

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

KLAITON LUIS CAGNINI SARTOR

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO SSRs IDENTIFICADOS EM
REGIÕES DE QTLs RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS
2019

KLAITON LUIS CAGNINI SARTOR

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO SSRs IDENTIFICADOS EM
REGIÕES DE QTLs RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso Superior de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Morini Küpper
Cardoso Perseguini

Coorientador: Prof. Dr. Lucas da Silva Domingues

DOIS VIZINHOS
2019



TERMO DE APROVAÇÃO

Validação de marcadores do tipo SSRs identificados em regiões de QTLs relacionados com a resistência à antracnose no feijoeiro

por

Klaiton Luis Cagnini Sartor

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 27 de junho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Morini Kupper Cardoso
Persequini
Orientadora
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof^ª. Dr^ª. Nédia de Castilhos Ghisi
Membro titular
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof. Dr. Alessandro Jaquiel Waclawovsky
Membro titular
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof^ª. Dr^ª. Angélica Signor Mendes
Responsável pelos Trabalhos de Conclusão
de Curso de Agronomia
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof. Dr. Alessandro Jaquiel Waclawovsky
Coordenador(a) do Curso
UTFPR – Dois Vizinhos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que me foi concedido desde o momento que nasci até o atual.

Aos meus pais, Severino Sartor e Rosina Sartor, e minha irmã, Kéli Sartor, que sempre me incentivaram e tornaram possível minha graduação neste curso.

A minha namorada, Aline da Veiga, por estar do meu lado, me auxiliar e de forma prestativa me ajudar neste trabalho.

A minha orientadora, professora Juliana Morini, que teve paciência e não mediu esforços para me ensinar durante a graduação e especialmente na condução de meu TCC.

Aos amigos e colegas que tive ao longo do curso, saibam que as lembranças e os laços de amizade ficarão para toda a vida.

Muito obrigado!

RESUMO

SARTOR, Klaiton L. C. **Validação de marcadores do tipo SSRs identificados em regiões de QTLs relacionados com a resistência à antracnose no feijoeiro**. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

Para que a produção seja cada vez maior e de melhor qualidade, as plantas são submetidas a seleções, cruzamentos e modificações em seu DNA, sendo estas as principais ferramentas do melhoramento vegetal. Com relação a seleção de plantas, atualmente existem técnicas que permitem realizar essa seleção somente a partir de seus DNAs, sem a necessidade de expressão do fenótipo daquele indivíduo. Uma destas técnicas é a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Os marcadores do tipo microssatélite ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são defendidos por muitos pesquisadores como os de melhor competência e aplicabilidade a diversas espécies. Uma das aplicabilidades destes marcadores é a seleção de plantas resistente a patógenos, como por exemplo, a resistência do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). O objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares do tipo SSRs previamente identificados em regiões de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) no feijoeiro para saber se os mesmos estão de fato relacionados com a resistência à antracnose. Este trabalho iniciou com a semeadura de 16 genótipos de feijão e ainda em seu estágio vegetativo foram coletadas as folhas para que o DNA de cada genótipo fosse extraído. Com o DNA *in vitro*, foi feita a amplificação de 9 marcadores moleculares através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e posteriormente foi realizada a comparação das bandas amplificadas em gel de agarose com bandas de dois parentais, CAL-143 e IAC-UNA, sendo um suscetível e outro resistente à antracnose, respectivamente. A partir de dados de campo, onde foi avaliada a resistência à antracnose dos 16 genótipos, foi efetuado um comparativo com as amplificações em gel de agarose. Cinco marcadores podem ser apontados como sendo válidos: SSR-IAC284, SSR-IAC65, SSR-IAC239, SSR-IAC245 e SSR-IAC268. Porém, para os demais marcadores mais testes devem ser realizados para realmente comprovar se estão ou não relacionados a resistência à antracnose. O resultado deste trabalho permite que esses 5 marcadores sejam utilizados em futuras seleções assistidas de plantas para tornar o trabalho do melhorista mais rápido e eficiente.

Palavras-chaves: *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum lindemuthianum*. Marcadores moleculares. Microssatélites.

ABSTRACT

SARTOR, Klaiton L. C. **SSRs markers' validation identified in regions of QTLs related to bean anthracnose resistance.** 43 f. Course Conclusion Research (Agronomy Course), Federal University of Technology - Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

In order to have increasingly better and bigger production, plants are submitted to selections, crossbreds and DNA's modifications, being these the main vegetal improving resources. About plants' selection, nowadays there are techniques which allow to realize this selection only from their DNA, without the necessity of expressing the individual's phenotype. One of these techniques is the marker-assisted selection (MAS). The called microsatellites markers or Simple Sequence Repeat (SSRs) are advocated by many researchers as the ones which are more competent and applicable to several species. One of the applicabilities of such markers is the selection of plants resistant to pathogens, for instance, the resistance of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). The aim of this resource was to validate SSRs molecular markers previously identified in regions of QTLs (Quantitative Trait Loci) on bean plants to analyze if they are actually related to anthracnose resistance. This survey started by planting 16 beans' genotypes and still on its vegetative stage their leaves were collected in order to extract each genotype. Having the AND in vitro, 9 molecular markers were amplified through PCR (Polymerase Chain Reaction) and after that the bands amplified on agarose gel were compared with two parental bands, CAL-143 and IAC-UNA, being one susceptible and the other resistant to anthracnose, respectively. From the field data, where were evaluated the 16 genotypes' resistance to anthracnose, it was made a comparative with the amplifications in agarose gel. Five valid markers can be pointed: SSR-IAC284, SSR-IAC65, SSR-IAC239, SSR-IAC245 e SSR-IAC268. However, more tests need to be done for the other markers intending to prove if they are or are not really related to anthracnose resistance. This resource result allows these 5 markers to be used in future plants assisted selections, to make the improver work quicker and more efficient.

Key-words: *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum lindemuthianum*. Molecular markers. Microsatellites.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	JUSTIFICATIVA.....	10
3.	HIPÓTESES	11
4.	OBJETIVOS	12
4.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	12
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
5.	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
5.1.	FEIJÃO	13
5.2.	IMPORTÂNCIA NO BRASIL	13
5.3.	DOENÇAS QUE ACOMETEM O FEIJOEIRO	14
5.3.1.	Antracnose	15
5.4.	MELHORAMENTO VEGETAL	16
5.5.	MARCADORES MOLECULARES.....	17
5.5.1.	Marcadores Microsatélites	18
6.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
7.	RESULTADO E DISCUSSÕES	26
7.1.	GENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES	26
7.2.	ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	33
8.	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma *Fabacea* domesticada há mais de sete mil de anos e acredita-se que seja oriundo de dois centros de origem distintos: Andino e Mesoamericano (GEPTS, 1998). Por ter grande importância alimentícia, pesquisas em todo o mundo vêm sendo realizadas visando melhorar os cultivares de feijões existentes, desenvolvendo cultivares mais tolerantes a períodos de estresse, mais produtivas e com resistência a vários patógenos e pragas.

O melhoramento vegetal sempre busca selecionar genótipos com caracteres agrônômicos de interesse. Realizar melhoramento de alguma espécie é trabalhoso, pois é difícil “agrupar” todas as características desejadas em um único genótipo. Além disso, o melhoramento clássico é realizado através de cruzamentos entre indivíduos para fixar as características e, posteriormente, são realizados cruzamentos testes e exposição da planta a condições que lhe permitam expressar os genes para se ter certeza de que os caracteres estão presentes naquele genótipo.

Atualmente o melhoramento genético, seja de plantas ou animais, está avançado. Várias ferramentas e tecnologias são utilizadas para auxiliar no desenvolvimento de um genótipo superior aos demais. Um exemplo de tecnologia utilizada são os marcadores moleculares empregados para assessorar na identificação de características de interesse que estão presentes na planta; isso ocorre através da seleção assistida por meio de marcadores moleculares relacionados com caracteres de interesse agrônômico (LOGO, [s/d]).

Muitas características das plantas são controladas por mais de um gene: são as chamadas quantitativas, onde vários locos do DNA fornecem efeito a um mesmo atributo da planta. Quando uma característica é influenciada por vários genes, cada um tem uma pequena contribuição no fenótipo; além disso, o efeito ambiental nestes casos é muito expressivo, dificultando a seleção de indivíduos de interesse por parte dos melhoristas (RAMALHO, 2012). Essa dificuldade acontece porque a população terá poucos indivíduos com total expressão e total ausência da característica e muitos indivíduos que permanecerão entre esses dois extremos, expressando a característica em maior ou menor proporção.

Como a identificação e seleção de características quantitativas é difícil, o “mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e de associações com caracteres de interesse, têm fornecido estratégias para identificar, caracterizar e manipular a variabilidade genética” (GUIMARÃES; MOREIRA, 2005). Através da identificação a nível molecular dos genes que afetam a característica, a seleção de plantas com a característica de interesse é facilitada. Por isso, atualmente é essencial mapear e identificar os locos das características de interesse em um programa de melhoramento.

O mapeamento de locos que controlam caracteres quantitativos tem sido frequentemente realizado através da análise de ligação, considerando a variação genética presente em progênies de cruzamentos biparentais. Neste caso, somente dois alelos por loco podem ser avaliados simultaneamente. Esta abordagem limita o número de recombinações possíveis e os marcadores presentes identificados nas regiões dos QTLs são restritos à população de mapeamento que foi desenvolvida. Para que estes marcadores moleculares sejam utilizados em programas de seleção assistida é recomendável que se realize a validação destes marcadores em outros genótipos que não sejam aqueles pertencentes a população de mapeamento para o qual foram relacionados com regiões gênicas de interesse.

Um exemplo de característica quantitativa em feijão é a resistência ao patógeno causador da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). Essa doença é muito agressiva e pode causar sérios danos à cultura, chegando a 100% de perdas quando utilizado sementes contaminadas e/ou com o adjunto de condições ambientais favoráveis para a doença (WENDLAND, [s/d]). Por conta disso, se faz necessário encontrar uma medida para que seja cultivado feijão de forma que não se tenha esta doença. Para isso, o melhoramento genético tem papel fundamental na seleção de genótipos de feijão produtivos e resistentes à antracnose.

