeamento associativo | 31 |
| 3.2 | Avaliação da resistência fisiológica do feijoeiro ao mofo branco | 33 |
| 3.3 | Extração de DNA e reações de PCR (SSR e AFLP) | 34 |
| 3.4 | Mapeamento Associativo | 35 |
| 3.4.1 | Avaliação genotípica – via marcadores SSR e AFLP | 36 |
| 3.4.2 | Análise do Desequilíbrio de Ligação (DL) | 36 |
| 3.4.3 | Análise da estrutura populacional | 37 |
| 3.4.4 | Obtenção da matriz de parentesco K | 38 |
| 3.4.5 | Análise dos dados fenotípicos | 39 |
| 3.4.6 | Análises associativas | 41 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 44 |
| 5 | CONCLUSÕES | 55 |
| | REFERÊNCIAS | 56 |
| | ANEXOS | 62 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os trabalhos com melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) iniciaram-se no Brasil em 1932 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), porém somente com a criação na década de 1970 do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz Feijão, atualmente Embrapa Arroz e Feijão das Empresas Estaduais de pesquisa nas quais se inclui a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e o início das pesquisas nos programas de Pós-Graduação nas Universidades Federais é que o melhoramento genético do feijoeiro teve uma maior expressão, com a liberação de várias cultivares e contínuos ganhos de produtividade (MATOS, 2005).

Com o decorrer dos anos os ganhos com a produtividade do feijoeiro passaram a ser menores. Para continuar a obter ganhos significativos é fundamental ter uma ótima precisão experimental e utilizar-se de ferramentas, tais como os marcadores moleculares. Características complexas como produtividade são controladas por muitos locos de efeitos quantitativos (QTL's), geralmente de pequeno efeito, que se interagem entre si, com o genoma e com o ambiente. O mapeamento de QTL's, para tais características, busca localizar sua posição e estimar seus efeitos e inter-relações.

Para o feijoeiro, com a crescente utilização de pivots e em alguns casos ausência de rotação de culturas, algumas doenças têm gerado crescentes prejuízos nos últimos anos, entre essas merece destaque o mofo branco, por não se ter cultivares resistentes, por ser um patógeno que atinge muitas espécies e por produzir estruturas de resistências que podem permanecer na área de cultivo por muitos anos.

A maioria dos estudos de mapeamento de QTL's tem sido realizada através da análise de ligação em populações de cruzamentos biparentais contrastantes controlados F_2 , retrocruzamento e linhagens recombinantes,

considerando, desse modo, a variação genética presente exclusivamente nos parentais (2 alelos por locos) e somente uma característica de interesse. Entre as limitações dessa técnica estão: a baixa resolução, com a qual os QTL's são mapeados, devido ao baixo número de gerações não permitir uma maior recombinação do genoma, o efeito *background* devido às diferentes QTL's segregarem/relacionarem em populações diferentes de mapeamento e a interação destes QTL's ao longo dos ambientes. Além disso, a fenotipagem ocorre geralmente em poucos locais, seja por limitação de sementes ou recursos. Essas populações, muitas das vezes, apresentam genitores não adaptados e assim dificilmente serão utilizados em programas de melhoramento (MYLES, 2009).

Uma das grandes vantagens do mapeamento associativo está no fato de não ser necessário o desenvolvimento de populações de mapeamento, a amostragem de indivíduos não relacionados representa uma série de vantagens para o desenvolvimento e validação da seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento (JANNINK; BINK; JANSEN, 2001), bem como oferece a oportunidade de aumentar a exploração de acessos de germoplasma ou de linhagens-elite já adaptadas na busca de combinações alélicas vantajosas. As análises associativas podem beneficiar-se da inclusão de dados coletados de vários anos, como nos ensaios VCU/ELITE, com genótipos diretamente utilizados de programas de melhoramento (linhagens-elite).

Desse modo objetivou-se com o presente trabalho confirmar/detectar novos QTL's para reação ao mofo branco, diretamente nas linhagens-elite, referente aos anos de 2006 a 2012 do programa de melhoramento do feijoeiro do estado de Minas Gerais, pela metodologia do mapeamento associativo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e domesticação do feijão

O gênero *Phaseolus* originou-se nas Américas, sendo que possui 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman. Dentre esses, o feijão-comum, *Phaseolus vulgaris*, é a mais importante, pois é a espécie mais cultivada e também a mais utilizada nos cinco continentes. Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, Gepts et al. (1998) estabeleceram a hipótese de três centros de origem para o feijão: o primeiro no México, na América Central (Mesoamericano) o segundo na região Andina e o terceiro, de menor importância, na Colômbia.

Para a determinação desses centros de origem, os autores se basearam em características como o tipo de faseolina – principal proteína de reserva de feijões selvagens e cultivados – bem como no tamanho das sementes. Gepts (1998), por meio de análises eletroforéticas, determinou vários tipos de faseolina. Foi verificado que ocorria uma correspondência na distribuição geográfica entre os feijões silvestres e cultivados. Os feijões do tipo “S” predominam no México e América Central (92%), enquanto os do tipo “T” predominam nos Andes do Sul (50%). O do tipo “B” somente foi encontrado em feijões silvestres e cultivados na Colômbia. Já os tipos “C”, “H” e “A” foram encontrados em formas cultivadas nos Andes.

Os centros de origem correspondem aos centros de domesticação, já que as cultivares de feijão apresentam o mesmo tipo de faseolina, específica de cada centro de origem, de seus ancestrais selvagens. Há uma correlação entre o tipo de faseolina e o tamanho da semente. Cultivares do tipo “T”, “C”, “H” e “A” têm sementes maiores do que os com tipo “S” e “B” Gepts et al. (1998). No

Brasil os cultivares de sementes pequenas e faseolina do tipo “S”, como os feijões Carioca, Enxofre, Rosinha e muitos outros são comuns, e também feijões de grãos graúdos com faseolina do tipo “T”, como o cultivar Jalo EEP 558.

2.2 Aspectos gerais da cultura do feijoeiro

A produtividade média está em torno de 1031 kg/ha (WANDER, 2014) é muito baixa ainda devido a uma expressiva parte dos produtores utilizarem pouca tecnologia, sendo assim mais atingidos por fatores abióticos e bióticos. Desde a década de 50 do século XX e mais fortemente a partir da atuação das universidades e da criação da Embrapa, houve e há um constante aumento no potencial produtivo com cultivares chegando a produzir além de 3000 kg/ha.

O feijão é cultivado em Minas Gerais praticamente todos os meses do ano. O feijão é cultivado na época das “águas” semeadura de outubro até o início de dezembro; época da “seca” semeadura entre o final de janeiro a março e a época do “outono-inverno”, cuja semeadura ocorre de maio até o início de agosto, dependendo da região.

O estado de Minas Gerais está organizado em 12 mesorregiões (Figura 1). O destaque é o Noroeste de Minas, com aproximadamente 40% da produção, seguido pelo Triângulo mineiro/Alto Paranaíba e Norte de Minas (Tabela 1). Nota-se nas figuras 2 e 3 a evolução da produção e produtividade da cultura das safras 1976/1977 até 2011/2012 e principalmente o início do plantio de inverno na safra de 1984/1985 e seu grande incremento até 2011/2012, equiparando com as produções das outras épocas. Porém, a produtividade da cultura de inverno sempre foi muito superior por ser muito mais tecnificada.

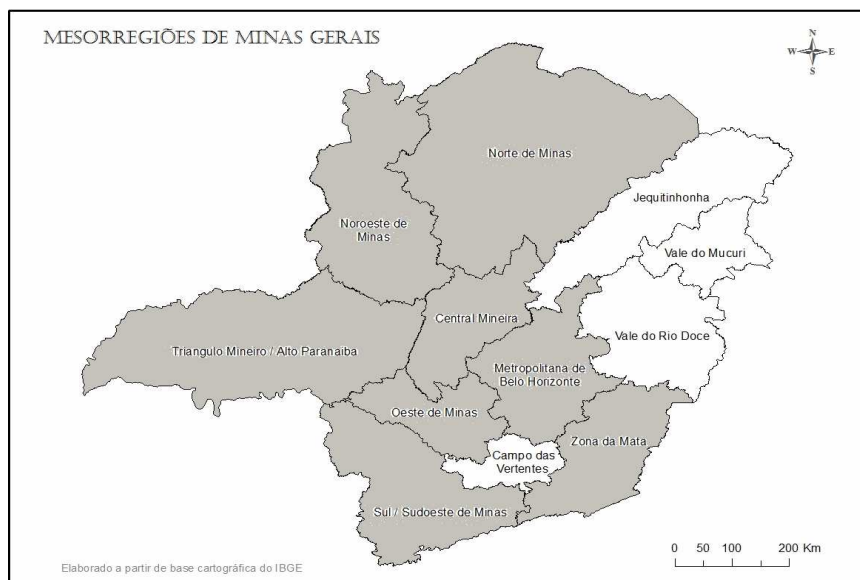


Figura 1 Mapa das mesorregiões do estado de Minas Gerais, destacado, em cinza, as principais mesorregiões produtoras de feijão

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2007)

Tabela 1 Produção, área semeada e produtividade das mesorregiões produtoras de feijão em Minas Gerais

| Mesorregiões | Produção (t) | Área semeada (ha) | Produtividade (kg/ha) |
|-----------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| Noroeste de Minas | 190.993 | 83.295 | 2.292 |
| Triângulo MG/Alto Paranaíba | 65.415 | 35.562 | 1.846 |
| Norte de Minas | 55.056 | 62.016 | 938 |
| Sul/Sudoeste de Minas | 49.616 | 51.731 | 1.002 |
| Zona da Mata | 31.581 | 50.605 | 673 |
| Oeste de Minas | 24.649 | 25.624 | 1.022 |
| Campo das Vertentes | 20.121 | 21.550 | 977 |
| Vale do Rio Doce | 13.186 | 21.934 | 607 |
| Metropolitana de BH | 11.741 | 16.808 | 701 |
| Jequitinhonha | 9.482 | 16.280 | 591 |
| Central Mineira | 5.089 | 5.010 | 1.110 |
| Vale do Mucuri | 3.934 | 5.615 | 700 |

Fonte: IBGE (2007)

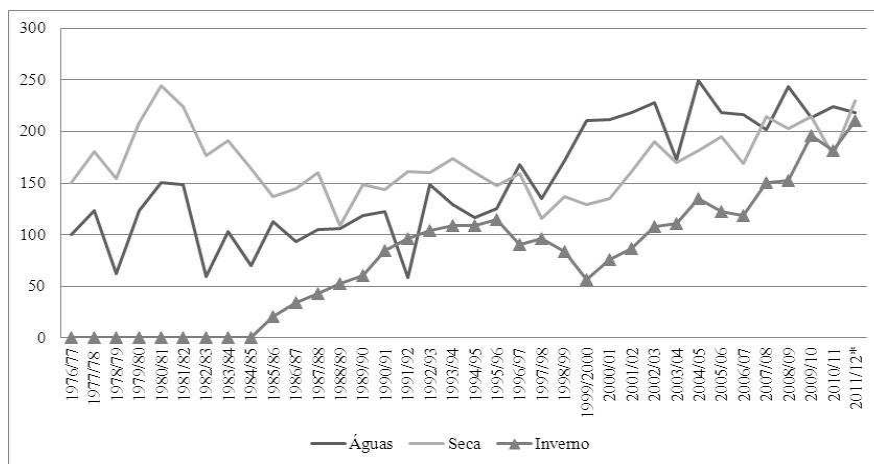


Figura 2 Comportamento da produção de feijão nas três safras anuais em Minas Gerais entre 1977 a 2012

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2012) e IBGE (2007) (* Dados estimados)

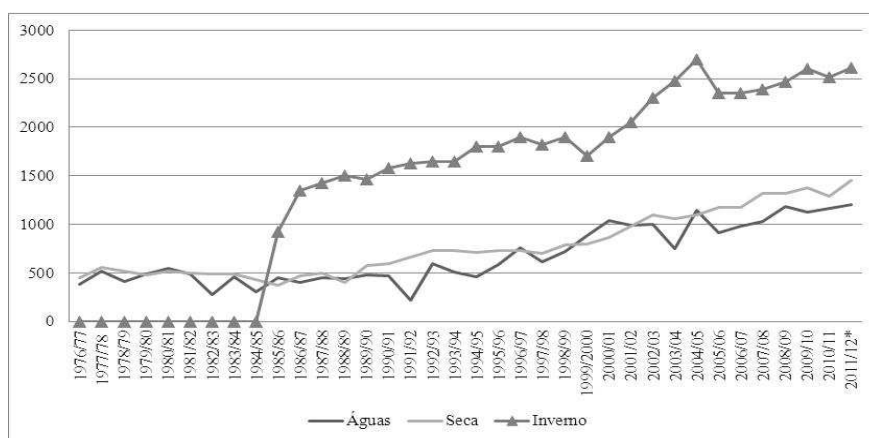


Figura 3 Comportamento da produtividade de feijão nas três safras anuais plantadas em Minas Gerais entre os anos de 1977 a 2012

Fonte: CONAB (2012) e IBGE (2007) (*Dados estimados)

2.3 Mofo branco

Entre as doenças do feijoeiro, o mofo branco (*Sclerotinia Sclerotiorum*) é uma das que mais cresce em importância, principalmente, devido à adoção de cultivos mais intensivos sob irrigação, principalmente no outono-inverno e sua intensificação, como ilustra a figura 3, ocorreu a partir dos anos 2000.

