Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Mapeamento de genes análogos de resistência a patógenos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Luciane Santini

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

PIRACICABA
2009

Luciane Santini
Engenheira Agrônoma

Mapeamento de genes análogos de resistência a patógenos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Orientadora:
Profa. Dra. MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

PIRACICABA
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Santini, Luciane
Mapeamento de genes análogos de resistência a patógenos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) / Luciane Santini. - - Piracicaba, 2009.
95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Feijão 2. Fungos fitopatogênicos 3. Genes 4. Mancha angular 5. Mapeamento genético 6
Marcador molecular 7. Oídio 8. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 635.652
S235m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedicatória

A Deus, pela graça da existência,

aos meus pais, por tudo que sei e sou,

à minha avó e à minha madrinha, pelo apoio,

aos meus familiares

e a todos os amigos que me apoiaram,

com carinho, dedico este trabalho

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À professora Dra Maria Lucia Carneiro Vieira, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio e, principalmente, pela confiança em mim depositada, desde a minha Iniciação Científica.

Ao Dr. Luiz Ricardo Hanai, por todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho e por seus valiosos conselhos.

À Professora Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a todos os integrantes do Laboratório de Genética Molecular (UEL) pelo seqüenciamento das amostras de DNA.

À Professora Dra. Siu Mui Tsai, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e a Dra. Rosana Pereira Vianello Brondani, da Embrapa Arroz e Feijão, por fornecerem as sementes da população de mapeamento 'Bat 93' x 'Jalo EEP558'.

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos, da Universidade Federal de Lavras e ao Dr. Leonardo Cunha Melo, da Embrapa Arroz e Feijão, por fornecerem as sementes da população "Carioca" x "Flor de Mayo" e os dados de avaliação fenotípica utilizados neste trabalho.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi, do Instituto Agronômico de Campinas, pelo treinamento na metodologia de clonagem de fragmentos de DNA.

Aos professores do Departamento de Genética, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, Alessandra, Anselmo, Augusto, Carla, Carlos, Endson, Guilherme, Luiz Ricardo, Helen, Larissa, Luciano Lucena, Marcelo, Patrícia e Taislene, por toda a colaboração, apoio e companheirismo.

Ao técnico Carlos Alberto de Oliveira, pelo auxilio prestado durante todos esses anos.

A todos com quem convivi durante a minha Iniciação Científica e o meu curso de Mestrado, que tanto contribuíram em minha formação, em especial ao Dr. Luciano Consoli e a Dra Mariza Monteiro.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ e ao técnico Rafael Colombi por toda a colaboração prestada.

Aos colegas e aos funcionários do Departamento de Genética, por todas as contribuições.

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

SUMÁRIO

RESUMO 9

ABSTRACT 11

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15

2.1. A cultura do feijoeiro 15

2.2. Principais patógenos do feijoeiro 16

2.3. Resistência de plantas a patógenos 16

2.4. Mapas de ligação em *Phaseolus vulgaris* 18

2.5. Mapeamento de QTL 19

2.6. Mapeamento de QTL em feijão 21

3. MATERIAL E MÉTODOS 23

3.1. Material vegetal 23

3.2. Extração e quantificação de DNA 23

3.3. Desenvolvimento e genotipagem dos marcadores RGA (*Resistance Genes Analogs*) 24

3.3.1. Restrição do DNA 24

3.3.2. Ligação dos adaptadores 25

3.3.3. Amplificação via PCR dos marcadores RGA putativos 25

3.3.4. Separação dos locos amplificados 28

3.3.5. Coloração e visualização das bandas 28

3.4. Validação dos marcadores RGA 28

3.5. Mapeamento dos marcadores RGA 31

3.5.1. População BJ 31

3.5.2. População CFM 32

3.6. Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados ao controle de doenças fúngicas . 32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

4.1. Desenvolvimento e genotipagem dos marcadores RGA 35

4.1.1. Segregação dos locos polimórficos 35

4.2. Validação dos marcadores RGA 39

4.3. Mapeamento dos marcadores RGA 43

4.3.1. População BJ 43

4.3.2. População CFM 48

4.4. Mapeamento de QTL associados ao controle de doenças fúngicas 53

5. CONCLUSÕES 59

REFERÊNCIAS 61

ANEXOS 69

RESUMO

Mapeamento de genes análogos de resistência a patógenos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

No presente trabalho, a metodologia *NBS-profiling* foi utilizada para o desenvolvimento de marcadores RGA (*Resistance Genes Analogs*) em duas populações de *Phaseolus vulgaris,* sendo uma derivada do cruzamento entre 'Bat 93' e 'Jalo EEP558' (BJ) e a outra derivada do cruzamento entre 'Carioca' e 'Flor de Mayo' (CFM). Uma vez identificados, foram mapeados 32 marcadores RGA na população BJ e 40 na população CFM. Nove dos marcadores alocados no mapa de ligação da população BJ se localizaram em proximidade a *clusters* de resistência, já identificados por outros pesquisadores. Foi realizado o sequenciamento de 32 dos RGA detectados, sendo 16 da cada população. Cinco sequências oriundas da população BJ e três sequências da população CFM apresentaram similaridade com proteínas de resistência identificadas em *P. vulgaris*, *Glycine max* e *Medicago truncaluta*. O mapa de ligação aqui gerado para a população CFM foi utilizado para o posicionamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) de resistência à mancha-angular (*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun) e ao oídio (*Erysiphe polygoni* DC.). Um total de 12 QTL foi mapeado, cinco associados à resposta à mancha angular e sete à resposta ao oídio.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; RGA; Mapeamento genético; *NBS-profiling*; QTL de resistência; *Pseudocercospora griseola*; *Erysiphe polygoni*

ABSTRACT

Mapping resistance gene analogs in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

In the presenty study, the NBS-profiling method was used for the development of RGA (Resistance Gene Analogs) markers in two populations of *Phaseolus vulgaris*, one derived from a cross between 'Bat 93' and 'Jalo EEP558' (BJ) and the other derived from a cross between 'Carioca' and 'Flor de Mayo' (CFM). After their identification, 32 RGA markers were mapped on the BJ population and 40 on the CFM population. Nine of the markers assigned to the linkage map of the BJ population were located in the proximity to clusters of resistance already identified by other researchers. We carried out the sequencing of 32 out of the RGA detected, being 16 from each population. Five sequences derived from the BJ population and three sequences from the CFM population showed similarity to resistance proteins identified in *P. vulgaris*, *Glycine max* and *Medicago truncaluta*. The linkage map here generated for the CFM population was used for the positioning of QTL (Quantitative Trait Loci) for resistance to angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun) and powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC.). Twelve QTL were mapped, five associated to the response to the angular leaf spot and seven to the powdery mildew.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; RGA; Genetic mapping; NBS-profiling; QTL for resistance; *Pseudocercospora griseola*; *Erysiphe polygoni*

1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é de extrema importância para o Brasil e, também, em termos mundiais, por ser uma das principais fontes de ferro e proteínas para as populações de baixa renda. Isso faz com que o aumento de produtividade das lavouras e a melhoria da qualidade dos grãos sejam necessidades de cunho econômico-social. Frente a isso, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem a melhoria da produção. No aspecto produtivo, os problemas fitossanitários são os principais limitadores. A espécie é atacada tanto por doenças fúngicas quanto por vírus e bactérias. Cultivares resistentes têm sido produzidas com sucesso através de melhoramento genético. O desenvolvimento de marcadores moleculares e o seqüenciamento de genes de resistência a patógenos, clonados a partir do genoma de diversas espécies vegetais, têm possibilitado o emprego de estratégias de melhoramento mais sofisticadas, como o uso da seleção assistida (MIKLAS *et al*., 2006; FALEIRO *et al*., 2009).

Vários estudos genéticos têm sido realizados em feijão envolvendo a construção de mapas de ligação com base em marcadores de DNA e fenotípicos. Tais marcas foram reunidas em um mapa mais denso e completo do genoma do feijão, chamado mapa núcleo (FREYRE *et al.*, 1998), onde cerca de 1060 marcadores cobrindo 1226 cM do genoma do feijão foram mapeados. Porém, ainda muito se tem trabalhado para aumentar o número de marcadores informativos presentes no mapa de ligação como, por exemplo, os marcadores análogos a genes de resistência (RGA, *Resistance Gene Analogs*) e para a identificação de regiões genômicas controladoras de caracteres quantitativos (QLT, *Quantitative Trait Loci*) (MAXWELL *et al*., 2007; RODRÍGUEZ-SUÁREZ *et al*., 2007; CICHY *et al*., 2009).

O acúmulo de informações acerca de genes de resistência, clonados a partir de diferentes espécies vegetais, tem possibilitado o desenvolvimento de novas técnicas para o estudo sobre a genética da resistência. Com o intuito de identificar RGA, van der Linden *et al.* (2004), desenvolveram uma metodologia derivada de AFLP, a qual foi chamada de *NBS-profiling*. Esta técnica possibilita a detecção de polimorfismo por restrição e amplificação, como no AFLP, mas a PCR é ancorada por um *primer* degenerado, desenhado para buscar determinadas regiões em domínios conservados dos genes de resistência.

Os genes de resistência podem apresentar diversos domínios, no entanto, há um predomínio de genes contendo o domínio de ligação a nucleotídeo (NBS – *Nucleotide Binding Site*) e o domínio rico em repetições de leucina (LRR – *Leucine Rich Repeats*) (HAMMOND-

KOSACK; KANYUKA, 2007). Dessa forma, grande parte das pesquisas que visam à obtenção de marcadores RGA baseia-se na busca por tais domínios.

A técnica *NBS-profiling* mostrou-se eficiente para obtenção de marcadores RGA em diversas espécies, como cevada, batata, tomate, alface e maçã (VAN DER LINDEN *et al.*, 2004; CALENGE *et al*., 2005; BRUGMANS *et al.,* 2008). Além disso, não se limita à detecção de domínios NBS, podendo ser utilizada com *primers* desenhados para qualquer um dos domínios conservados dos genes de resistência.

O estabelecimento de marcadores RGA do tipo *NBS-profiling*, para o feijão permite um mapeamento mais preciso dos locos de resistência a patógenos. Frente a isto, este trabalho teve como objetivos (1) a obtenção e o mapeamento de marcadores RGA em duas populações de *P. vulgaris*: uma população modelo (estudada por vários laboratórios no Brasil e no exterior), 'Bat 93' X 'Jalo EEP558', e outra população, gerada na Universidade Federal de Lavras, 'Carioca' X 'Flor de Mayo'; (2) o mapeamento de QTL relacionados a resposta à mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*) e ao oídio (*Erysiphe polygoni*) para a população 'Carioca' X 'Flor de Mayo'.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A cultura do feijoeiro

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydae, ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae.

P. vulgaris é uma espécie autógama, diplóide, com 2n = 2*x* = 22 cromossomos. Quando comparados aos de outras espécies vegetais, seus cromossomos são pequenos, sendo o tamanho do genoma estimado entre 686 e 750 Mb (VIEIRA *et al*., 2005; BENNETT; LEITCH, 2005).

Os centros de origem e domesticação das espécies do gênero *Phaseolus* localizam-se no continente Americano (BAUDET, 1977 *apud* DEBOUCK, 1988). Há dois principais centros de domesticação e um terceiro centro menos expressivo (GEPTS; DEBOUCK, 1993 *apud* SANTOS; GRAVILANES, 2006). Os principais centros de domesticação correspondem à região central das Américas, onde se originou a maioria das cultivares de grãos pequenos, como a cultivar 'Carioca' e à região sul dos Andes, onde se desenvolveram as cultivares de grãos maiores, como 'Jalo'. O terceiro centro de domesticação está localizado em uma região intermediária entre os dois primeiros, situada na Colômbia. Devido à diversidade de ambientes onde o feijão é cultivado, a espécie apresenta uma ampla variabilidade para caracteres agronômicos, como hábito de crescimento, tamanho e cor dos grãos e duração do ciclo.

O cultivo do feijão comum tem elevada importância econômica e social, mormente na América Latina e na África tropical, sobretudo porque é a principal leguminosa de consumo direto e uma excelente fonte de ferro e proteínas na dieta humana. Além disso, a cultura emprega um elevado número de pessoas para a sua produção (BORÉM; CARNEIRO, 1998). No cenário mundial, tem-se o Brasil como o principal produtor e consumidor do feijão comum (FAOSTAT, 2007), com uma estimativa de produção de 3.524,2 mil toneladas na safra 2008/2009 (CONAB, 2009). No entanto, o país ainda apresenta sérios problemas que limitam a produtividade das lavouras e a qualidade dos grãos obtidos que são, principalmente, de ordem fitossanitária (DE PAULA JR; ZAMBOLIM,1998).

Frente a isso, torna-se necessária a execução de programas visando à melhoria das condições de produção, com destaque para o controle de doenças, reduzindo os custos e aumentando a qualidade do produto. Para atender a essas necessidades, a obtenção de cultivares

resistentes, com características agronomicamente desejáveis, é de extrema importância (RAMALHO; ABREU, 1998).

1.2. Principais patógenos do feijoeiro

Como citado anteriormente, as doenças estão entre os principais fatores limitantes de produtividade do feijoeiro. Tais doenças podem ser fúngicas, bacterianas ou viróticas, sendo a maioria delas, ocasionada por fungos (HALL, 1994). Entre os patógenos fúngicos que atacam o feijoeiro, destacam-se: *Phaeoisariopsis griseola* (mancha-angular), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (murcha-de-fusarium), *Uromyces appendiculatus* (ferrugem), entre outros (DE PAULA JR; ZAMBOLIM, 1998).

No que diz respeito às doenças bacterianas, o patógeno de maior relevância para a cultura no Brasil é *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, causador do crestamento-bacteriano-comum. E, em relação às doenças virais, merece destaque o mosaico dourado, transmitido por *Bemisia tabaci* biótipo B (VIEIRA *et al*., 2005; KIMATI *et al*., 2005).

Frente às elevadas perdas de qualidade e produtividade do feijão, causadas pela incidência de doenças, é imprescindível a obtenção de materiais geneticamente resistentes. A incorporação de resistência a doenças tem efeito estabilizador nas cultivares, evitando a oscilação de rendimento de um plantio para outro, ocasionada pelo ataque de patógenos. E, dessa forma, possibilita a cultivar expressar seu potencial produtivo (VIEIRA *et al.*, 2005).

1.3. Resistência de plantas a patógenos

Visando à obtenção de plantas resistentes a patógenos, esforços crescentes estão sendo empregados para o melhor entendimento dos mecanismos de resistência e dos genes que os controlam (LIU *et al.,* 2007; AMELINE-TORREGROSA *et. al*., 2008). Além das barreiras físicas e químicas contra patógenos, as plantas também possuem um sistema de defesa que lhes possibilita identificar os microorganismos patogênicos. No entanto, certos patógenos se tornaram adaptados a determinadas espécies de plantas e, através de fatores de virulência, suprimem parte dos mecanismos gerais de defesa da planta. Porém, quando a planta hospedeira possui genes específicos de resistência, capazes de detectar a presença do patógeno e de suprimir seus fatores de virulência, o patógeno não consegue se estabelecer. Para conseguir vencer os mecanismos de

resistência das plantas hospedeiras, o patógeno evolui, evitando ser detectado (BENT; MACKEY, 2007).

Sabe-se, atualmente, que os genes de resistência a diversos patógenos apresentam motivos conservados, os quais fazem parte dos mecanismos de transdução de sinal. Reconhecendo moléculas altamente conservadas, o sistema imune basal em plantas interage com uma ampla gama de agentes patogênicos (MICHELMORE; MEYERS, 1998; BENT; MACKEY, 2007).

De acordo com Michelmore e Meyers (1998), as proteínas codificadas por genes de resistência apresentam diferentes domínios, prevalecendo os que contêm regiões de ligação de nucleotídeos (NBS – *Nucleotide Binding Site*) e regiões repetitivas ricas em leucina (LRR – *Leucine Rich Repeat*). Há, também, domínios compostos por regiões LRR e transmembranares (TM), domínios compostos por regiões LRR e proteína quinase, o domínio simples de proteína quinase (Pto) e o domínio serina-treonina quinase (STK) (HAMMOND-KOSACK; KANYUKA, 2007).

Graças à existência de domínios característicos e de motivos conservados nos genes de resistência, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando identificar essas regiões. Assim, *primers* degenerados, desenhados para se anelarem às sequências dos motivos conservados, são empregados na busca de polimorfismo por amplificação. Isto tem possibilitado o estudo de herança de resistência e a obtenção de marcadores de DNA para uso em seleção assistida, assim como o isolamento e a clonagem de alguns genes (GEFFROY *et al.* 1999; PFLIEGER *et al.* 2001; VALLAD *et al.*, 2001; LÓPEZ *et al.*, 2003; VAN DER LINDEN *et al.*, 2004). A maioria dos genes de resistência clonados codifica proteínas pertencentes aos domínios NBS e LRR (ELLIS; DODDS; PRYOR, 2000).

Com base no conhecimento atual e nas constantes pesquisas relacionadas à resistência de plantas a patógenos, a obtenção de cultivares resistentes tornou-se o processo mais eficaz para o controle de doenças em plantas cultivadas. Ressalte-se que a resistência genética é a única alternativa viável de controle de certas doenças, como é caso das viroses de cana-de-açúcar, maracujá e feijão e de algumas doenças fúngicas e bacterianas (TREVISAN *et al.*, 2006; BUENO; MENDES; CARVALHO, 2006).

Vários programas de melhoramento genético foram desenvolvidos buscando obter cultivares resistentes a patógenos, em diversas espécies. No entanto, tais pesquisas são

dificultadas pelo fato de que os fenótipos de resistência não são facilmente distinguíveis (BENT; MACKEY, 2007), o que ocorre, basicamente, em casos de herança quantitativa.

Dessa forma, tornou-se necessária a utilização de métodos auxiliares na detecção de resistência. Uma alternativa amplamente empregada na identificação de genes de resistência em plantas é mediada pelo uso de marcadores moleculares, como relatado nos trabalhos de Tullu *et.al.* (2006), Leister *et al.* (1996), Geffroy *et al.* (1999), entre outros. Esses marcadores moleculares são constituídos por regiões análogas a genes de resistência (RGA - *Resistance Gene Analogs*). Estes são gerados a partir da amplificação de DNA genômico com *primers* degenerados, sintetizados a partir dos genes de resistência clonados em diferentes espécies (PFLIEGER *et al*. 2001; VALLAD *et al*., 2001; LÓPEZ *et al*., 2003; VAN DER LINDEN *et al*., 2004). Os marcadores RGA são uma excelente ferramenta para o mapeamento dos genes de defesa e resistência em diversas espécies, incluindo *P. vulgaris.*

1.4. Mapas de ligação em *Phaseolus vulgaris*

O mapeamento genético é uma poderosa ferramenta para os geneticistas. No início sua utilização era restrita, pois os mapas eram construídos a partir de marcadores morfológicos e citológicos (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Em 1961, foi publicado por Lamprecht o primeiro mapa de ligação para *P. vulgaris*, baseado em marcadores morfológicos, apresentando oito grupos de ligação (BASSETT, 1988). Nas décadas seguintes, vários pesquisadores se dedicaram a gerar outros marcadores morfológicos e bioquímicos. Utilizando o conjunto de dados gerados até então, Bassett (1991) publicou um mapa de feijão revisado, contendo 13 grupos de ligação. Com o advento dos marcadores de DNA, houve um expressivo aumento no número de marcadores gerados em diversas espécies, incluindo *P. vulgaris*, o que possibilitou o adensamento dos mapas de ligação existentes. Logo após a publicação do mapa revisado por Bassett, foi publicado o primeiro mapa de feijão utilizando marcadores moleculares do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) (VALLEJOS; SAKIYAMA; CHASE, 1992).

Desde então, vários mapas de ligação formam publicados para *P. vulgaris*, construídos a partir de diferentes populações e empregando marcadores dominantes, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e codominantes, como RFLP e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Tais mapas de ligação foram utilizados por Freyre *et al.* (1998) para a construção do mapa consenso da espécie, a partir de uma população oriunda do cruzamento entre 'Bat 93' e 'Jalo EEP558'. O mapa consenso apresentou 563 marcadores, distribuídos em 11 grupos de ligação e seu comprimento total foi de 1226 cM. Esse mapa é tido como referência para *P. vulgaris* e novos marcadores moleculares continuam sendo mapeados (BLAIR *et al*., 2003; GRISI *et al*., 2007; HANAI *et al*., 2009; anexo B).

A contribuição dos mapas genéticos para os estudos de filogenia e para o melhoramento genético é evidente (CARNEIRO; VIEIRA, 2002), no entanto, a maioria dos marcadores inicialmente utilizados era anônima. Recentemente, com o advento da Genômica, tornou-se possível a obtenção de marcadores informativos, provenientes de sequências caracterizadas. Esses marcadores são importantes ferramentas na obtenção de mapas genéticos melhor caracterizados e densos e facilitam a identificação de regiões associadas a genes de interesse. Nesse contexto, têm-se os RGA como exemplo de marcadores informativos, importantes na identificação e mapeamento de genes de resistência a patógenos em diversas espécies, incluindo *P. vulgaris* (RIVKIN; VALLEJOS; MCCLEAN, 1999; VAN DER LINDEN *et al*., 2004).

1.5. Mapeamento de QTL

A maioria dos caracteres de importância econômica apresenta herança poligênica. Para estes caracteres, a variação entre indivíduos é resultante da atuação de múltiplos locos, da interação entre eles e dos efeitos ambientais envolvidos na determinação dos fenótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VARSHNEY; TUBEROSA, 2008). Devido ao grande número de genes controlando tais características, os fenótipos resultantes seguem um padrão contínuo de variação, apresentando uma distribuição normal.

Os locos que controlam esses caracteres quantitativos recebem a designação QTL (*Quantitative Trait Loci*). A detecção de ligação entre um QTL e marcadores genéticos é uma importante ferramenta para o estudo da arquitetura das características quantitativas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; HALEY; ANDERSSON, 2002).

Para o mapeamento de QTL, buscam-se associações entre os fenótipos do caráter quantitativo e os alelos dos marcadores que segregam na população. E a determinação das associações entre QTL e marcadores depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e o QTL. Os desvios de segregação em relação às proporções esperadas

pela hipótese de segregação independente é que permitem a detecção e o mapeamento do QTL (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; COELHO, 2000).

O mapeamento de QTL pode ser realizado com base em análises de marcas únicas ou com base em análises de duas ou mais marcas simultaneamente. Quando se utilizam marcas únicas, não é necessária a existência de um mapa de ligação completo (COELHO, 2000). No entanto, quanto maior for a distância entre o loco marcador e o QTL, menor será a probabilidade de detectarmos a ligação entre eles, devido a possibilidade de recombinação. Além disso, esta forma de mapeamento pode gerar falsos positivos se o nível de significância adotado nas análises for muito baixo. E como os marcadores de um mesmo cromossomo se mostrarão ligados uns aos outros, qualquer QTL poderá se associar a vários marcadores (KEARSEY; FARQUHAR, 1998).

Com o método de mapeamento baseado em intervalo (IM - *Interval Mapping*), proposto por Lander e Botstein (1989), os conjuntos de marcadores genéticos ligados entre si são analisados simultaneamente com respeito aos seus efeitos sobre os caracteres quantitativos. Neste método, é utilizado o princípio de máxima verossimilhança para a verificação da presença de um QTL entre um par de marcadores adjacentes. E os resultados dos testes de localização dos QTL são expressos em razão de probabilidade, indicada pelo índice conhecido como LOD *score* (COELHO, 2000; KEARSEY; FARQUHAR, 1998). Porém, como no mapeamento por intervalo as análises são realizadas para os intervalos considerados isoladamente, podem ocorrer falsos positivos em regiões adjacentes a regiões que contenham QTL (DOERGE, 1993 *apud* COELHO, 2000).

Visando resolver os problemas gerados pelo mapeamento por intervalo, Zeng (1993, 1994) e Jansen (1993) desenvolveram o método de mapeamento por intervalo composto (CIM - *Composite Interval Mapping*), o qual corresponde a uma combinação entre o método de mapeamento por intervalo e análises de regressão linear múltipla (LIU, 1998 *apud* COELHO, 2000). No CIM é realizada uma análise prévia para a determinação das marcas mais informativas que serão utilizadas no mapeamento de um dado intervalo (SILVA; VENCOVSKY, 2002).

Visando aumentar ainda mais o poder da análise de QTL, Kao, Zeng e Teasdale (1999), desenvolveram o método de mapeamento por múltiplos intervalos (MIM - *Multiple Interval Mapping*). Este método aprimora o conceito presente no CIM, incorporando ao modelo a análise simultânea de múltiplos intervalos, possibilitando estimar efeitos como epistasia entre os QTL e

interação QTL *x* ambiente. No entanto, mesmo diante da maior precisão estatística apresentada pelo MIM, o método CIM ainda é o mais utilizado.

1.6. Mapeamento de QTL em feijão

Os objetivos do melhoramento genético do feijoeiro são variados, como por exemplo, a incorporação de resistência e tolerância a estresses abióticos, aumento da produtividade, melhoria da qualidade dos grãos, etc. Como a maioria dessas características apresenta herança quantitativa, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos buscando identificar QTL (FALEIRO *et al*., 2003; MAXWELL *et al*., 2007; MIKLAS *et al.*, 2009).

Como não é possível desenvolver uma única população segregando para todos os caracteres de interesse, diferentes populações foram utilizadas no mapeamento. No entanto, as informações de muitos QTL mapeados já foram incluídas no mapa referência da espécie 'Bat 93' x 'Jalo EEP558' (BJ) (FREYRE *et al*., 1998). O mapa BJ atualizado apresenta vários QTL mapeados, incluindo QTL de resistência a patógenos, de tolerância a insetos praga, de sensibilidade ao foto-período e de coloração dos grãos. O mapeamento de QTL também consiste em uma importante ferramenta em programas de melhoramento que buscam a introgressão gênica, a partir de outras espécies ou de germoplasma silvestre (SINGH, 2005).