Estudos de mapeamento têm mostrado que esses locos residem em sete principais regiões cromossômicas que possuem resistências específicas já identificadas. Estas encontram-se nos grupos de ligação Pv01, Pv02, Pv04, Pv07, Pv08 e Pv11. (FERREIRA et al., 2012). Os grupos de ligação são formados por genes que estão fisicamente ligados, ou seja, pertencem ao mesmo cromossomo. A quantidade de grupos de ligação varia em cada espécie, sendo que ela é igual ao número de cromossomos haploides (11 no caso do feijão).

O objetivo deste trabalho foi realizar a validação de marcadores do tipo SSRs (*Simple Sequence Repeats*), também chamados de microssatélites, previamente identificados em regiões de QTLs que conferem resistência à antracnose no feijoeiro.

2. JUSTIFICATIVA

A função do melhoramento genético é “selecionar variedades mais produtivas, de melhor qualidade industrial, mais tolerantes a estresses e com melhor adaptação ecológica” (BRAMMER, 2000). Com estes objetivos alcançados, é possível “aumentar os rendimentos agrícolas e até mesmo reduzir o uso de insumos pelo agricultor, o que ajuda a preservar a saúde humana e o meio ambiente” (BRAMMER, 2000).

A importância deste trabalho se dá no levantamento de informações para selecionar variedades de feijão resistentes a antracnose (melhor adaptação ecológica). Com o uso de variedades resistentes ao patógeno, a quantidade de fungicida utilizado no cultivo do feijão reduz drasticamente, tendo então, uma produção mais sustentável do que a atual e uma redução de custo por parte do produtor. Além de diminuir a agressão ambiental, a saúde humana, tanto do produtor quanto do consumidor, também melhora pois o uso e a exposição a esse agrotóxico diminuem. (BESPALHOK FILHO et al. 2007)

Toppa e Jadoski (2013) já defenderam que a Seleção Assistida por Marcadores Moleculares pode ser usada para selecionar plantas com características complexas, como por exemplo resistência a pragas e doenças. Por conta disso, o uso de marcadores moleculares é eficiente na seleção de genótipos de feijão resistentes a antracnose.

A partir deste trabalho, foram obtidas informações sobre sequências de DNA, sendo que a maioria conferiu resistência à antracnose ao feijoeiro e uma pequena quantidade, não. Com esse resultado, pode-se auxiliar o melhoramento de plantas para que busque as sequências que aferem resistência à antracnose no desenvolvimento de cultivares superiores.

3. HIPÓTESES

- Há associação entre os marcadores SSRs e a resistência à antracnose no feijoeiro.
- Haverá amplificação dos Marcadores SSRs somente nos genótipos que apresentarem resistência à antracnose.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Realizar a validação de marcadores do tipo SSRs (microssatélites) previamente identificados em regiões de QTLs que conferem resistência à antracnose no feijoeiro.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar 16 genótipos de feijão comum com 9 marcadores SSRs previamente identificados em regiões de QTL que conferem resistência à antracnose.
- Utilizar os dados fenotípicos obtidos pelo grupo do Professor Dr. Lucas da Silva Domingues no projeto “Interação Genótipo x Ambiente de linhagens e cultivares de feijão na região sudoeste do Paraná” para promover a validação destes marcadores.
- Realizar análise de variabilidade genética com os genótipos utilizados neste trabalho.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. FEIJÃO

Desde o período em que a humanidade deixou de ser nômade e passou a cultivar seu próprio alimento, teve que desenvolver técnicas de cultivo e domesticação de plantas e animais para sobreviver. Dentro da gama de plantas que foram incorporadas à alimentação humana está o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Essa espécie é uma dicotiledônea e pertence à família *Fabaceae*, havendo ainda a espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., que também tem importância na alimentação e é conhecido como feijão-caupi (ANTUNES, 2008).

O feijoeiro é uma planta que realiza autofecundação, ou seja, é uma planta autógama. Seu DNA é composto por um total de 22 cromossomos sendo uma planta diploide e, portanto, possuindo 11 pares de cromossomos (RAMALHO; SANTOS, 1982). Seu cultivo é anual, podendo-se fazer três safras por ano, dependendo da região de cultivo.

5.2. IMPORTÂNCIA NO BRASIL

A introdução do feijoeiro no Brasil ocorreu possivelmente por três rotas distintas. A primeira teria sido a partir do México, que é um centro de origem, passando pelo Caribe, Colômbia, Venezuela e finalmente chegando ao Brasil. O feijão provindo deste local corresponde ao que hoje é amplamente cultivado no país, compreendendo aqueles com característica de grão pequeno, preto, marrom e mulatinho. A segunda rota originou-se nos Andes e trouxe para o país feijões de grãos grandes. A terceira e última foi através dos imigrantes que trouxeram consigo sementes após a descoberta e durante a colonização da América (OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2018).

O feijão é considerado um prato típico da cultura brasileira, sendo que “sete de cada 10 brasileiros consomem feijão todos os dias” (OLIVEIRA, 2015). Devido a isso,

o “Brasil é o maior produtor e consumidor de feijões *Phaseolus* do mundo, produzindo e consumido, todos os anos, em torno de 3,4 milhões de toneladas” (OLIVEIRA, 2015). A combinação de feijão e arroz pode ser exposta como o prato identidade do Brasil; e essa combinação não se dá somente por conta dos sabores dos dois alimentos, mas também em razão dos termos nutricionais que são agregados quando se juntam estas duas iguarias no prato.

Os tipos predominantes de feijão consumido no Brasil são o carioca e o preto. A preferência por um ou outro tipo é variável conforme a região e está ligada à época da colonização que trouxe consigo os gostos de cada um, cujas preferências permaneceram ao longo das gerações (FERREIRA, 2003).

No ano de 2017 foram cultivados 1.716.764 hectares de feijão na 1ª safra no Brasil, correspondendo a uma área 20% maior que o ano anterior. Para a 2ª e 3ª safras a área foi de 1.152.653 e 212.077, respectivamente no ano de 2017. A região Nordeste do país ganha destaque com maior área plantada desta cultura, visto que no ano de 2017 a área da 1ª safra foi cerca de 62% da área total brasileira cultivada. A produtividade média de 2017 no Brasil foi de 1.068 kg/ha, sendo que a região sul é a mais produtiva, alcançando 1.920 kg/ha (IBGE, 2007).

Na safra 2016/2017 o Estado do Paraná foi o maior produtor de feijão do país, colhendo 710,4 mil toneladas nas 3 safras. A 1ª e 2ª safras são as mais significativas para o estado, sendo que na 1ª geralmente é cultivado feijão preto, predominantemente nas regiões sudeste e centro-sul. Já na 2ª safra predomina o feijão carioca e é cultivada nas regiões oeste, sudoeste e centro oeste do Paraná. A 3ª safra se concentra no norte do estado e é realizada com baixa tecnologia, apenas para subsistência e algumas áreas comerciais com emprego de irrigação (OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2018).

5.3. DOENÇAS QUE ACOMETEM O FEIJOEIRO

Todos os seres vivos são afetados por fatores bióticos e abióticos, e com o feijão não é diferente. Várias doenças e pragas podem acometer esta espécie, assim como intemperes climáticas que podem causar danos e podem até provocar perda total do cultivo.

Diferentes espécies de plantas que são acometidas por uma determinada espécie de patógeno possuem níveis diferentes de suscetibilidade. Até mesmo dentro de uma mesma espécie de planta existem genótipos que se diferem entre si quanto a suscetibilidade e resistência a uma mesma doença.

As doenças são responsáveis por causar danos consideráveis às culturas e reduzir sua produtividade e qualidade do produto final. Existe uma relação estreita entre três fatores para que haja incidência de patógeno, sendo eles: hospedeiro (planta), ambiente e patógeno. Estes três fatores atrelados formam um ciclo vicioso que ocasiona o desenvolvimento de doenças vegetais. Cabe ao produtor inferir em algum destes três pontos para que a doença seja freada ou controlada.

As condições ambientais podem causar malefícios às plantas, como também podem afetar de forma negativa os patógenos e, no caso do feijão, é difícil ter um controle ambiental eficiente, pois como ele é cultivado em larga escala, o produtor tem pouca influência nesse fator. A presença do patógeno no campo é um fator que o produtor tem maior interferência, pois além de medidas preventivas que podem ser tomadas para barrar a entrada da doença, também pode ser feito um controle após a incidência do patógeno, em que o mais utilizado é o controle químico. Quanto ao hospedeiro, este é um ponto que vem sendo melhorado nos últimos anos empregando-se tecnologias para selecionar genótipos e/ou alterar o DNA para que estes sejam de maior resistência a patógenos e pragas (BIANCHINI; MENEZES; MARINGONI, 1989).

5.3.1. Antracnose

A antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) é uma das principais doenças que acometem o feijoeiro e, além disso, o gênero *Colletotrichum* causa danos em diversas outras culturas de importância agrônômica. No feijão a doença tem incidência quando a temperatura do ambiente permanece entre 13 e 27 °C, porém a faixa ótima é de 18 a 22 °C, e longos períodos com alta umidade (FANCELLI; DOURADO NETO, 2007), temperatura essa muito próxima à ideal para o cultivo de feijão.

A identificação desta doença na planta ocorre principalmente pela observação de lesões necróticas de coloração marrom-escuras ou pardas nas nervuras da parte

abaxial das folhas. As mesmas lesões podem ser observadas no caule, pecíolo, vagens e sementes variando a coloração para mais escuro ou claro, porém todas as lesões são leves ou moderadamente deprimidas (BIANCHINI; MENEZES; MARINGONI, 1989).