O fungo ataca toda a parte aérea da planta, principalmente, no início da floração ou após a polinização das flores, as quais servem como fonte básica de nutrientes para iniciar as infecções por ascósporos que, além de tecido senescente, necessitam de um filme-d'água para iniciar a infecção (HUNTER; ABAWI; CROISER, 1978). Nos órgãos infectados são encontradas lesões encharcadas, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco de aspecto cotonoso, cobrindo os tecidos da planta. Com o progresso da doença, as folhas e os caules infectados tonam-se marrons e permanecem eretos, mesmo com a morte da planta.

A geminação carpogênica (sexual) é considerada, por vários autores, como a principal responsável pelas epidemias em campo (KARL; NASSER; CAFÉ FILHO, 1997). Entretanto, esse patógeno produz estruturas de resistência (escleródio) que podem permanecer muitos anos no solo. Cada escleródio pode produzir em média cinco, seis ou mais apotécios e cada apotécio pode produzir milhões de ascósporos. Os esporos (ascósporos) são dispersos pelo vento e/ou pela água.

A resistência do feijoeiro ao mofo branco é complexa, poligênica e pode ser dividida em resistência em virtude de mecanismos de escape da planta como porte mais arbustivo, possibilitando maior arejamento e entrada de luz; e a resistência fisiológica propriamente dita (HUANG; MUNDEL; ERICKSON, 2003; SOULE et al., 2011).

Segundo Antonio et al. (2008), que avaliaram pelo método do ácido oxálico a reação de progênies $F_{2,3}$ do retrocruzamento um (RC_1) G122 (G122 x VC3) e Carneiro, Santos e Leite (2010) que avaliaram progênies $F_{2,3}$ do RC_1 M20 (G122 x M20), por meio do *straw test*, há predominância da variância aditiva no controle da expressão da reação de resistência parcial (fisiológica) do feijoeiro ao mofo branco. Ambas as autoras concluíram que as estimativas das herdabilidades, no sentido amplo, obtidas (0,47 e 0,53), indicam que a seleção é mais eficiente com base na média de progênies e com inoculações múltiplas.

2.4 Arquitetura da planta

O porte mais ereto das plantas apresenta uma série de vantagens, tendo por isso recebido grande atenção dos melhoristas. Dentre as vantagens destaca-se: menor acamamento que propicia facilidade nos tratos culturais, possibilidade de colheita mecanizada, redução das perdas na colheita devido ao menor contato com o solo, propiciando também maior qualidade dos grãos e menor incidência de doenças.

A arquitetura da planta é um caráter complexo e um conjunto de características contribui para que a planta seja ereta ou prostrada. Dentre essas características estão altura da planta, hábito de florescimento, comprimento da haste principal, número e comprimento dos entrenós na haste principal, número e ângulo de ramificações que se iniciam na haste principal, distribuição das vagens na planta, tamanho dos grãos, diâmetro do hipocótilo, Stay Green e hábito de crescimento (SANTOS; GAVILANES, 2006).

Uma das dificuldades nos estudos da arquitetura da planta é a influência do ambiente nesse caráter. Alta umidade, temperaturas elevadas e fertilidade abundante são condições edafoclimáticas que levam as plantas apresentarem um maior desenvolvimento vegetativo. Linhagens eretas nestas condições de cultivo

podem tornarem-se prostradas. Collicchio, Ramalho e Abreu (1997) avaliando o porte em três safras verificou que na safra das águas as notas de porte tendem a ser maiores, ou seja, as plantas tendem a ficar mais prostradas.

Com relação às doenças o porte exerce grande influência, principalmente para o mofo branco, pois com um porte mais ereto há maior circulação de ar e entrada de luz, fatores que dificultam o desenvolvimento do fungo na planta. Para o mofo branco uma importante revisão foi realizada no sentido de se confirmar alguns QTL's para resistência a esse patógeno e/ou aos mecanismos de escape, principalmente aqueles determinantes do porte. Dentre os 79 QTL's detectados para reação ao mofo branco, 13 foram confirmados, sendo seis destes altamente relacionados a mecanismos de escape, tais como porosidade do dossel, altura da planta e comprimento dos internódios. (MIKLAS et al., 2013; SOULE et al., 2011).

2.5 Melhoramento genético do feijoeiro na UFLA

Em 30 anos de melhoramento genético do feijoeiro da UFLA (1974 a 2004), Matos et al. (2005) verificaram um progresso genético de 3,26 % ao ano 31,26 kg/ha/ano. No entanto, está cada vez mais difícil obter ganhos expressivos, já que os programas de melhoramento partem de genótipos melhorados, com elevado desempenho.

Em 2002 foi oficializado o convênio “Melhoramento do Feijoeiro para o estado de Minas Gerais (MG)”, cuja proposta é a obtenção, avaliação e desenvolvimento de linhagens/cultivares de feijoeiro adaptadas a MG e cooperação técnica e financeira entre as instituições envolvidas: EMBRAPA, UFLA, UFV (Universidade Federal de Viçosa) e EPAMIG, visando à obtenção e registro de novas cultivares de feijoeiro comum. Cada instituição é responsável pela condução dos experimentos em suas regiões de atuação.

Entre os caracteres avaliados nos dois anos de avaliação de cada biênio do VCU (Valor de Cultivo e Uso) estão: a produtividade, o porte, acamamento, os dias para florescimento e as doenças (mancha angular, oídio), a depender da ocorrência destas nas diferentes safras/locais nas quais esses ensaios são conduzidos. As melhores linhagens são registradas e protegidas com o nome BRSMG - nome fantasia - com titularidade das quatro instituições.

Com o avanço das técnicas de sequenciamento, plataformas de genotipagem, e a diminuição no seu custo, o uso dos marcadores moleculares aumenta o seu potencial como ferramenta nos programas de melhoramento para auxiliar no aumento dos ganhos obtidos no melhoramento de plantas. Vários estudos genéticos têm sido realizados e os objetivos são bem diversos, entre eles podemos citar os estudos a respeito do esclarecimento sobre a origem da variabilidade genética das cultivares atuais, do controle genético da resistência a diversas doenças e dentre outras as características agronômicas como o porte, relacionadas com doenças importantes como o mofo branco (ANTONIO et al., 2008; MIKLAS et al., 2002, 2013; SCHWARTZ; SINGH, 2013).

2.6 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares têm sido empregados numa série de finalidades como identificação de genótipos (*fingerprinting*), estudos de fluxo gênico, estimativas do parentesco, análise da diversidade genética, construção de mapas moleculares, identificação de QTL's principalmente para doenças, identificação de transgênicos, na seleção genômica ampla entre outras aplicações. Embora, inicialmente focada em características oligogênicas, a automatização e o desenvolvimento de plataformas de genotipagem têm proporcionado o estudo de características quantitativas mais complexas (BERNARDO, 2010).

Os marcadores utilizados nessas plataformas automatizadas são os SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*) (NACHMAN, 2001). Entre os diversos tipos de marcadores os microssatélites - Sequências Simples Repetidas (SSR) merecem destaque pelas suas características: possuem natureza codominante, são PCR-específicos, reproduzíveis e com ampla distribuição no genoma, o que os tornam importantes na construção e na integração dos mapas genéticos (BLAIR et al., 2003; CÓRDOBA et al., 2010; HANAI et al., 2007, 2010). Os marcadores SSR-EST (*Expressed Sequence Tags*) possuem vantagens adicionais por serem desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma. Um marcador derivado de EST que esteja associado a um caráter de interesse pode ser parte do próprio gene (THIEL, 2003).

Entre os marcadores o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), também se mostra importante para a saturação do genoma, por explorar a variação do comprimento de fragmentos de restrição (HANAI et al., 2010; VOZ et al., 1995).

O polimorfismo detectado pelo AFLP é observado pela presença ou ausência do fragmento amplificado, conferindo a essas marcas um caráter dominante (LOPES, 2003). Cada gel, em geral, é capaz de revelar a variação em vários fragmentos (locos), numa única reação de PCR, o que se constitui em uma vantagem desse marcador em relação aos demais.

Os perfis de AFLP são oriundos dos fragmentos gerados pela digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte mais frequente. Após a digestão, os fragmentos de restrição recebem sequências específicas, denominadas de adaptadores, que se ligam às suas extremidades. Subconjunto de fragmentos são amplificados, seletivamente, via PCR, utilizando como *primers*, sequências complementares às sequências dos adaptadores, acrescida de três nucleotídeos arbitrários na posição 3', permitindo a seleção dos fragmentos que serão amplificados. A separação dos fragmentos se

dá em gel de poliacrilamida de modo que os fragmentos de corte raro-frequente sejam prioritariamente visualizados.

A técnica permite a detecção de um grande número de pontos de mutação por reação, pois uma simples mudança de base pode ocasionar a perda ou o ganho de um sítio de restrição e, por isso, esses marcadores são importantes para a saturação de mapas genéticos ou de determinadas regiões genômicas de espécies como o feijoeiro com baixa densidade de marcadores moleculares.

Geralmente são utilizados marcadores SSR como âncoras para posicionamento desses locos marcadores AFLP no mapa núcleo da espécie e assim obter maior cobertura/representatividade da diversidade das características de interesse da espécie do feijoeiro, conforme realizado no feijoeiro por Hanai et al. (2010). Neste trabalho Hanai et al. (2010) identificou QTL's para resistência à antracnose e ferrugem em regiões genômicas com baixa densidade de marcadores mapeados.

2.7 Seleção assistida por marcadores moleculares e mapas genéticos

A partir da década de 90 do século XX a seleção assistida por marcadores tornou-se uma ferramenta disponível para programas de melhoramento, principalmente para características oligogênicas como algumas doenças (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; SOULE et al., 2011). O estudo de locos controladores de características quantitativas (QTL's) via marcadores genéticos moleculares associados ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTL's. A eficiência na detecção de QTL's depende do número de QTL's, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, tipo e tamanho da população segregante, tamanho do genoma, frequência

de recombinação entre o QTL e o marcador, saturação do mapa e eficiência da avaliação fenotípica (COLLARD et al., 2005).