Especificamente para a identificação de genes e mapeamento de QTL de resistência a patógenos em feijão, foram utilizadas populações com diferentes estruturas genéticas. Sendo elas: linhagens quase isogênicas (NILs – *Near Isogenic Lines*), linhagens isogênicas, F2 segregantes, e linhagens recombinantes endogâmicas (RILs – *Recombinant Inbred Lines*) (ver GEPTS *et al*., 2008). Recentes publicações sobre o mapeamento de QTL em feijão mostram grande interesse dos grupos de pesquisa na identificação de *clusters* de resistência a patógenos e de tolerância a estresses abióticos (CICHY *et al.*, 2009; MIKLAS *et al*., 2009).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Neste estudo, foram utilizadas duas populações de *Phaseolus vulgaris*, o feijão-comum, compostas por linhagens recombinantes (RILs). Uma delas, a população núcleo de mapeamento, é proveniente do cruzamento entre as variedades 'Bat 93' e 'Jalo EEP558' (BJ) e a outra, do programa de melhoramento da Universidade Federal de Lavras (MG), derivada do cruzamento entre "Carioca" e "Flor de Mayo" (CFM). Segue a descrição dessas populações.

População BJ: corresponde a população utilizada por FREYRE *et al*. (1998) para a integração dos mapas de feijão. Essa população é muito utilizada em estudos de mapeamento pelo fato dos genitores serem provenientes de diferentes centros de origem. 'Bat 93' é uma linhagem mesoamericana desenvolvida no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical/Cali, Colombia) e 'Jalo EEP558' é uma seleção da landrácea 'Jalo', de origem Andina, obtida na Estação Experimental de Patos de Minas. Esta população segrega para diversas características, como para resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro, ao crestamento bacteriano, à mancha-angular, ferrugem e antracnose (NODARI *et al*., 1993). No desenvolvimento deste trabalho, foram empregados os genitores do cruzamento e 74 RILs na geração F_8. O material foi gentilmente cedido pela Dra. Siu Mui Tsai (CENA/USP) e pela Dra. Rosana Pereira Vianello Brondani (Embrapa Arroz e Feijão).

População CFM: é formada por 196 RILs na geração $F_{5:7}$, que foi utilizadas no mapeamento genético realizado por Melo, Santos e Ferreira (2002) e por Hanai (2008). Esta população também é segregante para diversas características, entre elas, para reação ao oídio e à mancha-angular (MELO; SANTOS; FERREIRA, 2002). No presente trabalho foram utilizados os genitores do cruzamento, ou seja, 'Carioca' e 'Flor de Mayo' e 94 das 196 RILs disponíveis. As sementes dos genitores e das linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. João Bosco dos Santos (Universidade Federal de Lavras).

2.2. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA de todos os indivíduos foi realizada a partir de 300 mg de tecido foliar fresco jovem, utilizando-se o método CTAB (DELLAPORTA; WOOD; KICKS, 1983). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% (p/v), acrescido de 0,5 X de *SYBR*®

Safe DNA gel stain (Promega). O gel foi visualizado sob luz UV e digitalizado utilizando-se o equipamento de fotodocumentação *Multi Doc-It Digital Imaging System* (UVP). A comparação entre a fluorescência das bandas do DNA extraído e do fago λ, de concentrações conhecidas, permitiu estimar, visualmente, as concentrações das amostras. Foi então, feita uma alíquota de trabalho do DNA de cada população e dos respectivos genitores na concentração de 20 ng/µL.

2.3. Desenvolvimento e genotipagem dos marcadores RGA (*Resistance Genes Analogs*)

Para o desenvolvimento dos marcadores RGA foram utilizados *primers* degenerados desenhados, especialmente, para buscar sequências conservadas nos genes de resistência a patógenos em plantas (Tabela 1).

Tabela 1- *Primers* complementares às sequências dos RGA usados no presente estudo

Primer	Seqüência[7] 5' – 3'	Descrição
NBSa-F[3]	GGA ATG GGK GGA CTY GGY AAR AC	Domínio NBS/*P-loop*
NBSa-R[3]	ATC ATA ACT TAT TTT KAG	Domínio NBS-LRR/Motivo 2
NBS5[1]	YYTRKRTHGTMITKGATGATGTITGG	Domínio NBS/Quinase 2
Kdc-F[3]	ATG GGA AGG AAG TAT TCC AA	Domínio Quinase
Kdc-R[3]	ARG TTC CAC AGG ACA TCA CC	Domínio Quinase
Kde-F[3]	AAG AAA TTG CGG TAA AAA GGC TA	Domínio Quinase
Kde-R[3]	AAG ATT CTG GCC ATC CCA AAA TC	Domínio Quinase
RGP-F[2,5]	GGN ATG GGY GGB RTH GGY AAR AC	Domínio NBS/*P-loop*
RGHDR2[2,5]	CAR MGC YAA WGG YAA DCC	Domínio NBS/hidrofóbico
P2-R[2,4]	A CCR AAN GAR TAN ACR TC	Domínio STK/subdominio X
P3-F[2,4]	TNG GNS ANG GNG KNT TYG G	Domínio STK/subdomínio I
PR5[2,3]	AAC AAY TGY CCR TAC ACC GT	Proteína de defesa/PR5
PR5-AS[2,3]	GGA TCA TCT TGW GGR TAR CTA TA	Proteína de defesa/PR5
Glus[2,3]	RYN GGN GTW TGY TAY GG	Proteína de defesa/PR2
Glu-As[2,3]	CAD CCR CTY TCN GAY AC	Proteína de defesa/PR2

[1]Adaptado de van der Linden *et al*., 2004; [2]Adaptado de Lanaud *et al*., 2004; [3]Adaptado de Pflieger *et al*., 2001; [4]Adaptado de Vallad *et.al*., 2001; [5]Adaptado de Geffroy *et al*., 1999; [6]Adaptado Leister *et al*., 1996; [7]Código para bases mistas: Y = C ou T; R = A ou G; W = A ou T; B = C, G ou T; H = A, C ou T; D = A, G ou T; S = C ou G; K = G ou T; M = A ou C; S = C ou G; D = A, G ou T; V = A, C ou G; N = A, C, G ou T; I = inosina

2.3.1. Restrição do DNA

O DNA genômico dos genitores da população BJ foi digerido com quatro enzimas de restrição. As enzimas foram selecionadas com base no tipo de fragmento gerado, optando-se por aquelas que geram fragmentos abruptos: *Alu*I (New England BioLabs®), *Hae*III (Fermentas™) e *Rsa*I (New England BioLabs®), que reconhecem 4 pb e *Dra*I (Fermentas™) que reconhece 6 pb.

Um total de 200 ng de DNA foi digerido com 6 U de enzima, em um volume de 20 µL, seguindo as condições do fabricante. A reação ocorreu em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), durante 4 h a 37°C, com posterior inativação das enzimas a 80°C durante 20 min.

2.3.2. Ligação dos adaptadores

O adaptador foi preparado pela mistura equimolar dos dois oligonucleotideos (Tabela 2) para uma concentração final de 40 µM. A mistura foi aquecida por 10 min a 65°C e resfriada, lentamente, a temperatura ambiente.

A seguir, o adaptador foi ligado às extremidades dos fragmentos gerados pela restrição. A mistura de ligação totalizou 40 µL, contendo 20 µL do DNA digerido, 1,25 µL de adaptador (40 µM), 2µL de tampão de ligação (10X), 1,2 unidades da enzima de ligação T4-DNA ligase (New England BioLabs®) e água destilada deionizada para completar o volume. A reação de ligação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), tendo permanecido 14 h a 16°C, com posterior inativação da enzima a 65°C durante 20 min.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos usados para buscar sequências candidatas a RGA em feijão

Oligonucleotídeo	Sequência
Fita longa do adaptador[1]	5'-ACT CGA TTC TCA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA-3'
Fita curta do adaptador[1]	3'-H_2N TTC ATA TCT AGG GT-5'
Primer do adaptador[1]	5'-ACT CGA TTC TCA ACC CGA AAG-3'

[1]Adaptados de van der Linden *et al*. (2004)

2.3.3. Amplificação via PCR dos marcadores RGA putativos

As reações foram realizadas no volume de 20 µL, contendo 3 µL de DNA digerido e ligado aos adaptadores, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,25 µM do *primer* "âncora" (RGA), 0,25 µM do *primer* do adaptador, 10X do tampão de PCR, 1U da enzima Taq DNA polimerase (Promega®) e água destilada deionizada para completar o volume.

O adaptador e seu *primer* foram especificamente desenhados para garantir a amplificação dos fragmentos desejados, ou seja, aqueles entre o adaptador e uma região conservada ancorada a um gene de resistência. Utilizou-se para a formação do adaptador uma fita curta, sem a região de anelamento do *primer* do adaptador, com a extremidade 3' bloqueada por um radical amino, e

uma fita longa contendo a região complementar ao sítio de anelamento do *primer* do adaptador (Tabela 2). Assim, no primeiro ciclo de amplificação, o sítio de anelamento do *primer* não existe no adaptador, o que garante a extensão da primeira fita apenas a partir do *primer* âncora (fase linear da PCR).

Esta primeira extensão ocorre até o final do fragmento, que termina com a fita longa do adaptador, o que gera, assim, o sítio de anelamento do *primer* complementar ao adaptador. Então, a partir do segundo ciclo, ocorre a extensão da segunda fita (fase exponencial da PCR). Um esquema ilustrativo é apresentado na figura 1.

As reações de amplificação foram realizadas em dois estágios. Após a desnaturação inicial de 5 min a 94°C, ocorreu um primeiro estágio, composto por 8 ciclos, com desnaturação de 45 s a 94°C, anelamento de 50 s com temperatura iniciando em 58°C e tendo uma redução de 1°C a cada ciclo, e extensão de 1 min a 72°C. Um segundo estágio foi programado, composto por 25 ciclos, com desnaturação de 45 s a 94°C, anelamento de 50 s a 50°C e extensão de 1 min a 72°C, ao final dos quais ocorreu uma incubação adicional de 7 min a 72°C para a extensão dos fragmentos.

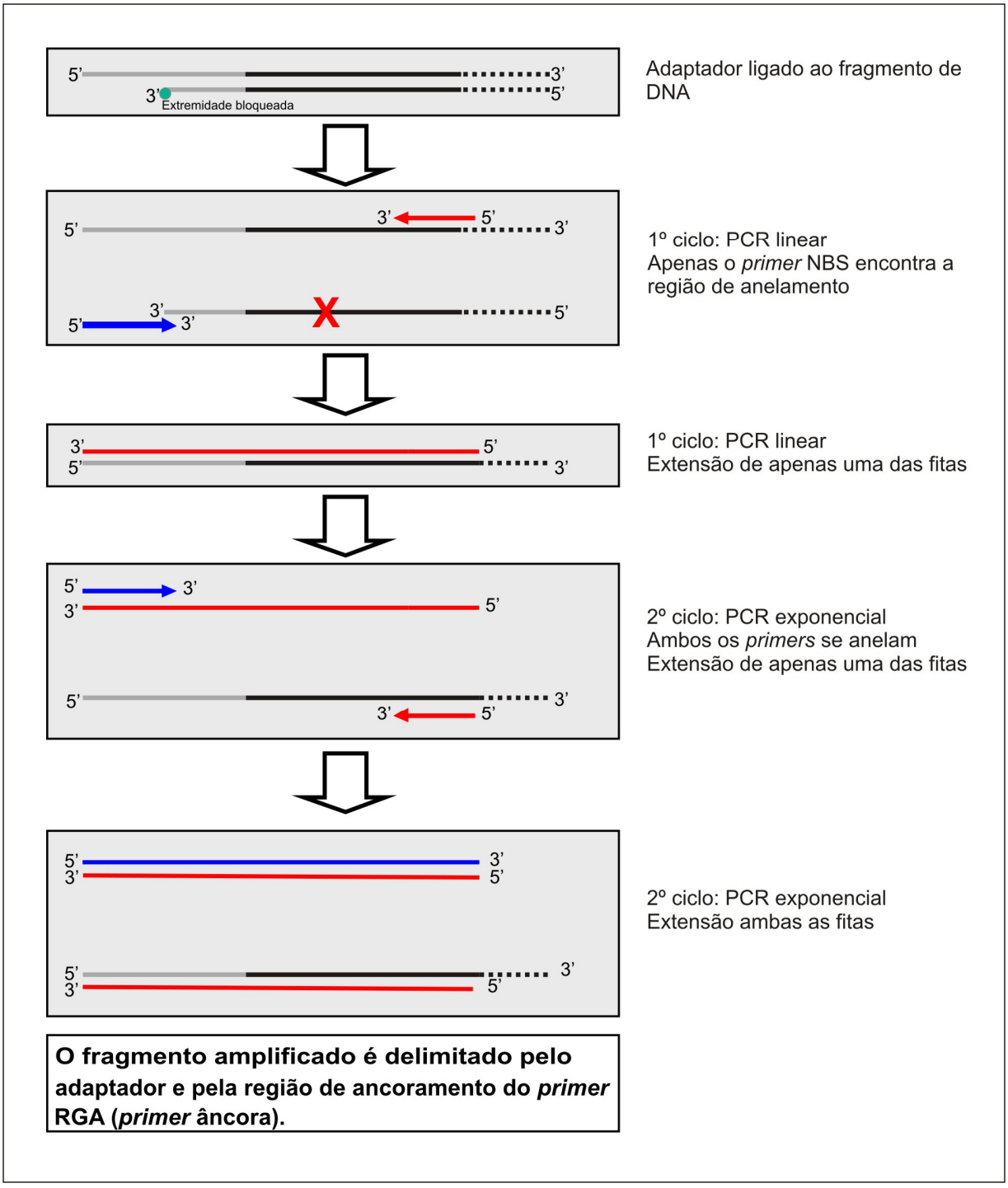

Figura 1 - Esquema demonstrativo da amplificação de locos RGA, utilizando a abordagem *NBS-profiling* (VAN DER LINDEN *et al*., 2004)

2.3.4. Separação dos locos amplificados

O produto da PCR foi desnaturado pela adição de igual volume de tampão de corrida desnaturante (0,2% de azul de bromofenol, 0,2% de xileno cianol, 10 mM EDTA, pH 8,0, e 95% de formamida) e aquecimento a 95ºC por 5 min. Uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi então aplicada em gel de poliacrilamida de 0,4 mm de espessura [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão TBE 1X], o qual foi submetido a uma potência constante de 70 W por cerca de 4 h, usando-se um aparato de eletroforese Sequi-Gen® (Bio-Rad). *Ladders* de 25 e 100 pb foram usados como marcadores de massa molecular.

2.3.5. Coloração e visualização das bandas

A coloração foi realizada com nitrato de prata ($AgNO_3$), de acordo com Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001), com algumas modificações, como descrito a seguir. A fixação do gel foi feita por imersão em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, agitando por 10 min, seguida de uma lavagem com água destilada deionizada, durante 1 min, com agitação. O procedimento de pré-tratamento foi realizado com solução de ácido nítrico 1,5%, durante 3 min, seguindo-se uma nova lavagem do gel com água destilada deionizada durante 1 min. A impregnação do gel foi realizada com a solução $AgNO_3$ 0,2% durante 20 min, sob agitação, seguida de duas novas lavagens com água destilada deionizada, com duração de 30 s cada. Para a revelação dos géis foram utilizados 2 L de solução contendo 30 $g.L^{-1}$ de Na_2CO_3 e 1,0 $mL.L^{-1}$ de formaldeído (37%). Nesta etapa, 1 litro foi aplicado sobre o gel até começarem a surgir bandas. A solução foi então substituída pelo outro litro de solução reveladora, para finalizar o processo de revelação. Após a revelação das bandas, o gel foi transferido para uma solução de bloqueio contendo ácido acético 5%, onde permaneceu durante 5 min. Em seguida, realizou-se uma lavagem com água destilada deionizada durante 1 min. Após este passo, para a secagem do gel, a placa foi colocada em posição vertical, em local seco e arejado, sob temperatura ambiente, possibilitando posterior análise das bandas presentes. Os géis foram analisados sobre uma fonte de luz branca, e digitalizados por um *scanner* (Color Page - Genius®).

2.4. Validação dos marcadores RGA

Após a genotipagem, os locos segregantes que apresentaram um tamanho entre 200 pb e 700 pb foram extraídos do gel de poliacrilamida para serem clonados e seqüenciados. Os

fragmentos extraídos foram eluídos em 100 µL de TE 10:01 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) e, posteriormente, transferidos para colunas de filtragem e submetidos a centrifugação a 6000 rpm durante 5 min em centrífuga de mesa (USA Scientific®). O DNA recuperado foi utilizado em uma PCR para confirmar o tamanho dos fragmentos e se certificar que nenhum deles foi amplificado somente a partir do *primer* do adaptador.

Para a confirmação dos fragmentos, as reações foram realizadas de duas formas. Uma delas, constituindo o controle positivo, contendo tanto os *primers* âncoras quanto o *primer* do adaptador, e outra, correspondente ao controle negativo, contendo somente o *primer* do adaptador.

As reações realizadas para o controle positivo totalizaram um volume de 50 µL, contendo 10 µL de DNA, 0,25 µM do *primer* "âncora", 0,25 µM do *primer* do adaptador, 25 µL de *Master Mix Go Taq Flexi* (Promega®) e água destilada deionizada para completar o volume. Nas reações realizadas para o controle negativo, o volume total foi de 20 µL, contendo 5 µL de DNA, 0,25 µM do *primer* do adaptador, 10 µL de *Master Mix Go Taq Flexi* (Promega®) e água destilada deionizada para completar o volume. As condições de amplificação foram as mesmas descritas no item 4.3.3.

Uma alíquota de 5 µL das reações foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), acrescido de 0,5 X de *SYBR® Safe DNA gel stain* (Promega). Foi utilizado *Ladder* de 100 pb como marcador de massa molecular. O gel foi visualizado sob luz UV e digitalizado utilizando-se o equipamento de fotodocumentação *Multi Doc-It Digital Imaging System* (UVP). O volume restante das reações que apresentaram o resultado esperado foi utilizado em uma nova eletroforese, em gel de agarose 0,8% (p/v), possibilitando a extração dos fragmentos desejados do gel. A purificação destes fragmentos foi realizada utilizando-se o *Pure Link™ Quick Extration Kit* (Invitrogen).

Os fragmentos de interesse foram, então, ligados ao vetor de clonagem *pGem-T Easy Vector System* (Promega®). A ligação foi realizada em volume total de 20 µL, contendo 10 µL de tampão de ligação (2x), 25 ng do vetor, 6 µL dos fragmentos de DNA, 3 U de enzima T4 DNA ligase (Promega®) e água destilada deionizada para completar o volume. A concentração do DNA utilizado na ligação foi definida para garantir a relação ótima entre o tamanho do inserto e a quantidade de vetor utilizada, conforme as especificações do fabricante do vetor. A ligação ocorreu *overnight* a 4°C.

O produto da ligação foi usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α (HANAHAN, 1983). A transformação foi realizada em volume total de 80 µL, contendo 50 µL de células competentes, 24 µL de tampão de transformação e 6 µL do produto de ligação. A solução foi cuidadosamente homogeneizada e deixada no gelo durante 20 min (com homogeneização esporádica). Em seguida, foi imediatamente transferida para o banho-maria a 42°C por 2 min e novamente colocada em gelo, onde permaneceu por 5 min. Após esse período, as amostras foram levadas para câmara de fluxo laminar, onde 450 µL de meio de cultura SOC (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) pré-aquecido a 37°C foram adicionados.

Para o crescimento inicial das células bacterianas transformadas, estas foram incubadas em estufa a 37°C, por 60 min; terminado este período, centrifugou-se a 1300 rpm por 30 s, descartaram-se 420 µL do sobrenadante, e ressuspendeu-se o restante. Em seguida, 60 µL do produto da transformação, 60 µL de IPTG 20% (0,2 $g.mL^{-1}$ de IPTG) e 60 µL XGAL 2% (20 $mg.mL^{-1}$ de X-GAL; 5 mL de formamida), foram plaquedos em meio LB sólido (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) acrescido de 100 $\mu L.mL^{-1}$ de ampicilina.

As placas foram incubadas em BOD a 37°C por cerca de 18 h para o crescimento das colônias e, então, armazenadas a 4°C até o dia seguinte, o que possibilitou a diferenciação entre colônias transformadas (coloração branca) e não transformadas (coloração azul). Após a identificação das colônias transformadas, estas foram selecionadas e transferidas para placas do tipo ELISA, contendo 200 µL de meio LB. A incubação foi realizada *overnight* a 37°C.

As *minipreps* para purificação dos fragmentos clonados foram realizadas por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para a verificação dos insertos, foi realizada uma PCR com os *primers* pUC/M13 - 40F e pUC/M13 - 46R, complementares a regiões do vetor de clonagem (*pGem-T Easy Vector System* - Promega®). A verificação dos insertos foi realizada com base no tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação.

As reações foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 2 µL de DNA, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 2 µM de cada *primer*, 1X do tampão de PCR (10 mM Tris-HCl em pH 9,0 a 25°C, 50 mM KCl e 0,1% Triton® X-100), 1U da enzima Taq DNA polimerase (*Go Taq Flexi* - Promega®) e água destilada deionizada para completar o volume.

As amplificações ocorreram com desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos com desnaturação de 30 s a 94°C, anelamento de 60 s a 55°C, e extensão de 90 s a 72°C; ao final dos ciclos ocorreu uma incubação adicional de 10 min a 72°C para a extensão dos

fragmentos. A separação e verificação do tamanho dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando como padrão de massa molecular o marcador *Ladder* 100 pb.

Os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado foram sequenciados de acordo com o método desenvolvido por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), usando o DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE) e o seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

A qualidade das sequências foi avaliada usando-se o pacote computacional *Phred/Phrap/Consed* (EWING *et al*., 1998), adotando como limiar para a aceitação das sequências o valor *Phred/Phrap* igual a 20.

As sequências obtidas foram analisadas através do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment), por comparação com as sequências existentes no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As análises foram feitas por BLASTx e as sequências que apresentaram similaridade com proteínas conhecidas foram analisadas por BLAST especializado de domínios conservados (BLASTcd).

2.5. Mapeamento dos marcadores RGA

Os mapas de ligação de ambas as populações foram construídos utilizando-se o programa *MapMaker/Exp* versão 3.0 para *Windows* (LANDER *et al*., 1987).

2.5.1. População BJ

Para as análises de mapeamento, foram usados os dados de segregação de 424 marcadores, sendo 130 marcas do mapa consenso, 203 marcas AFLP, 59 microssatélites e 32 RGA. Os dados de segregação dos marcadores do mapa consenso foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Gepts (*University of California,* USA) e os marcadores AFLP e microssatélites foram desenvolvidos por Hanai (2008). Para a construção do mapa BJ, primeiramente, foram escolhidos três marcadores de cada grupo de ligação do mapa consenso (FREYRE *et al.,* 1998), sendo um marcador de cada extremidade e um marcador da região central. Esses marcadores foram usados para a determinação dos 11 grupos de ligação de *P. vulgaris*. Após a pré-determinação dos 11 grupos, os demais marcadores foram atribuídos aos grupos de ligação através do comando "assign", com um LOD > 3,0. Com o comando "suggest subset", foram identificados os 10

marcadores mais informativos de cada grupo de ligação, os quais foram então ordenados pelo comando “compare”. O restante dos marcadores foi alocado aos grupos de ligação utilizando-se o comando “try” e a ordenação das marcas foi então verificada pelo comando “ripple”.

2.5.2. População CFM

O mapa de ligação para a população CFM foi construído com base a partir de análises realizadas com os dados de segregação de 295 locos (225 AFLP, 27 microssatélites e 43 RGA). Os marcadores AFLP e microssatélites foram obtidos por Hanai (2008).

Para a determinação dos grupos de ligação foi utilizado o comando “group” com LOD > 7,0. Em cada grupo de ligação foram selecionados os 10 marcadores mais informativos, com menos dados perdidos e que apresentaram a segregação esperada para serem ordenados utilizando o comando “compare”. Os demais marcadores foram adicionados aos grupos de ligação através do comando “try” e posteriormente a ordenação dos marcadores foi verificada pelo comando “ripple”

A correspondência entre os grupos de ligação de cada população foi determinada pela existência de marcadores comuns aos mapas CFM e BJ.

Na construção de ambos os mapas de ligação, os marcadores que não puderam ser ordenados com LOD maior que 2,0 foram atribuídos aos intervalos mais verossímeis. As freqüências de recombinação foram então transformadas em distância de mapa (cM), utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). E após a obtenção das distâncias (em cM) entre os marcadores, o programa *MapChart* (VOORRIPS, 2002) foi usado para construir a representação gráfica dos mapas.

2.6. Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados ao controle de doenças fúngicas

O mapa de ligação da população CFM foi utilizado para o mapeamento de QTL associados a resistência à mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*) e ao oídio (*Erysiphe polygoni*).