As perdas com essa doença podem chegar até 100%, pois além de afetar a massa verde da planta também acometem o produto final, ou seja, grão e semente causando descoloração, manchas e deformação (FANCELLI; DOURADO NETO, 2007). Por causar grandes perdas e prejuízos na cultura, a preocupação do produtor em controlar esse patógeno é intensa. Dentre as principais formas de controle está o uso de sementes de qualidade e livre da doença, tratamento de sementes com fungicidas, aplicações de agroquímicos nas plantas durante seu desenvolvimento e o uso de cultivares resistentes (BIANCHINI; MENEZES; MARINGONI, 1989).

5.4. MELHORAMENTO VEGETAL

O melhoramento de plantas pode ser definido como “a arte e a ciência que visam a modificação genética das plantas para torná-las mais úteis aos homens, animais e ambiente” (BORÉM 2009). Esse ramo de estudo e trabalho é muito amplo, pois envolve desde uma simples seleção de plantas ou sementes, até aplicação de biotecnologia para alterar o DNA de determinado indivíduo.

Sua importância é evidente visto que a população humana mundial está crescendo ano após ano e até 2050 a estimativa é de que seja alcançado 9,4 bilhões de pessoas no globo terrestre. Portanto, a produção de alimentos também deve crescer de forma a acompanhar a demanda que o planeta exigirá (BORÉM, 2009).

O foco dos programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil é “o aumento da produção de sementes e a resistência às doenças” (BORÉM, 2005). Esses dois objetivos são buscados, pois cada vez mais se faz necessário produzir mais e melhor. Como a demanda por alimento só tende a aumentar, será necessária maior quantidade de alimento. Além disso, a preocupação com a situação atual e futura com o meio ambiente é grande, daí a necessidade de desenvolver cultivares e tecnologias que permitam produzir maior quantidade em um mesmo espaço territorial e que o dano ao meio ambiente seja o menor possível.

O melhoramento está tão avançado atualmente que para algumas espécies não é nem mais necessário cultivar um exemplar para saber sobre algumas de suas características. Basta apenas extrair seu DNA e, a partir de várias técnicas de biologia molecular e análises genéticas, descobrir se aquele indivíduo possui determinados atributos.

5.5. MARCADORES MOLECULARES

Para auxiliar a seleção de genótipos de interesse, uma tecnologia utilizada atualmente são os marcadores moleculares. O uso de um marcador não é novidade para o melhoramento, pois já faz muito tempo que começou a ser observado que plantas que expressavam determinadas características morfológicas também expressavam adjunto outras características que eram de difícil mensuração visual (RAMALHO, 2012).

O que vem se destacando nos últimos anos é o uso de marcadores moleculares. Esses marcadores são “fragmentos discretos de DNA obtidos por ferramentas da biotecnologia moderna que, visualizadas em géis de eletroforese, servem como ferramenta para uma série de estudos genéticos em plantas” (HOFFMANN; BARROSO, 2006). O uso desses marcadores só se tornou possível com o desenvolvimento da Reação da Cadeia da Polimerase (PCR).

Os marcadores moleculares podem amplificar em um único loco ou em vários, tudo depende do tipo de marcador que será utilizado. Aqueles que amplificam em vários locos do genoma resultam em várias bandas no gel de agarose, já aqueles que amplificam em um único loco, têm no gel um número máximo de bandas igual ao grau de haploidia daquela espécie (HOFFMANN; BARROSO, 2006).

Outra característica dos marcadores moleculares é quanto a sua capacidade de identificar indivíduos dominantes e codominantes. Os marcadores microssatélites, por exemplo, são codominantes, ou seja, para indivíduos heterozigotos é possível identificar duas bandas no gel (uma do alelo dominante e outra do alelo recessivo), enquanto que para indivíduos homozigotos apenas uma banda (contemplando os dois alelos) está presente no gel (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Apesar do uso de marcadores moleculares consistir no uso de várias técnicas delicadas e de alto investimento em equipamentos e reagentes, este é um procedimento que oferece maior certeza e rapidez na seleção de plantas no programa de melhoramento. Embora existam vários tipos de marcadores moleculares, é difícil dizer qual é melhor ou pior. Cabe ao profissional escolher aquele que melhor se adapta às suas necessidades de pesquisa, ao seu laboratório e seu orçamento.

5.5.1. Marcadores Microsatélites

Os marcadores microsatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*), são “sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem” (BORÉM; CAIXETA, 2006). Os fragmentos de DNA que flanqueiam estas sequências de repetição são altamente conservados entre as gerações, o que permite que sejam utilizadas estas regiões para sintetizar primers complementares e através da PCR os microsatélites sejam amplificados (RAMALHO, 2012).

Os SSR, segundo Borém e Caixeta (2006), são um dos tipos de marcadores mais competentes, pois:

Independente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microsatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos.

Para Borém e Miranda (2009), as vantagens dos marcadores microsatélite são a codominância, alto polimorfismo; além de serem ideais para o uso em seleção assistida e identificação de genótipos.

O uso desse tipo de marcador em feijão tem sido frequente nos últimos anos. Sua aplicação é variada, sendo utilizado por exemplo para estimar a diversidade genética (CABRAL et al., 2011; MOTA et al., 2013; CASCÃO et al., 2013; FERREIRA et al., 2017), identificar regiões de QTLs associadas com resistência ao cretamento bacteriano comum (COUTO et al., 2009), desenvolvimento de novos marcadores

moleculares SSRs (CAMPOS, 2009; GARCIA, 2009), validação de marcadores moleculares em feijão (MOTA, 2015), seleção de marcadores associados à resistência a murcha de fusarium (BALSALOBRE, 2009), seleção assistida para famílias de feijoeiro comum, produtividade e tipo de grão (PEREIRA et al., 2008; TORGA et al., 2010, identificação de marcadores relacionados ao escurecimento de grão (COUTO et al., 2011), transferibilidade de marcadores SSR de soja para feijão (SCHIAVON et al., 2009), seleção assistida em retrocruzamento visando a resistência ao mofo branco (ANTONIO et al., 2012) e análise de polimorfismo de locos microssatélites (TEIXEIRA et al., 2011).

6. MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar a validação dos marcadores, foi utilizado um total de 16 genótipos de feijão (Quadro 1). Os genótipos são oriundos de um projeto de pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos (UTFPR – DV), intitulado “Interação Genótipo x Ambiente de linhagens e cultivares de feijão na região sudoeste do Paraná”, coordenado pelos professores Joel Donazzolo e Lucas da Silva Domingues.

Número de Genótipos	Genótipo
P1	LEC 03-14
P2	CNFC 11948
P3	C10-2-4/41
P4	PÉROLA
P5	TB 03-26
P6	LP 11-363
P7	FAP-F3-2
P8	CHC 01-175-1
P9	LEP 04-14
P10	CHP 99-65-24
P11	LP 12-601
P12	TB 03-27
P13	IPR UIRAPURU
P14	BRS ESTEIO
P15	IPR Campos Gerais
P16	CNFC 11954

Quadro 1 – Genótipos utilizados. P=Planta. Fonte: Adaptado de Lucas da Silva Domingues e Joel Donazzolo (2016).

Foram semeadas 4 sementes de feijão por vaso contendo substrato comercial. Nem todas as sementes germinaram; porém ao menos um exemplar de cada genótipo germinou e teve material para a coleta (Figura 1).



Figura 1: Germinação dos 16 genótipos de feijão em vasos contendo substrato comercial. Fonte: Autor, 2019.

Em torno de 50 dias após a semeadura, quando as plantas já estavam com aproximadamente 25 cm de altura, foram coletadas cerca de 12 folhas por planta, as quais foram expostas a nitrogênio líquido para desidratar e posteriormente foram liofilizadas.

A liofilização do material (Figura 2) é importante para que as amostras de cada genótipo possam ser estocadas por longo período de tempo e a extração de DNA não seja realizada logo após a coleta das folhas das plantas. Através da liofilização o material não sofre oxidação e seu conteúdo genético permanece íntegro.



Figura 2: Liofilização das folhas de feijão. Fonte: Autor, 2019.

Com o material liofilizado, as amostras foram trituradas com um moedor de sementes e o material vegetal foi estocado na forma de pó. A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial da Promega®, seguindo seu respectivo protocolo, com algumas modificações.

A proposta inicial era validar 13 marcadores SSRs, os quais seriam amplificados em todos os genótipos de feijão (Tabela 1). Porém, apenas 9 marcadores tiveram resultados satisfatórios quando amplificados nos genótipos.

Nome dos marcadores	Tipo de marcador molecular	GL	Nome do QTL	Sequência de pares de base	Referência
SSR-IAC18a	SSR	7	ANT07.1 ^{UC}	F: AACTTGTTGCCAGAATGACT R: CACAACCTCCCCTTTATGCTA	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC284	SSR	7	ANT07.2 ^{UC}	F:AAGGAGAAAATAAAAATCACAGTC R: GTTTCGAGGTTATTGGGGA	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC65	SSR	4	ANT04.1 ^{UC}	F: AGTGATGAAATAGATGCTCCTT R: GACTAGATGTTACCCTCCTTCA	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC183	SSR	6	ANT06.1 ^{UC}	F: CGCATTTATAAGAGAAGCAACA R: CCGATGGAAACACCTGAAA	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC239	SSR	7	ANT07.1 ^{UC}	F: AAAGAAAAAGTGGGGAAAG R: GCTCATGCAAAAATAGACTCA	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC245	SSR	4	ANT04.1 ^{UC}	F: TAGGCCATCATCATTGTTG R: TAGGCCATCATCATTGTTG	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC67	SSR	4	ANT04.1 ^{UC}	F: GAAGCTGCGACGGAACATAG R: CCTAGTCCCTCCCATCCCAG	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC262	SSR	7	ANT07.3 ^{UC}	F: ATATCGTTTGATATCCTTACACA R: CAAACACTGGTTCACATCTCAC	Oblessuc et al. (2014)

SSR-IAC268	SSR	6	ANT06.1 ^{UC}	F: ATGTAGATCTGGTAAGGAGTGAA R:AATTAGATTAGTCAAGAAACAAAAC	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC282	SSR	2	ANT02.2 ^{UC}	F: CTCTTGGTTACGCGTGGACTAC R: CGCCTATGTTGGGTTGAGATG	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC276	SSR	6	ANT06.1 ^{UC}	F: AAGCCCAAGCCCAAACCCAG R: CACCACCAAGACCCGATTCCAG	Oblessuc et al. (2014)
PvM40	SSR	7	ANT07.1 ^{UC}	F: CTCTCCATTTTGTTCAG R: GAACCATCAGAAACTAC	Oblessuc et al. (2014)
SSR-IAC55	SSR	9	ANT09.2 ^{UC}	F: AACCCGTGAATCTTTGAGG R: ATTGATGGTGGATTTTGAA	Oblessuc et al. (2014)

Tabela 1: Marcadores escolhidos para fazer a validação GL: Grupo de Ligação. F: *Forward* sentido 5'-3'. R: *Reverse* sentido 3'-5'. Fonte: Adaptado de Oblessuc et al. (2014).

