



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



MARCIENE AMORIM RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE MARCADORES
ASSOCIADOS A LOCOS DE RESISTÊNCIA A VIROSE
DO MOSAICO DOURADO EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna
unguiculata* (L.) Walp.).**

Feira de Santana, BA
2011

MARCIENE AMORIM RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE MARCADORES
ASSOCIADOS A LOCOS DE RESISTÊNCIA A VIROSE
DO MOSAICO DOURADO EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna
unguiculata* (L.) Walp.).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Ranieri Ferreira Santana

Co-orientador: Dr. Carlos Antonio Fernandes Santos

Feira de Santana, BA
2011

BANCA EXAMINADORA

Dr. Leonardo Silva Boiteux
(Embrapa Hortaliças)

Dr. Edson Perito Amorim
(Embrapa Mandioca e Fruticultura)

Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana, BA
2011

*Dedico aos meus queridos pais
e irmãos.*

AGRADECIMENTOS

Bom é render graças ao Senhor, e cantar louvores ao teu nome, ó Altíssimo, anunciar de manhã a tua benignidade, e à noite a tua fidelidade. Salmo 92:1-2.

A Deus, pelo cuidado sempre constante, pelo dom da vida e por tudo o que aprendi nessa etapa de minha vida;

Aos meus pais, Valdemar e Eulália e irmãos, Marcelo, Márcio, Marcy e Vânia, vocês são um presente precioso em minha vida e sou grata a Deus por todos os momentos que passamos juntos;

Ao meu co-orientador, Carlos Antonio Fernandes Santos, pela orientação e apoio em todas as etapas do trabalho;

Ao meu orientador, José Raniere Ferreira Santana, por sua amizade e confiança;

Ao professor Albérico Lima, por sua simpatia e pelo treinamento que tive em seu laboratório;

A todos do laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Semiárido, onde tive a oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela amizade, alegria e colaboração, muito obrigada às queridas: Ierla, Renata, Soniane e Weslany e aos queridos, Hugo Leonardo e Laerte;

A Luiz Cláudio (Claudinho), meu amigo de todas as horas, pelo incentivo e preciosa ajuda;

À Kátheen Politowski, pela ajuda na elaboração dos abstracts;

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pelo apoio institucional e **à Fapesb** pela concessão da bolsa de estudos;

À EMBRAPA Semiárido, por ter disponibilizado toda a infra-estrutura necessária na realização do trabalho;

Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi a identificação de marcadores associados aos genes de resistência ao vírus do mosaico dourado do feijão caupi (CGMV) por meio do mapeamento de marcadores AFLP e o desenvolvimento e validação de marcadores SCAR ligados aos genes de resistência. Para o estudo, foi utilizada a população de 286 indivíduos F_2 resultante do cruzamento entre IT97K-499-35, genitor resistente, e Canapu T16, suscetível. Foram utilizadas as metodologias de 'Bulked segregant analysis' e AFLP para identificar marcadores ligados ao gene de resistência. O programa JoinMap versão 2.0 foi usado para construção do mapa, adotando-se LOD mínimo de 3,0, frequência máxima de recombinação de 0,45, e função de mapeamento Kosambi. Dentre as 196 combinações de primers AFLP testadas, foram identificados três marcadores ligados ao gene de resistência ao CGMV. Os marcadores apresentaram distâncias de 4,3 cM (E.AAC/M.CCC₅₁₅), 14,2 cM (E.AGG/M.CTT₂₈₀) e 16,8 cM (E.AAA/M.CAG₃₅₂) do gene de resistência ao mosaico dourado, com os dois primeiros flanqueando-o. Os LODs foram 50,4, 24,4 e 28,7, respectivamente. Foram desenvolvidos oito marcadores SCARs a partir das marcas AFLP E.AAC/M.CCC₅₁₅ e E.AAA/M.CAG₃₅₂. Nas oito combinações de primers SCARs testados entre indivíduos resistentes e suscetíveis da população F_2 , não foi possível obter a mesma segregação observada na análise AFLP. Esforços para desenvolver marcadores SCARs eficientes em detectar o gene de resistência a partir das marcas AFLP obtidas no mapeamento do gene que confere resistência ao CGMV continuam sendo realizados.

Palavras-chave: Mapeamento genético. Marcadores moleculares. *Cowpea golden mosaic virus*. *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

The objective of this work was the identification of markers linked to resistant genes to the cowpea golden mosaic virus (CGMV) through AFLP markers and the development and validation of SCAR markers linked to the resistance genes. For the study, the F₂ population (286 individuals) resulting from the cross between IT97K-499-35, resistant genitor, and Canapu T16, susceptible, was used. The methodologies of Bulk Segregant Analysis and AFLP were used to identify markers linked to the resistance gene. The program JoinMap version 2.0 was used for construction of the map, adopting a minimum LOD of 3.0, a maximum recombination frequency of 0.45, and the Kosambi mapping function. Among the 196 combinations of AFLP primers tested, three markers linked to the resistance gene to CGMV were identified. The markers presented distances of 4.3 cM (E.AAC/M.CCC₅₁₅), 14.2 cM (E.AGG/M.CTT₂₈₀), and 16.8 cM (E.AAA/M.CAG₃₅₂) of the resistance gene to golden mosaic, with the first two flanking it. The LOD scores were 50.4, 24.4, and 28.7, respectively. Eight SCAR markers were developed from the AFLP markers E.AAC/M.CCC₅₁₅ and E.AAA/M.CAG₃₅₂. In the eight combinations of SCAR primers tested among resistant and susceptible individuals of the F₂ population, it was not possible to obtain the same segregation observed in the AFLP analysis. Efforts to develop SCAR markers efficient in detecting the resistance gene from AFLP markers obtained in the mapping of the gene that confers resistance to CGMV continue being done.