Para as análises de mapeamento de QTL, foram utilizados os dados fenotípicos de reação à mancha-angular e ao oídio obtidos por Melo, Santos e Ferreira (2002). As famílias dessa população foram avaliadas em duas épocas de plantio (época das secas e do inverno), em duas

localidades do Estado de Minas Gerais (Lavras e Patos de Minas). As avaliações quanto à resistência ao oídio foram realizadas durante o inverno, em 1996 e 1997. E a resposta da população à mancha-angular foi avaliada durante a época das secas, em 1997 e 1998. A co-segregação dos marcadores com as os valores fenotípicos foi detectada por "mapeamento por intervalo composto" (ZENG, 1993, 1994; JANSEN, 1993), usando-se o programa *QTL Cartographer* para Windows, versão 2.5 (WANG; BASTEN; ZENG, 2007). O limiar para se aceitar um QTL foi obtido através de 1000 permutações com 5% de significância. O pico de LOD *score* foi adotado como estimativa da posição do QTL no mapa de ligação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento e genotipagem dos marcadores RGA

No total, foram testadas 60 combinações de quatro enzimas de restrição com 15 *primers* RGA, visando à detecção de polimorfismos nas duas populações. Os padrões de amplificação variaram desde quatro locos claramente visíveis a até mais de 50 locos, dependendo da combinação enzima/*primer*.

A seleção das melhores combinações de enzimas de restrição com *primers* RGA foi realizada com base no padrão de amplificação e no polimorfismo entre os genitores das populações de mapeamento. As combinações apresentando os melhores padrões de amplificação e, também, os maiores níveis de polimorfismo, foram usadas para a genotipagem das RILs. Com relação à população BJ, a enzima *Rsa*I foi a que gerou os melhores padrões de amplificação para a maioria dos *primers* testados. Quatro *primers* (NBSa-F, Kdc-F, Kdc-R e RGP-F) foram selecionados para a genotipagem desta população, após a restrição com a enzima *Rsa*I.

Nos testes de combinações para a população CFM, foram utilizados os genitores e quatro linhagens (RILs). Após os testes, selecionaram-se oito combinações enzima/*primer* para a genotipagem. Das combinações selecionadas, seis correspondem à restrição com a enzima *Dra*I e a amplificação com os *primers* Kdc-F, Kdc-R, Kde-F, Kde-R, Glu-As e RGP-F. As outras duas combinações utilizadas foram com *Alu*I e os *primers* Kdc-F e PR5.

3.1.1. Segregação dos locos polimórficos

A genotipagem da população BJ foi realizada usando as combinações *Rsa*I/NBSa-F, *Rsa*I/Kdc-F, *Rsa*I/Kdc-R e *Rsa*I/RGP-F, gerando um total de 194 locos, dos quais 32 foram polimórficos (16,5%). Um gel com as combinações *Rsa*I/NBSa-F é mostrado na figura 2 e os dados coletados estão nas tabelas 3 e 4. Já para a genotipagem da população CFM foram utilizadas oito combinações, mostradas na tabela 5, que geraram um total de 387 locos, dos quais 43 (11,1%) foram polimórficos (Tabela 6).

As taxas de polimorfismo observadas devem-se, em parte, à metodologia empregada, como se pode perceber ao comparar nossos dados com os de pesquisadores que utilizaram outras técnicas. Assim, Mutlu, Miklas e Coyne (2006) encontraram um polimorfismo de 24,4% para a população BJ, no entanto, utilizaram uma abordagem baseada em PCR com 100 combinações

entre diferentes *primers* degenerados complementares a genes de resistência a patógenos. O polimorfismo encontrado entre os genitores 'Bat 93' e 'Jalo EEP558' também foi maior nos trabalhos desenvolvidos por Yu *et al*. (2000), que detectaram 43% de polimorfismo usando marcadores microssatélites e por Hanai *et al.* (2009), que encontraram 29% de polimorfismo usando marcadores AFLP.

Apesar da maioria dos locos ter segregado de acordo com o esperado (1:1), quando aplicado o teste de aderência, χ^2 (α = 0,05), a freqüência de locos apresentando distorção de segregação foi relativamente alta (31,2% para BJ e 37,2% para CFM). Estes valores são superiores aos 18% de distorção de segregação encontrados por Freyre *et al.* (1998) para a população BJ, utilizando marcadores anônimos. Uma possível explicação seria a ligação forte destes locos marcadores com genes de resistência, o que pode ter influenciado no processo de seleção destas populações. Hipótese esta reforçada pelo fato dos genitores 'Bat 93' e 'Jalo EEP558' serem fenotipicamente contrastantes quanto à suscetibilidade ao vírus do mosaico comum, à antracnose e ao crestamento bacteriano (MUTLU; MIKLAS; COYNE, 2006). E, também, por 'Carioca' e 'Flor de Mayo' apresentarem diferenças fenotípicas quanto à suscetibilidade à mancha-angular e ao oídio (MELO; SANTOS; FERREIRA, 2002).

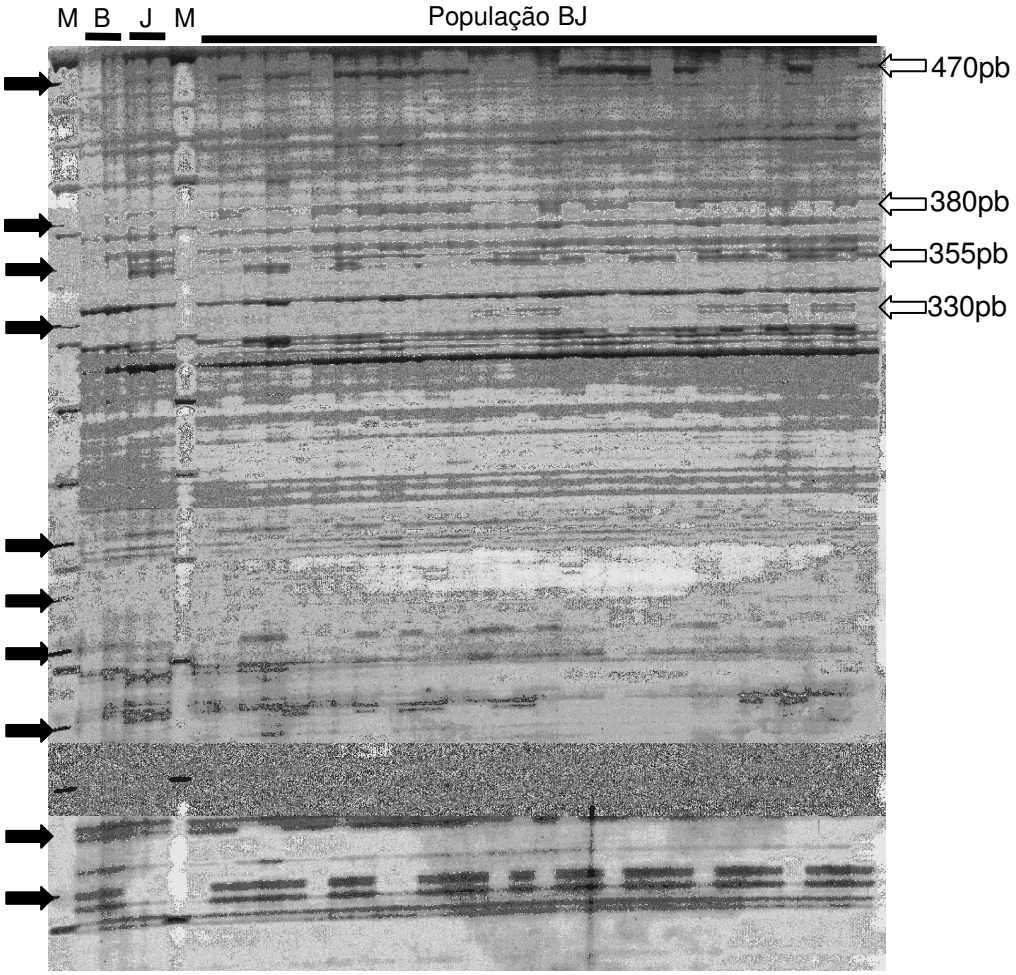

Figura 2 - Genotipagem da população BJ, utilizando a combinação *Rsa*I/NBSa-F. As setas da esquerda indicam locos segregantes e as setas da direita indicam os fragmentos que foram clonados para o sequenciamento. Nas canaletas de 2 a 5 estão os genitores (canaletas 2 e 3: 'Bat 93'; canaletas 4 e 5: 'Jalo EEP558'). Na primeira e sexta canaletas, estão os marcadores de massa molecular *Ladder* 25 pb + *Ladder* 100 pb

Tabela 3 - Dados da genotipagem de marcadores RGA na população BJ. São mostradas as combinações de enzima e respectivo *primer*, o número de locos amplificados e a frequência de polimorfismo encontrada

Combinação enzima / *primer*	Número de locos	Locos polimórficos	Taxa de polimorfismo (%)
*Rsa*I/NBSa-F	55	13	23,64
*Rsa*I/Kdc-F	44	11	25,00
*Rsa*I/Kdc-R	42	4	9,52
*Rsa*I/RGP-F	53	4	7,55
Total	*194*	*32*	*16,49*

Tabela 4 - Segregação dos locos polimórficos detectados nas amplificações do DNA da população BJ. Combinações: *Rsa*I/NBSa-F , *Rsa*I/RGP-F, *Rsa*I/Kdc-F e *Rsa*I/Kdc-R

Loco	Marcador	χ^2	Loco	Marcador	χ^2
*Rsa*I/NBSa-F (90 pb)	RNAF90	3,853*	*Rsa*I/RGP-F (550 pb)	RRPF550	1,389^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (115 pb)	RNAF115	3,853*	*Rsa*I/Kdc-F (275 pb)	RKCF275	4,813*
*Rsa*I/NBSa-F (120 pb)	RNAF120	1,080^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (310 pb)	RKCF310	0,493^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (180 pb)	RNAF180	3,853*	*Rsa*I/Kdc-F (318 pb)	RKCF318	0,653^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (215 pb)	RNAF215	12,813**	*Rsa*I/Kdc-F (320 pb)	RKCF320	0,333^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (225 pb)	RNAF225	8,333**	*Rsa*I/Kdc-F (348 pb)	RKCF348	1,080^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (230 pb)	RNAF230	4,813*	*Rsa*I/Kdc-F (425 pb)	RKCF425	0,067^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (240 pb)	RNAF240	2,253^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (430 pb)	RKCF430	0,867^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (260 pb)	RNAF260	1,080^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (500 pb)	RKCF500	33,347**
*Rsa*I/NBSa-F (330 pb)	RNAF330	0,013^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (510 pb)	RKCF510	33,347**
*Rsa*I/NBSa-F (356 pb)	RNAF356	1,613^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (610 pb)	RKCF610	1,933^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (380 pb)	RNAF380	2,253^{ns}	*Rsa*I/Kdc-F (700 pb)	RKCF700	1,080^{ns}
*Rsa*I/NBSa-F (470 pb)	RNAF470	0,653^{ns}	*Rsa*I/Kdc-R (230 pb)	RKCR230	0,014^{ns}
*Rsa*I/RGP-F (230 pb)	RRPF230	5,028*	*Rsa*I/Kdc-R (240 pb)	RKCR240	2,315^{ns}
*Rsa*I/RGP-F (380 pb)	RRPF380	0,028^{ns}	*Rsa*I/Kdc-R (385 pb)	RKCR385	0,671^{ns}
*Rsa*I/RGP-F (410 pb)	RRPF410	0,028^{ns}	*Rsa*I/Kdc-R (430 pb)	RKCR430	2,315^{ns}

^{ns}Não significativo

*Significativo ao nível de 5%; **significativo ao nível de 1%

Tabela 5 - Dados da genotipagem de marcadores RGA na população CFM. São mostradas as combinações de enzima e respectivo *primer*, o número de locos amplificados e a freqüência de polimorfismo encontrada

Combinação enzima/*primer*	Número de locos	Locos polimórficos	Taxa de polimorfismo (%)
*Dra*I/Kdc-F	41	7	17,07
*Dra*I/Kdc-R	56	7	12,50
DraI/Kde-F	57	5	8,77
DraI/Kde-R	50	5	10,00
DraI/Glu-As	49	3	6,12
DraI/RGP-F	35	5	14,29
AluI/PR5	52	5	9,62
AluI/Kdc-F	47	6	12,77
Total	*387*	*43*	*11,11*

Tabela 6 - Segregação dos locos polimórficos detectados nas amplificações do DNA da população CFM. Combinações: *Dra*I/Kdc-F, *Dra*I/Kdc-R, *Dra*I/Kde-F, *Dra*I/Kde-R, *Dra*I/Glu-As, *Dra*I/RGP-F, *Alu*I/PR5 e *Alu*I/Kdc-F

Loco	Marcador	χ^2	Loco	Marcador	χ^2
*Dra*I/Kdc-F (233 pb)	DKCF233	$26,60^{**}$	*Dra*I/Kde-R (300 pb)	DKER300	$0,18^{ns}$
*Dra*I/Kdc-F (378 pb)	DKCF378	$0,04^{ns}$	*Dra*I/Kde-R (1400 pb)	DKER1400	$2,47^{ns}$
*Dra*I/Kdc-F (389 pb)	DKCF389	$10,33^{**}$	*Dra*I/Kde-R (2000 pb)	DKER2000	$3,52^{ns}$
*Dra*I/Kdc-F (394 pb)	DKCF394	$9,04^{**}$	*Dra*I/Glu-As (213 pb)	DGAS213	$1,90^{ns}$
*Dra*I/Kdc-F (635 pb)	DKCF635	$5,15^{*}$	*Dra*I/Glu-As (290 pb)	DGAS290	$0,54^{ns}$
*Dra*I/Kdc-F (673 pb)	DKCF673	$3,45^{ns}$	*Dra*I/RGP-F (140 pb)	DRPF140	$13,14^{**}$
*Dra*I/Kdc-F (885 pb)	DKCF885	$2,72^{ns}$	*Dra*I/RGP-F (205 pb)	DRPF205	$6,26^{*}$
*Dra*I/Kdc-R (216 pb)	DKCR216	$0,27^{ns}$	*Dra*I/RGP-F (225 pb)	DRPF225	$0,10^{ns}$
*Dra*I/Kdc-R (229 pb)	DKCR229	$2,59^{ns}$	*Dra*I/RGP-F (230 pb)	DRPF230	$0,05^{ns}$
*Dra*I/Kdc-R (232 pb)	DKCR232	$2,91^{ns}$	*Dra*I/RGP-F (280 pb)	DRPF280	$2,47^{ns}$
*Dra*I/Kdc-R (306 pb)	DKCR306	$10,89^{**}$	*Alu*I/PR5 (206 pb)	APR5206	$1,11^{ns}$
*Dra*I/Kdc-R (332 pb)	DKCR332	$9,24^{**}$	*Alu*I/PR5 (273 pb)	APR5273	$4,74^{*}$
*Dra*I/Kdc-R (355 pb)	DKCR355	$1,30^{ns}$	*Alu*I/PR5 (288 pb)	APR5288	$3,11^{ns}$
*Dra*I/Kdc-R (358 pb)	DKCR358	$4,74^{*}$	*Alu*I/PR5 (370 pb)	APR5370	$16,35^{**}$
*Dra*I/Kde-F (138 pb)	DKEF138	$0,17^{ns}$	*Alu*I/PR5 (415 pb)	APR5415	$8,52^{**}$
*Dra*I/Kde-F (140 pb)	DKEF140	$3,11^{ns}$	*Alu*I/Kdc-F (178 pb)	AKCF178	$2,42^{ns}$
*Dra*I/Kde-F (185 pb)	DKEF185	$4,35^{*}$	*Alu*I/Kdc-F (320 pb)	AKCF320	$10,33^{**}$
*Dra*I/Kde-F (360 pb)	DKEF360	$5,69^{*}$	*Alu*I/Kdc-F (338 pb)	AKCF338	$5,26^{*}$
*Dra*I/Kde-F (400 pb)	DKEF400	$0,17^{ns}$	*Alu*I/Kdc-F (400 pb)	AKCF400	$2,84^{ns}$
*Dra*I/Kde-R (185 pb)	DKER185	$0,18^{ns}$	*Alu*I/Kdc-F (880 pb)	AKCF880	$1,57^{ns}$
*Dra*I/Kde-R (272 pb)	DKER272	$3,77^{ns}$	*Alu*I/Kdc-F (900 pb)	AKCF900	$0,53^{ns}$
*Dra*I/Kde-R (273 pb)	DKER273	$3,68^{ns}$			

^{ns}Não significativo
*Significativo ao nível de 5%; **significativo ao nível de 1%

3.2. Validação dos marcadores RGA

Os fragmentos RGA selecionados para a validação foram excisados dos géis de poliacrilamida e reamplificados. Posteriormente, o tamanho dos fragmentos amplificados foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Os resultados confirmaram a eficiência da técnica empregada, pois não houve amplificação quando se utilizou somente o *primer* do adaptador (Figura 3), ou seja, todos os fragmentos selecionados apresentam regiões complementares aos *primers* âncoras (RGA).

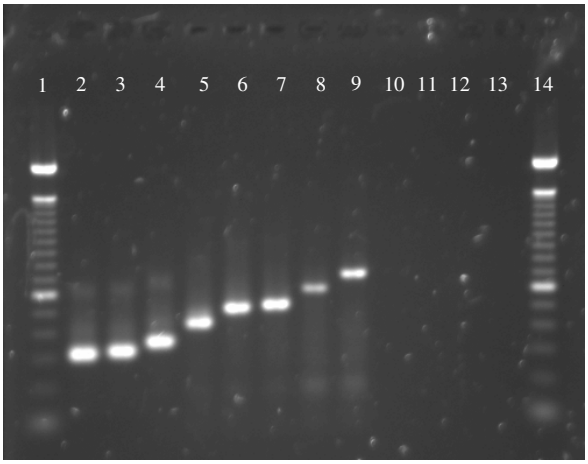

Figura 3 - Gel de agarose (1%) mostrando o padrão de amplificação das bandas extraídas do gel de poliacrilamida e reamplificadas. Nas canaletas 2 a 9 estão os produtos das reações com o *primer* do adaptador e com o *primer* específico ao domínio Kdc-F: fragmentos com 310, 320, 348, 430, 500, 510, 600 e 700 pb, respectivamente. Nas canaletas de 10 a 13 foram aplicados os controles negativos, quais sejam, os produtos das reações apenas com o *primer* do adaptador. O marcador de massa molecular *Ladder* 100 pb é mostrado na primeira e última canaletas

Todas as 32 sequências obtidas foram analisadas por BLASTx e sete delas apresentaram similaridade com proteínas de resistência (Tabela 7) quando alinhadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Cinco dessas sequências foram isoladas da população BJ e as demais da população CFM. O marcador RNF330 foi similar a uma proteína de resistência de *Medicago truncatula*, os marcadores RNF356, RRF380, DRPF205 e DRPF280 apresentaram similaridade com proteínas de resistência de soja (*Glycine Max*) e as sequências RNF475 e RRF410 foram similares a proteínas de resistência de feijão-comum. O marcador DKEF360 apresentou similaridade com uma proteína tirosina quinase de *M. truncatula*, que também atua na defesa das plantas a patógenos. Além disso, em cada uma das populações estudadas foi encontrado um marcador similar a uma mesma proteína, a poliproteína gag-pol, característica de retrotransposons.

Nossos resultados são condizentes com os obtidos por van der Linden *et al.* (2004) que, ao analisarem as sequências dos marcadores RGA obtidos por *NBS-profiling*, encontraram análogos a genes de resistência, a uma proteína quinase e um a retrotransposon.

Interessante dizer que o marcador DRPF280, mapeado na população CFM, e o marcador RNF356, mapeado na população BJ, apresentaram similaridade com uma mesma proteína de resistência de soja. Frente a esse resultado, tais sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando-se o programa *Clustal X* para Windows, versão 1.8 (THOMPSON *et al.*, 1997). O

alinhamento dessas sequências confirmou a existência de uma região conservada (Figura 4). Além disso, como será discutido posteriormente, ambos os marcadores foram mapeados no grupo de ligação 10. Isso indica que um mesmo gene pode ter sido identificado em ambas as populações, mesmo utilizando diferentes combinações de enzima/*primer*.

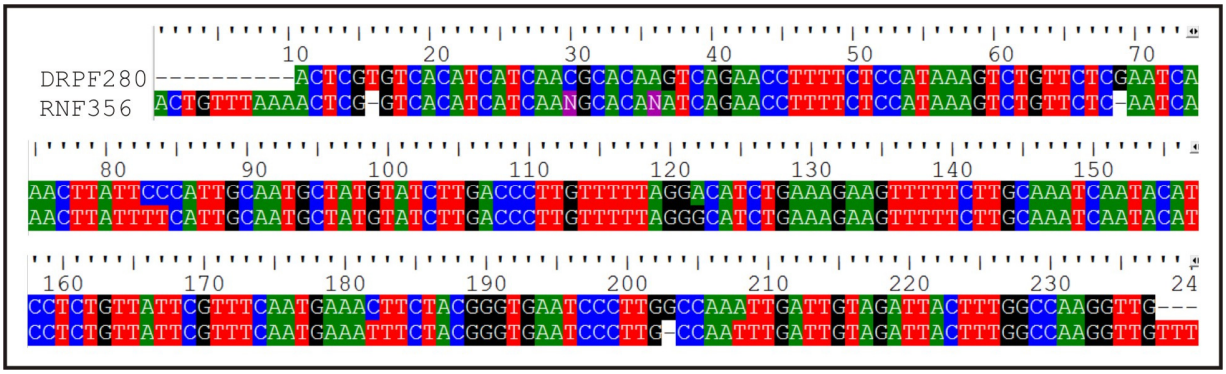

Figura 4 - Alinhamento das sequências DRPF280 e RNF356, realizado pelo programa *Clustal X* (THOMPSON *et al*., 1997)

Para complementar as análises, todas as 11 sequencias similares às proteínas conhecidas (ver anexo A) foram analisadas por BLAST especializado em domínios conservados (BLASTcd). As análises resultaram no alinhamento de oito sequências com domínios conservados conhecidos. Seis destas sequências apresentaram um bom alinhamento com a região P-*loop* do domínio NB-ARC (Tabela 8). O alinhamento das sequências com o domínio NB-ARC é mais um forte indício de que estas fazem parte de genes de resistência de plantas a patógenos. Isso porque, estão incluídas neste domínio as proteínas responsáveis por morte celular programada, ativadas via regiões de reconhecimento a patógenos, como as regiões ricas em leucina (LRR) (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998; BENT; MACKEY, 2007). Já a seqüência DKEF360 alinhou-se com o domínio catalítico da proteína tirosina quinase, o qual possui uma região de ligação a ATP. E o marcador AKCF320, que havia apresentado similaridade com um retrotransposon, alinhou-se ao domínio RnaseH, confirmando tratar-se de uma região sujeita a transposição.

Tabela 7 - Análise das sequências por BLAST tomando por base o banco de dados do NCBI

Seqüência	Busca	Proteína	Descrição	Organismo	Identidade (%)	*Score (bits)*	*E value*	População de mapeamento
RNF330	BLASTx (nr)	ABN09142.1	Proteína de resistência	*Medicago truncatula*	62	109,0	6.10^{-24}	BJ
RNF356	BLASTx (nr)	AAC49509.1	Proteína de resistência	*Glycine max*	53	55,8	9.10^{-10}	BJ
RNF475	BLASTx (nr)	AAC33296.1	Proteína de resistência	*Phaseolus vulgaris*	97	189,0	6.10^{-47}	BJ
RRF380	BLASTx (nr)	AAF44094.1	Proteína de resistência	*Glycine max*	89	89,4	4.10^{-26}	BJ
RRF410	BLASTx (nr)	ABN42886.1	Proteína de resistência	*Phaseolus vulgaris*	73	114,0	3.10^{-24}	BJ
RKF310	BLASTx (nr)	ABD28710.1	Polinucleotidil transferase	*Medicago truncatula*	39	58,5	2.10^{-7}	BJ
RKR240	BLASTx (nr)	AAR13317.1	Poliproteína gag-pol	*Phaseolus vulgaris*	53	58,2	3.10^{-7}	BJ
AKCF320	BLASTx (nr)	AAR13317.1	Poliproteína gag-pol	*Phaseolus vulgaris*	59	73,9	5.10^{-12}	CFM
DKEF360	BLASTx (nr)	ABE88079.1	Proteína tirosina quinase	*Medicago truncatula*	77	107,0	3.10^{-22}	CFM
DRPF205	BLASTx (nr)	ACM89623.1	Proteína de resistência do tipo TIR-NBS-LRR	*Glycine max*	72	55,8	4.10^{-10}	CFM
DRPF280	BLASTx (nr)	AAC49509.1	Proteína de resistência	*Glycine max*	50	59,3	1.10^{-7}	CFM

Tabela 8 - Análise das sequências por BLASTcd tomando por base o banco de dados do NCBI

Fragmento	Domínio	*Score (bits)*	*E value*	População de mapeamento
RNF330	NB-ARC/P-*loop*	46,95	1.10^{-6}	BJ
RNF356	NB-ARC/P-*loop*	36,16	0,001	BJ
RNF475	NB-ARC/P-*loop*	102,42	3.10^{-23}	BJ
RRF380	NB-ARC/P-*loop*	47,72	6.10^{-7}	BJ
RRF410	NB-ARC/P-*loop*	82,39	2.10^{-17}	BJ
AKCF320	RnaseH	43,48	1.10^{-5}	CFM
DKEF360	Proteína tirosina quinase	42,89	2.10^{-5}	CFM
DRPF205	NB-ARC/P-*loop*	40,78	6.10^{-5}	CFM

3.3. Mapeamento dos marcadores RGA

3.3.1. População BJ

Todos os 32 marcadores RGA gerados foram alocados no mapa núcleo de feijão (FREYRE *et al*., 1998; HANAI *et al*., 2009) em 10 dos 11 grupos de ligação. Apenas ao grupo de ligação 6 não se atribuiu marcador RGA. Os grupos de ligação 2, 7, 8, 10 e 11 foram os que tiveram o maior número de marcadores alocados, com quatro e cinco locos RGA (Tabela 9 e Figura 5).