A amplificação dos marcadores moleculares foi realizada em um termociclador, configurado em 4 passos:

- 1º Passo: 1 min a 94 °C;
- 2º Passo: 1 min a 94 °C, 1 min a 56°C, 1 min a 72 °C, (repetido 30 vezes);
- 3º Passo: 5 min a 72 °C;
- 4º Passo: Manter as amostras a 4 °C até retirar a placa de PCR.

A temperatura de 94 °C tem a função de separar a fita dupla de DNA, a temperatura de 56 °C auxilia no anelamento dos primers dos marcadores moleculares nas fitas de DNA, a temperatura de 72 °C é ótima para que a Taq DNA polimerase atue e construa a fita de DNA a partir dos primers que foram anelados junto as fitas e a temperatura de 4 °C serve para conservar as amostras após o termino da PCR.

Para realizar a amplificação dos marcadores SSRs utilizaram-se as seguintes quantidades de cada reagente: 2,5 microlitros de água milliq (Kit MasterMix da Promega®), 7,5 µL de Master Mix, 1,0 microlitro de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 3,0 microlitros de DNA genômico total (o DNA deve estar em uma concentração de 10 ng/microlitro), em um volume final de reação de 15 microlitros. Para verificar a qualidade das amplificações, os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed™ 1X (Biotium, Inc. Hayward, CA). A leitura dos fragmentos amplificados foi feita considerando o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) comparando com marcador de peso molecular de 100 pb (*ladder*). Os microssatélites foram analisados pelo número de alelos por loco e pela frequência alélica por loco.

Posteriormente, foi realizada a genotipagem dos produtos de amplificação utilizando agarose de alta resolução (agarose metaphor 4%). Para verificar quais são os genótipos que apresentam resistência à antracnose, foram utilizados os genótipos

parentais de uma população de mapeamento genético para comparação dos tamanhos de amplificação, sendo o parental IAC-UNA o portador dos locos de resistência e o CAL-143 portador dos locos de suscetibilidade. Para realizar a genotipagem, os marcadores SSRs utilizados foram amplificados nos genótipos CAL-143 e IAC-UNA (além dos outros 16 genótipos).

A figura 3 exemplifica como foi feita a leitura no gel de agarose metaphor 4%. A canaleta 1 contém o *ladder* de 100 pares de base, a canaleta 2 e 3 contém o produto da PCR de CAL-143 e IAC-UNA respectivamente com o marcador SSR-IAC67. As canaletas 4 e 5 também contém o produto da PCR de CAL-143 e IAC-UNA, respectivamente com o marcador SSR-IAC262. As canaletas 6 e 7 contém o produto da PCR de CAL-143 e IAC-UNA, respectivamente com o marcador SSR-IAC268, enquanto que as canaletas 8 e 9 contém DNA genômico total de CAL-143 e IAC-UNA respectivamente.

Nesta figura podemos observar que a canaleta 2 tem somente um produto amplificado de DNA, isso indica que o genótipo é homozigoto para o loco analisado, também é possível concluir que a região amplificada possui em torno de 106 pb. A canaleta 3 possui um produto amplificado com cerca de 104 pb e outro com 298 pb (indicados pelos retângulos azuis), isso indica que o genótipo IAC-UNA é heterozigoto para o marcador SSR-IAC67. As canaletas 4 e 5 possuem um único produto amplificado de DNA, indicando que os dois genótipos são homozigotos para o marcador SSR-IAC262. Já a canaleta 6 (CAL-143) possui dois produtos amplificados (retângulos amarelos) indicando dois alelos diferentes (heterozigoto) para o marcador SSR-IAC268, enquanto que a canaleta 7 possui apenas um produto amplificado, ou seja, o genótipo é homozigoto para esse marcador. As canaletas 8 e 9 representam o DNA genômico total dos genótipos CAL-143 e IAC-UNA, respectivamente (retângulo branco). Neste caso, podemos observar que O DNA genômico total possui elevada quantidade de pares de base quando comparado com os produtos amplificados, por conta disso, as bandas demoram mais tempo para percorrer o gel de agarose.

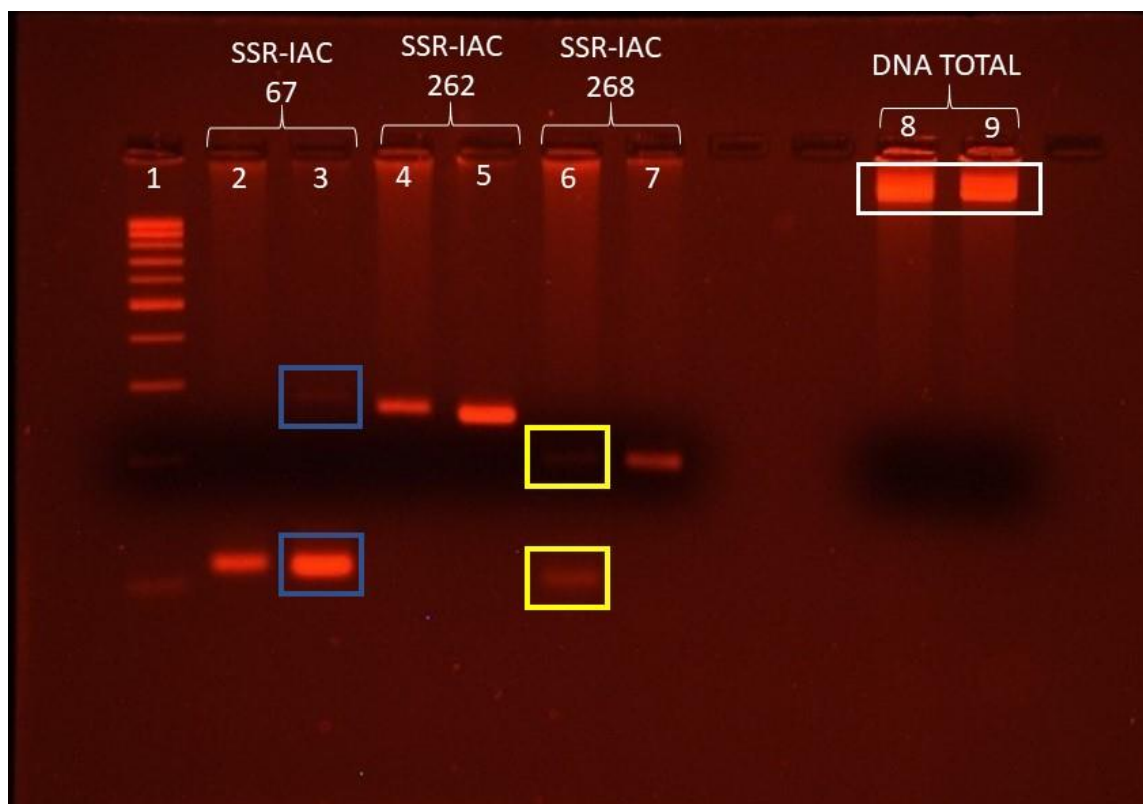


Figura 3: Amplificação de CAL-143 e IAC-UNA com três marcadores moleculares e DNA genômico total de CAL-143 e IAC-UNA. Canaleta 1: *Ladder*; Canaleta 2: CAL-143 com SSR-IAC67; Canaleta 3: IAC-UNA com SSR-IAC67; Canaleta 4: CAL-143 com SSR-IAC262; Canaleta 5: IAC-UNA com SSR-IAC262; Canaleta 6: CAL-143 com SSR-IAC268; Canaleta 7: IAC-UNA com SSR-IAC268; Canaleta 8: DNA genômico total de CAL-143; Canaleta 9: DNA genômico total de IAC-UNA.

Por fim, foram analisados os dados fenotípicos do projeto “Interação Genótipo x Ambiente de linhagens e cultivares de feijão na região sudoeste do Paraná” e os dados da genotipagem obtidos neste trabalho para efetuar a validação dos marcadores moleculares.

7. RESULTADO E DISCUSSÕES

7.1. GENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

Com o material vegetal estocado, o DNA de cada genótipo foi extraído, incluindo os genótipos CAL-143 e IAC-UNA. Para realizar a extração de DNA foi seguida toda a metodologia do protocolo que acompanha o kit de extração. Porém, o tempo que as amostras permaneceram na centrífuga foi maior do que o protocolo propunha, porque percebeu-se que o tempo previsto no protocolo não era suficiente para separar os materiais. A figura 4 demonstra um gel de agarose 1% contendo as amostras de DNA dos genótipos junto do marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100 pares de base (pb). Neste gel é possível verificar que a extração de DNA dos genótipos foi satisfatória, pois os DNAs estavam íntegros, apresentando uma ótima qualidade para as etapas seguintes. Os genótipos P9, CAL-143 e IAC-UNA não estavam presentes neste gel, pois foram extraídos posteriormente. Contudo, a extração desses genótipos também foi realizada com êxito.