Os pré-requisitos para o mapeamento de QTL's em cruzamentos controlados são: I) delineamento genético ou populações de mapeamento adequado: populações do tipo F₂, retrocruzamentos, linhagens recombinantes ou RILs (*Recombinant Inbred Lines*) dentre outras. Dessa forma, para a construção de mapa molecular e identificação de QTL's, são escolhidas duas linhagens genética e fenotipicamente divergentes em relação aos caracteres de interesse. Assim, nos indivíduos F₁ o Desequilíbrio de Ligação (DL) é máximo e as populações derivadas a partir deles procuram explorar esse desequilíbrio (GUPTA; RUSTGI; KULWAL, 2005).

Embora essas populações segregantes sejam facilmente criadas, elas apresentam numerosas desvantagens. Primeiro, o valor da variação genética dentro da população é limitado, devido ao fato de cada loco poder segregar para apenas dois alelos (espécies diploides), de forma que na ausência de polimorfismo entre os pais não é possível identificar o QTL. Segundo, as bases genéticas dentro das quais estudos de melhoramento são realizados, geralmente, tais populações não representam a base genética dos germoplasmas elites (JANNINK; BINK; JANSEN, 2001). Terceiro, o relativo baixo número de gerações após o máximo DL, que ocorre na geração F₁, implica num reduzido número de meioses amostradas dentro da população de mapeamento, assim ocasionando longos trechos de cromossomo em DL, grandes blocos haplotípicos, o que teoricamente aponta para a necessidade de um menor número de marcadores para cobertura do genoma.

Para o feijão-comum, inicialmente três principais mapas de ligação foram estabelecidos, utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares e fenotípicos (NODARI et al., 1993). Essas marcas foram integradas em um mapa do genoma do feijoeiro, chamado mapa núcleo (FREYRE et al., 1998)

desenvolvido a partir do cruzamento entre as cultivares BAT93 (B) de origem mesoamericana e Jalo EEP558 (J) de origem andina. Porém, esse mapa núcleo de ligação (BJ) era limitado quanto a informações genéticas sobre características úteis para os melhoristas (resistência a doenças, por exemplo).

Blair et al. (2003) desenvolveram um mapa núcleo de microssatélites (SSR) integralizado a esse mapa núcleo anterior BJ a partir de uma população biparenatal do CIAT com os seguintes genitores: DOR 364 (D) e G19833 (G).

Entre os grupos de pesquisa importantes no desenvolvimento de marcadores e mapas genéticos do feijoeiro no Brasil podemos citar a UFV, EMBRAPA Arroz e Feijão com trabalhos de integralização de marcadores SSR-EST no mapa núcleo do feijoeiro e os grupos IAC e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP. Além de integrar marcadores ao mapa núcleo da espécie esses grupos têm gerado mapas genéticos a partir de populações biparentais de cultivares nacionais adaptadas. Com o auxílio de marcadores microssatélites (SSR) utilizados como âncoras para alinhar e comparar os mapas provenientes dessas cultivares brasileiras/adaptadas e o mapa núcleo. Verificar a importância de QTL's já mapeados e de novos QTL's dessas populações biparentais adaptadas agronomicamente às nossas condições com o mapa núcleo do feijoeiro.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento e técnicas moleculares em 2010, tentou-se integrar os mapas genético e físico utilizando a biblioteca BAC do genótipo G19833 e as linhagens RIL'S da população DOR 364/G19833 (DG).

Houve também a criação de uma base de dados de bioinformática do feijoeiro pela Universidade da Califórnia chamada *PhaseolusGenes* cujo endereço eletrônico é <http://phaseolusgenes.bioinformatics.ucdavis.edu>. Nesse *site* é possível buscar por marcadores de QTL's já identificados para algumas características e até por sequências.

A partir desses mapas é possível a decomposição de caracteres de herança complexa em seus componentes mendelianos, um melhor entendimento genético das características mostrando que se a mesma é de caráter aditivo ou de dominância, o mapeamento de regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica, a quantificação do efeito dessas regiões para o caráter estudado e a subsequente utilização dessas informações no desenvolvimento de cultivares melhoradas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O mapeamento de QTL's não se trata apenas de determinar a posição destes no genoma, mas também a quantificação e a caracterização de seus efeitos, como interações alélicas, por exemplo, o grau de dominância - de cada um, e mesmo interações epistáticas e pleiotrópicas. Uma vez que os genótipos desses locos controladores de caracteres quantitativos são desconhecidos, uma alternativa é estimar os efeitos de QTL's fixados em posições intermediárias de marcadores moleculares genotipados que não têm efeito sobre o caráter em estudo, utilizando a informação do mapa desses marcadores.

O reconhecimento dessas e de outras limitações têm motivado o interesse em estratégias alternativas de melhoramento, populares em estudos de genética humana e animal e posteriormente em plantas conhecidas como mapeamento associativo ou mapeamento por DL. (LYNCH; WALSH, 1998, 2002).

2.8 Mapeamento associativo

O mapeamento associativo avalia o desequilíbrio de ligação entre polimorfismos no DNA com regiões do genoma responsáveis por caracteres de interesse. Em plantas a metodologia prega o uso de populações não estruturadas (sem progênes) compostas de indivíduos não aparentados advindos de

backgrounds genéticos diferentes e ampla variação fenotípica (ABDKARIMOV; ABDUKARIMOV, 2008).

Basicamente o mapeamento associativo se divide em duas metodologias, a de genes candidatos (*candidate genes*) que surgiu inicialmente em humanos e restringia-se a determinadas regiões específicas do genoma e a metodologia da análise do genoma como um todo (*whole genome scanning*), inicialmente com uma ideia de utilização de um menor número de marcadores, menor resolução, assim voltada para espécies autógamas com o genoma constituído de blocos haplotípicos mais conservados. Com o aprimoramento da técnica de sequenciamento e marcadores SNP's, permitiu-se a automação da genotipagem, e assim uma maior cobertura de todo o genoma da espécie (*whole genome scanning*). Os primeiros estudos em plantas foram em *Arabidopsis* e em milho (GUPTA; RUSTGI; KULWAL, 2005).

A extensão do DL ao longo do genoma e a estrutura dos blocos haplotípicos determinarão o tipo, número e densidade de marcadores, a serem utilizados, além dos métodos mais adequados para a análise e interpretação dos resultados. No entanto o desequilíbrio de ligação não necessariamente resulta de ligação física, já que outros fatores como epistasia, seleção (natural ou artificial), deriva genética, estrutura populacional, sistema reprodutivo também podem interferir, fazendo com que falsas associações entre marcador/QTL sejam detectadas (FLINT-GARCIA; THORNSBERRY; BUCKLER, 2003). Essas falsas associações podem ser “controladas” ao se considerar a estrutura populacional e a matriz de parentesco K (YU; BUCKLER, 2006).

De modo geral, num estudo de mapeamento associativo, o primeiro aspecto a ser avaliado é a extensão e distribuição do DL. A genotipagem ampla do DL determina a resolução de mapeamento e a densidade de marcadores para um escaneamento do genoma. Se o DL cai a uma curta distância, a resolução de mapeamento esperada é alta, mas um grande número de marcadores são

necessários. Por outro lado, se DL se estende por uma longa distância, às vezes em cM, então a resolução de mapeamento será baixa, mas um número relativamente pequeno de marcadores serão precisos (ZHU et al., 2008).

A visualização gráfica do DL pode ser apresentada tanto como um parcela de decaimento do D' ou r^2 através da distância física ou genética, ou como um arranjo linear de DL entre locos polimórficos dentro de um gene ou entre locos ao longo de um cromossomo (BRADBURY et al., 2007; FLINT-GARCIA; THORNSBERRY; BUCKLER, 2003).

Geralmente os grupos de linhagens-elite são tipicamente derivados de poucos fundadores no passado foram submetidos à intensa seleção. Por essas razões é esperado que o DL nesse material seja alto, o que já foi confirmado nos primeiros resultados experimental. Linhagens-elite podem não oferecer maior resolução quando comparada com análise de QTL em populações de mapeamento biparentais. Porém, há pelo menos duas importantes vantagens: um substancial maior nível de polimorfismo e a detecção de alelos favoráveis diretamente na população-alvo (BRESSEGHELLO; SORRELS, 2006). É importante que o melhorista/experimentador escolha um grupo de germoplasma diverso que explore os eventos de recombinação que podem ter ocorrido na história evolutiva da espécie de interesse.

Uma vez analisado o desequilíbrio de ligação deve-se analisar a estrutura populacional dos seus genótipos com o auxílio de marcadores aleatórios ao longo do genoma. O estudo sobre a estrutura populacional do painel associativo é fundamental para evitar associações errôneas entre fenótipo e marcador.

Entre as formas de se inferir a estrutura das populações estão o cálculo da matriz Q via programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) a utilização da genealogia e a utilização dos componentes principais (PRICE et al., 2006). A estrutura de populações tem por objetivo

identificar subpopulações e estimar a proporção da variação de cada indivíduo proveniente de cada subpopulação particular. A matriz dessas estimativas é chamada Q, e é usada como covariável controle para a estrutura da população.

Como a matriz Q não contempla um possível parentesco entre os indivíduos de cada subpopulação, Yu e Buckler (2006) propuseram calcular esse parentesco entre cada indivíduo presente no estudo, dois a dois, ou seja, obter a matriz K de parentesco e também inseri-la no modelo. Para utilizar essa informação no modelo o mapeamento associativo deve contar com uma abordagem de modelos mistos que contemple além do fenótipo, genótipo, estrutura populacional e a informação sobre o parentesco par a par entre os indivíduos do painel associativo (YU; BUCKLER, 2006).

Para isso o mapeamento associativo deve contar com uma abordagem de modelos mistos que contemple além do fenótipo, genótipo, informações sobre a estrutura populacional a matriz Q, e matriz de parentesco k (obtida no programa SPAGeDi 1.3) (YU; BUCKLER, 2006).

A matriz de parentesco original é calculada a partir do *pedigree*. Nesta matriz as diagonais têm valores entre um e dois que são equivalentes a um mais o coeficiente de endogamia. Fora das diagonais esses valores se situam entre 0 e 1 e refletem o parentesco entre esses indivíduos. A variância genética estimada a partir dessa matriz é a variância genética entre indivíduos, advinda dos gametas que deram origem a esses indivíduos. A matriz de parentesco original é duas vezes a matriz de parentesco usada na genética de populações, portanto a multiplicação da matriz k por dois é requerida, antes que ela seja utilizada no modelo misto (YU; BUCKLER, 2006).

Essa multiplicação não muda as soluções dos BLUE's e BLUPS e os seus testes estatísticos. Como os testes associativos são testes baseados nos BLUE's, estes não são afetados. No entanto essa multiplicação afeta as

estimativas dos componentes de variância aditivo e residual e logo a herdabilidade.

Como o mapeamento associativo envolve, geralmente, um grande número de marcadores e de testes, deve-se tomar cuidado com o erro tipo I, o qual pode surgir em função desses múltiplos testes. Dentre os métodos estatísticos para correção desse erro está o FDR (*False Discovery Rate*). O FDR é uma opção para a correção de Bonferroni por não ser tão conservativo, dessa forma, as chances de detectar locos que estejam realmente em desequilíbrio de ligação são maiores. Desse modo pode-se dizer que os verdadeiros positivos seriam considerados e que somente os falsos positivos seriam descartados. No caso o FDR é utilizado quando trabalha com milhares de marcadores. Outra metodologia que vem ganhando destaque é o mínimo fator de BAYES (min BF) (GOODMAN, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas para o mapeamento associativo

Foram avaliadas 144 linhagens de feijoeiro. Dessas, 139 foram provenientes dos ensaios: Elite 2006-2008 e 2009-2011, VCU grãos tipo carioca e VCU grãos tipo preto do Biênio 2007-2009 e VCU grãos tipo carioca, preto e cores do biênio 2010 – 2012 (Tabela 2) as outras cinco linhagens foram CNFRJ 10564, G122, JALO EEP 558, ESAL 550, IPR CORUJINHA testemunhas com reações fenotípicas extremas para reação fisiológica ao mofo branco.