A segregação de dez dos marcadores RGA desviou da esperada (1:1). Os locos com distorção de segregação mapeados localizaram-se em quatro grupos de ligação. As marcas RKF275 e RNF230 estão no grupo de ligação 1, as marcas RRF230, RNF90, RNF115 e RNF180 estão no grupo 2, a marca RNF225 no grupo 4 e as marcas RNF215, RKF500 e RKF510, no grupo 7.

Neste trabalho, tal como relatado por Freyre *et al.* (1998), que utilizaram marcadores anônimos para o mapeamento da população BJ, encontrou-se, no grupo de ligação 1, "excesso" de alelos de origem andina e, nos grupos 2 e 7, houve predomínio de alelos mesoamericanos. Entretanto, Blair *et al.* (2003) encontraram um excesso de alelos andinos no grupo de ligação 2, porém foi estudada uma população derivada do cruzamento entre DOR364 (de origem mesoamericana) e G19833 (de origem andina), utilizando marcadores SSR. As diferenças encontradas quanto à origem dos alelos em excesso, em cada população estudada, podem ser

explicadas pela ocorrência de pressão de seleção ao longo das gerações, reforçada pelo fato das populações terem se desenvolvido em diferentes locais.

Tabela 9 - Lista dos marcadores RGA detectados na população BJ e seus respectivos grupos de ligação

(Continua)

	Marcador	Combinação Enzima / *Primer*	Tamanho (pb)	GL
1	RKF275	*Rsa*I/Kdc-F	275	1
2	RNF230	*Rsa*I/NBSa-F	230	1
3	RNF120[1]	*Rsa*I/NBSa-F	120	1
4	RNF115	*Rsa*I/NBSa-F	115	2
5	RNF180	*Rsa*I/NBSa-F	180	2
6	RNF90	*Rsa*I/NBSa-F	90	2
7	RRF230[1]	*Rsa*I/RGP-F	230	2
8	RNF240	*Rsa*I/NBSa-F	240	3
9	RKF610	*Rsa*I/Kdc-F	610	3
10	RNF225	*Rsa*I/NBSa-F	225	4
11	RKF700	*Rsa*I/Kdc-F	700	4
12	RKF310[1]	*Rsa*I/Kdc-F	310	4
13	RKR230	*Rsa*I/Kdc-R	230	5
14	RKR385	*Rsa*I/Kdc-R	385	7
15	RNF215	*Rsa*I/NBSa-F	215	7
16	RKF510[1]	*Rsa*I/Kdc-F	510	7
17	RKF500[1]	*Rsa*I/Kdc-F	500	7
18	RKF318	*Rsa*I/Kdc-F	318	8
19	RKF320	*Rsa*I/Kdc-F	320	8
20	RKF348[1]	*Rsa*I/Kdc-F	348	8
21	RKR240	*Rsa*I/Kdc-R	240	8
22	RKR430	*Rsa*I/Kdc-R	430	9
23	RRF380	*Rsa*I/RGP-F	380	10
24	RRF550	*Rsa*I/RGP-F	550	10
25	RNF380	*Rsa*I/NBSa-F	380	10
26	RNF356	*Rsa*I/NBSa-F	356	10
27	RNF260	*Rsa*I/NBSa-F	260	10
28	RKF425	*Rsa*I/Kdc-F	425	11

[1] Marcadores acessórios

Tabela 9 - Lista dos marcadores RGA detectados na população BJ e seus respectivos grupos de ligação

(Conclusão)

	Marcador	Combinação Enzima / *Primer*	Tamanho (pb)	GL
29	RKF430	*Rsa*I/Kdc-F	430	11
30	RNF330[1]	*Rsa*I/NBSa-F	330	11
31	RRF410[1]	*Rsa*I/RGP-F	410	11
32	RNF475	*Rsa*I/NBSa-F	475	11

[1] Marcadores acessórios

Em quatro grupos de ligação, foram alocados dois ou mais marcadores RGA em uma mesma posição, sendo RKF275 e RNF230 no grupo de ligação 1, RNF115, RNF180 e RNF90 no grupo de ligação 2, RKF318 e RKF320 no grupo 8 e RKF425 e RKF430, no grupo 11. Também, foram co-localizados os marcadores RKF510 e RKF500 como acessórios no grupo de ligação 7 e os marcadores RNF330 e RRF410 no grupo 11. A co-localização destes marcadores pode ser explicada pela existência de genes em *cluster*, por se tratarem de alelos de um mesmo loco, ou simplesmente, porque a população estudada não foi suficientemente grande para permitir a detecção de indivíduos recombinantes para essas regiões do genoma. Mutlu, Miklas e Coyne (2006) também encontraram marcadores RGA co-localizados, porém optaram por mapear somente um marcador em cada loco.

Assim com observado por Miklas *et al.* (2006) e por Mutlu, Miklas e Coyne (2006), alguns marcadores gerados foram alocados em regiões contendo genes de resistência a patógenos. No presente estudo, encontrou-se um total de cinco marcadores RGA em proximidade a genes de resistência a doenças bacterianas e fúngicas, nos grupos de ligação 1, 7 e 11. O marcador RNF120 foi alocado ao grupo de ligação 1, em uma região contendo genes de resistência à antracnose (*Co-1*, *Co-x*, *Co-w*) e à ferrugem (*Ur-9*). No grupo de ligação 7, o marcador RKR385 se posicionou em proximidade ao gene de resistência à antracnose (*Co-6*). Também no grupo de ligação 11, foram mapeados três RGA em uma região contendo genes controladores de resistência à ferrugem (*Ur-3*, *Ur-11* e *Ur-Dourado*) e à antracnose (*Co-2*), sendo eles, os marcadores RNF330, RRF410 e RNF475. Além disso, 14 marcadores RGA foram mapeados em regiões contendo QTL de resistência a diversos patógenos, apresentadas por Kelly *et al*. (2003) e Miklas *et al.* (2006). Estes pesquisadores relataram a existência de QTL de resistência a patógenos nos 11 grupos de ligação de *P. vulgaris*. Na região do grupo de ligação 1, onde foram mapeados os marcadores RKF275 e

RNF230, há QTL de resistência ao crestamento bacteriano e ao mofo-branco. No grupo de ligação 2, o marcador RRF230 se alocou a uma região contendo QTL de resistência ao crestamento bacteriano e à antracnose, já os marcadores RNF115, RNF180 e RNF90 co-localizaram com um QTL de resistência ao mofo branco. O marcador RNF240 foi mapeado em uma região do grupo de ligação 3 onde foi identificado um QTL de resistência a podridão radicular. Ainda no grupo 3, o marcador RKF610 foi mapeado próximo a um QTL de resistência ao crestamento bacteriano, identificado pelo marcador D1377 (KELLY *et al.,* 2003). No grupo de ligação 5 foi relatado um QTL contra crestamento bacteriano ligado ao marcador Bng162. Interessante dizer que o marcador RKR230 foi alocado a menos de 4 cM do marcador Bng162. Os marcadores RKF500 e RKF510 mapearam em uma região do grupo de ligação 7 que também apresenta um QTL para resistência ao crestamento bacteriano. Já no grupo de ligação 11 foi identificado um QTL de resistência ao crestamento bacteriano ligado ao marcador D1512, próximo ao qual estão os marcadores RGA RNF330, RRF410 e RNF475.

A consistência dos dados aqui obtidos pode ser constatada uma vez que dos cinco marcadores que apresentaram similaridade a genes de resistência, três foram alocados no mapa de *P. vulgaris* em proximidade a um QTL de resistência ao crestamento bacteriano e a genes de resistência à antracnose e à ferrugem, presentes no grupo de ligação 11.

(Continua)

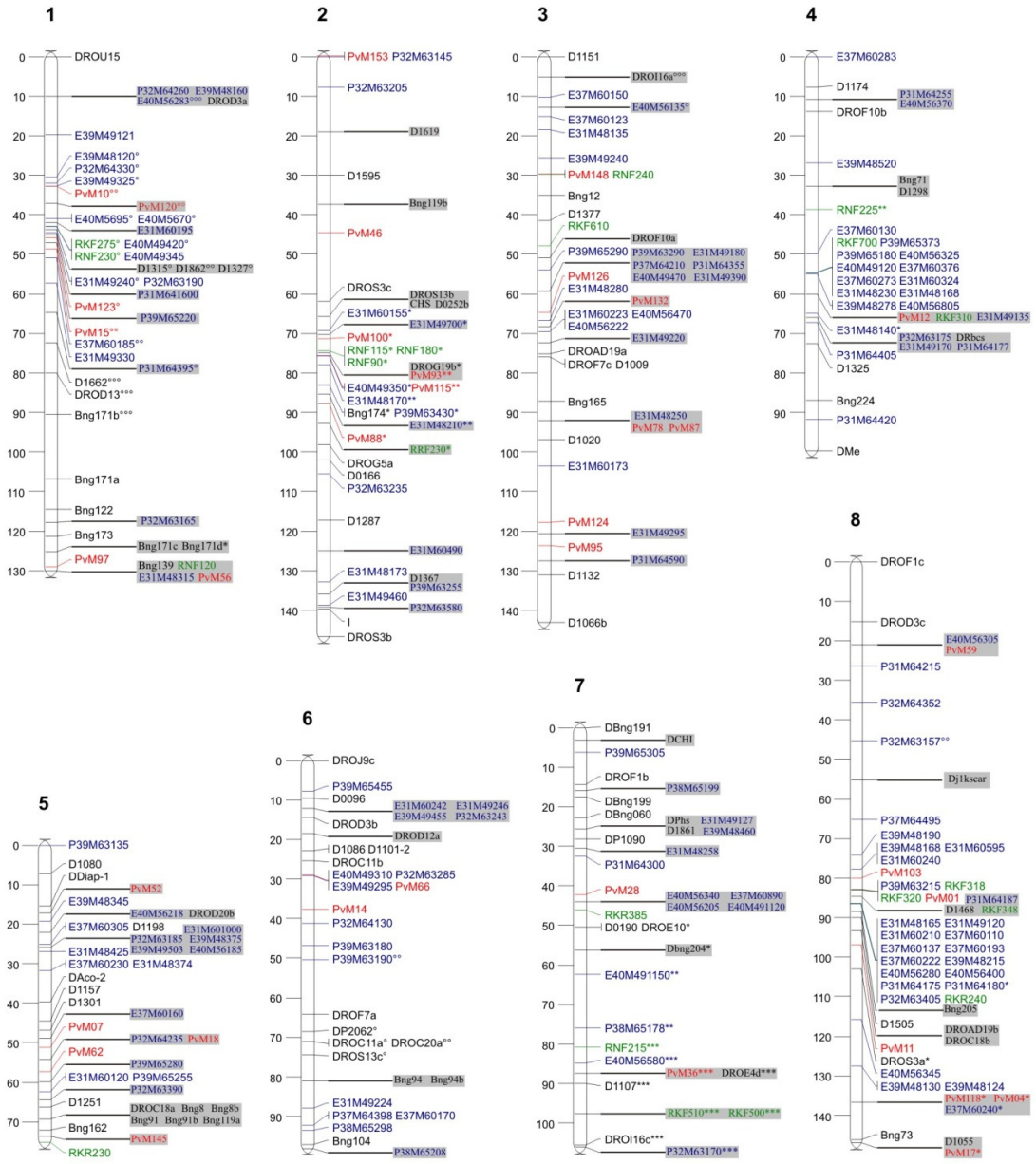

Figura 5 - Mapa genético da população BJ, contendo os marcadores provenientes do mapa consenso de Freyre *et al.* (1998), marcadores SSR-EST e AFLP (HANAI, 2008) e os marcadores RGA. Os marcadores provenientes do mapa consenso apresentam coloração preta, os SSR-EST vermelha, os marcadores AFLP azul e os RGA verde. Os marcadores atribuídos a intervalos estão representados em retângulos acinzentados. Os locos que apresentaram distorção de segregação estão representados por * (quando houve excesso de alelos mesoamericanos) ou por ° (excesso de alelos andinos). Níveis de significância: 5% (* ou °); 1% (** ou °°); e 0,1% (*** ou °°°). A distância entre os marcadores é apresentada em cM

(Conclusão)

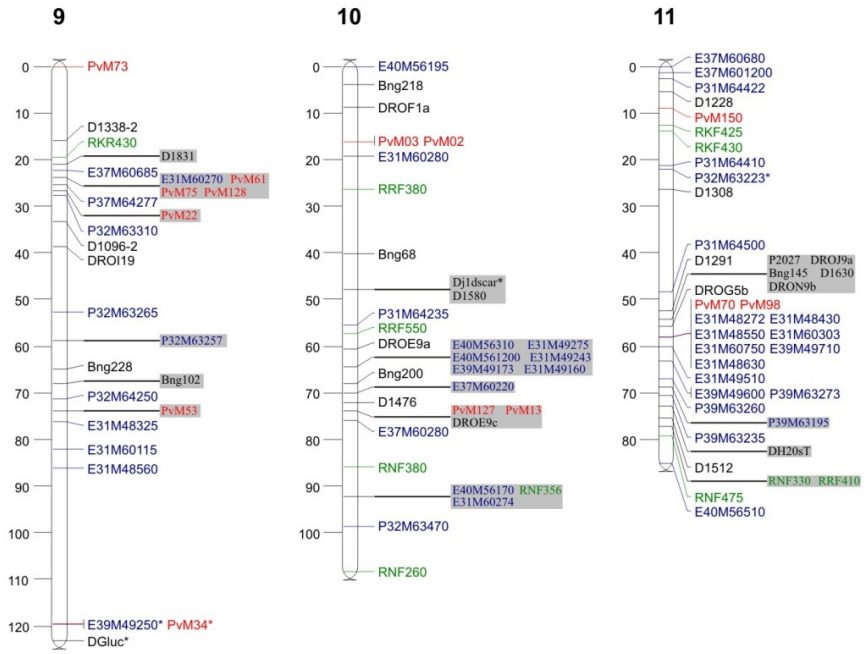

Figura 5 - Mapa genético da população BJ, contendo os marcadores provenientes do mapa consenso de Freyre *et al.* (1998), marcadores SSR-EST e AFLP (HANAI, 2008) e os marcadores RGA. Os marcadores provenientes do mapa consenso apresentam coloração preta, os SSR-EST vermelha, os marcadores AFLP azul e os RGA verde. Os marcadores atribuídos a intervalos estão representados em retângulos acinzentados. Os locos que apresentaram distorção de segregação estão representados por * (quando houve excesso de alelos andinos) ou por ° (excesso de alelos mesoamericanos). Níveis de significância: 5% (* ou °); 1% (** ou °°); e 0,1% (*** ou °°°). A distância entre os marcadores é apresentada em cM

3.3.2. População CFM

As análises de mapeamento foram realizadas com os dados de segregação de 295 locos, sendo 27 microssatélites e 225 AFLP (HANAI, 2008) e 43 RGA. A distorção de segregação apresentada por essa população foi relativamente alta, cerca 42% dos locos desviaram da segregação esperada (1:1), quando aplicado o teste de χ^2 (α = 0,05). Os testes de χ^2 foram realizados para cada loco, como se fossem testes únicos. No entanto, como se utilizam muitos marcadores, dentre os quais, vários são independentes, têm-se múltiplos testes independentes, o que permite a utilização de uma correção. Isso resulta na elevação do valor de significância para o teste de χ^2. Diante desse fato, mesmo sem realizar a correção, optou-se por não descartar, no início das análises de mapeamento, os marcadores que apresentaram distorção na segregação. Após realizar análises preliminares, foram retirados das análises de mapeamento aqueles marcadores que apresentaram elevada distorção de segregação e ocasionaram a alteração na ordem dos marcadores adjacentes no grupo de ligação.

Dessa forma, o mapa de ligação gerado para a população CFM apresentou 12 grupos de ligação (Tabela 10 e Figura 6), pois o grupo 8 permaneceu dividido, formando dois grupos menores. No total, 133 marcadores foram ordenados no *framework* com LOD > 2, sendo 93 marcadores AFLP e 21 microssatélites (HANAI, 2008) e 19 marcadores RGA. Outros 21 RGA foram alocados ao mapa como marcadores acessórios nos intervalos mais verossímeis. O mapa totalizou 923,6 cM de comprimento, com uma distância média de 6,9 cM entre marcas e uma cobertura de aproximadamente 77% do genoma da espécie.

A numeração dos grupos de ligação para a população CFM foi baseada na designação dos grupos de ligação da população BJ. A correspondência entre os grupos de ligação foi determinada com base em marcadores comuns aos dois mapas. Três grupos de ligação do mapa CFM não apresentaram marcadores comuns ao mapa BJ, o que impossibilitou a determinação exata de seus correspondentes na população de referência. Tais grupos devem corresponder aos grupos 3, 4 e 9 de BJ, mas como essa correspondência não pôde ser comprovada, foram arbitrariamente designados como CFM12, CFM13 e CFM14.

Com relação aos marcadores RGA, 16 deles tiveram segregação desviada da esperada, ou seja, 1:1. E dentre eles, dois não foram alocados ao mapa de ligação. Os locos apresentando distorção de segregação foram observados em 4 grupos, sendo eles, CFM1, CFM2, CFM8.1 e CFM11.

Quanto à localização dos marcadores RGA, dos 43 locos analisados, 40 estão distribuídos em nove grupos de ligação. Somente nos grupos de ligação CFM5 e CFM6 não foram mapeados RGA. O grupos de ligação CFM2 e CFM8.1 foram aqueles com maior número de RGA alocados, 9 em cada grupo. Interessante ressaltar que os grupos de ligação 2 e 8 de BJ também apresentaram elevado número de RGA mapeados. Esses dados, aliados às informações que se têm a respeito da identificação de QTL de resistência a patógenos nos grupos de ligação 2 e 8 (KELLY *et al*., 2003; MIKLAS *et al*., 2006), corroboram a existência de regiões controladoras de resistência nesses grupos de ligação.

Tabela 10 - Lista dos marcadores RGA obtidos na população CFM e seus respectivos grupos de ligação

(Continua)

	Marcador	Combinação Enzima / *Primer*	Tamanho (pb)	GL
1	APR5415	*Alu*I/PR5	415	CFM1
2	DKEF360	*Dra*I/Kde-F	360	CFM1
3	APR5206[1]	*Alu*I/PR5	206	CFM1
4	DKCR229[1]	*Dra*I/Kdc-R	229	CFM1
5	DKCR232[1]	*Dra*I/Kdc-R	232	CFM1
6	DKCR216	*Dra*I/Kdc-R	216	CFM2
7	DKEF138[1]	*Dra*I/Kde-F	138	CFM2
8	DKEF140[1]	*Dra*I/Kde-F	140	CFM2
9	DKCR332[1]	*Dra*I/Kdc-R	332	CFM2
10	DKCF389[1]	*Dra*I/Kdc-F	389	CFM2
11	DKCF394	*Dra*I/Kdc-F	394	CFM2
12	DKCF306[1]	*Dra*I/Kdc-F	306	CFM2
13	DKCF2000[1]	*Dra*I/Kdc-F	2000	CFM2
14	DRPF225[1]	*Dra*I/RGP-F	225	CFM7
15	DRPF230	*Dra*I/RGP-F	230	CFM7
16	AKCF880	*Alu*I/Kdc-F	880	CFM7
17	AKCF900	*Alu*I/Kdc-F	900	CFM7
18	DKCF233	*Dra*I/Kcd-F	233	CFM8.1
19	AKCF338[1]	*Alu*I/Kdc-F	338	CFM8.1
20	DKCF673[1]	*Dra*I/Kcd-F	673	CFM8.1
21	APR5370[1]	*Alu*I/PR5	370	CFM8.1
22	DGAS213	*D*raI/Glu-As	213	CFM8.1
23	DGAS185	*D*raI/Glu-As	185	CFM8.1
24	DGAS290[1]	*D*raI/Glu-As	290	CFM8.1
25	DKCR358	*Dra*I/Kdc-R	358	CFM8.1
26	AKCF320[1]	*Alu*I/Kdc-F	320	CFM8.1
27	DKPF280[1]	*Dra*I/Kcd-F	280	CFM10
28	DKPF205[1]	*Dra*I/Kcd-F	205	CFM10
29	AKCF400[1]	*Alu*I/Kdc-F	400	CFM11
30	DKCR355[1]	*Dra*I/Kdc-R	355	CFM11
31	APR5273[1]	*Alu*I/PR5	273	CFM11
32	DKCF635[1]	*Dra*I/Kdc-F	635	CFM11
33	DKCF885[1]	*Dra*I/Kdc-F	885	CFM11

[1] Marcadores acessórios

Tabela 10 - Lista dos marcadores RGA obtidos na população CFM e seus respectivos grupos de ligação

(Conclusão)

	Marcador	Combinação Enzima / *Primer*	Tamanho (pb)	GL
34	DKER272	*Dra*I/Kde-R	272	CFM12
35	DKER273	*Dra*I/Kde-R	273	CFM12
36	DKER300	*Dra*I/Kde-R	300	CFM13
37	DKER1400	*Dra*I/Kde-R	1400	CFM13
38	AKCF178	*Alu*I/Kdc-F	178	CFM14
39	DKCF378	*Dra*I/Kdc-F	378	CFM14
40	DKEF400	*Dra*I/Kde-F	400	CFM14

[1] Marcadores acessórios

(Continua)

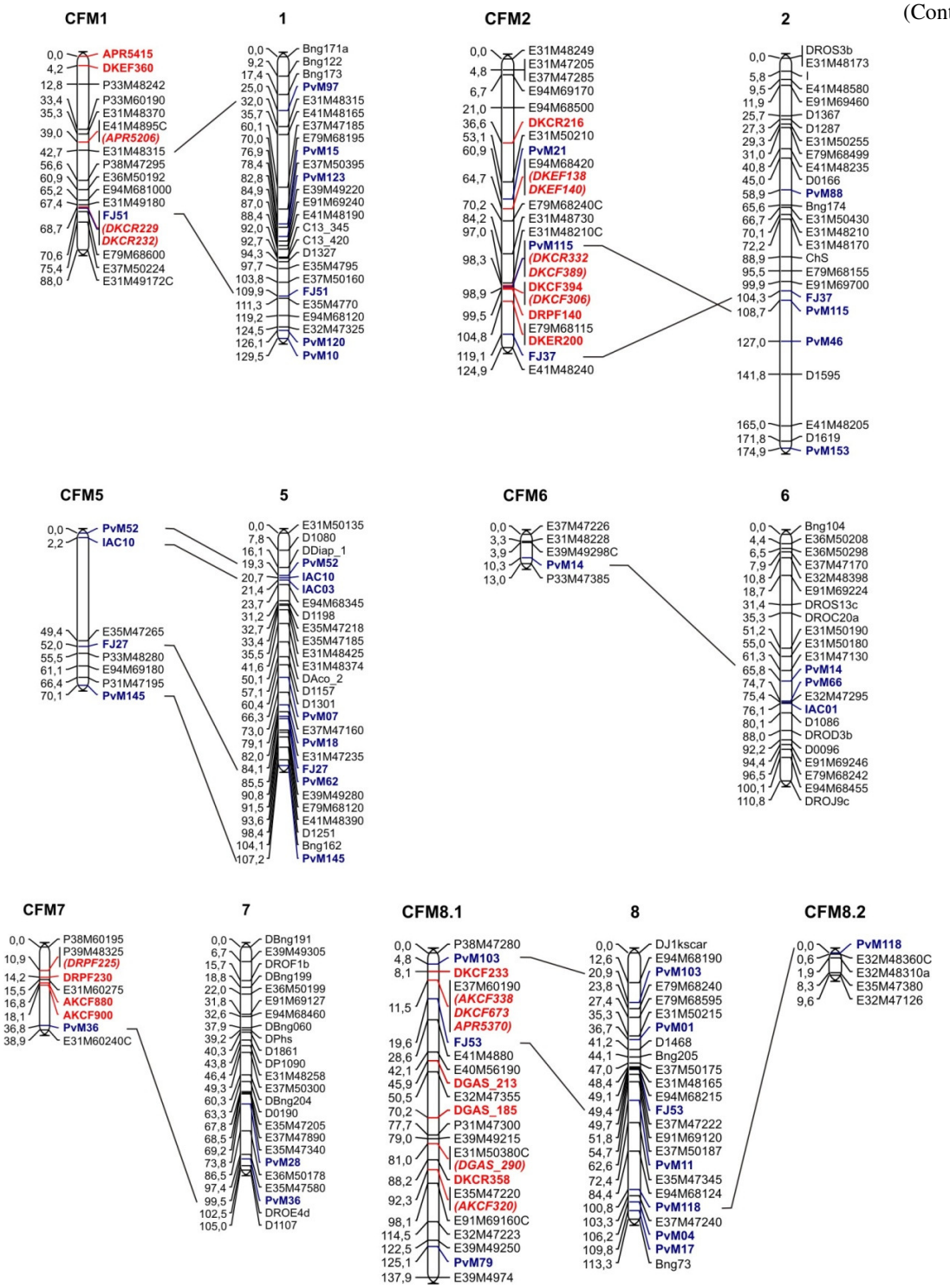

Figura 6 - Mapa de ligação da população CFM e sua correspondência com o mapa de ligação da população BJ. Os grupos de ligação obtidos para a população CFM estão identificados pelas letras CFM e os grupos de BJ são identificados somente por números. Os locos realçados em azul são microssatélites (HANAI, 2008), os locos em vermelho são RGA (os marcadores acessórios estão entre parênteses e em itálico) e os demais são marcadores AFLP (HANAI, 2008)

(Conclusão)

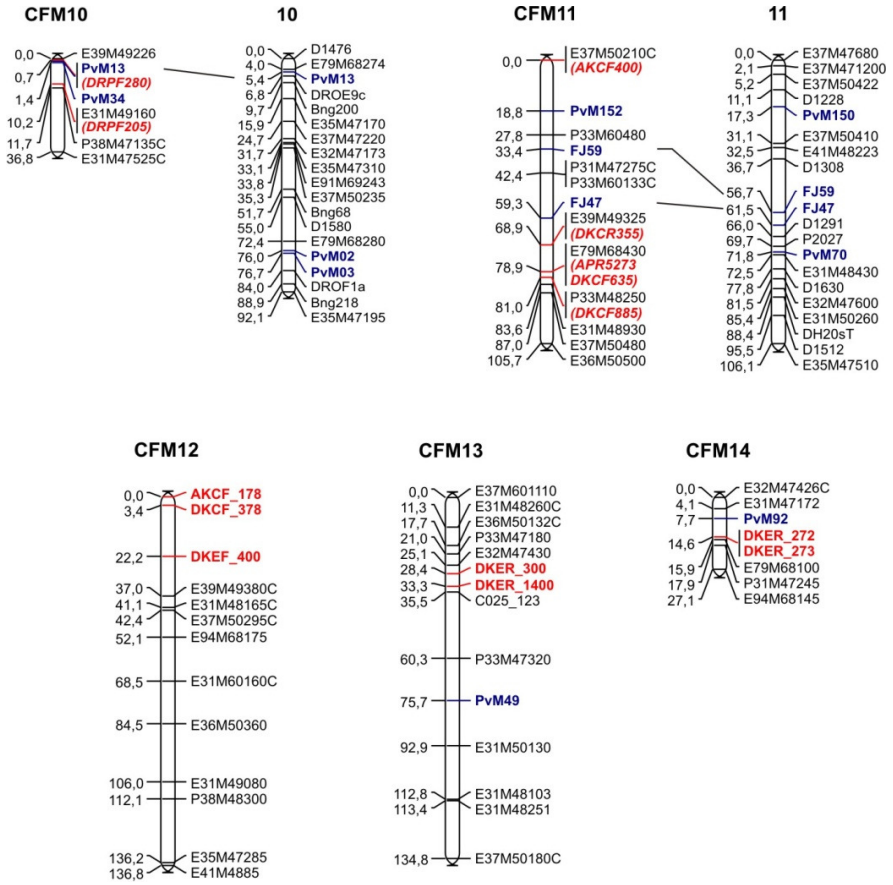

Figura 6 - Mapa de ligação da população CFM e sua correspondência com o mapa de ligação da população BJ. Os grupos de ligação obtidos para a população CFM estão identificados pelas letras CFM e os grupos de BJ são identificados somente por números. Os locos realçados em azul são microssatélites (HANAI, 2008), os locos em vermelho são RGA (os marcadores acessórios estão entre parênteses e em itálico) e os demais são marcadores AFLP (HANAI, 2008)

3.4. Mapeamento de QTL associados ao controle de doenças fúngicas

Os dados fenotípicos quanto à resistência ao oídio e à mancha-angular obtidos por Melo, Santos e Ferreira (2002), foram utilizados no presente trabalho com o intuito de identificar possíveis QTL. Os referidos pesquisadores avaliaram os indivíduos da população CFM em diferentes locais e épocas de plantio (Tabela 11). A avaliação da reação das plantas ao ataque dos patógenos foi realizada de acordo com uma nota média atribuída por quatro avaliadores, no período de maior incidência e severidade das doenças. A escala de notas utilizada para a classificação dos genótipos é descrita na tabela 12.