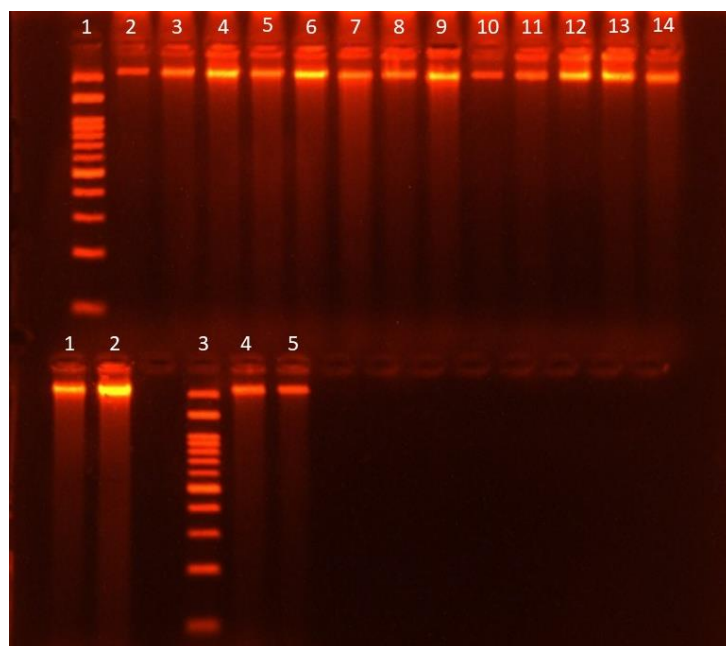


Figura 4: Resultado da eletroforese para comprovar a extração de DNA. Fila superior: Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Canaleta 2: P1; Canaleta 3: P2; Canaleta 4: P3; Canaleta 5: P4; Canaleta 6: P5; Canaleta 7: P6; Canaleta 8: P7; Canaleta 9: P8; Canaleta 10: P10; Canaleta 11: P11; Canaleta 12: P12; Canaleta 13: P13; Canaleta 14: P14. Fila inferior: Canaleta 1: P15; Canaleta 2: P16; Canaleta 3: Marcador de peso molecular de 100 pb; Canaleta 4: P8; Canaleta 5: P8. Fonte: Autor, 2019.

A partir do DNA extraído foi dado início às Reações em Cadeia da Polimerase – PCR. A programação do termociclador foi a mesma para todos os primers, pois todos têm a mesma temperatura de anelamento.

Após cada PCR, foi feita eletroforese das amostras em gel de agarose 1% para comprovar se a reação havia ocorrido de forma correta. Caso não tivesse resultado satisfatório, a PCR para aquelas amostras era repetida. A figura 5 exemplifica o resultado da PCR do primer SSR-IAC65 para os genótipos com exceção do P9, CAL-143 e IAC-UNA que foram feitos posteriormente. Com o auxílio do marcador de peso molecular é possível observar que as bandas possuem em torno de 300 pares de base de DNA (seta azul). Essa informação é importante para que posteriormente seja possível a genotipagem do material em agarose metaphor de alta resolução.

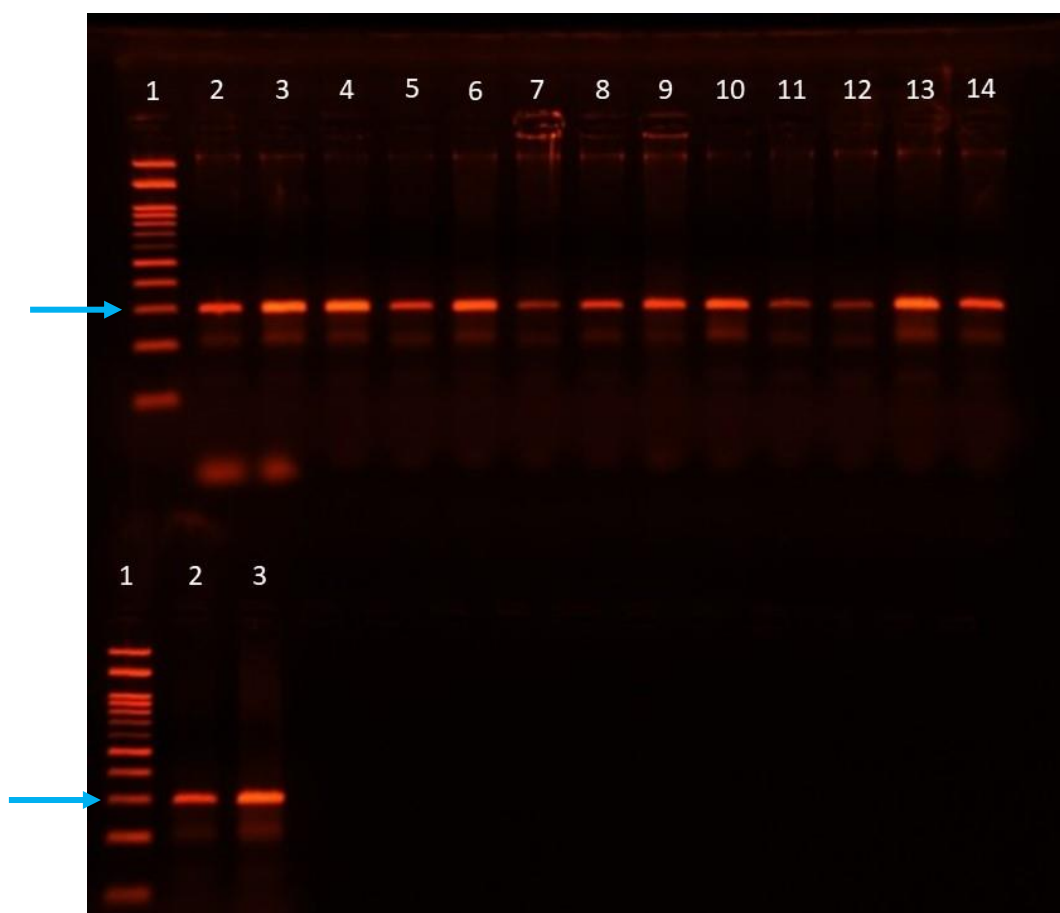


Figura 5: Eletroforese de DNA de 15 genótipos amplificados com o primer SSR IAC-65. Fila superior: Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de base; Canaleta 2: P1; Canaleta 3: P2; Canaleta 4: P3; Canaleta 5: P4; Canaleta 6: P5; Canaleta 7: P6; Canaleta 8: P7; Canaleta 9: P8; Canaleta 10: P10; Canaleta 11: P11; Canaleta 12: P12; Canaleta 13: P13; Canaleta 14: P14. Fila inferior: Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Canaleta 2: P15; Canaleta 3: P16. Setas azuis: amplificações em torno de 300 pb. Fonte: Autor, 2019.

Como já citado anteriormente, para 4 marcadores a PCR não teve resultados satisfatórios, são eles: SSR-IAC282, SSR-IAC276, PvM40 e SSR-IAC55. Foram realizadas mais algumas repetições tentando mudar o protocolo para estes marcadores, mas os resultados também não foram eficientes. Após estas tentativas as amostras de DNA extraído acabaram; por isso, repetiu-se a extração de DNA a partir do material estocado, mas sem sucesso. Por conta disso, e também em razão do pouco tempo restante que havia para realizar um novo plantio e nova coleta de material de feijão, decidiu-se continuar o experimento com os 9 marcadores moleculares que haviam sido amplificados.

As amostras de PCR dos marcadores foram submetidas a eletroforese com agarose de alta resolução (agarose metaphor) em uma proporção de 4%. Cada eletroforese era feita com um gel de agarose de alta resolução contendo *ladder* de 100 pares de base, CAL-143, IAC-UNA e os 16 genótipos de feijão comum. É importante salientar que todas essas amostras (com exceção do *ladder*) são oriundas da PCR de determinado primer, portanto, cada gel tinha o resultado de um primer em específico para todos os genótipos. Na figura 6, por exemplo, temos o resultado do marcador SSR IAC-18a, onde é possível visualizar diferença na posição das bandas de DNA do CAL-143 (seta azul) e do IAC-UNA (seta verde). A banda do CAL-143 tem em torno de 310 pares de base, enquanto que a banda do IAC-UNA tem 308. A partir dessa diferença, os demais genótipos foram comparados a essas duas bandas e observou-se se eles estavam na mesma posição do CAL-143, IAC-UNA ou em outra posição.