Keywords: Genetic mapping. Molecular markers. *Cowpea golden mosaic virus*. *Vigna unguiculata*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
A cultura do FEIJÃO CAUPI – <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	1
Melhoramento da cultura	2
Cowpea golden mosaic virus(CGMV)	3
Marcadores moleculares de DNA	5
Mapeamento genético	7
Mapeamento genético e <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	9
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO I - MAPEAMENTO DE LOCOS AFLP LIGADOS A TOLERÂNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DO FEIJÃO CAUPI.	18
RESUMO	19
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO II- DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR DE LOCOS AFLP LIGADOS AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO	36
RESUMO	37
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
CONCLUSÕES GERAIS	51
ANEXOS	52

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do FEIJÃO CAUPI – *Vigna unguiculata* (L.)Walp

O feijão caupi é uma Dicotiledônia, pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, secção *catianga*, e espécie *Vigna unguiculata* (L.)Walp. (PADULOSI e NG, 1997; FREIRE FILHO et al., 2005).

O feijão caupi é uma das mais antigas culturas conhecidas pelo homem e é também amplamente adaptada e cultivada em todo o mundo (AGBICODO, 2009). Ao contrário do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e outras leguminosas, pode ser cultivado no Brasil, tanto no clima seco do Nordeste, como no clima úmido do Norte, mostrando-se amplamente adaptada ao clima tropical (ARAÚJO et al., 1984).

De acordo com Freire Filho (1988) e Brito (2008), a região de origem mais provável situa-se na parte Oeste e Central da África. Há evidências de que essa leguminosa tenha sido introduzida por colonizadores portugueses e espanhóis e pelos escravos africanos no Brasil por meio da Bahia, no século XVI, espalhando-se pela Região Nordeste, sobretudo no Semiárido.

Mundialmente, destaca-se como um importante alimento, sendo componente essencial dos sistemas de produção nas regiões secas dos trópicos, cobrindo parte da Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio e América Central e do Sul (SINGH et al., 2002). Além disso, proporciona mais da metade da proteína vegetal da dieta humana na maioria das regiões tropicais semiúmidas (BRITO, 2008). A produção mundial de feijão caupi em 2007 atingiu cerca de 3,6 milhões de toneladas em 12,5 milhões de hectares, estando o Brasil entre os três maiores produtores mundiais, ao lado de dois países africanos (Nigéria e Níger). Os três países juntos representam 84,1% de área e 70,9% da produção mundial (FAO, 2010; SILVA-DAMACENO, 2010). A grande área de produção de feijão caupi no Brasil encontra-se na região Norte e Nordeste, gerando cerca de 1,4 milhão de empregos por ano, com produção estimada em R\$ 448 milhões (CECCON, 2010).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), os estados da Bahia, Piauí e Maranhão produziram, na safra de 2009, 387 mil toneladas, 35,4 mil toneladas e 31 mil toneladas, respectivamente. A cultura está conquistando espaço na

região Centro-Oeste, sobretudo, no estado do Mato Grosso, onde a produtividade pode ultrapassar 1000 kg por hectare (CECCON, 2010).

A cultura, explorada tradicionalmente por pequenos produtores em cultivo de sequeiro e com baixo nível tecnológico, antes vista apenas como cultura de subsistência, vem ocupando um novo espaço no setor de agronegócios nas últimas décadas, com o aumento progressivo da participação de empresários de médio e grande porte na comercialização de feijão caupi. Esta nova realidade tem gerado uma demanda por cultivares com características que atendam às necessidades dos sistemas de produção tecnificados, dentre as quais, o alto potencial de rendimento, resistência a pragas e doenças e qualidade de grãos, além de características de porte e arquitetura adequadas ao maior adensamento e à mecanização da cultura, inclusive da colheita (BEZERRA et al., 2008).

Melhoramento genético da cultura

O feijão caupi, quando comparado a outras culturas, é considerado pouco melhorado, apesar de possuir uma ampla variabilidade genética para praticamente todos os caracteres de interesse agrônômico (Freire-Filho et al., 2005).

Os principais objetivos do melhoramento de feijão caupi no mundo são fundamentalmente: **i)** resistência a doenças, pragas e ervas daninhas parasitas; **ii)** tolerância a seca e resistência a altas temperaturas; **iii)** adaptação a solos arenosos e a solos com baixa fertilidade; **iv)** melhoria das características do grão, porte, aumento da quantidade de proteínas e diminuição do tempo de cozimento (SINGH et al., 1997; EHLERS e HALL, 1997).

No Brasil, os objetivos específicos dos programas de melhoramento da cultura são aumentar a produtividade, melhorar a qualidade visual, culinária e nutricional dos grãos, aumentar a adaptabilidade, a estabilidade e a tolerância a estresses hídricos, desenvolver cultivares com arquitetura adequada para cultivo mecanizado e incorporar resistência a pragas e doenças (FREIRE FILHO, et al., 2005).