Tabela 11 - Épocas de avaliação da população "Carioca" x "Flor de Mayo" quanto à resistência à mancha-angular e ao oídio. Adaptado de Melo Santos e Ferreira (2002)

Doença avaliada	Local	Ano	Época de avaliação	Ambiente
Oídio	Lavras	1996	Inverno	OIL1
Oídio	Lavras	1997	Inverno	OIL2
Oídio	Patos de Minas	1997	Inverno	OIPM
Mancha-angular	Lavras	1997	Secas	MAL1
Mancha-angular	Patos de Minas	1997	Secas	MAPM
Mancha-angular	Lavras	1998	Secas	MAL2

Tabela 12 - Escala notas utilizadas na classificação dos genótipos de *P. vulgaris* quanto a reação à mancha-angular e ao oídio (REZENDE; RAMALHO; CORTE, 1999 *apud* MELO; SANTOS; FERREIRA, 2002)

Nota	Área foliar afetada (%)
1	0
2	1
3	1 a 5
4	5 a10
5	10 a 20
6	20 a 40
7	40 a 60
8	60 a 80
9	80 a 100

As análises de QTL foram realizadas para reação a ambas as doenças em cada um dos ambientes, utilizando-se o método de "mapeamento por intervalo composto" (CIM), proposto por Zeng (1993, 1994) e Jansen (1993). O limiar para aceitação de um QTL foi obtido após 1000 permutações, ao nível de 5% de significância. E o critério adotado para o posicionamento dos QTL foi o valor máximo de LOD *score* relativo ao intervalo.

Como pode ser observado na figura 7, foram identificados cinco QTL para reação à mancha-angular e sete para oídio (Tabela 13). QTL associados ao controle da resistência à mancha-angular estão presentes nos grupos de ligação CFM2, CFM8.1, CFM12 e CFM13, enquanto QTL para a reação ao oídio foram identificados nos grupos de ligação CFM2, CFM7, CFM8.1 e CFM13.

Tabela 13 - Marcadores associados à reação à mancha-angular e ao oídio na população de mapeamento derivada do cruzamento entre "Carioca" e "Flor de Mayo". As análises foram realizadas utilizando-se o programa *QTL Cartographer* para Windows (versão 2.5)

Ambiente	Marcador	Posição do QTL (cM)[1]	Grupo de ligação	LOD	R^2 (%)	a[4]
		Mancha-angular				
MAL1	E31M50210[2]	0,8	CFM2	6,11	22,67	-0,4663
MAL2	PvM49[3]	14,0	CFM13	5,37	29,24	-0,3216
MAPM	PvM21[3]	0,8	CFM2	2,77	10,60	-0,2157
MAPM	PvM79[3]	0,6	CFM8.1	3,90	15,04	-0,3004
MAPM	P38M48300[2]	11,0	CFM12	4,38	27,02	-0,3243
		Oídio				
OIL2	E31M50210[2]	0,8	CFM2	8,11	21,71	-0,7761
OIL2	P39M48325[2]	11,0	CFM7	5,51	13,51	0,6875
OIL2	E31M60275[2]	0,3	CFM7	2,82	7,44	0,5073
OIPM	PvM21[3]	0,8	CFM2	6,09	8,94	-0,5439
OIPM	P39M48325[2]	0,9	CFM7	3,84	6,75	0,3663
OIPM	P31M47300[2]	0,3	CFM8.1	3,16	4,19	0,2562
OIPM	P33M47320[2]	0,8	CFM13	2,99	3,98	0,2652

[1] Distância do pico do QTL ao marcador mais próximo; [2]marcador AFLP; [3]microssatélite; [4]efeitos de substituição alélica (os valores positivos indicam a contribuição alélica do genitor "Carioca", enquanto os valores negativos correspondem a contribuição do genitor "Flor de Mayo")

No grupo CFM2, foram mapeados em uma mesma região, QTL para reação à mancha-angular e QTL para reação ao oídio, em Lavras e em Patos de Minas. Todos os QTL mapeados para mancha-angular estão em repulsão, ou seja, denotam a superioridade do genitor "Flor de Mayo". Foi possível detectar no grupo de ligação CFM2, QTL para reação a mancha-angular em Lavras (MAL1) e em Patos de Minas (MAPM), respondendo respectivamente por 22,67 e 10,60% da variação fenotípica. O mesmo pode ser dito a respeito do QTL mapeado no grupo CFM13, no ambiente MAL2 que responde por 29,24% da variação fenotípica e para os QTL mapeados nos grupos de ligação CFM8.1 e CFM12 em Patos de Minas, que representam respectivamente 15,04 e 27,02% da variação fenotípica.

Quanto aos QTL para reação ao oídio, foram mapeados dois no grupo CFM2, também em repulsão, enquanto nos grupos de ligação CFM7, CFM8.1 e CFM13 os QTL estão em associação, demonstrando a superioridade do genitor "Carioca". Os QTL com maior efeito quanto à susceptibilidade ao oídio foram identificados em Lavras (OIL2) e mapeados nos grupos CFM2 e CFM7, representando respectivamente 21,71 e 13,51% da variação fenotípica.

Alguns QTL foram mapeados em proximidade às regiões contendo marcadores RGA, nos grupos CFM2, CFM7 e CFM8.1 os quais, no entanto, foram alocados no mapa de ligação como acessórios.

O grande número de marcadores RGA e de QTL de resistência mapeados nos grupos CFM2, CFM7 e CFM8.1 são fortes indícios da presença de *clusters* de resistência nesses grupos de ligação. Os QTL para resposta ao oídio em Lavras e em Patos de Minas presentes em uma mesma região do grupo CFM7, assim como o mapeamento de QTL para mancha-angular e oídio em diferentes ambientes no grupo CFM2, sugerem estabilidade.

Os QTL mapeados são potencialmente exploráveis em programas de seleção assistida (YOUNG, 1996). Com destaque para os QTL co-localizados nos grupos de ligação CFM2 e CFM8.1. Um estudo mais aprofundado dessas regiões pode confirmar a estabilidade desses QTL e determinar os efeitos de um mesmo QTL para a reação a ambas as doenças. No entanto, com dados apresentados na tabela 13, já é possível identificar os marcadores mais apropriados para serem empregados na seleção assistida para cada local avaliado. Além disso, os QTL mapeados indicam quais são as regiões mais importantes dos grupos de ligação CFM12 e CFM13 para serem saturadas, visando à identificação de marcadores para a seleção assistida.

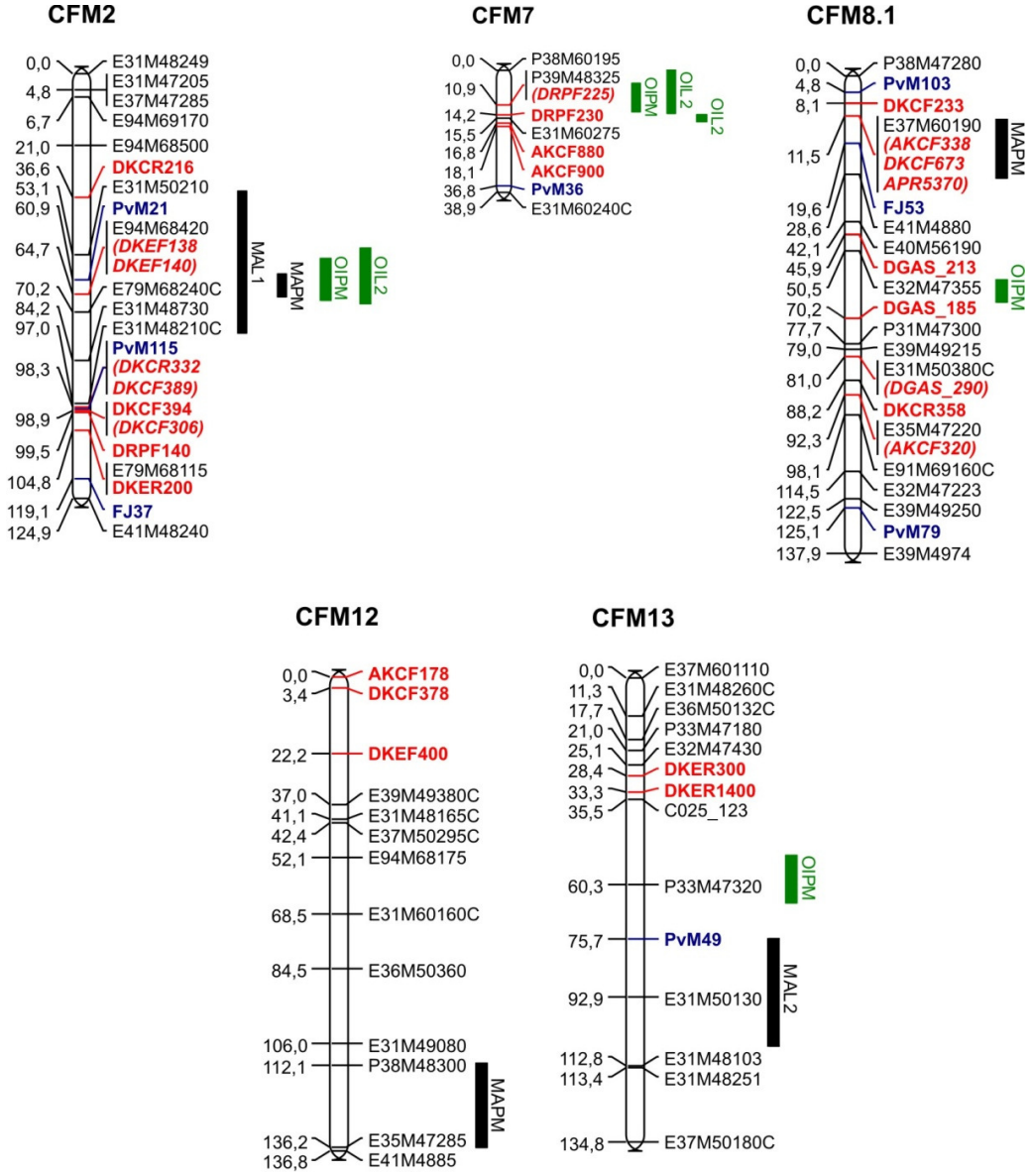

Figura 7 - Mapa de ligação da população CFM com a representação gráfica dos QTL de resistência fúngica mapeados. Os locos realçados em azul são microssatélites (HANAI, 2008), os locos em vermelho são RGA (os marcadores acessórios estão entre parênteses e em itálico) e os demais são marcadores AFLP (HANAI, 2008). Ao lado do mapa são mostrados os QTL detectados em suas posições mais prováveis (em verde: oídio e em preto: mancha-angular)

4. CONCLUSÕES

A metodologia *NBS-profiling* foi eficiente para a obtenção e o mapeamento de marcadores RGA nas populações de *Phaseolus vulgaris*, originadas dos cruzamentos entre 'Bat 93' e 'Jalo EEP558' (BJ) e entre 'Carioca' e 'Flor de Mayo' (CFM), constituindo uma importante ferramenta para ser empregada em estudos genéticos e em programas de seleção assistida por marcadores. As sequências de DNA dos RGA que mostraram similaridade com proteínas de resistência podem ser utilizadas para o desenvolvimento de marcadores PCR específicos.

REFERÊNCIAS

AMELINE-TORREGROSA, C.; WANG, B.; O´BLENESS, M.S.; DESHPANDE, S.; ZHU, H.; ROE, B.; YOUNG, N.D.; CANNON, S.B. Identification and characterization of nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, p. 5-21, 2008.

BASSETT, M. J. Linkage mapping of marker genes in common bean. In: GEPTS, P. (Ed). **Genetic Resources of *Phaseolus* Beans.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 329-353.

BASSETT, M. J. A revised linkage map of common bean. **Hortscience,** Alexandria, v. 26, p. 834-836, 1991.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.-B. QTL Cartographer: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. Center for Quantitative Genetics, NCSU, 1999. Disponível em: <statgen.ncsu.edu/qtlcart>. Acesso em: 29 agosto 2008.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. **Annals of Botany,** London, v. 95, p. 45-90, 2005.

BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.

BORÉM, A.; CARNEIRO, E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão:** aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**.** Viçosa: UFV, 1998. p. 13-18.

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas:** princípios e procedimentos**.** 3.ed., Lavras: UFLA, 2006. 319 p.

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H.F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 1362-1374, 2003.

BRUGMANS, B.; WOUTER, D.; VAN OS, H.; HUTTEN, R.; VAN DER LINDEN, G.; VISSER, R.G.F.; VAN ECK, H.J.; VAN DER VOSSEN, E. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, p. 1379-1388, 2008.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C. G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H. J.; VAN ARKEL, G.; DENANCÉ, C.; DUREL, C.-E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, p. 660-668, 2005.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, p. 89-100, 2002.

CICHY, K. A.; BLAIR, M.W.; MENDOZA, C.H.G.; SNAPP, S.S.; KELLY, J.D. QTL Analysis of Root Architecture Traits and Low Phosphorus Tolerance in an Andean Bean Population. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 59-68, 2009.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Ed). **Análise de QTL no melhoramento de plantas.** Goiânia: UFG, 2000. p. 1-20.

CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos 2008/2009 - Nono Levantamento - Jun/2009**, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9_levantamento_jun2009.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2009.

CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

DE PAULA JR., T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas.** Viçosa: UFV, 1998. p. 375-433.

DEBOUCK, D.G. *Phaseolus* Germoplasm exploration and maintenance. In: GEPTS, P. (Ed). **Genetic Resources of *Phaseolus* Beans.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 3-29.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; KICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, p. 19-20, 1983.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 3, n. 4, p. 278-284, 2000.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDEL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALEIRO, F.G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V.A.; CRUZ, C.D.; CORRÊA, R.X. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 38, n. 12, p. 1387-1397, 2003.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica,** Wageningen, v.138,p. 213-218, 2004.

FAOSTAT. **Top production – Beans, dry.** Food and Agriculture Organizaton of the United Nations (FAO), 2007. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 29 jun. 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 220 p.

FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A-F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA, P.A.; TSAI, S-M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.E.; GEPTS, P. 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, p. 847-856, 1998.

GEFFROY, V.; SICARD, D.; DE OLIVEIRA, J.C.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 12. p. 774-784, 1999.

GEPTS, P.; ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN,P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI,F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Eds.). **Genomics of Tropical Crop Plants.** New York: Springer Science; Business Media, LLC, 2008. p. 113-143.

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

HALEY, C.S.; ANDERSSON, L. Linkage mapping of quantitative trait *loci* in plants and animals. In: DEAR, P.H. (Ed). **Genome mapping**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 49-70.

HALL, R. **Compendium of Bean Diseases.** Saint Paul: APS Press, 1994. 73 p.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; KANYUKA, K. (R Genes) in Plants. **Encyclopedia of life sciences**, Hertfordshire, 2007. DOI:10.1002/9780470015902.a0020119.

HANAHAN, D. Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, p. 557-580, 1983.

HANAI, L.R. **Desenvolvimento de marcadores SSR-EST e construção de mapas genéticos em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** 2008. 96p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

HANAI, L.; SANTINI, L.; CAMARGO, L.; FUNGARO, M.; GEPTS, P.; TSAI, S.; VIEIRA, M. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, 2009. DOI: 10.1007/s11032-009-9306-7.

JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait *loci*. **Genetics**, Austin, v. 135, p. 205-211, 1993.

KAO, C.-H.; ZENG, Z.-B.; TEASDALE, R.D. Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. **Genetics**, Austin, v. 152, p.1203-1216, 1999.

KEARSEY, M.J.; FARQUHAR, A.G. QTL analysis: where are we now? **Heredity**, London, v. 80, p. 137-142, 1998.

KELLY, J. D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 82, p. 135-154, 2003.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. CARMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. 663 p.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics,** Washington, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.A.K.; FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 13, p. 211-227, 2004.

LANDER, E.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLON, A.; DALEY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps of experimental and natural populations. **Genomics,** San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. **Genetics,** Austin, v. 121, p. 185-199, 1989.

LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics**, New York, v. 14, p. 421-429, 1996.

LIU, J.; LIU, X.; DAI, L.; WANG, G. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. **Journal of Genetics and Genomics**, Bangalore, v. 34, n. 9, p. 765-776, 2007.

LÓPEZ, C. E.; ACOSTA, I. F.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITAN-SOLIS, E.; GALLEGO, G.; BEEBE, S.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 93, p. 88-95, 2003.

MAXWELL, J.J.; BRICK, M.A.; BYRNE, P.F.; SCHWARTZ, H.F., SHAN, X.; OGG, J.B.; HENSEN, R.A. Quantitative Trait Loci Linked to White Mold Resistance in Common Bean. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2285-2294, 2007.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Mapeamento de QTLs para reação ao oídio e mancha-angular do feijoeiro-comum em diferentes locais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 37, p. 1115-1126, 2002.

MICHELMORE, R.W.; MEYERS, B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 1113-1130, 1998.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J.; BEEBE, S.; BLAIR, M. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica,** Wageningen, v. 147, p. 105-131, 2006.

MIKLAS, P. N.; FOURIE, D.; WAGNER, J.; LARSEN, R.; MIENIE, C.M.S. Tagging and mapping Pse-1 gene for resistance to halo blight in common bean differential cultivar UI-3. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 41-48, 2009.

MUTLU, N.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. **Molecular Breeding,** Dordrecht, v. 17, p. 127-135, 2006.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 85, p. 513-520, 1993.

PFLIEGER, S.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; BLATTES, A.; LEFEBVRE, V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance *loci* in pepper. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 103, p. 920-929, 2001.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F,B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão:** aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**.** Viçosa: UFV, 1998. p. 435-450.

RIVKIN, M. I.; VALLEJOS, C. E.; MCCLEAN, P. E. Disease-resistance related sequences in common bean. **Genome,** Ottawa, v. 42, p. 41-47, 1999.

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

SAMBROOK, J.; Russel, D.W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academyof Sciences of the United States of America,** Washington, 12, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, J.B.; GRAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T.J.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão.** Viçosa: UFV, 2006. p. 41-65.

SILVA, H.D.; VENCOVSKY, R. Poder de detecção de “quantitative trait loci”, da análise de marcas simples e da regressão linear múltipla. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, p.755-762, 2002.

SINGH, S.P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) In: SINGH, R.J.; JAUHAR P.P. **Genetic resources, chromosome, and crop improvemet grain legumes**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2005. p. 13-57.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUNGIN, F.; HIGGINS, DG. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 4876-4882, 1997.

TULLU, A.; TAR'NA, B.; BREITKREUTZ, C.; BUCHWALDT, L.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D.; VANDENBERG, A. A quantitative-trait locus for resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) map close to a gene for resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology,** Ontario, v. 28, p. 588-595, 2006.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; REZENDE, J.A.M. Resistance to passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 1026-1030, 2006.

VALLAD, G.; RIVKIN, M.; VALLEJOS, C.; MCCLEAN, P. Cloning and homology modelling of a Pto-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1046-1058, 2001.

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

VAN DER BIEZEN, E.; JONES, J.D.G. The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, London, v. 8, n. 7, p. 226-227, 1998.

VAN DER LINDEN, C. G.; WOUTERS, D. C. A. E.; MIHALKA, V.; KOCHIEVA, E. Z.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 109, p. 384-393, 2004.

VARSHNEY, K.R.; TUBEROSA, R. **Genomics – Assisted Crop Improvement.** Dordrecht: Springer, 2008. 509 p. v. 2.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, A.P.; CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 2005. p. 301-391.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **Journal of Heredity,** Washington, v. 93, p. 77-78, 2002.

WANG, S; BASTEN, C.J; ZENG, Z.-B. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2007. Disponível em: <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>. Acesso em: 29 ago. 2008.

YOUNG, N.D. QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, Saint Paul, v.34, p.479-501, 1996.