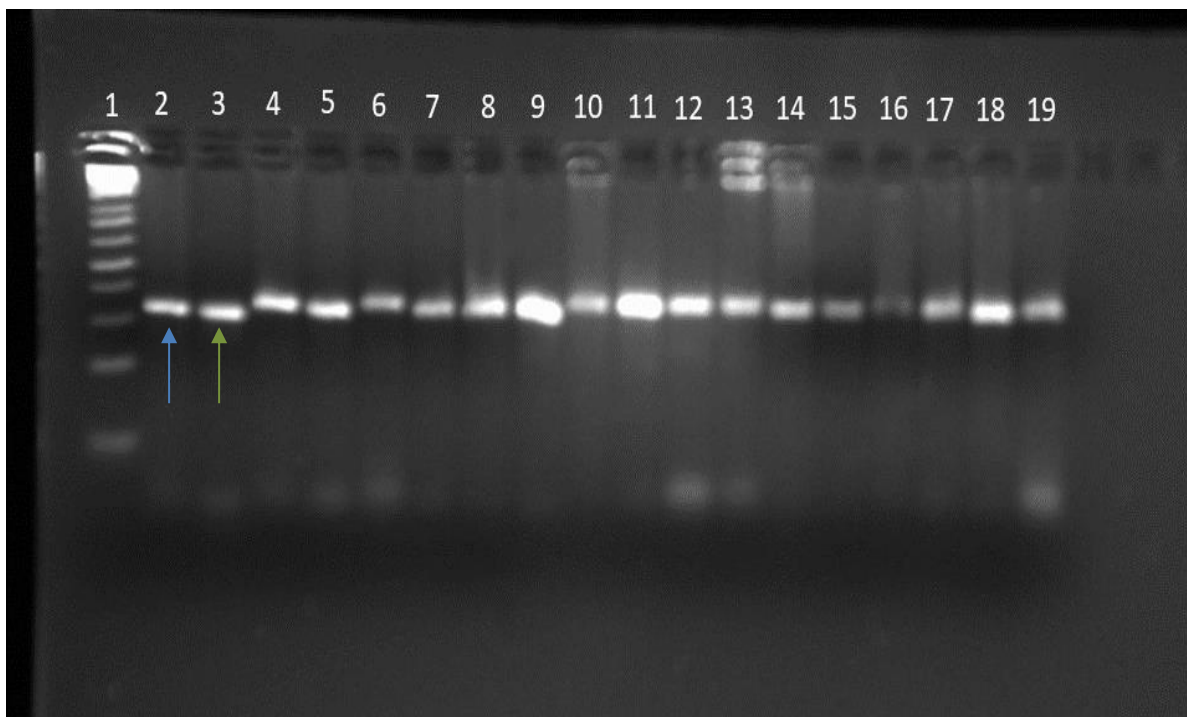


Figura 6: Amostras de DNA amplificadas com o marcador SSR IAC-18a. Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Canaleta 2: CAL-143; Canaleta 3: IAC-UNA; Canaleta 4: P1; Canaleta 5: P2; Canaleta 6: P3; Canaleta 7: P4; Canaleta 8: P5; Canaleta 9: P6; Canaleta 10: P7; Canaleta 11: P8; Canaleta 12: P9; Canaleta 13: P10; Canaleta 14: P11; Canaleta 15: P12; Canaleta 16: P13; Canaleta 17: P14; Canaleta 18: P15; Canaleta 19: P16. Seta azul: CAL-143 com 308 pb; Seta verde: IAC-UNA com 310 pb. Fonte: Autor, 2019.

A leitura de todos os géis foi realizada anotando-se a quantidade de pares de base de cada genótipo para cada marcador molecular. Por conta dos marcadores SSRs serem multialélicos, é possível visualizar os genótipos que são heterozigotos, portanto quando é possível visualizar apenas uma banda no gel para uma mesma amostra, significa que o genótipo é homozigoto para aquele marcador.

Para facilitar a interpretação dos dados, foi confeccionada uma tabela (2) com todos os genótipos e a amplificação de cada marcador. Nesta tabela a letra “x” representa a posição da banda do CAL-143 no gel de agarose metaphor e o símbolo “+” é a posição da banda do IAC-UNA no gel de agarose metaphor. Quando em um mesmo genótipo um dos símbolos está em caixa alta, significa que o genótipo é heterozigoto para aquele marcador (alelos diferentes). O símbolo “-” significa que as bandas estão em posições diferentes tanto do CAL-143 quanto do IAC-UNA, ou seja, o genótipo não possui nenhum alelo igual a esses dois genótipos. Por fim, o número “0” indica perda de dado, ou seja, os genótipos não apresentaram amplificação e não tiveram sua genotipagem realizada.

	SSR-IAC18a	SSR-IAC284	SSR-IAC65	SSR-IAC183	SSR-IAC239	SSR-IAC245	SSR-IAC67	SSR-IAC262	SSR-IAC268
CAL-143	x x	x x	x x	x X	x x	x x	x x	x x	x +
IAC-UNA	++	++	++	++	++	++	+ +	++	++
P1	--	++	++	x x	--	++	x x	x x	++
P2	x x	++	--	x X	++	x x	+ +	x x	x +
P3	--	++	x x	x x	--	++	+ +	x x	++
P4	x x	++	--	x x	--	++	x x	x x	++
P5	x x	--	x x	x x	++	++	+ +	x x	++
P6	x x	++	++	x x	++	++	x x	x x	++
P7	x x	++	--	++	--	++	x x	x x	++
P8	x x	++	--	++	++	++	x x	x x	++
P9	x x	x x	++	x x	0 0	++	+ +	x x	++
P10	x x	++	++	x x	0 0	++	x +	x x	++
P11	++	++	0 0	++	0 0	++	x x	x x	++
P12	++	x x	0 0	--	0 0	x x	x x	x x	++
P13	0 0	++	x x	x x	++	++	x +	x x	++
P14	x x	++	--	x x	--	++	x +	x x	++
P15	++	--	--	++	++	++	x x	x x	++
P16	x x	++	--	x x	++	x x	++	++	++

Tabela 2: Resultado da amplificação dos 9 marcadores moleculares nos 18 genótipos de feijão. “x”= alelo presente em CAL-143; “+”= alelo presente em IAC-UNA; “-“= alelos diferentes de CAL-143 e IAC-UNA; “0”= dado indisponível; símbolo em caixa alta= alelos diferentes (heterozigoto). Fonte: Autor, 2019.

Por meio da análise realizada através das informações contidas na tabela 3 é possível verificar quais são os genótipos que possuem os mesmos alelos do CAL-143 e aqueles que possuem os mesmos alelos do IAC-UNA. A partir disso, pode-se apontar quais genótipos são resistentes à antracnose e quais genótipos são suscetíveis a doença.

Para comprovar esta relação entre os alelos e a resistência/suscetibilidade à doença, foram utilizados dados de campo dos 16 genótipos, sendo que o campo estava naturalmente infectado com o fungo causador da antracnose no feijoeiro. Esses dados foram cedidos pelo professor Lucas Domingues (Tabela 3), que utilizou

uma escala de 1 até 9 graus para medir a severidade da doença (adaptada de RODRIGUES et. al., 2013, p. 1689). A escala segue o seguinte padrão de análise:

- 1: Ausência de sintomas;
- 2: Até 1% das nervuras tem manchas necróticas, apenas na parte inferior da folha;
- 3: Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior;
- 4: Até 1% das nervuras tem manchas necróticas vistas em ambas as faces da folha;
- 5: Maior frequência dos sintomas foliares do que do grau anterior;
- 6: Manchas necróticas nas nervuras, tendo algumas lesões nos caules, ramos e pecíolos;
- 7: Manchas na maioria das nervuras, presença abundante de lesões nos caules, ramos e pecíolos;
- 8: Manchas quase na totalidade das nervuras, ocasionando numerosas rupturas, desfolhação abundante e redução do crescimento das plantas, com lesões abundantes;
- 9: Maioria das plantas mortas.

	Bloco I		Bloco II		Bloco III		Média	
	AF	AV	AF	AV	AF	AV	AF	AV
P1	2	1	1	2	1	1	1,333	1,333
P2	1	1	1	2	1	2	1	1,666
P3	1	1	1	1	1	1	1	1
P4	1	1	1	1	1	4	1	2
P5	1	1	1	1	1	1	1	1
P6	1	1	1	2	1	1	1	1,333
P7	1	X	1	1	2	2	1,333	1.5
P8	1	X	1	1	1	1	1	1
P9	1	X	1	1	1	1	1	1
P10	2	1	1	1	1	1	1,333	1
P11	1	1	1	1	1	1	1	1
P12	1	1	1	1	1	2	1	1,333
P13	1	1	1	1	1	1	1	1
P14	1	1	1	1	1	1	1	1
P15	1	1	1	X	1	1	1	1
P16	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 3: Dados de resistência à antracnose dos genótipos. Bloco= Repetições; AF= Antracnose na folha; AV= Antracnose na vagem e X= Dado indisponível. Fonte: Adaptada de Lucas da Silva Domingues e Joel Donazzolo (2016).

Considerando que as plantas que ficam dentro da escala 1 até 3 são resistentes a antracnose, pode-se concluir que todos os 16 genótipos são resistentes à doença. Portanto, todos os marcadores amplificados nestes genótipos deveriam amplificar na mesma região que amplificam para o IAC-UNA, pois ele também é resistente à antracnose.

Quando comparados os resultados genotípicos (obtidos em laboratório) com os dados fenotípicos (obtidos a campo) percebe-se que há algumas discordâncias. Os marcadores SSR-IAC18a, SSR-IAC183 e SSR-IAC262 amplificaram na maioria dos genótipos no mesmo local que o CAL-143, contrariando os resultados fenotípicos. Isso demonstra que estes marcadores não podem ser validados, pois eles indicam que os genótipos deveriam ser suscetíveis à antracnose, o que não acontece na prática.

Para o marcador SSR-IAC67, metade dos genótipos possuem alelos do CAL-143 e a outra metade possui do IAC-UNA, tornando confusa a interpretação dos dados, pois além disso, há alguns genótipos que possuem em seu genoma um alelo do CAL-143 e o outro do IAC-UNA e não se sabe a interação destes alelos.

Os marcadores SSR-IAC284, SSR-IAC65, SSR-IAC239, SSR-IAC245 e SSR-IAC268 amplificaram na maioria dos genótipos (quando não na totalidade) na mesma posição que o IAC-UNA. Com esta informação e comparando-a com os dados fenotípicos, conclui-se que eles são válidos para se utilizar em programas de melhoramento por seleção assistida para a resistência à antracnose no feijoeiro.

Por conta dos dados fenotípicos terem sido levantados em safra anterior, não foi possível ter a campo os genótipos CAL-143 e IAC-UNA. Por isso não se tem dados fenotípicos destes dois genótipos naquela safra para aquelas condições ambientais as quais os outros 16 genótipos foram expostos. Portanto não há parâmetro de comparação entre os 16 genótipos de feijão comum e CAL-143 e IAC-UNA; apenas sabe-se que o CAL-143 é suscetível a antracnose enquanto o IAC-UNA é resistente à mesma.

Entretanto as condições ambientais daquela safra foram favoráveis ao desenvolvimento da doença. Nos 4 meses de cultivo a temperatura média foi de 22,68 °C, a média da umidade relativa do ar foi 82,33 % e a precipitação durante esse período foi de 971 milímetros (GEBIOMET, 2016). As condições favoráveis ao desenvolvimento da antracnose (já citadas no trabalho) são semelhantes as condições ambientais dessa safra, assim, presume-se que realmente os 16 genótipos de feijão comum são resistentes a antracnose.