As fontes de germoplasma disponíveis para o melhoramento da cultura podem ser obtidas no International Institute of Tropical Agriculture (IITA), principal centro de pesquisas em feijão caupi, localizado na Nigéria. No Brasil, o Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (CPAMN, Teresina, PI) é responsável pela coleção ativa do feijão caupi. Cultivares melhoradas e linhagens em avaliação são encontrados no

banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (FREIRE FILHO, et al., 2005; WETZEL e FAIAD, 2001). Além dessas, existem instituições estaduais que visam ao melhoramento do feijão caupi, como a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), dentre outras.

Os primeiros trabalhos de melhoramento dessa cultura objetivaram a obtenção de cultivares mais produtivas (BARRETO et al., 1996). No entanto, a tendência do melhoramento genético moderno, por demanda dos consumidores, é desenvolver cultivares que associem produtividade com parâmetros de qualidade. Dentre outras melhorias, as novas cultivares devem incorporar, cada vez mais, tolerância às diversas pragas e doenças, reduzindo drasticamente ou eliminando o uso de agrotóxicos no cultivo (SANTOS et al., 2007).

Cowpea golden mosaic virus (CGMV)

Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão caupi no Brasil, encontram-se as doenças, particularmente as viroses, pois os vírus agrupam o maior número de espécies nocivas a cultura e provocam perdas tanto no volume de produção quanto na qualidade do produto. (ARAÚJO et al., 1984; SOBRINHO et al., 2000).

O mosaico dourado do feijão caupi é causado pelo vírus *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV), classificado no gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae* (HAMPTON et al., 1997). A família *Geminiviridae* constitui uma das mais importantes economicamente, englobando vírus cujo genoma é composto por uma fita simples de DNA circular, encapsidado em partículas icosaédricas geminadas, que se replicam no núcleo das células infestadas. As espécies virais que compõem a família *Geminiviridae* são divididas em quatro gêneros (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus*). Os principais geminivírus que infectam as leguminosas, inclusive o feijão caupi, pertencem ao gênero *Begomovirus*- os quais possuem genoma composto por um ou dois segmentos de DNA (VAN REGENMORTEL et al., 2000; FREIRE FILHO et al., 2005).

O CGMV foi relatado pela primeira vez em *V. unguiculata* na Nigéria por Rossel (1977), sendo referido no Brasil pela primeira vez por Santos et al., (1980). De acordo com Rios (1990) e Sobrinho (2000), o vírus se encontra amplamente

disseminado nas regiões produtoras de feijão caupi, sendo encontrado nos estados do Piauí, Goiás, Rio Grande do Norte, Bahia, Pernambuco e Ceará.

A mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn, 1889, responsável pela transmissão do vírus do mosaico dourado do feijão caupi, é considerada um dos importantes vetores de vírus que infectam a cultura. O vírus pode sobreviver em diversas leguminosas, solanáceas e malváceas e em plantações mais velhas de feijão (LIMA et al., 1983), facilitando a infestação de novas plantações de feijão caupi.

Os sintomas causados pela doença, inicialmente se expressam na forma de pequenas pontuações verde-amareladas. Proporcionalmente à sua evolução, tais pontuações crescem em formato e extensão, cobrindo toda a superfície do limbo foliar, finalizando por deixar os folíolos com coloração amarelo-dourado. Às vezes tem-se observado redução no porte das plantas, sem, contudo, apresentar distorção nem deformação foliar (SOBRINHO et al., 2000). O vírus pode provocar perdas expressivas na produção (40% a 78%) (Santos & Freire Filho, 1984). Em uma avaliação feita por Barreto et al. (2001) quanto ao impacto do CGMV, foi verificado que o nível de severidade de sintomas provocados pelo vírus nas plantas tem efeito significativo sobre o desempenho da cultura, retardando o ciclo e reduzindo a produção de grãos.

A presença do begomovírus pode ser verificada por técnica molecular via PCR, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1c496 desenvolvidos por Rojas et al. (1993). Essa ferramenta facilita a identificação do vírus, uma vez que segmentos do seu genoma são ampliados, aumentando a sensibilidade da detecção do patógeno.

Quanto a fontes de resistência ao CGMV, Santos e Freire Filho (1986) estudaram 450 genótipos; desses, 57 foram classificados como altamente resistentes, entre os quais os genótipos CNC 0434, Tvu 612, CE-315 (Tvu 2331) e BR 1-Poty. A resistência ao CGMV já está incorporada em uma boa parte das cultivares lançadas, como BR 10-Piauí (SANTOS et al., 1987), BR 14-Mulato (CARDOSO et al., 1990), BR 17-Gurguéia (FREIRE FILHO et al. 1994), EPACE 10 (BARRETO et al., 1988), BRS Paraguaçu (ALCÂNTARA et al., 2002). A resistência ao CGMV foi atribuída a dois genes dominantes e independentes em estudo realizado na Índia por Sangwan e Rishi (2004). No entanto, outro estudo realizado no mesmo país indicou que a resistência ao mosaico dourado é controlada por um gene dominante (KUMAR et al., 1994).

Segundo Silva (2008), o entendimento da herança genética de resistência aos vírus é de extrema importância para o planejamento de um programa de melhoramento cuja estratégia é incorporar genes para a resistência em cultivares com características agronômicas desejáveis.