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

ZENG, Z.B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait *loci*. **Proceedings of the National Academyof Sciences of the United States of America,** Washington, v. 90, p. 19972-10976, 1993.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait *loci*. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

ANEXOS

ANEXO A

```
>RNF330
ACATCTCTGG TTGAAATAAT TATCACACTT CCTTCACCAA ACCATTGCGA TTTCCAAATA GGGCTTTC
AACTGTTTAA ACTCGGTCAC ATCATCAAGC ACAATCAGAA CCTTTTCTCC ATAAAGTCTG TTCTCAAT
CAAACTTATT CCCATTGCAA TGCTATGTAT CTTGACCCTT GTTTTTAGGA CATCTGAAAG AAGTTTTT
CTTGCAAATC AATACATCCT CTGTTATTCG TTTCAATGAA ATTTCTACGG GTGAATCCCT TGCCAATT
TGATTGTAGA TTACTTTGGC CAAGGTTGTC TTGCCAACTC CCCCCATTCC AATCACTAGT GAATTCGC
GCCGCCTGCA GGTCGACCAT ATGGGAGAGC TCCCAACGCG TTGGATGCAT AGCTTGA

>RNF356
ACTCGATTCT CAACCCGAAA GTATAGATCC CAACATCTCT GNGTTGAAAT AATTATCACA CTTCCTTC
ACCAAACCAT TTGCGATTTC CAAATTAGGG CTTTCANACT GTTTAAAACT CGGTCACATC ATCAANGC
ACANATCAGA ACCTTTTCTC CATAAAGTCT GTTCTCAATC AAACTTATTT TCATTGCAAT GCTATGTA
TCTTGACCCT TGTTTTTAGG GCATCTGAAA GAAGTTTTTC TTGCAAATCA ATACATCCTC TGTTATTC
GTTTCAATGA AATTTCTACG GGTGAATCCC TTGCCAATTT GATTGTAGAT TACTTTGGCC AAGGTTGT
TTTACCAACT CCACCCATTC C

>RNF475
GAATTCGATT GGAATGGGGG AGTTGGTAAA ACCACTCTCG CTCAACATGT ATTCAATGAC CTGAGGGT
GGATGAGGCT AAATTTGATG TTAAAGTTTG GGTTTGTGTT TCAGATGAAT TTGATGTTTT CAAGATAT
CTAGAGCAAT TCTTGAGGCA GTTACTAAAT CAACCGATGA TAGTAGAGGT CTGGAGATGG TCCATAGA
AGAATGAAAG AAGAATTGAC GGGAAAGAAA TTTCTTCTGG TTTTGGATGA CGTTTGGAAC GAAAACCA
ACCTAAATGG GAGGAAGTGC AGAAGCCCCT TGTTTTAGGA GTCCAAGGGA GTAAGGTTCT TGTGACCA
CACGTAGTAA GGAAGTTGCT TCTACCATGC GTTCAGAAGA ATACTCCCTA CAACAATTAC AAGAAGAT
GATTGTTGGA AGTTGTTTGC TAAACATGCA TTTCGAGGTG ATTGT

>RRF380
AATCGCAGCT ATNAGGTGAC ACTATAGAAT ACTCAAGCTA TGCATCCAAC GCGTGGGAGC CTCCCATA
TGGTCGACCT GCAGGCGGCC GCGAATCACT AGTGATGGCA TGGGTGGTGT AGGTAAAACA ACCATTGC
GCAAGAAGTA TATAATAAGT TGTGTTTTGA ATATGAAGGT TGTTTTTTTG GCTAACATAA GAGAAGAA
TCGGGAAGAC TTGGAATGAT CTCTCTGAAG AAGAAGCTTT TCTCAACATT ATTAGGAGGA GAAGATTT
GAAAATTGAC ACACCCAATG GATTGCCTCA ATATATTGAG AGAAGGCTTC GTCGTATGAA AGTTCTCA
TCATTCTTGA TGATGTCAAT GATTCAGATC AACTGGAAAT TTTAGCTGGA ACATATGATT GGTTTGGA
TCAGGTAGCA GAATCATCAT AACAACCAGA GATAAGCAGG TTGGGATCTA TACTTTCGGG TTGAGAAT
CGAGT

>RRF410
ATCAAGCTAT TAGGTGAATA TAGAATAGTC AGCTATGCAT CCAACGCGTT GGGAGCTCTC CCATATGG
TCGACCTGCA GGCGGCGCGA ATTCACTAGT GATGGAATGG GTGGGATCGG TAAGACCACA CTGCTCAA
CATGTATACA ACAACCCAAT GATAGAGGGT ATATTTGCTA TCAAAGCCTG CGTTTGTGTT TCTGATGA
ATTTGATGTT TTCATGTTAA CCAGAGCAAT TCTTGAGTCA ATCCGTAAGG AAACTGATAA TAGCAGAA
ACCTAGAAAT GGTTCAGGGA CGATTGAAAG AAAAATTGAA TGGAATGAGG TTTCTTCTGG TTCTGGAT
GATGTTTGGA ACGAAGATCA AAACCAATGG AAATCATTGA AAACTCCTCT TAAATATGGG GTTAAGGG
AAGTAAAATT CTAGTGACAA CACGCAGTAA CAAAGTTGCT TCTACCTTAG AGTCAAACAA TGTTAGGA
TCTATACTTT CGGGTTGAGA ATCGAGT

>RKF310
GCATATGTTT CTATTTATGA GGCTTTTGGA GTCTTAAGGT GTTACCCTCG TCAATGACTA CTGTTTGG
AAAGTCTTGG CTGATAGGTT ACCAACACAT GTGAACTTGG AGAAAAGAGG GATTGATCTG GAAAGCAG
TATGTGTTTC TTGTGCAGGG AAGAGAAGGA ATTTGGGAGT CATATTTTTT TCAAATGCAA GGTAGCTT
GGAAGGTATG GAGTTTGTGC AGTAAGTGGG TTGGGGAGGC CTTCGTATAC CATTGGAATA CTTGCTTC
CCATAATCAC TAGTGAATTC GCGCCGCCTG CAGGTCGACC ATATGGGAGA GCTCCCAACG CGTTGGAT
GCATAGCTTG A

>RKR240
CCCGACGTCG CATGCTCCCG GCCGCCATGG CGGCCGCGGG AATTCGATTA GTTTCCACAG CACATCAC
CGATCTAGAG GAGCTATTCA CCACAATAGC CAAGTATAAA TTGAAGCTCA ATCTCAAAAA ATGCGTAT
TAAAGGTGGA AGCAGGAAAG TTTTTAGGGT TTCGCCTCAC CGACCGAGGA ATAGAGGCAA ACCGCGAG
AAGTGTGCGA CGATCATAGC CATGAGATGC CAGACCGAGG TGAAAGAGGT
```

Figura A1 - Seqüências dos marcadores RGA detectados na população BJ

```
>AKCF320
GACGTATAGT ATGACTCCTA GAGGCCCCAT TACAGGCCAG GTTTACGCTG ACTTCGTAGT AGAACTCT
CCTTAACAGC CGCACACCAA GAAGGAACAG GTTTCANATG GATGCTCTCT GTAGATGGTT CCTCAAAC
CAACAAGGTA GTGGGGCTGG TGTCATCATG GAAGGACCGG ATGGGTTGTT GATTGAGCAG GCCCTACG
ATTCACTTTC AAGGCCAACA ACAACCAAGC AAAATATGAG GCCTTGATCG TTGGAATACT TG

>DKEF360
TAGGAAACAC GCCAAATAGT ATACTATTTT TGTTCTTGAG ATTGCTGAAG AACAAATTGC AGAAAAAG
TAACACTTCT ACAGGAGTTA TGTGAAAACA TACCAAATAG GTGAAAGTCG AGACTTTTAT TCGGCAAA
TACTCGTATA CAAGTATCTT TTCATTTTCC TCTAAGCAAC ATGCCAAAAG TCTTACAAGG TTGCGATG
CCTCAATTTA GCTATAAACA TTACTTCATT ATTGAACTCC TCTGAGCCTT GACCAGAAAA TTTTGATA
GCCTTTTTAC CGCA

>DRPF205
TTTTTCTCAT TCAGACACTG TGCTATTAGC TGTTTCTGTA CACCTAATGA TCTAGAATCT CGATAAGT
TTTTGGTTAC ATCATCAATA AAACAATGAA AATCATATTG ATGATAGATT CTTTCATATA AAGCCTGA
GCAAGAGTTG TTTTGCCTAT ACCACCCATT CC

>DRF280
GAACCTTTTC TCCATAAAGT CTGTTCTGAA TCAAACTTAT TCCCATTGCA ATGCTATGTA TCTTGACC
CTTGTTTTTA GGACATCTGA AAGAAGTTTT TCTTGCAAAT CAATACATCC TCTGTTATTC GTTTCAAT
GAAACTTCTA CGGGTGAATC CCTTGCCAAA TTGATTGTAG ATTACTTTGG CCAAGGTTGT
```

Figura A2 - Seqüências dos marcadores RGA detectados na população CFM

ANEXO B

Artigo científico publicado no periódico Molecular Breeding:

HANAI, L.; SANTINI, L.; CAMARGO, L.; FUNGARO, M.; GEPTS, P.; TSAI, S.; VIEIRA, M. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, 2009. DOI: 10.1007/s11032-009-9306-7.

Mol Breeding
DOI 10.1007/s11032-009-9306-7

Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers

Luiz Ricardo Hanai · Luciane Santini · Luis Eduardo Aranha Camargo · Maria Helena Pelegrinelli Fungaro · Paul Gepts · Siu Mui Tsai · Maria Lucia Carneiro Vieira

Received: 26 February 2009 / Accepted: 15 June 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Microsatellites and gene-derived markers are still underrepresented in the core molecular linkage map of common bean compared to other types of markers. In order to increase the density of the core map, a set of new markers were developed and mapped onto the RIL population derived from the 'BAT93' × 'Jalo EEP558' cross. The EST-SSR markers were first characterized using a set of 24 bean inbred lines. On average, the polymorphism information content was 0.40 and the mean number of alleles per locus was 2.7. In addition, AFLP and RGA markers based on the NBS-profiling method were developed and a subset of the mapped RGA was sequenced. With the integration of 282 new markers into the common bean core map, we were able to place markers with putative known function in some existing gaps including regions with QTL for resistance to anthracnose and rust. The distribution of the markers over 11 linkage groups is discussed and a newer version of the common bean core linkage map is proposed.

Keywords *Phaseolus vulgaris* · Core linkage map · EST-SSR · AFLP · NBS-profiling method · Resistance gene analogs

L. R. Hanai · L. Santini · L. E. A. Camargo · M. L. C. Vieira (✉)
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, P.O. Box 9, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil
e-mail: mlcvieir@esalq.usp.br

M. H. P. Fungaro
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, Londrina, PR 86055-900, Brazil

P. Gepts
Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA

S. M. Tsai
Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, P.O. Box 96, Piracicaba, SP 13416-000, Brazil

Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for direct human consumption in the developing world (Broughton et al. 2003). Production is especially important in Eastern and Southern Africa and Latin America where, in particular, rice and beans are an inseparable pair of staple foods for millions of people, representing a major source of dietary protein. Therefore, an increased effort has been devoted to improving bean varieties and expanding the area under bean cultivation. However, the productivity of most bean varieties grown in developing countries is still low.

Molecular markers have been used to assist common bean breeding programs in various ways (Jarne and Lagoda 1996), including studies on the

Published online: 03 July 2009

origin and diversity of current cultivars (Gepts 1998), the domestication of *P. vulgaris* (Koinange et al. 1996), and the genetic control of resistance to important diseases (Miklas et al. 2003; Miklas et al. 2006a; Nodari et al. 1993b; Yu et al. 1998). The first molecular linkage maps of common bean were developed by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers (Adam-Blondon et al. 1994; Nodari et al. 1993a; Vallejos et al. 1992). Subsequently, common markers were used to integrate these maps by establishing the correspondence of their linkage groups (Freyre et al. 1998). For instance, a population of RILs derived from a cross between 'BAT93' and 'Jalo EEP558' was used as a core mapping population to construct an integrated linkage map. Although RFLP markers have been important to establish a genome-wide framework for anchoring and cross-referencing plant linkage maps, their widespread use in common bean was restricted by the lack of probes and the low-throughput nature of RFLP markers. Different types of markers, mainly random amplified polymorphic DNA (RAPD) were then used to increase the density of the common bean molecular linkage map (Freyre et al. 1998). More recently, single sequence repeats (SSR), also called microsatellites, have been developed and used to increase the density of existing maps, especially the core 'BAT93' × 'Jalo EEP558' linkage map (Blair et al. 2003; Grisi et al. 2007; Yu et al. 2000).

Currently, high-throughput markers, such as AFLP, are preferred for map saturation purposes. Putative functional markers are still underrepresented in the common bean molecular linkage map compared to other types of markers (López et al. 2003; Miklas et al. 2006b; Mutlu et al. 2006; Rivkin et al. 1999). Among these are resistance gene analogs (RGA), which are associated with a number of known *R*-genes (Brugmans et al. 2008; Ferrier-Cana et al. 2003; Kanazin et al. 1996; Mutlu et al. 2006) and quantitative resistance loci (Flandez-Galvez et al. 2003; Mutlu et al. 2006; Timmerman-Vaughan et al. 2002). In addition, microsatellites represent a limited proportion of the markers on the bean core map (Blair et al. 2003; Grisi et al. 2007; Yu et al. 2000), in spite of their many desirable attributes, including their presence in both non-genic and genic regions of plant genomes (reviewed by Li et al. 2004; Oliveira et al. 2006). A large number of unmapped microsatellite markers have been reported in the literature (Benchimol et al. 2007; Buso et al. 2006; Caixeta et al. 2005; Campos et al. 2007; Cardoso et al. 2008; Gaitán-Solís et al. 2002; Guerra-Sanz 2004; Hanai et al. 2007; Métais et al. 2002; Murray et al. 2002; Yaish and Pérez de la Vega 2003). In addition, the density of the common bean core map is still low for purposes of marker-assisted selection and map-based cloning.

The objectives of the present work were to test new SSR markers developed from common bean expressed sequence tags (EST) in a set of *P. vulgaris* genotypes, assess their capacity to render SSR polymorphisms and to map them and other markers such as RGA and AFLP onto the common bean core map.

Materials and methods

Plant material and DNA extraction

A set of 23 common bean inbred lines and one accession of *P. acutifolius* were used to evaluate allelic variation at EST-SSR loci. Among *P. vulgaris* accessions, 17 genotypes belonged to the Mesoamerican gene pool ('Apetito Blanco', 'Baetão', 'Barbunya', 'BAT93', 'Brasil2', 'Carioca Comum', 'Flor de Mayo', 'Garbancillo', 'Great Northern', 'IAC-UNA', 'Jamapa', 'Mulatinho', 'Porrillo', 'Puebla152', 'Rio Tibagi', 'Sanilac' and 'Tu'), and six to the Andean gene pool ('Antioquia 8', 'CAL 143', 'Jabola', 'Jalo EEP558', 'Pompadour' and 'Red Kidney'). For map construction the inter-gene pool 'BAT93' × 'Jalo EEP558" population (Freyre et al. 1998; Nodari et al. 1993a) consisting of 74 F_8 RILs was used.

Total genomic DNA was extracted from young leaf tissue using the CTAB extraction method as described by Doyle and Doyle (1987). DNA concentrations were estimated by electrophoresis on ethidium bromide-stained agarose gels using appropriate molecular weight standards. From this quantification, aliquots at 10 and 50 ng/μl were prepared for EST-SSR amplifications and enzymatic digestions, respectively.

Development and amplification of EST-SSR markers

As reported previously (Hanai et al. 2007), a total of 3,126 bean EST sequences were obtained from the bean EST project homepage (http://lgm.esalq.usp.br/BEST/). EST-containing SSR exhibiting at least five

repeat units of di-, tri-, and tetranucleotide motifs were analyzed and 156 primer pairs were designed. PCR reactions were performed in a final volume of 16 µl in 96-well plates using a Gen Amp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems). Approximately 20 ng of template DNA were mixed in a solution containing 0.2 µM of both forward and reverse primers, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris–HCl (pH 8.3), 50 mM KCl and 0.4 units *Taq* DNA polymerase (Promega). Four PCR program profiles were used to amplify EST-SSR loci. All four profiles started with a preliminary denaturation step at 94°C for 2 min followed by two stages. In both stages, denaturing and elongation conditions were held constant at 94°C for 30 s and 72°C for 60 s, respectively. The duration of primer annealing was 45 s, but the temperature varied in stage 1, decreasing 1°C per cycle during 12 cycles (65–53°C), 0.5°C per cycle during 10 cycles (55–50°C) or 1°C per cycle during 10 cycles (55–45°C) in programs 1, 2 and 3, respectively. In program 4, the initial annealing temperature was 45°C and increased 1°C per cycle during 10 cycles (45–55°C). Stage 2 comprised 25 cycles of amplification. In all programs, the annealing temperature of stage 2 was the one reached at the end of the first PCR stage. Final elongation was performed at 72°C for 7 min.

Development and sequencing of RGA markers

RGA markers were amplified based on the NBS-profiling methodology (van der Linden et al. 2004). This methodology is based on the digestion of DNA, ligation with adapters, and a PCR reaction where one primer targets the adapter while the other, which is degenerate, targets the conserved nucleotide binding site (NBS) domain of plant disease resistance genes. This amplification results in several fragments per reaction due to the abundance of resistance gene-like sequences in plant genomes.

About 200 ng of genomic DNA from the parental line 'BAT93' and 'Jalo EEP558' were digested with *Rsa*I (New England BioLabs). Digestions were performed in a final volume of 20 µl using 6 U of the enzyme according to the manufacturer's recommendations, during 4 h at 37°C. Reactions were terminated by heat inactivation (20 min at 65°C). An adapter previously prepared from an equimolar mixture of LA (long arm) oligonucleotide (5′-ACTCGATTCTCAA CCCGAAAGTATAGATCCCA-3′) and SA (short arm) oligonucleotide (5′-TGGGATCTATACTT*-3′) was ligated to the restriction fragment ends. The 3′ end of the SA oligonucleotide was blocked for *Taq* DNA polymerase extension by the addition of an amino group (*). Ligation was performed by adding 20 µl of a mixture containing 1.25 µM adapter, 1× ligation buffer (New England BioLabs), 80 units T4 DNA ligase (400 units/µl; New England BioLabs) to 20 µl of digested DNA. The reaction was incubated at 16°C overnight and terminated by heat inactivation (65°C for 10 min). As template DNA 3 µl of ligation products were used for the amplification of selected fragments anchored to the NBS-domain. For this, an AP (adapter primer) complementary to the adaptor (5′-ACTCGATTCTCAACCCGAAAG-3′) and one of four NBS-primer were used in distinct reactions (Table 1). The amplification was performed in a final volume of 20 µl containing 0.25 µM of both primers, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris–HCl (pH 8.3), 50 mM KCl and 1.0 unit *Taq* DNA polymerase (Promega). The amplification was carried out in a Gen Amp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems). A two-stage PCR was used after an initial denaturing step at 94°C for 5 min. The first

Table 1 Designation and sequence of primers used to generate RGA markers based on the NBS-profiling method

Primer designation[a]	Sequence 5′–3′	Protein domain/motif
AP	ACTCGATTCTCAACCCGAAAG	Adapter[b]
NBSa-F	GGAATGGGKGGACTYGGYAARAC	NBS/kinase
Kdc-F	ATGGGAAGGAAGTATTCCAA	NBS/kinase
Kdc-R	ARGTTCCACAGGACATCACC	NBS/kinase
RGP-F	GGNATGGGYGGBRTHGGYAARAC	NBS/hydrophobic

[a] F for forward and R for reverse

[b] Primer specific to the adapter sequence used in combination with RGA specific primers

stage consisted of 8 cycles at 94°C for 45 s, at 58°C (−1°C per cycle) for 1 min, and at 72°C for 1 min, whereas the second stage consisted of 25 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final extension of 7 min at 72°C was conducted. The amplification of fragments anchored to NBS-domain was assured by designing an adapter that does not have an AP-primer annealing site in the SA oligonucleotide. This annealing site is constructed after elongation of the NBS-primer, when the end of LA oligonucleotide is used as template for AP-primer annealing (for details see van der Linden et al. 2004).

RGA markers of interest were excised from polyacrylamide gels and reamplified following the same PCR conditions initially used. Fragments were resolved on agarose gels, purified (PCR purification kit, Qiagen), and cloned into pGEM®-T Easy vector (Promega) for sequencing. Inserts were sequenced in the forward and reverse directions. The sequencing reaction was performed as described by Sanger et al. (1977) using DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) on MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). Sequences were assembled using the Phred/Phrap/Consed package using a phred score ≥20 as the threshold for base quality. Nucleotide sequences were compared to sequences deposited in the Genbank database (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) using the BLAST tool (Altschul et al. 1990).

Generation of AFLP markers

AFLP markers were amplified based on the protocol described by Vos et al. (1995) with modifications. Restriction and ligation enzymes required for AFLP analysis were obtained from the New England Biolabs Company. Briefly, 200 ng of genomic DNA from each of the parents and the 74 F_8 RILs were double digested with *EcoR*I and *Mse*I or *Pst*I and *Mse*I enzymes (5 U of each) in a 25 µl reaction mixture (10 mM Tris–acetate, pH 7.5; 10 mM Mg-acetate, 50 mM K-acetate) during 4 h at 37°C. All resulting fragments were ligated to adapter sequences by adding an equal volume of a ligation solution i.e. 30 mM of Tris–HCl (pH 7.5), 10 mM of $MgCl_2$, 10 mM of DTT, 1.0 mM of ATP, 0.25 µM of *Eco*RI or *Pst*I adapter, 2.5 µM of *Mse*I adapter, and 80 units of T4 DNA ligase (400 units/µl). These reactions were incubated at 16°C overnight and terminated by heat inactivation (65°C for 10 min). The adapter-ligated DNA (3 µl) was used for the pre-selective amplification using AFLP primers based on the sequence of the *Eco*RI or *Pst*I and *Mse*I adapters, with one selective nucleotide at the 3′ end. The pre-selective reaction was amplified using the following conditions: 94°C for 2 min; 26 cycles of 94°C for 60 s, 56°C for 60 s, 72°C for 60 s; and a final elongation at 72°C for 5 min. Five microliters of a 10-fold diluted pre-selected PCR product were used as DNA template for the selective amplification using AFLP primers with three additional selective nucleotides at the 3′ end. The following cycling parameters were used for selective amplification: 94°C for 2 min; 12 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 60 s; 23 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 60 s; and a final elongation at 72°C for 5 min.

Genotyping

All markers were resolved in 6% w/v denaturing polyacrylamide gels (19:1; acrylamide:bis-acrylamide) using the electrophoresis apparatus Sequi-Gen® GT (Bio-Rad). Samples (3 µl) of amplified products were denatured with 1× loading buffer (0.2% each bromophenol blue and xylene cyanol, 10 mM EDTA, pH 8.0, and 95% formamide) at 95°C for 5 min before they were loaded onto the gels. The EST-SSR markers were electrophoresed for 2 h 30 min at 70 W, and AFLP and RGA markers for 4 h 30 min at 80 W. The loci were visualized by silver staining according to Creste et al. (2001). AFLP loci were coded using the name of the primer pair followed by the fragment size (bp). RGA loci were coded using the initials of the enzyme and NBS primer names followed by the fragment size (bp). The codes for EST-SSR markers are shown in Table 2.

Map construction

The segregation of each AFLP and RGA locus was scored by the presence or absence of the fragment. EST-SSR as well as rare codominant AFLP loci were scored by identifying the parental fragments in the segregating population. Goodness-of-fit tests for 1:1 segregation ratio were performed for all makers segregating in the 74 F_8 RILs.

For the construction of the map, we adopted the following approach using the software MAPMAKER

Table 2 PvM (*Phaseolus vulgaris* Microsatellites) loci derived from bean expressed sequence tags (EST)

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM010 (PVEPSE3030I07)	ACT5	GAAGGGCAATGGCTGAAG TCCCGTGGAAACACTTGG	256/256	1	Nd	1	
PvM023 (PVEPSE2004G02)	AG5	CCTGTTCCCTCTGTGTGAGA AATCAACCCCATCAAACCAA	219/700	2	Mono		N
PvM031 (PVEPSE3030F06)	ATC5	GAGAAGCCAGGAACTTA GCATCCCTTTTGTGTC	159/159	3	Nd		
PvM043 (PVEPSE2026A06)	AG10	CGAGCAAAGACATCGGTTT CATTGTAAGCCAGGGAAGG	112/112	4	Mono		N
PvM047 (PVEPSE2022E03)	CA5	AGCACTATGATTTTTGAAT CCTGGGTTGAAGGAAT	205/700	3	Nd		
PvM050 (PVEPSE2025C02)	TC5	GCGTGGGGTCTTTTCTCTCT AACGCATGGAAGTGCAAGTT	206/206	4	Mono		N
PvM051 (PVEPSE2019C07)	CA5	CCAACCACCCTTCTTCTCTCT ATCCGTGCCAACCATCTTT	199/199	4	2/0.22		Y
PvM052 (PVEPSE2018H03)	CA7	TCCTCTGCAAACAAAACCCTA TTCGCCAAATTCGACAATCT	204/500	4	3/0.62	5	Y
PvM053 (PVEPSE2016A02)	TC6	TGGGGGAATTGAGTGAACAT TCTTTCTTGCGCTTTTCTCTTC	200/200	3	4/0.51	9	Y
PvM054 (PVEPSE2015G11)	TC5	GCATCGTTGTTTCCTTCACA GATTGGAGAGCGGATTGGTA	193/193	3	2/0.09		Y
PvM055 (PVEPSE2014C04)	AT6	TGGTCTTCCTGGAGATGAAAG GCACAAAGTGCCCAAATG	209/209	1	Mono		N
PvM056 (PVEPSE2013B09)	TA6	AGCTGGCAGAAACTTGGAAA TTGAAACCCAGGTCTATTCTCTTC	214/214	3	4/0.62	1	Y
PvM057 (PVEPSE2030D11)	CT5	TCCTCAAATGCTTGGTTTCA CCGGTTCTCACCAGATTGTT	199/199	1	Mono		N
PvM058 (PVEPSE2031B01)	TC5	ATTGGGACGGGGATTG ACTTTTCCTTCTCTTCTCCTCT	151/151	3	3/0.38		Y
PvM059 (PVEPSE2031C12)	CT5	TGAGGCACACTTCGACTACAA ATGGCAAGAACGTGAAAAGG	158/158	2	2/0.38	8	Y

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM060 (PVEPSE2032B08)	AC5	TTCACATTCTTCACTCACA ATCCCTTGGACGATGAC	161/161	3	2/0.08		Y
PvM061 (PVEPSE2033A05)	AC6	GAAAAAGCTATGGGCCACAC CGGTAGAGAATCCAGCGAGA	231/231	2	2/0.39	9	N
PvM062 (PVEPSE2033F05)	TC5	GCACCACTTTCTCAGATTTGG CTGTCATGGCGATGGTGTTA	172/172	3	3/0.48	5	Y
PvM064 (PVEPSE2035G05)	GA6	AGTACCCTACACGTATCACTG GCCACTAGCCCATCTTCT	163/163	1	Nd		
PvM065 (PVEPSE2129G03)	TA5	GAGCGCACAAATGCAATAAT GGGAGGATAACGACAATAGG	241/241	1	2/0.09		Y
PvM066 (PVEPSE3001H04)	AT5	CCTCAGCAAGCTCCGTAAAC CATGCAACCTGAAACACTCC	196/196	1	2/0.51	6	Y
PvM067 (PVEPSE3002D09)	GT5	CTGGTGCAGCAAGGTTTTTC TGCGCCAGAATTTACAATACAC	216/216	1	2/0.09		Y
PvM068 (PVEPSE3007B09)	AT6	CCATTACGTGTCCAAGGTCTC CAAAAAGGAATCGGACTCTAGG	269/269	3	3/0.51		Y
PvM069 (PVEPSE3008F01)	TC7	CAATAAAAACCGCAGAGAATCC GCGTAAGCAGGTGGGTAAGT	217/217	1	2/0.09		N
PvM070 (PVEPSE3010C09)	AT6	GAAGGGTCATTGTGGAC TCTTTTGTCACTCCTAATCC	161/161	1	Nd	11	
PvM072 (TC144)	TC9	GAAACACAATGGCTCAAGCA CAAACCAGCAGCAACAAGAG	200/200	3	Mono		Y
PvM073 (TC154)	AAG6	CTTCACCGATCTGACAGCAG TTCTCCAGGAACCCCTTCTTT	194/600	4	3/0.44	9	Y
PvM074 (TC241)	GCG5	TGAACACCCTTTCGTCAACTC CCTTCTCCTCCCCTGATTTT	200/450	4	2/0.08		Y
PvM075 (PVEPLE1001E04)	GAT5	ATTGGAAGGGGGATGAACCT TAGGAGAGTGCCCAGTGCTT	222/222	4	3/0.44	9	Y
PvM078 (PVEPSE2003D01)	TCT6	CATTACTCCCTTCCCTTCCA ACTTCACTGGCACTCACAGG	174/174	1	Nd	3	