Tabela 2 Codificação das linhagens utilizadas dos programas VCU e ELITE

| VCU CARIOCA | | VCU PRETO | | ELITE | | VCU CORES |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| 2007-09 | 2010-12 | 2007-09 | 2010-12 | 2006-08 | 2009-2011 | 2010-12 |
| GENO1 | GENO4 | <u>GENO21</u> | <u>GENO21</u> | <u>GENO15</u> | GENO2 | GENO19 |
| GENO5 | GENO9 | GENO26 | GENO28 | GENO18 | GENO3 | GENO29 |
| GENO6 | <u>GENO15</u> | GENO27 | GENO31 | <u>GENO19</u> | GENO8 | GENO47 |
| GENO7 | <u>GENO44</u> | GENO30 | GENO33 | GENO40 | GENO11 | GENO55 |
| GENO10 | <u>GENO49</u> | GENO32 | GENO36 | GENO42 | GENO12 | GENO90 |
| GENO39 | GENO54 | GENO34 | GENO37 | <u>GENO44</u> | GENO13 | GENO91 |
| GENO41 | GENO58 | GENO35 | GENO38 | <u>GENO49</u> | GENO14 | GENO93 |
| GENO43 | GENO59 | GENO45 | <u>GENO101</u> | GENO50 | GENO16 | GENO94 |
| GENO46 | <u>GENO64</u> | <u>GENO101</u> | <u>GENO103</u> | GENO51 | GENO17 | GENO97 |
| GENO52 | <u>GENO69</u> | <u>GENO103</u> | <u>GENO106</u> | GENO56 | <u>GENO19</u> | GENO99 |
| GENO63 | <u>GENO70</u> | <u>GENO106</u> | GENO127 | GENO60 | GENO20 | GENO100 |
| <u>GENO69</u> | <u>GENO72</u> | GENO111 | GENO128 | GENO62 | GENO22 | GENO125 |
| <u>GENO89</u> | <u>GENO89</u> | GENO134 | GENO130 | <u>GENO64</u> | GENO23 | GENO126 |
| GENO92 | <u>GENO98</u> | GENO135 | GENO132 | GENO66 | GENO24 | GENO129 |
| GENO108 | GENO114 | GENO136 | GENO138 | GENO67 | GENO25 | GENO131 |
| GENO109 | GENO115 | GENO140 | GENO142 | GENO68 | GENO65 | |
| GENO113 | <u>GENO119</u> | | | <u>GENO70</u> | GENO75 | |
| GENO118 | <u>GENO120</u> | | | GENO71 | GENO76 | |
| <u>GENO119</u> | GENO121 | | | <u>GENO72</u> | GENO77 | |
| <u>GENO120</u> | GENO122 | | | GENO73 | GENO78 | |
| GENO137 | GENO123 | | | GENO74 | GENO79 | |
| GENO139 | GENO133 | | | GENO87 | GENO80 | |
| GENO141 | GENO144 | | | GENO88 | GENO81 | |
| GENO143 | | | | <u>GENO89</u> | GENO82 | |
| | | | | GENO95 | GENO83 | |
| | | | | GENO96 | GENO84 | |
| | | | | <u>GENO98</u> | GENO85 | |
| | | | | GENO107 | GENO86 | |
| | | | | <u>GENO110</u> | <u>GENO89</u> | |
| | | | | GENO112 | GENO102 | |
| | | | | GENO116 | GENO104 | |
| | | | | GENO117 | GENO105 | |
| | | | | <u>GENO119</u> | GENO107 | |
| | | | | | <u>GENO110</u> | |
| | | | | | <u>GENO119</u> | |

*linhagens sublinhadas estão presentes em ambos os biênios

3.2 Avaliação da resistência fisiológica do feijoeiro ao mofo branco

Para avaliarmos a resistência fisiológica ao mofo branco dessas 144 linhagens utilizamos o método da ponteira (*straw test*) (PETZOLDT; DICKSON 1996; SINGH, 2008). Inoculou-se o micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* nas safras das secas de 2011, inverno de 2012 e secas de 2013 no campo, cerca de cinco semanas após a germinação, em látice triplo 12 x 12, em dez plantas competitivas de cada parcela de 1 metro de comprimento com cerca de 15 plantas. Também foi realizado um experimento em casa de vegetação em dezembro de 2013 com temperatura de 25°C e umidade de 75% em blocos casualizados com duas repetições de 4 plantas de cada linhagem em vasos de 6 L, na qual o vaso foi considerado como repetição.

Para obtenção do micélio do fungo, para a inoculação via “*straw test*”, os escleródios foram coletados do campo da Fazenda Experimental da FAEPE, submetidos à assepsia e depositados em placas de petri com meio BDA com antibiótico Clorafenicol e Panvit. As placas foram colocadas em câmara incubadora por sete dias, a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Foi necessária a repicagem por meio de discos com um furador de 0,7 mm de diâmetro, para placas contendo meio BDA, para seguir um crescimento mais uniforme do micélio. Após três dias a essa repicagem, a placa ficou coberta com micélio.

Para a inoculação fez-se um corte no ápice do caule principal da planta e colocou-se a ponteira plástica de micropipeta com o disco de ágar em que o micélio foi crescido. Oito dias após a inoculação procedeu-se à avaliação da reação do feijão ao mofo branco, por meio de uma escala diagramática de 1 a 9, (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH, 2008). Em que: 1 - plantas sem sintomas; 2 - invasão do fungo, além do sítio de inoculação, porém, menor do que uma polegada; 3 - invasão do fungo além de uma polegada até antes do primeiro nó; 4 - quando o fungo atinge o primeiro nó; 5 - invasão do fungo além

do primeiro nó, porém, menor do que uma polegada; 6 - invasão do fungo além de uma polegada até antes do segundo nó; 7 - quando o fungo atinge o segundo nó; 8 - invasão do fungo além do segundo nó e 9 - morte da planta.

Ambas as avaliações no campo e na casa de vegetação ocorreram na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG, localizado na região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21°58' de latitude Sul e 42°22' de longitude Oeste. Para as análises de variância individuais de cada safra conduzida em campo e para a avaliação em casa de vegetação utilizou-se a média da parcela. Para a análise conjunta todos os dados (médias das parcelas) das três repetições das três safras avaliadas em campo foram contemplados.

3.3 Extração de DNA e reações de PCR (SSR e AFLP)

As linhagens foram semeadas em substrato plantimax em células de isopor. Aproximadamente uma semana após a germinação coletou-se, em *bulk*, uma folha de 6 plântulas de cada uma das 144 linhagens, cerca de 1 grama de folhas jovens e extraiu-se o DNA pelo protocolo modificado por Hanai et al. (2010). A qualidade e quantificação do DNA genômico foram realizadas em eletroforese em gel de agarose 1%, corados com SYBRSafe (Invitrogen) e suas concentrações estimadas pela intensidade de fluorescência emitida. A quantificação foi baseada na intensidade das concentrações pré-estabelecidas do DNA do fago lambda.

Para cada reação de SSR e SSR-ESTs foi utilizado 20 ng de DNA genômico, 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATD, dCTD, dGTD, dTTD), uma unidade da enzima taq DNA polimerase, 20 mM de Tris pH 8,3, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 µg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10 mM de tartrazina e água, completando 12 µL. A amplificação foi realizada em

termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, seguindo o seguinte programa: dois minutos a 94° C para desnaturação do DNA; 32 ciclos, em que cada ciclo: 20 segundos, à temperatura de 94° C para desnaturação; 20 segundos para anelamento do *primer*, cujas temperaturas variaram de 46 a 68° C, de acordo com o *primer* e 20 segundos a 72° C para síntese de DNA.

As reações de PCR para os marcadores do tipo AFLP foram realizadas conforme descrito por Vos et al. (1995). Após a digestão com as enzimas de restrição EcoRI e MseI e ligação dos oligonucleotídeos adaptadores, o DNA foi amplificado utilizando iniciadores (*primers*) com uma base seletiva (EcoRI-N e MseI-N), em 15 µL de reação, seguindo o seguinte programa: dois minutos a 94° C para desnaturação do DNA, 26 ciclos à temperatura de 94° C, 56° C e 72° C por um minuto para cada temperatura. Após essa etapa, o DNA pré-amplificado foi diluído (1:25) e amplificado novamente utilizando iniciadores com três bases seletivas (EcoRI-NNN e MseI-NNN), cada N correspondente a uma base: A, C, T ou G. Para as reações de PCR utilizou-se 3,0 µL de DNA diluído (10 x) e um volume final de reação de 15 µL amplificados seguindo o seguinte programa: dois minutos a 94° C para desnaturação do DNA, 12 ciclos iniciais de 94 ° C por 30 segundos , 65 ° C por 30 segundos e 72 ° C por um minuto e posteriormente 23 ciclos com a diferença que a temperatura de anelamento foi de 56 ° C e uma extensão final a 72 ° C por 5 minutos.

Após a amplificação (SSR e AFLP) os fragmentos de DNA foram separados em gel vertical de poliacrilamida 8% desnaturante por cerca de três horas e revelados com nitrato de prata (HANAI et al., 2010). A visualização foi feita por meio de transiluminador de luz branca.

3.4 Mapeamento Associativo

Para realização do mapeamento associativo deve-se seguir os seguintes itens 3.4.1 ao 3.4.6.

3.4.1 Avaliação genotípica – via marcadores SSR e AFLP

Na escolha desses marcadores procurou-se por *primers* equidistantes em cada cromossomo, preferencialmente do tipo SSR e SSR-EST (*Expressed Sequence Tag*) e já relacionados às QTL's para resistência ao mofo branco. Alelos com frequência inferior a 5 % não foram inseridos nas análises, devido à maior possibilidade de produzirem efeitos de “confundimento” na geração da matriz Q e K e ao menor poder nos testes de associação. Testes de associação são dependentes da frequência alélica e da diferença fenotípica devida aos alelos daquele loco (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

Para os marcadores SSR os alelos foram anotados/discriminados de acordo com o tamanho do fragmento em pares de base (pb). Foi calculado o PIC (*Polymorphism Information Content*) para medir a informatividade de cada um dos locos gerados, de acordo com a equação:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2 \quad (1)$$

Em que:

PIC: conteúdo de informação polimórfica

P_i : é a frequência de cada alelo do loco marcador

3.4.2 Análise do Desequilíbrio de Ligação (DL)

Para avaliar a resolução da análise associativa deve-se primeiramente estudar o (DL) entre pares de marcadores. Neste caso, estudado pelo parâmetro r^2 que representa originalmente a correlação entre dois alelos (dois por loco) em

2 locos. Quando múltiplos alelos estão presentes uma alternativa é realizar uma média ponderada do r^2 calculado para todas as combinações alélicas entre os pares de locos, ponderadas pela frequência alélica entre cada par de locos. Esse procedimento é realizado pelo teste de permutação rápida no programa TASSEL 2.1 (BRADBURY et al., 2007).

Nesse teste de permutação rápida para determinar-se o r^2 considerou cada grupo de ligação separadamente, evitando que os marcadores pudessem apresentar algum grau de DL com os marcadores de outros(s) grupos de ligação. Alelos com frequência abaixo de 5 % foram excluídos *a priori* em opção disponível no programa TASSEL 2.1. Pares de locos somente foram considerados em DL para p-valores menores do que 0,01.