Vale ressaltar que no processo de transferência de alelos de resistência, os marcadores moleculares do DNA podem ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se estreitamente ligados aos alelos de resistência, podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores (S.A.M.), principalmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento (ALZATE-MARIN et al., 2005)

Marcadores moleculares do DNA

Entende-se por marcadores moleculares genéticos as características de DNA que diferem dois ou mais indivíduos e que são herdadas de acordo com as leis de herança mendeliana. Marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise das plantas.

A utilidade de técnicas moleculares de análise genômica pode ser sintetizada em dois pontos principais: **i)** Permite identificar variabilidade nas sequências de DNA a um nível de resolução superior ao observado no âmbito morfológico e **ii)** Reduzem a enorme complexidade do genoma estudado à análise mendeliana. Assim, os dados moleculares obtidos permitem estimar parâmetros genéticos úteis para um amplo espectro de estudos, como diversidade intra e inter-específica, mapeamento genético, DNA *fingerprint*, entre outros (FERREIRA et al., 2007).

A detecção de polimorfismos de DNA pode ser feita de diferentes formas. Os principais tipos de marcadores são baseados na hibridização de moléculas de DNA com sondas e na amplificação de sequências de DNA via PCR. Os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorfism*) e minissatélites estão entre os que são baseados na hibridização de fragmentos de DNA, no entanto, entre aqueles cujo polimorfismo é revelado com base na amplificação de sítios de DNA destacam-se RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfhosm*), microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), ISSR (*Inter sequence simple repeat*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorfism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), dentre outros (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Dentre os marcadores moleculares, o AFLP destaca-se por sua alta reprodutibilidade e sua capacidade multiplex, sendo largamente aplicado em estudos de diferentes áreas da genética, como no melhoramento de plantas (BORÉM e CAIXETA, 2009). A técnica, desenvolvida por Zabeau e Vos (1993), foi descrita por Vos et al. 1995. Esses marcadores não requerem conhecimentos prévios de sequência e permitem a identificação simultânea de um grande número de produtos de amplificação.

A metodologia dos marcadores AFLP consiste em quatro etapas: Inicialmente, o DNA total da planta é clivado por duas enzimas de restrição que possuem sítios de restrição distintos, uma enzima de corte raro (sítio de restrição de 6 a 8 pb) e outra de corte frequente (sítio de restrição de 4pb), originando três tipos de fragmentos: **i)** com ambas as extremidades digeridas pela enzima de corte raro; **ii)** com ambas extremidades digeridas pela enzima de corte frequente e **iii)** com cada extremidade digerida com uma das duas enzimas.

A segunda etapa consiste na ligação de pequenas seqüências de DNA (adaptadores) que são ligados às extremidades dos fragmentos digeridos e servem de sítios de anelamento para os *primers* da subsequente amplificação via PCR. A terceira, denominada pré-amplificação, utiliza *primers* complementares aos adaptadores com um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3' terminal. Esta primeira etapa de PCR determina que só os fragmentos que contêm os nucleotídeos seletivos flanqueando o sítio de restrição serão amplificados. O próximo passo (quarta etapa) é o da amplificação seletiva. Nessa reação, utilizam-se *primers* com as seqüências dos adaptadores e com três nucleotídeos seletivos adicionais nos terminais 3'.

Os produtos da amplificação são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona um alto nível de resolução. O número de fragmentos visualizados neste gel pode variar de algumas dezenas até mais de uma centena. A quantidade de bandas pode ser obtida variando-se as enzimas de restrição e a combinação de *primers* de natureza diversa e com número diferente de nucleotídeos seletivos. Os polimorfismos genéticos gerados por marcadores AFLP são identificados pela presença ou ausência de fragmentos amplificados, conferindo a estas marcas um caráter dominante (BLEARS et al.,1998; OLIVEIRA et al.; 2005; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Outra característica importante dessa técnica é que os marcadores AFLP possuem herança mendeliana, fazendo com que esta metodologia tenha grande potencial para assistir diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas. Uma das suas

principais aplicações reside na construção de mapas ligação e clonagem de genes de interesse. Devido ao ilimitado número de polimorfismo que podem ser analisados pela técnica de AFLP, é possível saturar regiões específicas do genoma, o que é pré-requisito para a clonagem baseada em mapa de gene - alvo. (ZABEAU, 1993; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Em feijão caupi, vários estudos foram realizados utilizando-se de marcadores AFLP na construção de mapas genéticos (BOUKAR et al., 2004; MENÉNDEZ et al., 1997; QUÉDRAOGO et al., 2001 e 2002), análise de diversidade genética (COULIBALY et al., 2002; FANG et al., 2007; GILLASPIE et al., 2005) e identificação de genes expressos por meio de cDNA-AFLP (SILVA et al., 2010), entre outros.