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM079 (PVEPSE2003F03)	GAA5	TCCGAAACTAACAGAACAAGGA TTATGGACAGTGGACGAACG	191/191	1	2/0.5		Y
PvM080 (PVEPSE2004B12)	CAC5	ACTATCCCCAACAACCACCA TCATAGCCTCCACCAGAAGG	204/204	4	Mono		Y
PvM081 (PVEPSE2004F01)	ATG5	TCCCAGTGAAATCTGCTACAT CCAACAATAAAATGGCACAAA	176/176	4	2/0.08		Y
PvM082 (PVEPSE2004G10)	TTA5	TTTCATCTTCAAAACTCTCATCAA ATGGCAGACCGAACTCTCTA	183/183	4	2/0.16		Y
PvM083 (PVEPSE2005C02)	TTC5	AGAAATGAGTGAGCGTGTCG ACGGCTGATAGAGCGGGTA	152/152	1	Mono		Y
PvM084 (PVEPSE3013B07)	TG5	AGAAGGTGAAGTATGATTTA TACATTGATTTTGGGTCA	244/244	1	Mono		N
PvM085 (PVEPSE3015B05)	TA6	ATTCACGGTTAGGATAGAT TGGCTGTCTTGTGTTTCT	111/111	1	Mono		N
PvM086 (PVEPSE3018D04)	AT5	ACCGGGAGAAAAGGAAGAAC GCCAAAAAGTAAGAAGCAGCA	210/250	1	2/0.09		Y
PvM087 (PVEPSE3021G12)	TA5	CATCACGACAGTTTTCC CATTACATTACACCTATTCA	278/278	1	Nd	3	
PvM088 (PVEPSE3022A06)	AG5	AGGTGCAAAAGCAAGAATGC TCCCCAGCAGTATGATGACA	208/208	1	Nd	2	Y
PvM089 (PVEPSE3023B04)	TC5	CGAAGTAGCACGCAGAGAGA GCAAGACGGGAGTGATGG	185/290	1	2/0.08		Y
PvM090 (PVEPSE3023H10)	TC6	CCCTTCACCGCTCCATACT CGGAAACAGTGGCTGGTCTA	250/250	1	2/0.08		Y
PvM092 (PVEPSE3027F14)	TA6	CGTGGGCTACACTGGAAGAC CATCTGCAAATGCTTGCTGT	240/240	1	3/0.35		Y
PvM093 (PVEPSE3029J06)	GA5	TTATATGCGGAGCAAAGGATG GACCGACAAAGCCTTCATTC	216/216	1	2/0.38	2	Y
PvM094 (PVEPSE3030F08)	CT6	AGTCACCGGATGCTCTGAAG GGGGTTTAGGGAAAGCAAAA	185/185	1	Mono		Y

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM095 (TC17)	AC9	GGGCGAGTTCATCTTCACAA AGGATCAACAGCCTCCAGTG	243/400	1	4/0.69	3	Y
PvM096 (TC18)	CT5	GCCAGTTTGTTGCTTGGAAT GAAGAATGGTTGCTCCCTCA	190/190	1	Mono		Y
PvM097 (TC19)	TA5	CAAGAGTGAAGGGGCAGTTT CGGCCAACCACTACTTTTAG	155/155	1	3/0.66	1	N
PvM098 (TC70)	TC5	CTCCCTCCTTCACACTCTTTG GGGGTAGTCCTTTGGAACG	114/114	1	3/0.46	11	Y
PvM099 (TC70)	TC5	CTCTTTGTGTGGCTCCCTGT GGTGGCATCTTTTTCTACCTCA	203/2000	1	Mono		Y
PvM100 (TC147)	AT7	GCCAATAACATCACCTCAT GGGTAGTCAGTTTCTAAGCA	290/290	1	4/0.36	2	Y
PvM101 (TC158)	TC6	TCACATACAAGCACATCAACCA CCAGCAACTCCAGACACAGT	176/660	1	Mono		Y
PvM102 (TC161)	CA5	CGGAAATAGAAACTCAAACTT AATGGAGAGAGAGCAAGG	259/259	1	Mono		Y
PvM103 (TC168)	AG8	CGAGAAAGAGAGAGAAGAGTTT GTGTTGGTGTGATGCTGAG	145/145	1	3/0.58	8	Y
PvM104 (TC187)	AC5	CCAATCGAAAGACCCAAATC GATCGCAGAGCCTTCAAATC	191/191	1	2/0.08		Y
PvM105 (TC188)	AT5	CCGTATGAACATCAACCATT CACAAGAGGATTTCCAACTCT	232/500	1	2/0.29		N
PvM106 (TC195)	AT5	GCTGGTGTGGAGATGATACT TGTTGATGTTGAAAGGAGTG	219/219	1	Mono		Y
PvM107 (TC198)	AT5	GGAGCCCCTCACCAATAGAC CGCCCTGGATCGTTAGATAG	347/347	1	Mono		Y
PvM108 (TC202)	CT5	CATCTTGAGTTTATCCCTGCTC AATTCCAAGGCCATTGACAC	238/238	1	Nd		
PvM110 (TC325)	CT5	CGCACACGCTCTCTCTCT CTTCTGCTGCTCCTCAATCTT	202/	2	Nd		

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM111 (TC427)	TA5	TGGCTGGTAACAACAACTTCA TACGACATGGACCAAAACGA	200/200	1	Mono		N
PvM112 (TC471)	AG5	GGTTCCTGCCCCAGAATC TTGCTGCTTCCGTTTCAGTA	251/251	1	Mono		Y
PvM113 (TC514)	CT5	CTGGTGGAGTTGTGGCTGTA GGATTCTGCTCAAAGGGAGA	180/180	1	Mono		Y
PvM114 (TC529)	CT5	TCTTCTTCTTCCAAGCCTTCC TATGGCAGCAAACGGGTAT	201/1000	1	Mono		Y
PvM115 (PVEPLE1003G09)	CT25	AAATGTAAAGTGCTCCAT CTGAGAGAAAGAAAGAGACA	143/143	2	13/0.91	2	Y
PvM116 (PVEPSE2002D05)	GA5	TATTGCCCAAAGATGCTTCC ATACCCAAAATGCACCCACT	179/179	1	Mono		Y
PvM117 (PVEPSE2004H03)	TC7	CACACATCTCACCTTGTCTCTCTC GCGGCATTCAACACTGCT	165/700	1	Mono		Y
PvM118 (PVEPSE2006F05)	TC8	GCGAACACATTCACACAACA AATCCCGACCAAGTCTCCTT	215/215	1	5/0.54	8	Y
PvM119 (PVEPSE2006H01)	TC9	AGAAGAAGAAGTAGAACAGAATC GCTGGAGTTGGGGTCAGT	226/1100	1	Nd		
PvM120 (PVEPSE2009C06)	TC6	CCCCATCCTCACTCACAAAC TCATTCTTCTGGTGCTGCTTT	211/211	1	2/0.39	1	Y
PvM123 (PVEPSE2013B07)	CT9	CCCACTACCACTCCTTTG AGCGTCTGAACCCATTG	194/194	2	4/0.47	1	Y
PvM124 (PVEPSE2013E06)	TA5	TCCCCTACTGATGTGTTC AAATGTCTGGTTTTGC	193/193	2	2/0.39	3	N
PvM125 (PVEPSE2014B09)	AC5	CAAACTCAACACCCTCTCA GGAAACAGCAGCACCAC	198/198	1	Mono		N
PvM126 (PVEPSE2014F08)	TC7	AAATCCTCTTCCACCTTTG AACACGCACACACAGACA	132/132	1	3/0.49	3	N
PvM127 (PVEPSE2015H07)	TC5	AACTTTCTTTGACCCTCTC GCTTTGTCTTGTTCTTCCA	155/155	2	6/0.72	10	Y

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM128 (PVEPSE2016C01)	GA11	GTTTCTGCGGTGAGAGTG AGCCTTCGTCGTTCTTCT	130/130	1	3/0.43	9	N
PvM129 (PVEPSE2017D09)	GA5	GGTAGGACAACAAGGTAACG AAAACAACGCAGGAAATG	167/167	2	Mono		N
PvM130 (PVEPSE2018H02)	TA5	TGGACAACAACACTACACA AAGACATTCACATAATAAGG	265/265	2	2/0.18		N
PvM132 (PVEPSE2018H10)	AG5	GCCGAAGCAGATAAAAGG TGTTCTCGTCTCCAATGC	191/191	2	4/0.51	3	Y
PvM133 (PVEPSE2019C09)	AT5	GAAGTCTCTTGGGTTTCAGA CCCTATTTTTCACTCTCACC	193/193	2	Mono		N
PvM134 (PVEPSE2020C04)	CA5	TCATACTACCTTGTTCTTACATTCA CACGCTGTTCCACCTG	182/182	2	Mono		Y
PvM135 (PVEPSE2005C06)	TTG5	TCTCTCTGTTTCTTTTCTGGGTTT CGTTGTCTTTTTCTCCGCTTT	151/225	1	Mono		N
PvM136 (PVEPSE2006E08)	TGG5	GCAACTATGCTGGGAAAGGA GGGCATTCTTCAGATTCTCG	217/217	1	2/0.08		Y
PvM137 (PVEPSE2007B06)	TTC6	TTCTCCTGTCCCTCCTTGTG GCCTTCCCACCAGGTTTAG	197/197	1	2/0.16		Y
PvM139 (PVEPSE2011H08)	AGC5	AGAGGACGATGGATTGGT TCAGAACAAGGGTTTTCG	288/288	2	Mono		N
PvM141 (PVEPSE2013G03)	CCA5	CTTCGTCATCTCCCACAA CCATCATCTCCTTTGGAA	214/214	2	Mono		N
PvM142 (PVEPSE2014H11)	CAG5	CAGATAAATAGCCCTGTGC GCATTCAAACGATGACTCTT	188/188	1	2/0.16		N
PvM143 (PVEPSE2016B08)	ATG5	TCTTCCACTCCTCCACCT CCTAAGCACCCCAAAAAT	183/170	1	Mono		N
PvM145 (PVEPSE2019C10)	TCC5	TTTCAGTTCGGGATTGTTCC ATTGGTGGAGGTGGGAGAG	203/203	1	3/0.16	5	Y
PvM146 (PVEPSE2020D07)	CGC5	ACCATTGACTCCGATGT ACGATAAACCCAATCCACCA	187/400	1	Mono		Y

Table 2 continued

Marker code (Bean unigene)	Repeats motif[a]	Sequence of forward and reverse primers (5′–3′)	Predicted/ observed allele (bp)[b]	PCR program[c]	Na/ PIC[d]	Linkage group	Amplification in *Phaseolus acutifolius*
PvM147 (PVEPSE2020F11)	TCA5	ATTTGCTGTTTTCTGCTG GAAGTTGAGGTGGGAGGT	151/151	1	Mono		N
PvM148 (PVEPSE2023B04)	CCA7	ACCTCAAAACCCACCACAAA GAAGTGCTCCCAGATGAAGG	191/191	1	3/0.48	3	Y
PvM149 (PVEPSE2025B02)	ACG5	ATGACGAGGAACCAGACACC GTCGCTTCAACGAGGATGTT	213/213	1	2/0.08		Y
PvM150 (PVEPSE2030D10)	TCT5	CTCCCAAGTTCCCCTTTTTC ATGCGTCCAACCCTTATGTC	199/199	1	2/0.43	11	Y
PvM151 (PVEPSE2031D01)	TTA6	GGGCTGCAAAGGTGACATTA ACCGAAAACCCATGCTACTC	204/215	1	3/0.29		Y
PvM152 (PVEPSE2032F06)	TTG6	ATTTTGGAGCGAAACAGCAT GAGAACCTCGTCGTCGTCTT	200/200	1	4/0.36		Y
PvM153 (PVEPSE3002B08)	AGA5	ATGGGCGATCTGGACTATGT TTGAAGACCAAGCCAAGAGAA	183/270	1	2/0.41	2	Y
PvM154 (PVEPSE3021F08)	TCA5	ATTCACCTCCTTCTGCTTCG GCTCCTTCTCTCCAGTCTCG	216/490	1	Mono		Y
PvM155 (PVEPSE3029G07)	AAC5	AAGTATGGAAACTGGGGCTGT GTGCGTGGAATAATGTGGTG	206/206	2	2/0.08		Y
PvM156 (PVEPSE2021C05)	TTC6	CACACTTCAACTCCAAAGG CCAACCCTCGCAAAAT	219/1100	2	Nd		

[a] Following the repeats motif, the number of repeat units is shown

[b] At least one genotype amplified the observed allele

[c] Detailed in Material and methods

[d] *Na* number of alleles observed considering all of the bean genotypes (24), *PIC* polymorphic information content calculated as described in Hanai et al. (2007), *Nd* not determined as there was no amplification or weak amplification, *Mono* monomorphic locus in all of the studied bean genotypes

v. 3.0 (Lander et al. 1987). Segregation data here obtained (EST-SSR, RGA and AFLP markers) were merged with available data of markers placed on the framework of the core map (Freyre et al. 1998). Initially, three RFLP markers equally distant were anchored to their respective linkage group using the 'anchor' command. The 'assign' command (LOD > 3) was used to assign all other markers to the linkage groups. In each linkage group, the order of 10 highly informative markers was defined using the 'order' command. Then, the other markers were added to the map using the 'build' command (LOD > 2.0). Loci that could not be ordered with the default log-likelihood threshold value were referred to as accessory markers and placed in the most likely interval. The Kosambi mapping function was used for the calculation of map distances (Kosambi 1944). Map drawings were generated using MapChart (Voorrips 2002). The nomenclature and orientation of linkage groups followed the recent changes adopted by the Genetics Committee of the Bean Improvement Committee (Pedrosa-Harand et al. 2008).

Results and discussion

Allelic variation at EST-SSR loci

Out of 156 primer pairs designed initially, 139 amplified 140 loci of which 40 were analyzed previously (Hanai et al. 2007). The remaining 100 loci were evaluated in the present study using a set of bean genotypes (Table 2). About 13 amplicons were larger than expected, probably due to the presence of introns between primer sites. Nevertheless, only 11 EST-SSR loci presented a non-optimal amplification pattern and were not analyzed. A total of 89 pairs of primers amplified fragments that were easy to score, 54 of which revealed polymorphisms among the 24 bean genotypes. The number of alleles per polymorphic locus varied from 2 to 13 with an average of 2.7. The polymorphic information content (PIC) of the 54 loci ranged between 0.08 and 0.89, with a mean PIC of 0.40.

Our data agree with previous findings that reported an average of 2.9 (Yu et al. 1999) and 3.1 alleles per locus (Guerra-Sanz 2004) as both studies analyzed genic SSR in bean accessions. Generally, SSRs from anonymous sequences are regarded as more informative than SSRs of genic origin. For example, average values of six and seven alleles per locus were described by Gaitán-Solís et al. (2002) and Buso et al. (2006), respectively. The fact that expressed sequences are associated with biological processes and therefore are more conserved than anonymous ones could explain these differences; however, when the same set of bean genotypes were analyzed using SSR loci developed from genic and genomic sources, the results showed similar average values for PIC and number of alleles per locus between genic and genomic SSRs (Hanai et al. 2007).

A considerable number of polymorphic SSR loci is generally required for variety identification or even for pedigree analysis when polymorphisms are used for tracing parentage (Guerra-Sanz 2004). The locus PvM115 containing a CT motif repeated 25 times showed both higher PIC (0.89) and number of alleles (13) in the 24 genotypes analyzed (Fig. 1). In our previous study, 12 alleles were detected at the PvM21 locus (Hanai et al. 2007). Thus, these two EST-SSR loci are very informative and may be useful in both types of analyses.

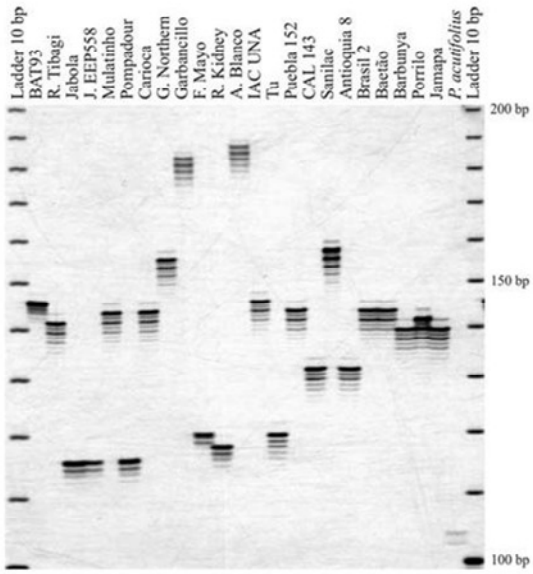

Fig. 1 Electrophoretic pattern at PvM115 locus (EST-SSR) in 24 *Phaseolus* genotypes detected in 6% silver-stained polyacrylamide gel. 10-bp DNA ladder (Invitrogen) are in first and last lane

An updated common bean core map

We screened 'BAT93' and 'Jalo EEP558' for polymorphisms using 156 EST-SSR primer pairs of the PvM series, 16 combinations of restriction enzymes (*Rsa*I, *Hind*III, *Alu*I and *Dra*I) and NBS primers (Table 1) through the NBS-profiling methodology and 28 combinations of AFLP selective primers. A total of 140 EST-SSR primer pairs amplified scorable loci, of which 50 were polymorphic. Regarding the NBS-profiling method, the restriction enzyme *Rsa*I was chosen because it generated better amplification profiles and more polymorphic RGA loci (data not shown). The four NBS primers in combination with *Rsa*I produced 194 loci, of which 32 were polymorphic (Fig. 2). In addition, the AFLP selective primer combinations (12 from *Eco*RI/*Mse*I and 16 from *Pst*I/*Mse*I digestions) amplified 1,252 loci, 29% of them being polymorphic. From these, 15 combinations producing 203 polymorphic loci were selected for genotyping the mapping population (Table 3).

The merging of the data of the 285 loci developed in this study (50 EST-SSR, 32 RGA and 203 AFLP) with the data of 143 markers previously mapped into the core common bean linkage map (Freyre et al. 1998) resulted in a map comprised of 413 DNA markers (Table 4) distributed in 11 linkage groups (LG). About 15 markers remained unlinked. The length of the new linkage map was estimated at 1,259 cM, corresponding to an average of one marker per 3.0 cM. The number of markers per LG ranged from 32 (10) to 50 (8) while the LG lengths varied from 75 (5) to 147 cM (2).

The levels of efficiency of both QTL mapping and selection based on DNA markers is enhanced when regularly spaced markers are available throughout the linkage groups (Lander and Botstein 1989). If the number of markers allocated to map positions is high, existing gaps are more likely to be saturated. With the integration of 282 new markers (50 EST-SSR, 32 RGA and 200 AFLP) into the common bean core map, we were able to place new markers in some

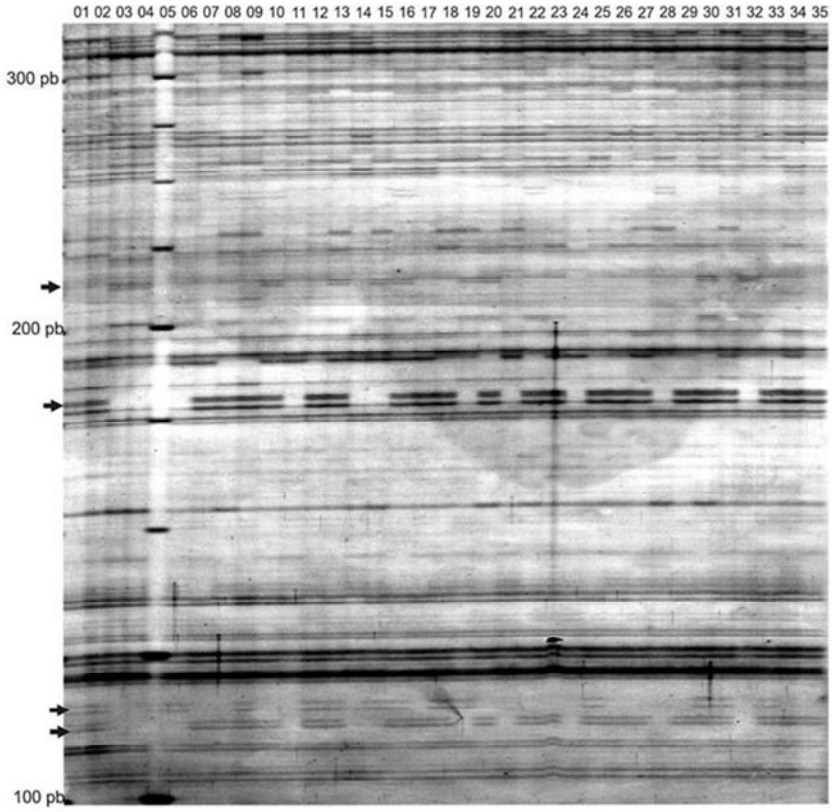

Fig. 2 Amplification pattern of RGA markers in 6% silver-stained polyacrylamide gel. The DNA was digested with *Rsa*I and amplified using the primers AP and NBSa-F. The parental lines are represented in duplicate ('BAT 93', lanes 1 and 2, and 'Jalo EEP558', lanes 3 and 4); lanes 6 through 35 correspond to F_8 RILs. *Arrows* indicate polymorphic loci. Lane 5 shows the 25-pb DNA ladder (Invitrogen)

Table 3 Number of polymorphic loci per combination of AFLP primers

Primer combination	Selective nucleotides	Number of polymorphic loci
P31M64	P + AAA, M + GCT	18
P32M63	P + AAC, M + GCA	19
P37M64	P + ACG, M + GCT	5
P39M65	P + AGA, M + GGA	8
P39M63	P + AGA, M + GCA	11
P38M65	P + ACT, M + GGA	4
P32M64	P + AAC, M + GCT	6
E31M48	E + AAA, M + CAC	20
E39M49	E + AGA, M + CAG	10
E40M56	E + AGC, M + CGC	23
E37M60	E + ACG, M + CTC	23
E31M60	E + AAA, M + CTC	18
E40M49	E + AGC, M + CAG	8
E31M49	E + AAA, M + CAG	18
E39M48	E + AGA, M + CAC	12
Total		203

*E Eco*RI complementary primer, *P Pst*I complementary primer, *M Mse*I complementary primer

existing gaps. In LG 3, for instance, five AFLP, one RGA, and one EST-SSR markers were positioned between markers *Bng12* and *D1151* and in LG 6 three AFLP and one EST-SSR markers were positioned between markers *ROF7a* and *D1086*. Similarly, additional markers were placed in two linkage groups within regions where QTL for resistance to anthracnose were mapped before (Miklas et al. 2006b): the QTL interval (40–75 cM) in LG 1 was saturated with seven AFLP and two EST-SSR markers whereas the QTL interval in LG 2 (65–95 cM) was saturated with 14 new markers, including 4 RGA (Fig. 3).

Slight discrepancies were observed between the present map and the previous one (Freyre et al. 1998). Linkage groups 2, 6 and 11 became shorter while LG 1, 3, 8, 9 and 10 became longer. These discrepancies are probably due to the size of the mapping population and the kind of markers used. In order to develop a core linkage map and align the existing RFLP maps, Freyre et al. (1998) used a number of markers with more missing data and a smaller population. For instance, the LG 2 of the Freyre's map had 175 cM while the corresponding groups in the Florida and Davis' maps had 128 and 107 cM, respectively (Nodari et al. 1993a; Vallejos et al. 1992). In addition, the present map is about 30 cM longer than the one reported by Freyre et al. (1998), because new markers were positioned at the end of the groups, e.g., LG 10 had eight new loci mapped as terminal markers, expanding its size to more than 36 cM (Fig. 3).