Para visualização e análise do grau de decaimento do DL no genoma, foram considerados os valores significativos de r^2 obtidos no programa Tassel 2.1 e as distâncias genéticas entre os pares de marcadores (cM), obtidas no mapa consenso do feijoeiro, disponível no *site*: (www.phaseolusgenes.bioinformatics.ucdavis.edu) e nos mapas físico e genético integralizado do feijoeiro (CÓRDOBA et al., 2010). As informações foram sumarizadas em gráfico, sendo utilizada uma linha de tendência logarítmica para assim inferir o tamanho médio dos blocos de ligação (haplótipos).

3.4.3 Análise da estrutura populacional

Para o cálculo da matriz Q utilizou-se os genótipos das linhagens obtidos com esses marcadores, para análise no programa STRUCTURE 2.3.4 via abordagem *bayesiana* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

Para o estudo da estrutura populacional das linhagens utilizou-se somente os dados de genotipagem dos marcadores SSR. No cálculo os seguintes parâmetros foram selecionados: 5 corridas independentes com o número de

subpopulações (s) variando entre 2 e 6 subpopulações, extensão de 100000 “burn-in” e 200000 simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov (MCMC), modelo ancestral de não mistura (*no admixture*) e modo de frequências alélicas correlacionadas.

Para se analisar e selecionar o “s” mais provável realizou-se a média e o desvio padrão dos valores mais prováveis medidos pelo Logaritmo neperiano de Probabilidade dos dados - $\ln P(D)$ de cada “s” das cinco corridas independentes referente a cada “s”. Gerou-se um gráfico com o número de subpopulações no eixo x e o $\ln P(D)$ e o seu desvio padrão no eixo y. A seleção do “s” mais provável se deu quando se teve um pico de aumento no $\ln P(D)$ associado a um baixo desvio padrão (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Para confirmar a seleção desse valor de “s” há outra metodologia designada delta “k” aqui denominada delta “s” desenvolvida por Evanno, Regnault e Goudet (2005).

Nessa metodologia realiza-se a diferença entre o $\ln P(D)$ médio referente a cada subgrupo $s + 1$ e s . Para os valores encontrados realiza-se nova diferença entre os valores de $s + 1$ e s . Multiplica os resultados negativos dessa diferença por menos um de forma a torná-los todos positivos; faz-se o somatório desses resultados. Para se obter o delta “s” de cada subgrupo, divide-se esse somatório pelo valor do desvio padrão calculado para as cinco corridas independentes (5) para cada subgrupo testado (EVANNO; REGNAULT; GOUDET, 2005).

3.4.4 Obtenção da matriz de parentesco K

Já para o cálculo da matriz de coancestralidade (K) entre os genótipos par a par, utilizou-se os marcadores SSR e AFLP no programa SPAGeDi 1.3 (HARDY; VEJEMANS, 2002). Como esse programa inicialmente não analisa marcadores codominantes e dominantes, conjuntamente, transformou-se os dados de AFLP de presença e ausência de banda para 100 e 200pb, pois foram

utilizadas linhagens puras, para assim obter a uma matriz k referente a todos marcadores e por isso mais informativa.

Como parâmetros para geração dessa matriz k selecionou-se o método Ritland (HARDY; VEJEMANS, 2002), indicado para marcadores codominantes e 1.000 permutações. Os valores da diagonal da matriz K obtida no programa SPAGeDi 1.3 foram preenchidos com o valor dois, os valores fora da diagonal multiplicados por dois e os valores negativos de parentesco foram zerados (YU; BUCKLER, 2006), para assim incluir essa matriz de parentesco no modelo misto no programa Tassel 2.1 e realização da análise associativa.

3.4.5 Análise dos dados fenotípicos

Os dados fenotípicos das avaliações da reação ao mofo branco pelo *straw test* foram conferidos quanto à presença de dados *outliers*. Realizou-se a média das parcelas e procedeu-se à análise de variância individual da resistência fisiológica das linhagens ao mofo branco.

Para as avaliações da reação ao mofo branco em campo utilizou-se o delineamento látice triplo e o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + r_j + b_{k(j)} + t_i + e_{ijk} \quad (2)$$

Em que:

Y_{ijk} : observação referente à linhagem i, no bloco k, dentro da repetição j;

m: média geral;

r_j : efeito aleatório da repetição j, sendo j = 1,2,3;

$b_{k(j)}$: efeito aleatório do bloco k, na repetição j, sendo k = 1,2, ..., 12);

t_i : efeito fixo do linhagem i, sendo i = 1,2,3, ..., 144;

e_{ijk} : efeito aleatório do erro experimental, associado à parcela que recebeu a linhagem i , no bloco k , dentro da repetição j . Assumiu-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos, com média zero e variância σ^2 .

Para a avaliação em casa de vegetação utilizou-se o delineamento de blocos casualizados (DBC) conforme o modelo:

$$Y_{ij} = m + r_j + t_i + e_{ijk} \quad (3)$$

Em que:

Y_{ijk} : observação referente à linhagem i no bloco k , dentro da repetição j ;

m : média geral;

r_j : efeito aleatório da repetição j , sendo $j = 1, 2$;

t_i : efeito fixo da linhagem i , sendo $i = 1, 2, 3, \dots, 144$;

e_{ijk} : efeito aleatório do erro experimental, associado à parcela que recebeu a linhagem i , no bloco k , dentro da repetição j . Assumiu-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos, com média zero e variância σ^2 .

Foi realizada a análise conjunta com as médias das parcelas de todas as repetições das três safras conduzidas em campo. Para isso, certificou-se que os quadrados médios dos erros das análises individuais fossem semelhantes, pelo teste de Hartley de homogeneidade de variância e utilizou-se o seguinte modelo para a análise conjunta:

$$Y_{ijk(1)} = m + a_1 + t_i + r_{j(1)} + b_{k(i)} + (ta)_{ik} + e_{ijk(1)} \quad (4)$$

Em que:

Y_{ijkl} : observação referente à linhagem i no bloco k , dentro da repetição j , na safra l ;

m : média geral;

a_l : efeito fixo safra l , sendo l =secas 2011, inverno 2012 e secas 2013;

t_i : efeito fixo do linhagem i , sendo $i = 1, 2, 3, \dots, 144$;

$r_{j(l)}$: efeito aleatório da repetição j , dentro da safra l , sendo ($j = 1, 2, 3$);

$b_{k(jl)}$: efeito aleatório do bloco k , dentro da repetição j e da safra l , sendo ($k = 1, 2, \dots, 12$);

$(ta)_{il}$: efeito fixo da interação entre linhagem i e a safra l ;

$e_{ijk(l)}$: é o erro experimental médio.

3.4.6 Análises associativas

A análise de associação entre os marcadores e as características fenotípicas foi realizada usando os modelos lineares mistos (MLM) no programa Tassel versão 2.1, específico para marcadores SSR, onde os marcadores testados e os dados referentes à subpopulação (matriz Q) foram considerados como fatores de efeito fixo, enquanto a matriz de parentesco foi considerada como um fator de efeito aleatório. A matriz de parentesco (K) foi obtida a partir do programa SPAGeDi versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002).

Para identificação de marcadores ligados aos QTL's associados ao mofo branco, segundo, Yu e Buckler (2006) o modelo original para a análise associativa é:

$$y = X\beta + S\alpha + Qv + Zu + \epsilon \quad (5)$$

em que:

y : vetor de observações fenotípicas;

β : vetor de efeitos fixos (outros efeitos diferentes dos marcadores e da estrutura populacional);

α : vetor de efeito fixo dos marcadores – analisados individualmente;

v : vetor do efeito fixo da estrutura da população;

u : vetor dos efeitos poligênicos aleatórios desconhecidos;

e : vetor aleatório do efeito do resíduo;

Q : matriz do programa STRUCTURE que relaciona y a v .

X , S e Z são matrizes de incidência (compostas por zeros e uns), que relaciona o y à α e u , respectivamente.

Devido à complexidade desse modelo optou-se por separá-lo em dois estágios. O primeiro estágio é para resolução do termo $X\beta$ desse modelo, o qual foi calculado pela análise de variância de cada safra individual e da análise conjunta obtida via modelos mistos no *proc mixed* no programa SAS. As médias ajustadas obtidas nessas análises passaram a ser o vetor das observações fenotípicas “ y ”. Dessa forma segundo o programa Tassel 2.1 o modelo utilizado foi:

$$Y = \text{marcador} + Q1 + Q2 + K \quad (6)$$

Em que:

Y : médias ajustadas obtidas nas análises de variância

$Q1$: subpopulação 1

$Q2$: subpopulação 2

K : matriz de parentesco entre os indivíduos par a par

Todas as associações com p -valor > 0.03 foram desconsideradas das análises posteriores. As associações restantes foram submetidas à correção para

múltiplos testes. Para tal utilizou-se o cálculo do menor fator bayesiano *Minimum Bayes Factor* – min BF (GOODMAN, 2001) equação 7.

$$\text{minBF} = -e * p * \ln(p) \quad (7)$$

Em que:

e: algoritmo neperiano;

p: o p-valor da associação entre marcador e a reação do feijoeiro ao mofo branco.

Tabela 3 Interpretação Bayesiana dos P-valores

| P-valor | mBF | $- e * p * \ln(p)$ | Força da evidência |
|---------|-------|--------------------|---------------------|
| 0,1 | 0,26 | 0,6 | Fraca |
| 0,05 | 0,15 | 0,4 | Moderada |
| 0,03 | 0,1 | 0,3 | Moderada |
| 0,01 | 0,04 | 0,13 | Moderada à forte |
| 0,001 | 0,005 | 0,02 | Forte a muito forte |

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como estimativa do tamanho médio dos blocos de ligação adotou-se a distância genética, onde ocorreu o cruzamento da linha de tendência logarítmica com o valor de r^2 correspondente a 0.05. Ao considerar as linhagens em estudo e os marcadores utilizados verifica-se que os blocos haplotípicos estendem-se por cerca de 40 cM (Figura 4). Dessa forma considera-se viável o mapeamento de QTL's com um número “menor” de marcadores, devido à “grande” extensão dos blocos haplotípicos. Segundo Flint-Garcia, Thornsberry e Buckler (2003) uma grande saturação de marcadores no genoma, neste caso, não teriam teoricamente “em média” implicações muito maiores na resolução do mapeamento.

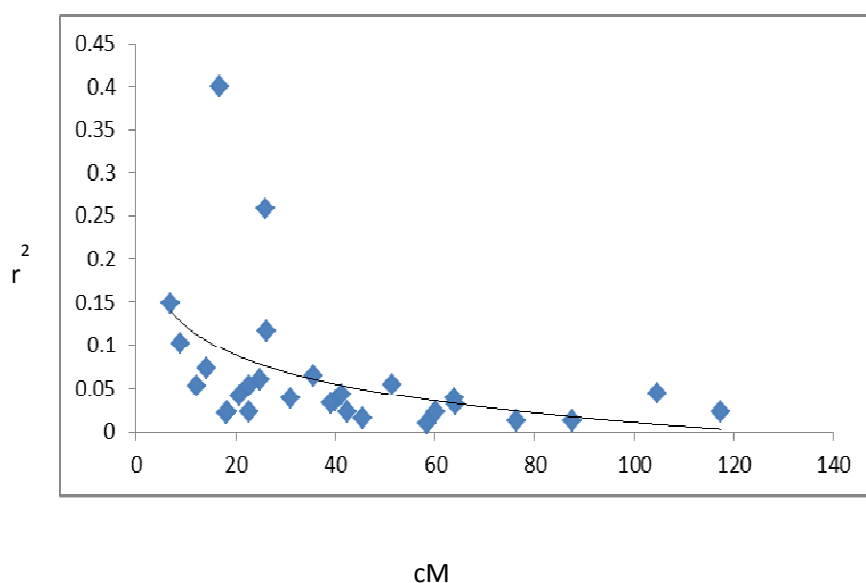


Figura 4 Queda do desequilíbrio de ligação conforme a distância genética (cM) entre pares de marcadores utilizados no mapeamento associativo

No entanto a extensão do DL varia ao longo do genoma. Nas regiões onde as extensões de DL são mais curtas a abordagem associativa para genes

candidatos é favorecida, mas também exigirá um grande número de marcadores. Em cevada Kraakman et al. (2006) para determinados locos marcadores proximamente ligados praticamente não se encontrou DL, e para alguns locos marcadores bem distantes o DL foi muito alto.