Os marcadores SCAR são desenvolvidos por conversão de determinado marcador em outro, ou seja, os marcadores SCAR são amplificados com *primers* específicos, desenvolvidos com base em sequências de marcadores já mapeados ou caracterizados (PARAN & MICHELMORE, 1993). O RAPD foi o primeiro marcador convertido em SCAR e estes estavam ligados a genes de resistência a doenças em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) (PARAN & MICHELMORE, 1993). Em *Vigna* spp, marcadores genéticos ligados a genes de resistência a doenças foram convertidos com sucesso em SCARs. Boukar et al. (2004) transformaram marcadores AFLP em marcadores co-dominantes SCARs denominados SEACTM-CAC83/85. Marcadores ISSR também foram convertidos com sucesso em marcadores SCAR em estudo realizado por Soufremanien & Golakrishna (2006). Os marcadores SCAR foram validados em diversos genótipos de *V. mungo*, mostrando-se eficientes na identificação de plantas susceptíveis e resistentes à virose causada por *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV).

O procedimento para desenvolver marcadores SCAR consiste no isolamento, na clonagem do fragmento de interesse em um vetor e no sequenciamento do fragmento isolado. Pares de *primers* específicos de 16 a 24 pares de nucleotídeos complementares às extremidades do fragmento sequenciado são desenhados. *Primers* mais longos, como estes, geralmente amplificam regiões de sequências únicas no genoma (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Mapeamento genético vegetal

A introdução de técnicas de genética molecular, no início da década de 80, permitiu que os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passassem a ser realizados com maior segurança, rapidez e eficiência (XAVIER et al., 2005). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998) o desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior importância da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies. Mapas genéticos possibilitam: **i)** a cobertura e análise completa de genomas; **ii)** A localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância; **iii)** a quantificação destas regiões na característica estudada; dentre outras.

A identificação de marcadores ligados a genes que controlam caracteres de importância agrônômica, como genes resistentes a viroses, podem ser de grande importância para o melhoramento genético de espécies vegetais. A grande disponibilidade de marcadores neutros, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para várias espécies de interesse agrônômico (CARNEIRO, 2002).

As etapas na identificação de marcadores ligados a genes de interesse agrônômico incluem: **i)** a escolha correta de linhagens progenitoras, que devem ser contrastantes para o caráter; **ii)** obtenção de uma população segregante (F_2 , F_3 , retrocruzamento) que permita calcular a frequência de recombinação entre os locos moleculares e o loco controlador do caráter; **iii)** detecção de polimorfismo dos indivíduos da população segregante; **iv)** análise fenotípica dos indivíduos da população segregante para o caráter; e por fim, **v)** estimativa da frequência de recombinação entre cada um dos locos marcadores moleculares e o loco de interesse (SERAFINI et al., 2001).

Pela técnica de análise de segregantes agrupados (BSA- *Bulk Segregant Analysis*), os métodos de análise em linhagens quase isogênicas (*NILs-Near Isogenic Lines*) e de análise de populações segregantes com fenótipos contrastantes podem ser usados para agilizar a identificação de marcadores ligados a um gene ou a uma região genômica (MICHELMORE et al., 2001) Análise de segregantes agrupados é um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou a uma região do genoma. O método envolve a comparação de dois *pools* de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada pool ou *bulk*, os indivíduos são identificados para características ou genes de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois *pools*

contrastantes para uma característica são analisados a fim de identificar marcadores que possam distingui-los. Marcadores que forem polimórficos entre os *pools* serão geneticamente ligados ao loco que determina a característica considerada para construir os *pools* (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), o BSA permite estimar o valor da frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter. Basicamente, esta técnica utiliza uma seleção genômica prévia com o intuito de reduzir drasticamente o esforço necessário para a identificação de ligação gênica, e focaliza a análise diretamente na região do genoma associada ao caráter de interesse.

Mapeamento genético e *Vigna unguiculata* (L.)Walp

Para *V. unguiculata*, o número diplóide estabelecido é $2n=22$ cromossomos (AGWARANZE, 1992). Seu genoma compreende cerca de 500 mega pares de bases (Mpb), possuindo um dos menores genomas entre as leguminosas, que por sua vez correspondem a apenas metade do tamanho do genoma da soja (*Glycine Max* Merr) e um sétimo do genoma da lentilha (*Lens culinaris* Moench) e da ervilha (*Pisum sativum* L.). O tamanho diminuto do seu genoma, ao lado do curto tempo de geração, torna essa espécie uma planta-modelo para estudos de mapeamento (BENKO-ISEPPON et al., 2001).

De acordo com Amorim (2009), os mapas genéticos desenvolvidos para o gênero *Vigna* classificam-se em dois grupos distintos: Mapas de referência, com o objetivo de servir de base para pesquisas futuras, e mapas específicos, que visam à localização de genes de interesse agrônômico como aqueles resistentes a doenças e pragas.

O trabalho de Kaga et al. (1996) está entre os primeiros estudos para o desenvolvimento de mapas de ligação para o gênero *Vigna*. Neste estudo, o mapa genético foi desenvolvido a partir de um cruzamento interespecífico (*V. angularis* e *V. nakashimae*), no qual um total de 132 marcadores foi mapeado, sendo 108 RAPD, 19 RFLP e cinco marcadores morfológicos, distribuídos em 14 grupos de ligação, cobrindo 1250 cM do genoma. Outros mapas foram desenvolvidos a partir de cruzamentos intra-específicos *V. umbellata* x *V. angularis* (KAGA et al., 2000), e no retrocruzamento entre (*V. nepalensis* x *V. angularis*) x *V. angularis* (HAN et al., 2005).