Segregation features

Most of the markers (82.5%) showed a 1:1 segregation ratio of the parental alleles ($P < 0.05$), as expected in a RIL population. Among the newly

Table 4 Distribution of different types of marker over the linkage groups (LG) of the novel common bean core map, and their lengths in centimorgans (cM)

LG	No. of markers previously mapped[a]	No. of novel markers			Total	Length (cM)
		EST-SSR	RGA	AFLP		
1	14	6	3	21	44	129.0
2	15	6	4	14	39	146.7
3	12	7	2	21	42	143.0
4	8	1	3	23	35	99.6
5	15	5	1	18	39	75.2
6	15	2	0	16	33	97.1
7	14	2	4	14	34	105.4
8	11	7	4	28	50	146.1
9	7	7	1	11	26	123.1
10	9	4	5	14	32	108.4
11	11	3	5	20	39	85.2
Total	131	50	32	200	413	1258.8

[a] Markers previously assigned to the framework of the common bean integrated map (Freyre et al. 1998). *EST-SSR* expressed sequence tag derived single sequence repeats, *RGA* resistance gene analog markers based on NBS-profiling method

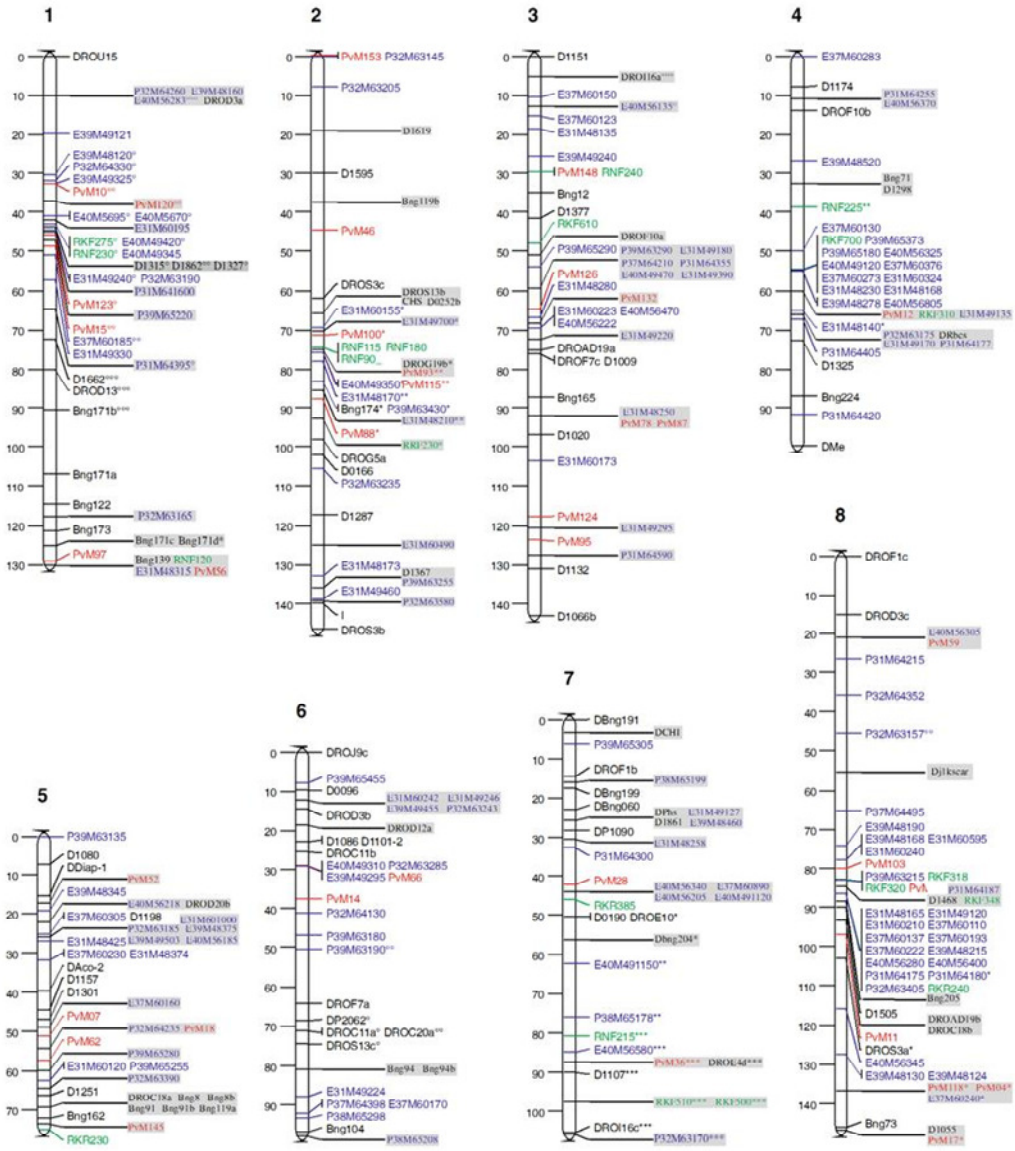

Fig. 3 An updated common bean molecular linkage map based on the 'BAT93' × 'Jalo EEP558' RIL population. The revised orientation and nomenclature of linkage groups follows that of the Bean Improvement Cooperative (http://www.css.msu.edu/bic/Genetics.cfm). About 261 markers were ordered with LOD > 2.0 and their distances (cM) from top to bottom are indicated to the left of linkage groups (*LG*). About 152 markers were assigned to linkage groups but not ordered in multipoint analyses (LOD > 2.0) and were placed in the most likely interval (*gray boxes*) without changing the map distances. Loci with distorted segregation ratios are indicated by asterisks (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$ for markers skewed toward 'BAT93') or degree symbols (°$P < 0.05$; °°$P < 0.01$; °°°$P < 0.001$ for markers skewed toward 'Jalo EEE558')

positioned markers, 13 EST-SSR (26%), 7 RGA (22%) and 28 AFLP (14%) showed segregation distortion. Gametes in direct competition, meiotic drive, and genes controlling pollen lethality are factors that affect allele segregation during meiosis and can produce distorted ratios (Moyle and Graham

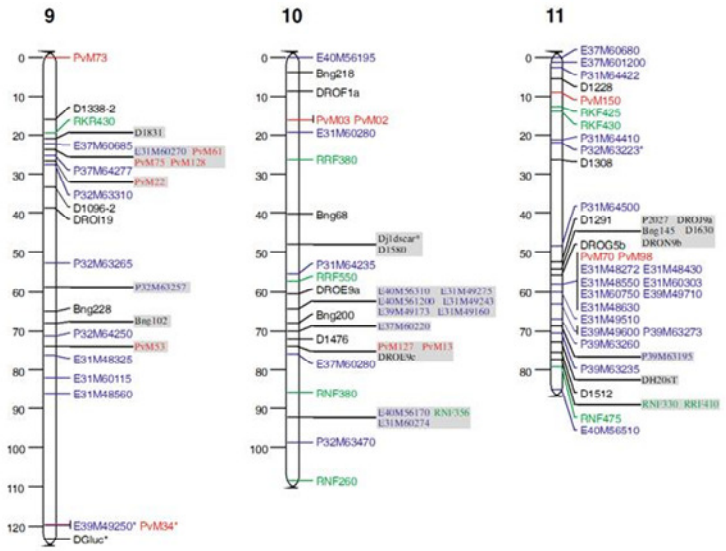

Fig. 3 continued

2006). Among the 28 AFLP loci with distorted segregation, similar numbers were found skewed towards 'BAT93' alleles (15) and 'Jalo EEP558' alleles (13). In contrast, segregation distortion affecting EST-SSR and RGA loci favored 'BAT93' alleles. Nine EST-SSR and five RGA loci showed an excess of 'BAT93' alleles, while four EST-SSR and two RGA loci showed an excess of 'Jalo EEP558' alleles. This could be explained by the higher adaptability of lines carrying 'BAT93' alleles. Since we used SSR markers that are within genes it is possible that their products were affected by natural selection leading to the observed bias in the segregation ratios. Following allelic frequencies of SSR loci in 24 generations, Rodrigues and dos Santos (2006) reported that all loci were affected by natural selection, which favored one of the parental common bean accessions ('Carioca MG') at 29 out of 30 loci.

Interestingly, markers showing distorted segregation were mainly located in six linkage groups. An excess of 'Jalo EEP558' alleles were positioned in two regions located on LG 1 and 6, while an excess of 'BAT93' alleles were mapped in four regions located in LG 2, 7, 8 and 9. The clustering of markers with segregation distortion possibly reflects the location of genes that were favored by either meiotic selection or inadvertent selection in BJ population.

Marker distribution

Table 4 shows the distribution of marker types in the common bean linkage groups together with group lengths (in cM). Non-anonymous EST-SSR and RGA markers were mapped to all linkage groups, excluding LG 6. About 50 EST-SSR markers were ordered with LOD > 2.0 into 40 distinct positions of the 11 linkage groups of the BJ map. Although EST-SSR were positioned on all LGs, their distribution was not uniform and varied from one in LG 4 to seven markers in LG 3, LG 8 and LG 9 (Table 4). Interestingly, LG 4 is the group in which most of the microsatellites studied by Yu and coauthors were mapped (Yu et al. 2000). This illustrates the complementariness of both studies regarding the saturation of the core map with SSR markers.

In general, we did not observe a direct relation between number of markers and length of the LGs. The shortest linkage group (75 cM) had as many markers (39) as the largest one (123 cM), which contained 26 markers (Table 4). This could be explained by the clustering pattern in some regions of the bean genome. Using absolute co-segregation of three or more markers as a criterion for defining a cluster we inferred clustering in seven LGs: 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 11, with large clusters (>8 markers) in

groups 4, 8 and 11 (Fig. 3). AFLP markers formed the majority of the clusters. The uneven distribution of AFLP markers derived from double digestion with *Eco*RI and *Mse*I was previously reported in other legume species such as soybean (Young et al. 1999) and adzuki bean (*Vigna angularis*; Han et al. 2005) but also in the yellow passion fruit (Lopes et al. 2006). The preferential localization of AFLP loci in DNA regions of recombination suppression may be associated with the restriction enzymes used, which may favor the finding of these markers in centromeric regions, for example (Troggio et al. 2007), as they may require methylation to maintain their specialized functions. Here, we used the combinations *Pst*I with *Mse*I and *Eco*RI with *Mse*I, as suggested by Young et al. (1999). These authors proposed that *Pst*I, which is blocked by methylation would be more efficient than *Eco*RI in producing AFLP markers placed at random on linkage maps. In fact, out of 51 *Pst*I/*Mse*I-derived markers, only five were found completely linked, two being located in the cluster of LG 4 and three in the cluster of LG 8.

Mapping markers with putative known function

Several EST-SSR showing similarities with known and unknown proteins were mapped in several linkage groups. These include markers with highly significant e-values ($<e^{-30}$) such as PvM61 (LG 9) from a sequence similar to members of the stress-related NAC transcription factor family (Fang et al. 2008); PvM18 (LG 5) from a sequence similar to the leucine-rich repeat (LRR) domain of plant disease resistance genes (Ryan et al. 2007); and PvM87 (LG 3) from an EST similar to subtilisin-like proteases, a class of enzymes involved in recognition of pathogens and activation of defense responses (van der Hoorn and Jones 2004). A complete list of the putative function of ESTs from which SSR markers were developed in this work is presented in Table 5.

Mapping of RGA markers

About 32 RGA loci generated with the NBS-profiling method using four degenerated primers that target the NBS domain were mapped at 26 positions on 10 linkage groups (Fig. 3). The remaining six mapped at exactly the same loci (RKF275 and RNF230 on LG 1; RNF90, RNF115 and RNF180 on LG 2; RKF500 and RKF510 on LG 7; RKF318 and RKF320 on LG 8; and RNF330 and RNF475 on LG 11). This was expected, as many disease resistance genes occur in clusters as complex loci in many plant species, including common bean. The anthracnose resistance locus Co-4 is such an example as it contains five copies of the *COK-4* gene (Melotto et al. 2004). Vallejos et al. (2006) showed that multiple copies of a gene member of the TIR–NBS–LRR family were present within the *I* locus, which confers resistance to *Bean common mosaic virus*.

At least five RGA markers mapped to regions containing resistance genes for anthracnose and rust diseases. In LG 1 the marker RNF120 co-located with *Co-1*, *Co-x*, *Co-w* and *Ur-9* genes; in LG 7 the marker RKR385 was mapped near to *Co-6* gene; and in LG 11 three markers (RNF330, RRF410 and RNF475) were positioned in the region containing the *Co-2* gene against anthracnose and *Ur-3*, *Ur-11* and *Ur-Dorado* genes against rust (Miklas et al. 2006a). The RGA markers were also positioned in the vicinity of QTLs located on the core map (Miklas et al. 2006a). For instance, markers RKF275 and RNF230 (LG 1) were mapped near to QTLs for resistance to common bacterial blight and white mold. In LG 2, the marker RRF230 was positioned in a region containing QTLs for resistance to common bacterial blight and anthracnose as well as RNF115, RNF180 and RNF90 co-located with a QTL for resistance to white mold. The RGA RNF240 mapped to a region that a QTL for resistance to *Fusarium* root rot was located in LG 3. The marker RKR230 (LG 5) was mapped together a QTL for resistance to white mold, and markers RKF500 and RKF510 (LG 7) co-positioned with a QTL conditioning common bacterial blight. The marker RRF550 (LG 10) was mapped near a QTL for resistance to angular leaf spot, and the markers RNF330, RRF410 and RNF475 (LG 11) were mapped near a QTL region for resistance to anthracnose (Miklas et al. 2006a).

About 16 RGA fragments were sequenced, and five sequences showed high similarity with plant resistance proteins (Table 5). The BLASTx analyses showed that RNF356 and RRF380 sequences are similar to resistance proteins from *Glycine max*. Similarly, sequences of RNF475 and RRF410 were highly similar to resistance proteins from *P. vulgaris* as well as the RNF330 sequence has similarity with a resistance protein from *Medicago truncatula*. Several

Table 5 EST-SSR and RGA clones with similarity (e-value < e^{-5}) to protein sequences deposited in GenBank

Marker code (Sequence name)	Linkage group	GenBank access number	Homology	E-value	Organism matched
EST-SSR					
PvM001 (TC34)	8	P25699	Ferritin	4e-67	*Phaseolus vulgaris*
PvM002 (TC116)	10	ABE77731	Conserved hypothetical protein	4e-16	*Medicago truncatula*
PvM007 (TC127)	5	ABA40448	Fructokinase 2-like protein	5e-71	*Solanum tuberosum*
PvM010 (PVEPSE3030I07)	1	NP_194345	Cytokinin-responsive GATA factor 1	1e-9	*Arabidopsis thaliana*
PvM012 (PVEPSE3030L20)	4	ABE81465	C2 domain-containing protein	5e-34	*Medicago truncatula*
PvM013 (PVEPSE3030M09)	10	NP_565320	Proteína ribosomal 40S S17 (RPS17B)	3e-46	*Arabidopsis thaliana*
PvM017 (PVEPSE2030E02)	8	CAA42617	Ribulose bisphosphate carboxylase	8e-41	*Phaseolus vulgaris*
PvM018 (PVEPSE3003E05)	5	NP_188718	Leucine-rich repeat family protein	2e-29	*Arabidopsis thaliana*
PvM022 (PVEPSE2004H10)	9	BAG09558	Chloroplast RNA binding protein	9e-28	*Mesembryanthemum crystallinum*
PvM034 (PVEPSE3027C10)	9	BAA19769	SRC2 cold induced protein	1e-37	*Glycine max*
PvM036 (PVEPSE3011F10)	7	NP_194937	Galactosyltransferase	8e-17	*Arabidopsis thaliana*
PvM046 (PVEPSE2024B07)	2	Q94A43	BES1/BZR1 homolog protein 2	4e-21	*Arabidopsis thaliana*
PvM052 (PVEPSE2018H03)	5	NP_196885.1	Glutaredoxin family protein	7e-05	*Arabidopsis thaliana*
PvM059 (PVEPSE2031C12)	8	CAN61408	Hypothetical protein	1e-44	*Vitis vinifera*
PvM061 (PVEPSE2033A05)	9	ACD39379	NAC domain protein	1e-50	*Glycine max*
PvM066 (PVEPSE3001H04)	6	NP_001077728	Dormancy/auxin associated family protein	3e-12	*Arabidopsis thaliana*
PvM073 (TC154)	9	AAB00554	Dehydrin	3e-21	*Phaseolus vulgaris*
PvM075 (PVEPLE1001E04)	9	CAN73178	Hypothetical protein	7e-25	*Vitis vinifera*
PvM078 (PVEPSE2003D01)	3	CAO64383	Unnamed protein product	2e-28	*Vitis vinifera*
PvM087 (PVEPSE3021G12)	3	AAY54007.1	Subtilisin-like protease	3e-76	*Arachis hypogaea*
PvM093 (PVEPSE3029J06)	2	Q40287	Anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase 5	9e-18	*Manihot esculenta*
PvM095 (TC17)	3	P49357	Serine hydroxymethyltransferase 1	2e-66	*Flaveria pringlei*
PvM097 (TC19)	1	AAO91809	Drought induced protein	1e-38	*G. latifolia*
PvM098 (TC70)	11	NP_200264	Hypothetical protein	5e-35	*A. thaliana*
PvM103 (TC168)	8	AAN03469	Ubiquitin-conjugation enzyme	6e-71	*G. max*
PvM118 (PVEPSE2006F05)	8	ABF70090.1	Putative protein kinase	3e-60	*Musa balbisiana*
PvM120 (PVEPSE2009C06)	1	ABO78563	Glycine cleavage system P-protein	7e-06	*M. truncatula*
PvM124 (PVEPSE2013E06)	3	AAM63014.1	Unknown	5e-27	*A. thaliana*
PvM127 (PVEPSE2015H07)	10	CAN64365	Hypothetical protein	2e-07	*V. vinifera*
PvM148 (PVEPSE2023B04)	3	AAW28572.1	Putative oxygen evolving enhancer protein 3, identical	1e-38	*Solanum demissum*

Table 5 continued

Marker code (Sequence name)	Linkage group	GenBank access number	Homology	E-value	Organism matched
PvM150 (PVEPSE2030D10)	11	NP_191557.1	tRNA-binding region domain-containing protein	3e-47	*A. thaliana*
PvM153 (PVEPSE3002B08)	2	AAL50980	Bax inhibitor-like protein	5e-13	*Brassica oleracea*
RGA					
RNF330 (RNBSaF330)	11	ABE86051.1	Disease resistance protein	9e-25	*Medicago truncatula*
RNF356 (RNBSaF356)	10	AAC49509	Disease resistance protein homolog	2e-16	*Glycine max*
RNF475 (RNBSaF475)	11	AAC33296.1	NBS type putative resistance protein	3e-74	*Phaseolus vulgaris*
RRF380 (RRGPF380)	10	AAF44094.1	Disease resistance-like protein	9e-45	*Glycine max*
RRF410 (RRGPF410)	11	ABN42886.1	Resistance protein	1e-42	*Phaseolus vulgaris*
RKF310 (RKDCF310)	4	ABD28710	Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold	2e-7	*Medicago truncatula*
RKR240 (RKDCR240)	8	AAR13317	gag-pol polyprotein	2e-7	*Phaseolus vulgaris*

tagging approaches in candidate genes have been used for analyzing resistance genes in crop species, including common bean (López et al. 2003; Miklas et al. 2006b; Rivkin et al. 1999). Here we demonstrate the feasibility of NBS-profiling methodology for generating RGA loci as well as a complementary tool for tagging RGA that were not yet mapped in the common bean genome.

Acknowledgments Authors are in debt with the Brazilian institutions Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: grants 2004/13547-9 and 2008/54732-4 and scholarships 2004/07614-5 and 2008/52269-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

Adam-Blondon AF, Sevignac M, Bannerot H, Dron M (1994) SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. Theor Appl Genet 88:865–870

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410

Benchimol LL, de Campos T, Carbonell SAM, Colombo CA, Chioratto AF, Formighieri EF, Gouvea LRL, de Souza AP (2007) Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. Genet Resour Crop Evol 54:1747–1762

Blair MW, Pedraza F, Buendia HF, Gaitan-Solis E, Beebe SE, Gepts P, Tohme J (2003) Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 107:1362–1374

Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. Plant Soil 252:55–128

Brugmans B, Wouters D, van Os H, Hutten R, van der Linden G, Visser R, van Eck H, van der Vossen E (2008) Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. Theor Appl Genet 117:1379–1388

Buso GSC, Amaral ZPS, Brondani RPV, Ferreira ME (2006) Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. Mol Ecol Notes 6:252–254

Caixeta ET, Borém A, Kelly JD (2005) Development of microsatellite markers based on BAC common bean clones. Crop Breed Appl Biotechnol 5:125–133

Campos T, Benchimol LL, Carbonell SAM, Chioratto AF, Formighieri EF, de Souza AP (2007) Microsatellites for genetic studies and breeding programs in common bean. Pesqui Agropecu Bras 42:589–592

Cardoso JMK, Oblessuc PR, de Campos T, Sforça DA, Carbonell SAM, Chioratto AF, Formighieri EF, de Souza AP, Benchimol LL (2008) New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library. Pesqui Agropecu Bras 43:929–936

Creste S, Tulmann-Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Report 19:1–8

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure to small amounts of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11–15

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. Mol Genet Genomics 280:547–563

Ferrier-Cana E, Geffroy V, Macadre C, Creusot F, Imbert-Bollore P, Sevignac M, Langin T (2003) Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. Theor Appl Genet 106:251–261

Flandez-Galvez H, Ades PK, Ford R, Pang ECK, Taylor PWJ (2003) QTL analysis for ascochyta blight resistance in an intraspecific population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theor Appl Genet 107:1257–1265

Freyre R, Skroch PW, Geffroy V et al (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP. Theor Appl Genet 97:847–856

Gaitán-Solís E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002) Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Sci 42:2128–2136

Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. Hortscience 33:1124–1130

Grisi MCM, Blair MW, Gepts P, Brondani C, Pereira PAA, Brondani RPV (2007) Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 × Jalo EEP558. Genet Mol Res 6:691–706

Guerra-Sanz JM (2004) New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. Plant Breed 123:87–89

Han OK, Kaga A, Isemura T, Wang XW, Tomooka N, Vaughan DA (2005) A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. Theor Appl Genet 111:1278–1287

Hanai LR, Campos T, Camargo LEA, Benchimol LL, de Souza AP, Melotto M, Carbonell SAM, Chioratto AF, Consoli L, Formighieri EF, Siqueira M, Tsai SM, Vieira MLC (2007) Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. Genome 50:266–277

Jarne P, Lagoda PJL (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol 11:424–429

Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad Sci USA 93:11746–11750

Koinange EMK, Singh SP, Gepts P (1996) Genetic control of the domestication syndrome in common bean. Crop Sci 36:1037–1045

Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. Annu Eugenetics 12:172–175

Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genet 121:185–199

Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlon A, Daley M, Lincoln S, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174–181

Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. Mol Biol Evol 21:991–1007

Lopes R, Lopes MTG, Carneiro MS, Pina Matta F, Camargo LEA, Vieira MLC (2006) Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. passiflorae in yellow passion fruit. Genome 49:17–29

López CE, Acosta IF, Jara C, Pedraza F, Gaitan-Solis E, Gallego G, Beebe S, Tohme J (2003) Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. Phytopathology 93:88–95

Melotto M, Coelho M, Pedrosa-Harand A, Kelly J, Camargo LEA (2004) The anthracnose resistance locus Co-4 of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. Theor Appl Genet 109:690–699

Métais I, Hamon B, Jalouzot R, Peltier D (2002) Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. Theor Appl Genet 104:1346–1352

Miklas PN, Coyne DP, Grafton KF, Mutlu N, Reiser J, Lindgren DT, Singh SP (2003) A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. Euphytica 131:137–146

Miklas PN, Kelly J, Beebe S, Blair M (2006a) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. Euphytica 147:105–131

Miklas PN, Hu JG, Grunwald NJ, Larsen KM (2006b) Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. Crop Sci 46:910–916

Moyle LC, Graham EB (2006) Genome-wide associations between hybrid sterility QTL and marker transmission ratio distortion. Mol Biol Evol 23:973–980

Murray J, Larsen J, Michaels TE, Schaafsma A, Vallejos CE, Pauls KP (2002) Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. Genome 45:1013–1024

Mutlu N, Miklas PN, Coyne DP (2006) Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. Mol Breed 17:127–135

Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P (1993a) Towards an integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. Theor Appl Genet 85:513–520

Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RL, Gepts P (1993b) Towards an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. Genetics 134:341–350

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genet Mol Biol 29:294–307

Pedrosa-Harand A, Porch T, Gepts P (2008) Standard nomenclature for common bean chromosomes and linkage groups. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 51:106-107. http://www.css.msu.edu/bic/PDF/Standardized Genetic & Physical Bean Map 2008.pdf

Rivkin MI, Vallejos CE, McClean PE (1999) Disease-resistance related sequences in common bean. Genome 42:41–47

Rodrigues TB, dos Santos JB (2006) Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. Genet Mol Biol 29:345–352

Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y (2007) New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. Cell Microbiol 9:1902–1908

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463–5467

Timmerman-Vaughan GM, Frew TJ, Russell AC, Khan T, Butler R, Gilpin M, Murray S, Falloon K (2002) QTL mapping of partial resistance to field epidemics of ascochyta blight of pea. Crop Sci 42:2100–2111

Troggio M, Malacarne G, Coppola G, Segala C, Cartwright DA, Pindo M, Stefanini M, Mank R, Moroldo M, Morgante M, Grando MS, Velasco R (2007) A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring pinot noir bacterial artificial chromosome contigs. Genetics 176:2637–2650

Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus-vulgaris* L. Genetics 131:733–740

Vallejos CE, Astua-Monge G, Jones V, Plyler TR, Sakiyama NS, Mackenzie SA (2006) Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. Genetics 172:1229–1242

van der Hoorn RAL, Jones JD (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defense. Curr Opin Plant Biol 7:400–407

van der Linden CG, Wouters DCAE, Mihalka V, Kochieva EZ, Smulders MJM, Vosman B (2004) Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. Theor Appl Genet 109:384–393

Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J. Heredity 93:77–78

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP—a new technique for DNA-fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407–4414

Yaish MWF, Pérez de la Vega M (2003) Isolation of (GA)n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Genet Mol Biol 26:337–342

Young WP, Schupp JM, Keim P (1999) DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. Theor Appl Genet 99:785–792

Yu ZH, Stall RE, Vallejos CE (1998) Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. Crop Sci 38:1290–1296

Yu K, Park SJ, Poysa V (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). Genome 42:27–34

Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Heredity 91:429–434