Caso se tenha interesse em detalhar alguma região específica do genoma responsável por determinada característica via a abordagem de genes candidatos e considerasse os blocos haplotípicos naquela região com cerca de 1 cM seriam necessários marcadores distribuídos também nessa distância de 1 cM (BASTIEN; SONAH; BELZILE, 2014; TOMASSINI; SCHNURBUSCH; FOSSATI, 2007).

Na análise da estrutura da população gerada pelo genótipo das linhagens com os 45 marcadores microssatélites (SSR), foram detectados 152 alelos. Os marcadores SSR identificaram de dois a sete alelos por loco com média de 3,4 alelos por loco (Tabela A1- ANEXOS). Alelos com frequência inferior a 5 % foram tratados como dados perdidos por contribuírem para vieses de covariância entre marcadores e estrutura da população e assim maior chance de erro tipo 1. Como essas linhagens já sofreram intenso processo de seleção o nível de polimorfismo gerado foi considerado satisfatório, Cardoso (2009). A análise da estrutura da população indicou a estruturação do grupo de linhagens em três subpopulações, conforme Figura 5.

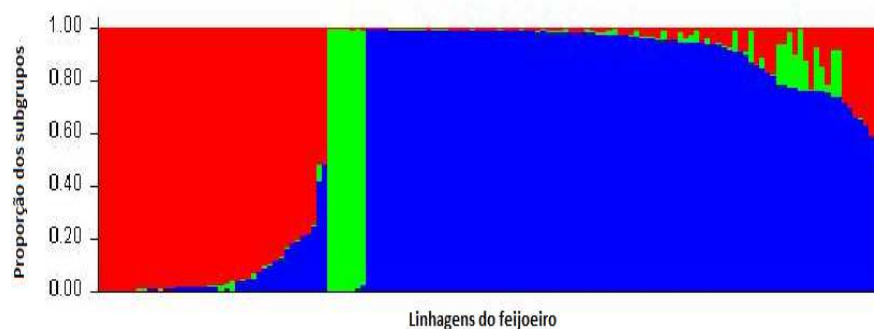


Figura 5 Teste de atribuição para as linhagens do VCU e ELITE aos subgrupos ($k=3$). Os diferentes genótipos estão representados por linhas verticais, sendo os de mesma cor pertencentes ao mesmo grupo. Diferentes cores na linha vertical (mesmo indivíduo) indicam a porcentagem do genoma compartilhado com os demais grupos

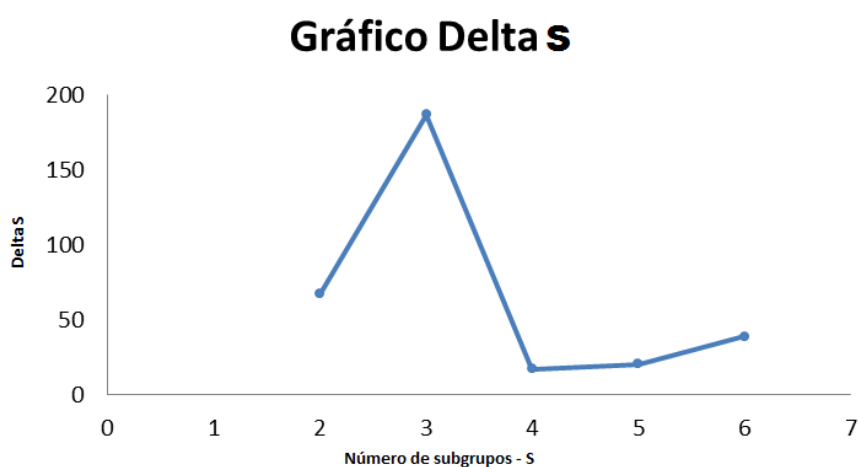


Figura 6 Valores de Δs para cada valor de s. O maior valor de Δs corresponde ao número ótimo de subgrupos

A tendência do agrupamento ocorreu quanto aos programas de melhoramento UFLA/EMBRAPA grupo em azul no gráfico; o segundo grupo em vermelho com a maioria das linhagens da UFV e o terceiro grupo em verde para os feijões do grupo, cores que são na maioria feijões andinos. Geralmente em estudos de “painéis associativos” são utilizados genótipos de bancos de germoplasma representativos da diversidade da espécie e a divisão dos grupos corresponde aos diferentes centros de origem ou de domesticação.

No caso do feijoeiro tem-se definido pelo menos 2 centros de origem, um na América Central que é o feijão caracteristicamente de tamanho do grão menor e o outro do tipo andino, que faz referência aos países nos quais se situa o

segundo centro de origem do feijão, que fazem fronteira com a cordilheira dos Andes, com grãos caracteristicamente maiores. Em outro estudo de mapeamento associativo com cerca de 395 linhagens de feijoeiro, a população foi estruturada em subgrupos correspondentes aos centros de origem andino e mesoamericano (CHUN; NAVABI; YU, 2011).

Com relação ao possível alto parentesco entre esses genótipos e possível estruturação destes em apenas um grupo na análise da estrutura populacional é preciso salientar que nestes grupos “VCU” estão em teste linhagens de três programas de melhoramento diferentes: o da Embrapa Arroz e Feijão e os programas da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e da Universidade Federal de Viçosa (UFV), além de estarem presentes linhagens do programa VCU cores que possuem alguns genótipos de origem andina. Dessa forma procurou-se contornar o alto grau de parentesco.

Para estudos de mapeamento associativo é fundamental uma fenotipagem com boa precisão experimental. Para a reação ao mofo branco notou-se boa precisão dos experimentos (Tabela 4) tanto os realizados a campo quanto aqueles em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. O grupo de linhagens apresentou grande variabilidade fenotípica quanto à resistência fisiológica ao mofo branco, com as médias variando em torno de 3,8 a 6,5 no campo e 4,4 a 7,5 na casa de vegetação e ótima precisão fenotípica.

Quanto à fonte de variação, interação Safras x Linhagens (Tabela 4), embora tenha sido significativa esta foi de baixa magnitude, cerca de 23%, quando comparada a fonte de variação Linhagens. Esse fato é comum quando a resistência é do tipo horizontal. Como componente dessa interação deve-se considerar a influência dos mecanismos de escape, com destaque para o porte. Devido à maior variação do porte das linhagens na safra das águas não avaliou-se as linhagens nesta safra.

Tabela 4 Resumo das análises de variância individuais e conjunta para resistência fisiológica ao mofo branco

| QUADRADO MÉDIO – | | | | | |
|------------------|------------|--------------|------------|----------|-------------------|
| FV | Secas 2011 | Inverno 2012 | Secas 2013 | Conjunta | Casa de vegetação |
| Safras | | | | 237.1** | |
| Linhagens | 1.0986** | 1.452** | 0.4659** | 1.7574** | 1.1543** |
| Safras*Linhagens | | | | 0.4136** | |
| Erro | 0.347 | 0.2432 | 0.159 | 0.2507 | 0.1427 |
| Rgg (acurácia) | 0.83 | 0.87 | 0.81 | 0.89 | 0.92 |
| Nota média | 5.1 | 5 | 4.55 | 4.96 | 5.5 |

* e **. Significativos, respectivamente, a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quanto às análises associativas, utilizou-se o modelo MLM cuja metodologia proposta por Yu e Buckler (2006) é a que oferece maior confiabilidade, pois considera tanto a divisão dos indivíduos em grupos (matriz Q) quanto o parentesco par a par entre os indivíduos (matriz de parentesco K), de modo a evitar associações espúrias. Na estimativa do parentesco (matriz K) foram incluídos os marcadores microsatélites (45) e (136) marcadores AFLP. O conteúdo informativo polimórfico (PIC) dos marcadores SSR está na tabela A1 e dos marcadores AFLP na tabela A2.

Entre as marcas mais importantes e consistentes para reação ao mofo branco merecem destaque entre os marcadores do tipo SSR, o BMd15 e o BMd20 e entre os marcadores do tipo AFLP o EagcMcag810 e EaaaMcat655 (Tabela 5). É importante frisar que esses QTL's foram confirmados/identificados diretamente em linhagens-elite com alto potencial produtivo e estão diretamente em uso nos programas de melhoramento do estado de Minas Gérias.

A marcas BMd15 e o BMd20 foram inicialmente detectadas/confirmadas nos estudo de Miklas et al. (2013) e Soule et al. (2011).

Soule et al. (2011) objetivaram confirmar QTL's já identificados em outros estudos e identificar novos QTL's diretamente relacionados na resistência ao mofo branco em duas populações biparentais em casa de vegetação e

diretamente em campo infestado pelo patógeno. Posteriormente, Miklas et al. (2013), além da resistência fisiológica propriamente dita, estudou mais profundamente os ditos mecanismos de escape envolvidos na resistência ao patógeno. Principalmente àqueles envolvidos na determinação do porte das plantas tais como acamamento, porosidade/arquitetura do dossel, altura e comprimento dos internódios em variadas linhagens dos ensaios de determinação do nível de resistência a variadas doenças, entre elas o mofo branco entre os anos de 2001 a 2011.

Tabela 5 Análise Associativa para seleção ao Mofo branco

| Secas 2011 - LAVRAS | | | | | | |
|-----------------------|------------|---------|---------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| Marcador | GL(alelos) | teste F | p valor | $-e*p*\ln(p)$ | R ² marcador | R ² modelo |
| BMD20 | 3 | 3,59 | 0,0156 | 0,18 | 0,11 | 0,96 |
| PV87 | 4 | 3,01 | 0,0208 | 0,22 | 0,12 | 0,95 |
| EagcMcag810 | 1 | 5,43 | 0,0214 | 0,22 | 0,09 | 0,98 |
| EaaaMcat655 | 1 | 4,66 | 0,0326 | 0,30 | 0,07 | 0,98 |
| Inverno 2012 - LAVRAS | | | | | | |
| EaacMcaa475 | 1 | 4,55 | 0,0349 | 0,32 | 0,06 | 0,84 |
| PVESTBR207 | 3 | 2,85 | 0,04 | 0,35 | 0,07 | 0,85 |
| BMD20 | 3 | 2,59 | 0,0557 | 0,44 | 0,07 | 0,83 |
| PV198 | 6 | 2,10 | 0,0574 | 0,44 | 0,09 | 0,81 |
| Secas 2013- LAVRAS | | | | | | |
| PVESTBR8 | 5 | 3,82 | 0,0029 | 0,05 | 0,17 | 0,95 |
| BMD20 | 3 | 4,21 | 0,0072 | 0,10 | 0,13 | 0,96 |
| PVESTBR221 | 2 | 4,79 | 0,0103 | 0,13 | 0,14 | 0,95 |
| BMD15 | 3 | 3,72 | 0,0132 | 0,15 | 0,11 | 0,92 |
| Análise conjunta | | | | | | |
| EagcMcag810 | 1 | 9,14 | 0,003 | 0,05 | 0,12 | 0,83 |
| BMD15 | 3 | 4,52 | 0,0048 | 0,07 | 0,12 | 0,82 |
| BMD20 | 3 | 4,41 | 0,0055 | 0,08 | 0,12 | 0,83 |
| EaaaMcat655 | 1 | 6,40 | 0,0125 | 0,15 | 0,08 | 0,84 |
| Casa de vegetação | | | | | | |
| EagcMcag810 | 1 | 9,90 | 0,0021 | 0,04 | 0,13 | 0,83 |
| BMD15 | 3 | 4,38 | 0,0057 | 0,08 | 0,12 | 0,84 |
| EagcMcag600 | 1 | 7,58 | 0,0068 | 0,09 | 0,10 | 0,83 |
| BMD20 | 3 | 3,44 | 0,019 | 0,20 | 0,09 | 0,83 |
| PV198 | 6 | 2,57 | 0,0219 | 0,23 | 0,12 | 0,81 |
| EaaaMcat655 | 1 | 4,50 | 0,0356 | 0,32 | 0,06 | 0,84 |

*valores de $-e*p*\ln(p) < 0,13$ indicam moderada à forte evidência de significância

Fonte: Goodman (2001) tabela 7.