Um ponto importante que deve ser destacado é que atualmente já foram identificados 28 genes no feijoeiro que conferem resistência à antracnose (BIC, 2017). Portanto, os genótipos analisados podem conter os demais genes de resistência à antracnose e, mesmo que não tenham os alelos apontados pelos marcadores SSR-IAC18a, SSR-IAC183 e SSR-IAC262, eles ainda podem expressar resistência a esse patógeno.

É necessário considerar que os marcadores testados neste trabalho conferem resistência para as raças 04, 38 e 55 de *C. lindemuthianum* (OBLESSUC et al. 2014). Segundo Rodríguez-Guerra et al. (2003), mais de 100 raças deste patógeno foram identificadas ao redor do mundo e, já em 1994, Rava et al. haviam identificado mais de 25 raças de antracnose no Brasil. Entre 1994 e 2002, Ana Lilia Alzate-Marin e Aloisio Sartorato (2004) identificaram 50 raças de *C. lindemuthianum* no Brasil em seus estudos, tendo como mais frequentes as raças 65, 73, 81 e 87. Ainda nesse estudo, os pesquisadores informam que o estado do Paraná é o que tem maior quantidade de raças (29 ao total) em comparação com os demais estados. De um total de 9 raças de antracnose que foram identificadas no Paraná por Gustavo Buziquia Dartibale (2016), as raças 0, 72 e 73 foram as mais frequentes, representando mais de 50% dos isolados coletados no estado.

Esses dados demonstram a grande variabilidade genética do fungo *C. lindemuthianum* e podem explicar a falta de relação de alguns dos marcadores com a resistência à antracnose, pois eles podem ter sido desenvolvidos a partir de uma raça da doença diferente daquela que acometeu os genótipos no campo de pesquisa dos professores Lucas Domingues e Joel Donazzolo.

7.2 ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA

Apesar de o foco do trabalho não ser analisar a diversidade genética, análises desta categoria se tornam possíveis de serem feitas com os dados obtidos. O método Gower correlaciona os dados fenotípicos e genotípicos e por meio de um algoritmo mede a distância genética entre os genótipos (MOURA, 2010), além de expressar o resultado em índices numa matriz. Com auxílio do programa Genes, foi efetuada a análise Gower e a maior distância genética entre os genótipos foi entre o P16 e P1

expressada pelo valor de 6,67; já a menor distância genética entre os genótipos foi entre o P13 e P6 com o índice de 0,23. A média da distância de todos os genótipos foi 3,45, sendo que a distância entre CAL-143 e IAC-UNA é de 5,97, considerada alta em relação à média e aos demais genótipos. A distância entre os genótipos CAL-143 e IAC UNA, já era esperada, tendo em vista que cada um dos genótipos apresentam diferenças na coloração dos grãos e também são contrastantes para resistência à antracnose e à mancha angular.

A distância de CAL-143 com os 16 genótipos varia entre 2,3 a 5,21; já a distância do IAC-UNA com os 16 genótipos é de 1,88 até 4,56. Isso comprova que a semelhança do IAC-UNA é maior com os genótipos utilizados do que a semelhança do CAL-143 com os mesmos genótipos. Esta relação acontece pelo fato de que os 16 genótipos são resistentes à antracnose, assim como o IAC-UNA.

Através do agrupamento de dissimilaridade pelo método UPGMA obtido pelo programa Genes, a figura 7 apresenta o dendrograma representando as distâncias genéticas que os genótipos têm entre si. Este dendrograma informa que os genótipos são semelhantes geneticamente, pois eles não formam estruturas em blocos separando os genótipos. Esse resultado era previsível, pois além de ser uma população pequena, não é natural para se dividir em locais. Além disso, não é oriunda de programas diversificados de melhoramento genético e o número baixo de marcadores utilizados pode prejudicar a análise de diversidade genética.

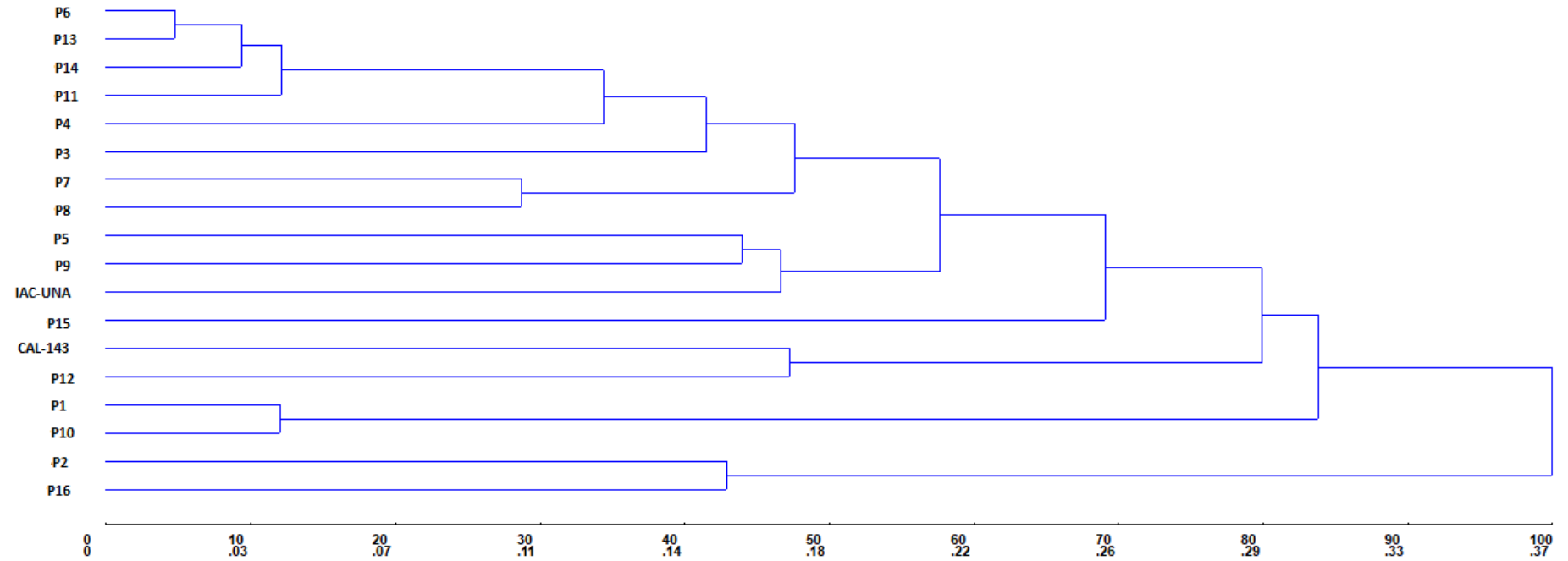


Figura 7: Dendrograma dos 16 genótipos de feijão comum juntamente com CAL-143 e IAC-UNA. Fonte: Autor, 2019.

Com auxílio do programa Structure foi possível realizar uma análise bayesiana e dividir os genótipos em 2 grupos (Figura 8). O próprio programa através do valor de *delta K* indica em quantos grupos é mais apropriado dividir. No caso dos genótipos deste trabalho o melhor foi em dois grupos ($k=2$).

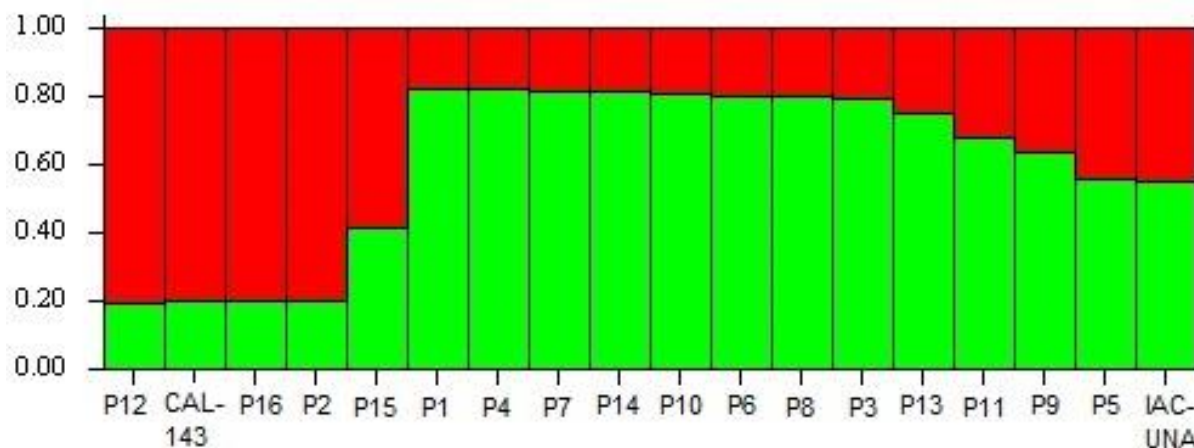


Figura 8: Representação dos 16 genótipos de feijão comum, CAL-143 e IAC-UNA. Fonte: Autor, 2019.

Cada barra da imagem representa um genótipo, o número de cores que há dentro de cada barra representa a quantidade de grupos que aquele genótipo compartilha. Já a porcentagem de cor representada dentro de cada genótipo, significa a proporção de genoma compartilhado com aquele grupo. A partir desses dados é possível reafirmar que os genótipos não têm grande diversidade genética, pois, além de serem separados em apenas dois grupos de características, todos os genótipos compartilham dos 2 grupos, ou seja, nenhum possui somente um grupo de característica. Esse fato dos genótipos estarem compartilhando alelos pode ser atribuído aos de resistência à antracnose que foram avaliados, já que os alelos que conferem resistência a uma determinada doença geralmente são herdados em blocos.

Os resultados das figuras 7 e 8 foram parecidos e isso de certa forma já era esperado, pois através dos dados de campo dos 16 genótipos de feijão comum é possível concluir que todos os eles compartilham atributos em comum já que são resistentes a antracnose.

8. CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares SSR-IAC284, SSR-IAC65, SSR-IAC239, SSR-IAC245 e SSR-IAC268 são validados e realmente tem relação com a antracnose. Os marcadores SSR-IAC18a, SSR-IAC183 e SSR-IAC262 não condizem com as características fenotípicas dos genótipos analisados, ou seja, os genótipos possuem resistência à antracnose (visualizada a campo) e os marcadores apontam suscetibilidade dos genótipos a essa doença. Já o marcador SSR-IAC67 aponta que metade dos genótipos são resistentes e o restante é suscetível, contrariando em partes os dados fenotípicos.

Quanto a diversidade genética, conclui-se que os 16 genótipos, CAL-143 e IAC-UNA são semelhantes em algumas regiões do genoma. Não é possível afirmar semelhança para mais regiões do genoma porque o número de marcadores moleculares utilizados é limitado e também porque eles são específicos para regiões de QTLs que conferem resistência a antracnose.

Diante dos resultados percebe-se a necessidade de realizar repetições com os 4 marcadores que falharam a fim de validá-los. Também fazer novas análises de incidência e severidade da antracnose nos 16 genótipos de feijão comum juntamente com o CAL-143 e IAC-UNA para ter um melhor parâmetro de comparação e o resultado ser mais consistente.

REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, Ana Lilia; SARTORATO, Aloísio. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. v. 47. **ANNUAL REPORT-BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE**, 2004, p. 241-242.

ANTONIO, Rafaela Priscila et al. Seleção assistida por marcadores de DNA em retrocruzamento visando resistência ao mofo branco em feijoeiro. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 61-67, 2012.

ANTUNES, Irajá F. Feijão. In: BARBIERI, Rosa Lía; STUMPF, Elisabeth Regina Tempel. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2008. p. 357-376.

BALSALOBRE, Thiago Willian Almeida et al. Marcadores moleculares funcionais associados com resistência a murcha de fusário em feijoeiro comum. In: **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. O melhoramento e os novos cenários da agricultura: anais. Vitória: Incaper, 2009.

BESPALHOK FILHO, João Carlos; GUERRA, Edson Perez.; OLIVEIRA, Ricardo. de. Melhoramento para resistência a doenças. In: _____. **Melhoramento de plantas**. Curitiba: UFPR, 2007. Cap. 16. p. 11-18.

BIANCHINI, Anésio; MENEZES, José R. de; MARINGONI, Antonio C. Doenças e seu controle. In: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989. p. 189-216.

BIC. **LIST OF GENES - *Phaseolus vulgaris* L.** BIC Genetics Committee: Prosser, EUA, 2017. Disponível em: <http://www.bic.uprm.edu/?page_id=91>.

BORÉM, Aluísio; MIRANDA, Glauco V. M. Marcadores Moleculares. In: _____. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. p. 434-458.

BRAMMER, Sandra P. **Marcadores moleculares**: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Documentos Online. n. 3. ISSN 1518-6512. EMBRAPA Trigo. dez. 2000.

CABRAL, Pablo Diego Silva et al. Diversidade genética de acessos de feijão comum por caracteres agronômicos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 898-905, 2011.

CAIXETA, Eveline T.; et al. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, Aluísio; CAIXETA, Eveline T.; **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 9-78.

CAMPOS, Tatiana. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites, mapeamento genético e mapeamento de características qualitativas em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Campinas, SP. 2009.

CASCÃO, Luma Mariano et al. Caracterização genética da coleção nuclear de feijão da Embrapa pelo uso de marcadores SSR. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **Variedade melhorada: a força da nossa agricultura: anais**. Viçosa, MG: SBMP, 2013.

COUTO, Karla Rodrigues et al. Identificação de marcadores microssatélites relacionados ao escurecimento de grãos em feijão. v. 45, n. 11. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**: Brasília, DF, 2011. p. 1268-1274.

COUTO, Karla Rodrigues et al. Identificação de QTLs ligados a resistência ao crestamento bacteriano em *Phaseolus vulgaris*. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **O melhoramento e os novos cenários da agricultura: anais**. Vitória: Incaper, 2009.

DARTIBALE, Gustavo Buziquia et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) oriundos dos estados do Paraná e de Pernambuco. **Anais do XXV Encontro Anual de Iniciação Científica. V Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**. UEL: Londrina, 2016. Disponível em: <<http://www.eaic.uem.br/eaic2016/anais/artigos/1405.pdf>>.

FANCELLI, Antonio L.; DOURADO NETO, Durval. Manejo de doenças. In: _____. **Produção de Feijão**. Piracicaba: Livroceres, 2007. p. 253-288.

FERREIRA, Carlos Magri; DEL PELOSO, Maria José; FARIA, Luís Cláudio de. **Feijão de Arranca**. ISSN 1679-8869. Versão eletrônica. EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO: Brasília, jan. 2003. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckh w71702wx5eo0a2ndxyore417p.html>.

FERREIRA, Juan J.; CAMPA, Ana; PÉREZ-VEJA, Elena; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, Cristina; GIRALDEZ, Ramón. Introgression and pyramiding into common bean market class fabada of genes conferring resistance to anthracnose and potyvirus. v. 124. **Theor Appl Genet.** p. 777-788, 2012.

FERREIRA, Marcia Flores da S. et al. Diversidade genética por marcadores microssatélites de feijão preto cultivado no Espírito Santo. In: **Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica; Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; Encontro Nacional De Iniciação à Docência.** São José dos Campos: UNIVAP, 2017. 2017.

GARCIA, Robertha Augusta Vasconcelos et al. Desenvolvimento e caracterização de microssatélites, mapeamento genético e identificação de QTL para tempo de cocção em *Phaseolus vulgaris*. **Tese de doutorado.** Goiás: UFG, 2009.

GEBIOMET. **Boletins Agrometeorológicos.** Grupo de Estudos em Biometeorologia – Gebiomet. UTFPR – Campus Dois Vizinhos. Disponível em: <<http://www.gebiomet.com.br/boletins.php>> . Acesso em: 01 de julho de 2019.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **Hort Science.** 1998. p. 1124-1130.

GUIMARÃES, Claudia T.; MOREIRA Maurilio A. Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas. In: BOREM, Aluizio. **Melhoramento de Espécies Cultivadas.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 865-896.

HOFFMANN, Lúcia V.; BARROSO, Paulo A. V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas.** Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18326/1/DOC147.pdf>>.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. v. 30 n. 12. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, dez. 2017. p.1-82.

LOGO, Raimundo Nonato Braga. Seleção Assistida por Marcadores. In: **AGEITEC** – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. EMBRAPA: Brasília, [s/d]. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000fy333t2402wx5ok0pvo4k3gqpln6m.html>.

MOTA, Ana Paula Simplício et al. Diversidade genética entre cultivares de feijão carioca da Embrapa estimada com base em marcadores microssatélites. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. **Variedade melhorada: a força da nossa agricultura: anais**. Viçosa, MG: SBMP, 2013.

MOTA, Ana Paula Simplício et al. Marcadores SSR e STS ligados ao gene Co-4 que controla a reação à antracnose do feijoeiro comum. **Dissertação de mestrado**. Goiânia: UFG, 2015.

MOURA, Maria da Cruz CL et al. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. v. 28. n. 2. **Horticultura Brasileira**: Brasília, DF, 2010. p. 155-161. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v28n2/a03v28n2>>.

OBLESSUC, P.R.; BARONI, R.M.; PEREIRA, G.S.; CHIORATTO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BRÍÑEZ, B. et al. **Quantitative analysis of race-specific resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean**. Molecular Breeding. 2014. p. 1313-1329.

OLIVEIRA NETO, Aroldo Antonio de; SANTOS, Candice Mello Romero. **A cultura do feijão**. Brasília, DF: Conab, 2018.

OLIVEIRA, Henrique de. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) declara 2016 como o “Ano Internacional dos Pulses”**. Embrapa, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses>>. Acesso em: 10 out. 2018.

PEREIRA, Helton Santos et al. Seleção fenotípica e assistida por marcadores moleculares de famílias de feijoeiro-comum com alta produtividade. v. 43, n. 11. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2008. p. 1551-1558

RAMALHO, Magno A. P. Genética quantitativa; Marcadores Moleculares. In: _____. **Genética na Agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012. p. 271-316/421-476.

RAMALHO, Magno A. P.; SANTOS, João B. dos. **Melhoramento do feijão**. v. 8. Belo Horizonte: Inf. Agropec. jun. 1982. p. 16-19.

RAVA, C.A.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. v. 18. n. 2. **Fitopatologia Brasileira**: Brasília, DF, 1994. p. 280.

RODRIGUES, Michelle Santos et. al. Avaliação de Linhagens Fontes de Resistência à Antracnose do Feijoeiro Comum Quanto à Reação a Diferentes Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **7º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Foz do Iguaçu: SBMP, 2013. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100640/1/p1687.pdf>>.

RODRÍGUEZ-GUERRA, R. et al. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. The British Society for Plant Pathology. **Plant Pathology**: Londres, Inglaterra, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-3059.2003.00808.x>>.

SCHIAVON, A. L. et al. Transferibilidade de marcadores microssatélites de soja para feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA 2009, Londrina. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 180-185.

TEIXEIRA, C. et al. Análise de polimorfismo de locos microssatélites em feijoeiro comum. Embrapa Arroz e Feijão-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS. **Resumos apresentados**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011.

TOPPA, Eder V. B.; JADOSKI, Cléber J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 12. n. 1. 2013. p. 1-5.

TORGA, Paula Pereira et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grãos e informações de QTLs. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE). **Ciência Agrotec**: Lavras, 2010.

VIEIRA, Clibas; et al. Melhoramento do Feijão. In: BORÉM, Aluizio. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 301-392.

WENDLAND, Adriane. **Doenças fúngicas da parte aérea**. AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. EMBRAPA: Brasília, [s/d]. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/fejao/arvore/CONT000gvwk5em102wx7ha0g934vg3trxyh6.html>>. Acesso em 24 out. 2018.