O primeiro mapa de ligação em cruzamento intra-específico com feijão-caupi (*V. unguiculata*) foi reportado por Menéndez et al. (1997). Neste mapa, foi utilizada uma população de mapeamento de 94 linhagens endogâmicas F8 entre duas linhagens melhoradas, 'IT84S-2049' e '524B'. Os autores utilizaram as metodologias RAPD, RFLP e AFLP para saturação do mapa. Foram obtidos 133 marcadores RAPD, 19 RFLPs, 25 AFLPs, três marcadores morfológicos e um enzimático, os quais formaram 12 grupos de ligação e cobriram uma região de 972 cM. Apesar dos resultados, esse trabalho obteve muitas marcas monomórficas.

Em seguida, Quédraogo et al. (2002), utilizando uma população de linhagens F9 obtida a partir da população F8 citada acima, publicaram um mapa de ligação em feijão caupi (*V. unguiculata*), que consiste em 11 grupos de ligação e cobre 2.670 cM do genoma, com uma distância média de 6,43cM entre marcadores.

Além do mapa em si, foram detectados marcadores associados a várias características de importância agrônômica, como resistência a duas raças de *Striga gesnerioides*, locos associados à resistência as viroses: *Cowpea mosaic virus* (CPMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV), *Southern bean mosaic virus* (SBMV), ao fungo fusário-selvagem (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphylum* (E.F Smith.) W.C. Snyd & H.N. Hansen) e ao nematoides das galhas (*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood).

No que concerne a estudos com mapeamento de genes que controlam características de resistência a doenças e pragas em feijão-caupi, Mayers et al. (1996) analisaram um cruzamento entre duas cultivares de *V. unguiculata* contrastantes para a característica de resistência ao pulgão (*Aphis craccivora* Koch), por meio da metodologia RFLP, encontrando um marcador fortemente ligado com o gene (*Rac1*) que confere resistência a este pulgão, assim como vários marcadores flanqueando esse gene de resistência.

Quédraogo et al. (2001) utilizaram as metodologias AFLP e Análise de segregantes agrupados (BSA) para identificar marcadores firmemente ligados aos genes *Rsg2-1* e *Rsg4-3*, que conferem resistência a duas raças de *S. gesnerioides*, em dois cruzamentos com parentais contrastantes para a característica estudada. As marcas resistentes às duas raças estão localizadas no grupo de ligação 1 do mapa genéticos de feijão caupi. Os autores concluíram que os marcadores AFLP firmemente ligados aos locos de resistência a *Striga* fornecem um grande avanço à seleção assistida por

marcadores e à eventual clonagem e caracterização do gene que confere resistência a *S. gesneriodes*.

Em relação ao mapeamento de caracteres de interesse agrônomico, estudos de QTL (*quantitative trait loci*) foram realizados por Muchero et al. (2010). Neste trabalho, foram mapeados três locos quantitativos, *Thr-1*, *Thr-2* e *Thr-3*, associados à resistência ao *Thrips tabaci* e *Frankliniella schultzei* usando linhas melhoradas recombinantes RILs em feijão caupi. Os QTLs foram identificados nos grupos de ligação 5 e 7, contabilizando entre 9,1 e 32,1% de variância fenotípica.

Em estudos visando à aplicação de marcadores moleculares na construção de mapas genéticos a partir de cruzamentos de linhagens adaptadas às condições do nordeste brasileiro, Amorim et al. (2009) mapearam genes de resistência ao CPSMV no grupo de ligação 1, entre dois marcadores SSR derivados de EST (*Expressed Sequence Tags*) do feijão caupi, a 6,1 cM do primeiro e a 24,1cM do segundo.

Considerando-se a importância dos programas de melhoramento genético de plantas para a melhoria da agricultura e o impacto que as ferramentas da biologia molecular estão proporcionando às diversas áreas de pesquisa, a proposta desse trabalho foi mapear genes de resistência a virose do mosaico dourado, um dos problemas que têm dificultado o avanço da produtividade do feijão caupi na região Nordeste, por meio de marcadores AFLP (capítulo 1) e o desenvolvimento e validação de marcadores SCAR ligados aos genes de resistência (capítulo 2).

REFERÊNCIAS

AGBICODO, M. E.; FATOKUN, A. C.; MURANAKA, S.; VISSER, F. G. R.; LINDER, G. C. van der. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, n. 3 p. 353-370, 2009.

AGWARANZE, N. F. **Morphological variability Inheritance of pubescence in *Vigna vexillata* (L) Rich and the Histology of hybrid between wild *Vigna* and cultivated Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp)**. 1992. PhD Thesis - University of Ibadan, Ibadan.

ALCÂNTARA, J. dos P.; MONTEIRO, I. D.; VASCONCELOS, O. L.; FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. BRS Paraguaçu, novo cultivar de caupi de porte enramador e tegumento branco para o estado da Bahia, **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 49, n. 286, p. 695-703, 2002.

ALZET-MARIN, L. A.; CERVIGNI, L. D. G.; MOREIRA, A. M.; BARROS, G. E. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

AMORIM, L. L. B. **Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR, DAF e CAPs**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARAÚJO, J. P. P. de. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp; descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1984. 82 p. (EMBRAPA-CNPAP. Circular Técnica, 18).

BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos.; QUINDERÉ, M. A. W.; VIDAL, J. C.; ARAÚJO, J. P. P.; WALT, E. E.; RIOS, G. P.; NEVES, B. P. **EPACE-10:nova cultivar para o Ceará**. Fortaleza: EPACE, 1988. 1 Folder.

BARRETO, P. D.; QUINDERÉ, M. A. W.; SÁ, M. F. P.; SANTOS, A. A. CNCx 698-128G-Linhagem de CAupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) com alto potencial de produção e adaptabilidade às diferentes condições de cultivo do Ceará. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 4., 1996, Teresina **Resumos...** Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996. p. 83-86. (EMBRAPA-CPAMN. Documentos, 18).

BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos.; QUINDERÉ, M. A. W. Genótipos de feijão-de-corda resistente ao mosaico dourado. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5, 2001, Teresina. **Avanços tecnológicos no feijão caupi**: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 58-62. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 56).

BEZERRA, C. A. A.; TÁVORA, F. A. J. F.; FREIRE-FILHO, R. F.; RIBEIRO, Q. R. Morfologia e produção de grãos em linhagens modernas de feijão-caupi em diferentes densidades populacionais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n.1, p. 85- 93, 2008.

BENKO-ISEPPON, A. M. Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5, 2001, Teresina. **Avanços tecnológicos no feijão caupi**: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 327-332.. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 56).

BLEARS, J. M.; GRANDIS, de A. S.; LEE, H.; TREVORS, T. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 21, n. 3 p. 99-114, 1998.

BRITO, E. S. de (Ed.). **Feijão caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 374 p.

BOUKAR, O.; KONG, L.; SINGH, B. B.; MURDOCK, L.; OHM, W. H. AFLP and AFLP-Derived SCAR Markers Associated with *Striga gesnerioides* Resistance in Cowpea, **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4 p. 1259-1264, 2004.

CARDOSO, M. J.; FREIRE FILHO, F. R.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **BR 14-Mulato**: nova cultivar de feijão massacar para o estado do Piauí. Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1990. 4 p. (EMBRAPA-UEPAE Teresina. Comunicado Técnico, 48).

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, 89-100, 2002.

CECCON, G.; MATOSO, O. A. **Feijão-caupi é pesquisado no Centro-Oeste**. Disponível em: <<http://www.portaldogronegocio.com.br/conteudo.php?id=41173>> Acesso em: 8 set. 2010.

CONAB. **4. Levantamento de grãos 2006/2007**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 1 jun. 2010.

COULIBALY, S.; PAQUET, R. S.; PAPA, P.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 2-3, p. 3358-366, 2002.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, n. 1-3, p. 187-204, 1997.

FANG, J.; CHAO, C. C. T.; ROBERTS, P. A.; EHLERS, J. D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.)Walp.]. In four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, New York, v. 54. p.1197-1209, 2007.

FAO. **Crops. cow peas, dry**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 4 out. 2010.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FERREIRA, M. E.; MOREZSOHN, M.C de.; BUSO, C. S. C. Fundamentos de Caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 387-389,

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: ARAÚJO, J. P. P. de, WATT, E. E. (Org.). **O feijão-caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1988. p. 25-46.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.

FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, A. A. dos.; ARAÚJO, A. G. de.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S. da.; RIBEIRO, V. Q. **BR 17-Gurguéia: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí**. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1994. 6 p. (EMBRAPA-CPAMN. Comunicado Técnico, 61).

GILLASPIE JÚNIOR, A. G.; HOPKINS, M. S.; DEAN, R. E. Determining genetic diversity between lines of *Vigna unguiculata* subspecies by AFLP and SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, New York, v. 52, n. 3, p. 245–247, 2005.

HAN, O. K.; KAGA, A.; ISEMURA, T.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D. A. A genetic linkage map for azuki bean (*Vigna angunlaris*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 111, n. 7, p. 1278-1287, 2005.

HAMPTON, R. O.; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Viral diseases of cowpea and their control by resistance-cofering genes. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Ed.). **Advances in cowpea research**, Ibanda: IITA, p. 66-72, 1997.

KAGA, A.; OHNISHI, M.; ISHII, T.; KAMIJIMA, O. A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angunlaris* x *Vigna nakashimae*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 5/6, p. 658-663, 1996.

KAGA, A.; ISHII, T.; TSUKIMOTO, K.; TOKORO, E.; KAMIJIMA, O. Comparative molecular mapping in Ceratotropis species using an interspecific cross between azuki bean (*Vigna angunlaris*) and rive bean (*Vigna umbelata*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, n. 56, p. 207-213, 2000.

KUMAR, K.; DAHIYA, S. B.; RISHI, N. Inheritance to cowpea yellow mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.). In: RISHI, N.; AHUJA, K. L.; SINGH, B. P. (Ed.). **Virology in the tropics**. New Delhi: Malhotra Publishing House, 1994.

MENÉNDEZ, M. C.; HALL, E. A.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 8, p. 1210-1217, 1997.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828–9832, 1991.

MUCHELO, W.; EHLERS, D. J.; ROBERTS, A. P. QTL analysis for resistance to foliar damage caused by *Thrips tabaci* and *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) feeding in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 47-48, 2010.

MYERS, G. O.; FATOKU, C. A.; YOUNG, N. D. RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.). **Eyphytica**, Wageningen, v. 91, n. 2, p. 182-187, 1996.