A identificação dos QTL's para mofo branco segue a nomenclatura sugerida por Miklas e Porch (2010). Por exemplo, o QTL WM 5.1^{PX} identificado pelo marcador SSR BMD20 código WM refere-se a característica

White Mold, mofo branco em inglês o 5 faz menção ao cromossomo 5, o índice 1 a ordem de descoberta de QTL's para resistência ao mofo branco naquele cromossomo, e o índice PX faz menção às iniciais dos genitores da população ao qual ele foi originalmente descoberto, no caso PC50/XAN-159.

Este QTL WM 5.1^{PX} identificado pelo marcador BMd20 foi importante em praticamente todas análises de associação conforme tabela 6 e está diretamente relacionado à resistência fisiológica ao mofo branco em campo e em casa de vegetação conforme Miklas et al. (2013) e Soule et al. (2011). Já a região WM 4.2^{R31, TL} identificada pelo marcador BMd15 no trabalho de Soule et al. (2011) foi inicialmente relacionada à resistência fisiológica, porém posteriormente no estudo de Miklas et al. (2013) verificaram que esta região está diretamente relacionada ao porte/acamamento e altura das plantas.

Dessa forma é possível que esta região seja composta de genes pleiotrópicos tanto para resistência fisiológica quanto para a determinação do porte das plantas. Esses QTL's confirmados neste estudo estão integrados no mapa principal de marcadores SSR do feijoeiro comum desenvolvido por Blair et al. (2003).

Para os marcadores do tipo AFLP com destaque para o EagcMcag810 e EaaaMcat655 podem estar ligados à QTL's não identificados ou estarem próximas à QTL's já identificados para resistência fisiológica e portanto, necessitam ser mapeados em populações ditas de cruzamento controlados F₂, Retrocruzamento ou RIL's de preferência em cultivares adaptadas às condições agrônomicas do estado de Minas Gerais (HANAI et al., 2010).

Quanto aos marcadores PVESTBR8, PVESTBR221 e o PV 198, identificados em apenas algumas safras, há uma maior chance de estarem relacionados aos mecanismos de escape envolvidos na resistência, principalmente o porte. Quanto ao PV198 identificado na safra inverno 2012 e na análise da inoculação na casa de vegetação, de acordo com a base de dados

“*Phaseolus genes*” há uma discordância na sua posição. Esse marcador foi mapeado em posições diferentes do cromossomo 6, para cada uma das duas populações biparentais as quais o mapearam. Pode ser que seja um novo QTL identificado ou até mesmo o QTL para resistência ao mofo branco do cromossomo 6 (BM170) identificado por Perez-Vega et al. (2012), e confirmado por Miklas et al. (2013).

Quanto ao efeito dos marcadores (R^2) nas análises associativas foram de certa forma semelhantes aos encontrados nas populações biparentais onde foram detectados/confirmados em estudo de revisão Miklas et al. (2013) e Soule et al. (2011). No caso, por exemplo, do BMd15 identificado por Soule et al. (2011) o R^2 encontrado foi de 15% e neste caso foi de 11%. É importante salientar que essas linhagens avaliadas foram selecionadas anteriormente com base em vários caracteres agrônômicos, em diferentes ambientes, onde, na maioria não ocorreu a presença/seleção para o mofo branco. Portanto, no geral, não houve pressão de seleção para resistência ao mofo branco, o que tende a levar a erosão de alelos de resistência.

Depois de identificadas as associações com maiores graus de confiança (Tabela 6) a próxima informação para programas de melhoramento que venham a utilizar a seleção assistida como ferramenta é a determinação de quais alelos para os locos marcadores de interesse estão relacionados com o fenótipo de interesse no caso com um maior nível de resistência fisiológica ao mofo branco. Entre os métodos mais simples propostos está a avaliação das médias fenotípicas de cada alelo do loco/ marcador associado à característica de interesse (WANG et al., 2008).

Na tabela 6 encontram-se os principais alelos dos marcadores que identificam os QTL's, para resistência fisiológica ao mofo branco detectados na análise conjunta dos experimentos de campo e na avaliação da casa de

vegetação. Nas tabelas em anexos A1 e A2 se encontra o Conteúdo Informativo do Polimorfismo (PIC) dos marcadores do tipo SSR e AFLP

Tabela 6 Efeito dos alelos dos marcadores de QTL's para resistência fisiológica das linhagens de feijoeiro ao mofo branco na média ajustada das notas (1 a 9) das inoculações de mofo branco via straw test das análises de variância conjunta e da casa de vegetação das linhagens

| Marcador | alelos (pb) | | | |
|--------------------|-------------|------|------|------|
| BMd15 | 230 | 235 | 250 | 252 |
| Frequência alélica | 0,08 | 0,12 | 0,71 | 0,09 |
| Análise conjunta | 5,1 | 4,4 | 5 | 5,2 |
| Casa de vegetação | 5,5 | 4,5 | 5,6 | 5,7 |
| BMd20 | 170 | 180 | 190 | 195 |
| Frequência alélica | 0,08 | 0,11 | 0,64 | 0,17 |
| Análise conjunta | 4,5 | 4,8 | 5 | 4,9 |
| Casa de vegetação | 4,6 | 5,8 | 5,5 | 5,7 |
| EagcMcag810 | 0 | 1 | | |
| Frequência alélica | 0,58 | 0,42 | | |
| Análise conjunta | 5,14 | 4,8 | | |
| Casa de vegetação | 5,7 | 5,2 | | |
| EaaaMcat655 | 0 | 1 | | |
| Frequência alélica | 0,28 | 0,72 | | |
| Análise conjunta | 5,2 | 4,91 | | |
| Casa de vegetação | 5,2 | 5,7 | | |

Outra questão a ser abordada é o poder dos testes de associação. Para alelos em frequência baixa (5%) os testes associativos têm baixo poder. O marcador PV198 teve sete alelos identificados nas linhagens estudadas. Nesses casos deve testá-los em cruzamentos biparentais adaptados e contrastantes para os alelos que apontaram as maiores diferenças fenotípicas na média da resistência à doença, para comprovação da sua importância na seleção assistida. Esse procedimento é chamado de *Joint Family Mapping* (MYLES et al., 2009).

Como o mapeamento associativo é mais uma ferramenta para auxiliar no entendimento da composição do genoma e os fenótipos de interesse, é

fundamental a associação com o mapeamento de QTL's em cruzamentos controlados, para certificação dos marcadores em forte associação com o fenótipo de interesse, para a seleção assistida por marcadores moleculares auxiliar o melhoramento de plantas (BASTIEN; SONAH; BELZILE, 2014).

Outro estudo importante, no qual se utilizou ambas as metodologias foi em soja para confirmação/deteção de QTL's envolvidos na reação ao mofo branco (BASTIEN; SONAH; BELZILE, 2014). Entre as regiões identificadas, relacionadas à resistência fisiológica, destacou-se uma no cromossomo 15, com um SNP altamente significativo, cercado por outros dois SNP's também significativos. Assim desenvolveu-se um marcador codominante para a região de interesse. A validação da marca ocorreu em duas populações nas 24 progênies homozigotas contrastantes (em cada uma das duas populações) para o alelo de resistência ou de suscetibilidade e confirmada nas progênies $F_{4,6}$, respectivas. Como resultado as progênies com o alelo de resistência apresentaram lesões 17.6 mm menores em média do que aquelas que carregavam o alelo de suscetibilidade para a doença.

Devido à complexidade da resistência a essa doença evidenciada em revisões de mapas de QTL's comparativos em diversos cruzamentos biparentais chegando a encontrar 79 QTL's envolvidos na resistência fisiológica e aos mecanismos de escape, Miklas et al. (2013) sugerem utilizar o melhoramento assistido por marcadores com cautela. A seleção de indivíduos com maiores níveis de resistência deve ser realizada em campo, ou seja, o mais próxima possível às condições de manejo da cultura seja em campos infestados com testemunhas para monitorar e corrigir as variações ocorridas em campo e preferencialmente via *straw test* em linhagens adaptadas ao ambiente local com alto potencial produtivo e caracteres agronômicos.

5 CONCLUSÕES

Mesmo em um painel de linhagens dos programas VCU e ELITE, ou seja, sob forte seleção, foi possível, via modelos mistos, levando-se em conta a estrutura da população e da matriz de parentesco “K” confirmou-se e identificou-se marcadores de QTL’s para o mofo branco. Esses novos QTL’s identificados devem ser confirmados em populações biparentais de preferência adaptadas às condições do estado de Minas Gerais.

O mapeamento associativo mostra-se uma técnica de muito potencial no melhoramento de plantas, podendo como neste caso ser aplicada diretamente nas linhagens-elite dos programas de melhoramento, com o benefício de dados fenotípicos de qualidade acumulados durante um extenso período. Dessa forma pode orientar futuros cruzamentos com o intuito de aumentar os ganhos com a seleção.

REFERÊNCIAS

- ABDURAKHMONOV, Y. I.; ABDUKARIMOV, A. Application of association mapping to understand the genetic diversity of plant germplasm resources. **International Journal of Plant Genomics**, New York, p. 1-18, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423417/>>. Acesso em: 22 jul. 2014.
- ANTONIO, R. P. et al. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 733-740, 2008.
- BASTIEN, M.; SONAH, H.; BELZILE, F. Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping-by-sequencing approach. **Plant Genome**, Davis, v. 7, p. 1-13, 2014.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. 2nd ed. Woodbury: Stemma, 2010.
- BLAIR, M. W. et al. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 1362-1374, 2003.
- BRADBURY, P. J. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2633–2635, 2007.
- BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M. E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics**, Austin, v. 172, p. 1165–1177, 2006.
- CARDOSO, J. M. K. **Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares**. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto de Agricultura de Campinas, Campinas, 2009.
- CARNEIRO, F. F. ; SANTOS, J. B.; LEITE, M. E. Marker-assisted backcrossing using microsatellites and validation of SCAR Phs marker for resistance to white mold in common bean. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.12, n. 6, p. 9, 2010.

CHUN, S.; NAVABI, A.; YU, K. Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, p. 52, 2011.

COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, p. 169-196, 2005.

COLLICCHIO, E.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho dos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 297-304, mar. 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos safras 2012/2013 – segundo levantamento**. Brasília, 2012. 33 p.

CÓRDOBA, J. M. et al. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 436, 2010.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, p. 22-32, 2002.

EVANNO, G.; REGNAULT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

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

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, I. V. E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **The Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357–374, 2003.

FREYRE, R. et al. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 847–856, 1998.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **Hortscience**, Alexandria, v. 33, p. 1124-1130, 1998.

GOODMAN, S. N. Of P-Values and bayes: a modest proposal. **Epidemiology**, Baltimore, v. 12, n. 3, p. 295-297, May 2001.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 461-485, 2005.

HANAI, L. R. et al. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 266-277, 2007.

HANAI, L. R. et al. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 25-45, 2010.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.

HUANG, H. C.; MUNDEL, H. H.; ERICKSON, R. S. Effect of physiological resistance and plant architecture on yield of dry bean under disease pressure of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 45, p. 169-176, July 2003.

HUNTER, J. E.; ABAWI, G. S.; CROISER, D. C. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Report**, Washington, v. 62, n. 7, p. 633-637, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 1920/1996**. Rio de Janeiro, 1997. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=AGRO34&t=producao-vegetal>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

JANNINK, J. L.; BINK, M.; JANSEN, R. C. Using complex plant pedigrees to map valuable genes. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 337-342, 2001.

KARL, A. C.; NASSER, L. C. B.; CAFÉ FILHO, A. C. Mofa Branco do feijoeiro, *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary, em áreas irrigadas nos cerrados. In: ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA, 2., 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV/DFP, 1997. p. 18-23.

KRAAKMAN, A. T. W. et al. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 17, p. 41-58, 2006.

LOPES, R. **Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo**. 2003. 126 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

MATOS, J. W. **Análise crítica do programa de melhoramento do feijoeiro da UFPA no período de 1974 a 2004**. 2005. 116 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MIKLAS, P. N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 525-543, Mar. 2013.

MIKLAS, P. N. et al. Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 45, p. 125-129, 2002.

MIKLAS, P. N.; PORCH, T. Guidelines for common bean QTL nomenclature. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 53, p. 202-204, 2010.

MYLES, S. et al. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 2194-2202, 2009.

NACHMAN, M. W. "Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans". **Trends in Genetics**, London, v. 17 n. 9, p. 481-485, 2001.

NODARI, R. O. et al. Towards an integrated linkage map of common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 513-520, 1993.

PÉREZ-VEGA, E. et al. Mapping QTL conferring partial physiological resistance to white mold in the common bean RIL population Xana/Cornell 49242. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 29, p. 31-41, 2012.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142–143, 1996.

PRICE, L. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, London, v. 38, p. 904–909, 2006.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945–959, 2000.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 41–66.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, P. S. Breeding Common Bean for resistance to white Mold: a review. **Crop Science**, Madison, v. 53, p. 1832–1844, 2013.

SINGH, S. P. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 49, p. 115–116, 2008.

SOULE, M. et al. Comparative QTL map for whitemold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31.2011. **Crop Science**, Madison, v. 51, p. 123–139, 2011.

THIEL, T. et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 411–422, 2003.

TOMMASINI, L.; SCHNURBUSCH, T.; FOSSATI, D. Association mapping of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in modern European winter wheat varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 115, p. 697–708, 2007.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA-fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

WANDER, A. E. Socioeconomia. In: RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; GUILHERME, S. R. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2015-2017**. Lavras: FUNDECC, 2014. p. 15–35.

WANG, J. et al. Association mapping of iron deficiency chlorosis loci in soybean (*Glycine max* L. Merr.) advanced breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 116, p. 777-787, 2008.

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 155–160, 2006.

ZHU, C. et al. Status and prospects of association mapping in plants. **The Plant Genome**, Madison, v. 1, p. 5-20, 2008.

ANEXOS

Tabela A1 Análise do Conteúdo Informativo do Polimorfismo (PIC) dos marcadores SSR

| GL | Posição | Loco | PIC | Número de alelos |
|------|---------|------------|------|------------------|
| b01h | 0 | BM201 | 0.50 | 4 |
| b01h | 34.3 | PVESTBR233 | 0.66 | 3 |
| b01h | 60.1 | PVESTBR221 | 0.41 | 3 |
| b01h | 86.4 | PVESTBR271 | 0.52 | 4 |
| b02d | 30.6 | PVESTBR8 | 0.62 | 3 |
| b02d | 37.7 | PVESTBR355 | 0.12 | 2 |
| b02d | 53.4 | BM143 | 0.73 | 7 |
| b02d | 65.1 | BMD19 | 0.49 | 2 |
| b02d | 87.9 | PV25 | 0.77 | 5 |
| b02d | 98.8 | BMD18 | 0.10 | 2 |
| b03c | 166.2 | BM156 | 0.71 | 5 |
| b03c | 33.7 | PV87 | 0.24 | 4 |
| b03c | 80.3 | SSR844 | 0.49 | 3 |
| b03c | 98.2 | PVESTBR246 | 0.11 | 2 |
| b04b | 0 | BMD15 | 0.60 | 4 |
| b04b | 14.1 | PVESTBR86 | 0.09 | 2 |
| b04b | 36.4 | BM149 | 0.20 | 2 |
| b04b | 58.5 | PVESTBR29 | 0.14 | 2 |
| b05e | 4.5 | PVESTBR137 | 0.80 | 7 |
| b05e | 28.1 | BM138 | 0.16 | 3 |
| b05e | 40.5 | PV93 | 0.68 | 4 |
| b05e | 70.6 | PVESTBR207 | 0.68 | 4 |
| b05e | 92 | BMD20 | 0.56 | 4 |
| b06g | 10 | PVEST23 | 0.38 | 2 |
| b06g | 35 | PV198 | 0.47 | 4 |
| b06g | 74.2 | BM170 | 0.63 | 4 |
| b06g | 86.5 | PV5 | 0.70 | 6 |
| b07a | 6.2 | BM185 | 0.69 | 4 |
| b07a | 86.6 | PVESTBR34 | 0.73 | 4 |
| b08f | 87.6 | BMD25 | 0.10 | 2 |
| b08f | 22.4 | PVESTBR336 | 0.59 | 3 |
| b08f | 41.5 | PVESTBR10 | 0.61 | 4 |
| b08f | 49 | BM151 | 0.41 | 3 |
| b08f | 58 | BM189 | 0.60 | 3 |
| b08f | 96 | PVESTBR204 | 0.42 | 3 |
| b08f | 112.2 | PVESTBR98 | 0.62 | 3 |
| b09k | 18 | BM141 | 0.44 | 2 |
| b09k | 38.7 | PVESTBR73 | 0.11 | 2 |
| b09k | 82.3 | PV168 | 0.11 | 2 |
| b09k | 95.8 | PVESTBR272 | 0.54 | 3 |
| b10i | 30.1 | PVESTBR17 | 0.72 | 5 |
| b10i | 72.3 | GATS11 | 0.38 | 3 |
| b11k | 40.4 | PVESTBR62 | 0.42 | 3 |
| b11k | 87.7 | PVESTBR205 | 0.63 | 3 |
| b11k | 98.4 | PVESTBR71 | 0.12 | 2 |

Tabela A2 Análise do Conteúdo Informativo do Polimorfismo (PIC) dos marcadores AFLP

| AFLP | PIC | AFLP | PIC | AFLP | PIC | AFLP | PIC |
|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| EaaaMcac165 | 0.33 | EaaaMcat460 | 0.50 | EaacMcaa156 | 0.33 | EacaMctc115 | 0.50 |
| EaaaMcac171 | 0.36 | EaaaMcat467 | 0.31 | EaacMcaa182 | 0.17 | EacaMctc125 | 0.45 |
| EaaaMcac180 | 0.11 | EaaaMcat469 | 0.08 | EaacMcaa185 | 0.37 | EacaMctc335 | 0.19 |
| EaaaMcac185 | 0.25 | EaaaMcat480 | 0.49 | EaacMcaa195 | 0.38 | EacaMctc375 | 0.50 |
| EaaaMcac210 | 0.50 | EaaaMcat560 | 0.49 | EaacMcaa240 | 0.46 | EacaMctc425 | 0.49 |
| EaaaMcac225 | 0.48 | EaaaMcat565 | 0.07 | EaacMcaa320 | 0.36 | EacaMctc565 | 0.18 |
| EaaaMcac320 | 0.14 | EaaaMcat655 | 0.38 | EaacMcaa340 | 0.18 | EacaMctc630 | 0.47 |
| EaaaMcac350 | 0.14 | EaaaMcat690 | 0.20 | EaacMcaa360 | 0.29 | EacaMctc635 | 0.39 |
| EaaaMcac390 | 0.30 | EaaaMctc95 | 0.16 | EaacMcaa405 | 0.20 | EacaMctc700 | 0.42 |
| EaaaMcac420 | 0.50 | EaaaMctc130 | 0.47 | EaacMcaa415 | 0.50 | EacaMctc750 | 0.49 |
| EaaaMcac440 | 0.43 | EaaaMctc175 | 0.27 | EaacMcaa435 | 0.33 | EacaMctc850 | 0.30 |
| EaaaMcac510 | 0.21 | EaaaMctc178 | 0.35 | EaacMcaa454 | 0.10 | EacgMcat235 | 0.12 |
| EaaaMcac600 | 0.36 | EaaaMctc190 | 0.22 | EaacMcaa475 | 0.48 | EacgMcat260 | 0.24 |
| EaaaMcac635 | 0.50 | EaaaMctc210 | 0.09 | EaacMcaa485 | 0.26 | EacgMcat320 | 0.30 |
| EaaaMcaa360 | 0.17 | EaaaMctc230 | 0.34 | EaacMcaa497 | 0.35 | EacgMctc135 | 0.42 |
| EaaaMcaa400 | 0.30 | EaaaMctc265 | 0.19 | EaacMcaa510 | 0.20 | EacgMctc165 | 0.18 |
| EaaaMcat140 | 0.08 | EaaaMctc450 | 0.28 | EaacMcaa535 | 0.46 | EacgMctc330 | 0.30 |
| EaaaMcat170 | 0.45 | EaaaMctc520 | 0.14 | EaacMcaa537 | 0.42 | EacgMctc350 | 0.14 |
| EaaaMcat270 | 0.33 | EaaaMctc670 | 0.43 | EaacMcaa540 | 0.11 | EacgMctc365 | 0.47 |
| EaaaMcat335 | 0.46 | EaaaMctc674 | 0.48 | EaacMcaa554 | 0.20 | EacgMcag130 | 0.29 |
| EaaaMcat345 | 0.27 | EaacMcaa110 | 0.50 | EaacMcaa560 | 0.29 | EacgMcag190 | 0.22 |
| EaaaMcat375 | 0.43 | EaacMcaa118 | 0.30 | EaacMcaa566 | 0.47 | EacgMcag193 | 0.35 |
| EaaaMcat430 | 0.10 | EaacMcaa140 | 0.26 | EacaMctc70 | 0.19 | EacgMcag196 | 0.09 |
| EacaMctc430 | 0.21 | EacaMctc165 | 0.38 | EacgMcgc350 | 0.13 | EacgMcgc310 | 0.18 |
| EacaMctc440 | 0.35 | EacaMctc232 | 0.19 | EacgMcgc355 | 0.06 | EacgMcgc318 | 0.13 |
| EacaMctc455 | 0.13 | EacaMctc235 | 0.20 | EacgMcgc367 | 0.23 | EacgMcgc330 | 0.11 |
| EacaMctc480 | 0.40 | EacaMctc375 | 0.16 | EacgMcgc415 | 0.14 | EacgMcgc230 | 0.42 |
| EacaMctc488 | 0.38 | EacaMctc415 | 0.17 | EacgMcgc460 | 0.09 | EacgMcgc245 | 0.13 |
| EacaMctc492 | 0.43 | EacaMctc428 | 0.43 | EacaMctc140 | 0.42 | EacgMcgc260 | 0.24 |
| EacgMcgc125 | 0.49 | EacgMcag670 | 0.31 | EacgMcag430 | 0.40 | EacgMcag220 | 0.18 |
| EacgMcgc140 | 0.10 | EacgMcag685 | 0.14 | EacgMcag440 | 0.28 | EacgMcag227 | 0.30 |
| EacgMcgc180 | 0.26 | EacgMcag690 | 0.39 | EacgMcag510 | 0.23 | EacgMcag238 | 0.49 |
| EacgMcgc200 | 0.47 | EacgMcag810 | 0.50 | EacgMcag540 | 0.45 | EacgMcag290 | 0.50 |
| EacgMcgc205 | 0.42 | EacgMcgc110 | 0.07 | EacgMcag600 | 0.44 | EacgMcag340 | 0.50 |

*Sublinhada as 12 combinações de primers AFLP utilizadas.