LIMA, J. A. A.; SILVEIRA, L. F. S.; SANTOS, M. L. B. Cultivares de feijão de corda com resistência de campo ao vírus do mosaico amarelo. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, DF, v. 8, n. 3, p. 614, 1983.

OLIVEIRA, P. R. D. de; SCOTTON, D. C.; NISHUMURA, D. S.; FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, 454-457, 2005.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N. (Ed.). **Advances in cowpea research**. Tsukuba: IITA, 1997. p.1-12.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

QUÉDRAOGO, T. J., MAHESHWARI, V., BERNER., K. D., St-PIERRE., A. C., BELZILE, F., TIMKO., P. M. Identification of AFLP markers linked to resistance os cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, n. 6-7, p. 1029-1036, 2001.

QUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; JEAN, M.; CLOSE, T. J.; EHLERS, J. D.; HALL, A. E.; GILLASPIE, A. G.; ROBERTS, P. A.; ISMAIL, A. M.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M. P.; BELZILE, F. J. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 175-188, 2002.

REGENMORTEL, M. H. V. van; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CASTENS, E.; ESTES, M. K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. (Ed.). **Virus taxonomy classification and**

nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego: Academic Press, 2000. 1161 p.

RIOS, G. P. **Principais doenças do caupi no Brasil.** Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1990. 40 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 29).

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L.; RUSSELL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease.** St. Paul, v. 77, p. 340-347. 1993.

ROSSEL, H. W. Preliminary investigations on the identity and ecologic of legume virus diseases in northern Nigeria. **Tropical Grain Legume Bulletin,** Ibadan, v. 43, n. 8, p. 41-46, 1997.

SANGWAN, S. R.; RISH, N. Inheritance to Cowpea Golden Mosaic Virus in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Mycology and Plant Pathology,** Udaipur, v. 34, n. 2, p. 620-622, 2004.

SANTOS, A. A. dos.; FREIRE-FILHO, F. R. Redução da produção do feijão Massacar causado pelo vírus do mosqueado amarelo. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, DF, v. 9, n. 2, p. 407, 1984.

SANTOS, A. A. dos.; FREIRE-FILHO, F. R. Genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) com resistência de campo ao vírus do mosaico dourado do caupi. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, DF, v. 11, n. 2, p. 287, 1986.

SANTOS, A. A. dos.; FREIRE-FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. BR 10-Piauí: cultivar de feijão Massacar (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, DF, v. 12, n.2, p. 400, 1987.

SANTOS, C. A. F.; SANTOS, I. C. N.; RODRIGUES, M. A. **Melhoramento genético do feijão.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 24 p. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 204).

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. de. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. 462 p.

SILVA, K. J. D. **Estatística da produção de feijão-caupi.** Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=966>>. Acesso em: 5 set 2010.

SILVA, H. A. P da; OLIVEIRA, R. S. da S. de; GONÇALO, T. P.; SILVA, J. R. da; GALISA, P. de S.; VIDAL, M. S.; ARAUJO, J. L. S. de. Identificação de genes expressos em nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetido ao déficit hídrico. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: anais.** Viçosa, MG: SBCS, 2010. 1 CD-ROM.

SILVA, E. K. C. *Cowpea Mosaic Severe Virus: Diagnóstico, estudo de herança e identificação de marcadores moleculares associados à resistência*. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMO, M. (Ed.). **Challenge and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

SINGH, B. B.; CHAMBLISS, O. L.; SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. **Advances in cowpea research**. Ibadan: IITA, 1997. p. 31-32.

SINGH, B. B.; OLUFAJO, O. O.; ISHIYAKU, M. F.; ADELEKE, R. A.; AJEIGBE, H. A.; MOHAMMED, S. G. Registration of six improved germplasm lines of cowpea with combined resistance to *Striga gesnerioides* and *Alectra vogelii*. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 2332-2333, 2006.

SOBRINHO, A. C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

SOUFRAMANIEN, J., GOPALAKRISHNA. ISSR and SCAR markers linked to the *mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, n. 6, p. 619-622, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4407-4.414, 1995.

WETZEL, M. M. S.; FAIAD, M. G. Germoplasma de caupi coleta conservação e intercâmbio. In: **V Reunião Nacional de Pesquisadores de caupi**, 2001, Teresina. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001, p. 312-315.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FILHO, F. R. F. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

ZABEAU, M.; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification**: a general method for DNA fingerprinting. *Int. C17: C12Q 1/68*. EP 0 534 858 B2. 31 mar. 1993.

CAPÍTULO I

MAPEAMENTO DE LOCOS AFLP LIGADOS A TOLERÂNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO EM FEIJÃO CAUPI.

RESUMO

O mosaico dourado é uma das mais importantes viroses no Nordeste brasileiro, podendo provocar reduções de até 70% na produção de grãos do feijão caupi. O sistema de marcadores AFLP, combinado com a metodologia de análise de grupos segregantes, foi utilizado com sucesso na identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao mosaico dourado (CGMV) numa população de 286 plantas F₂ de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), derivada do cruzamento entre IT97K-499-35 x Canapu T16. Os dados de segregação na população F₂ sugeriram que a tolerância ao CGMV foi controlada por um único gene, em dominância. Dentre as 196 combinações de *primers* AFLP testadas, que geraram em torno de 3800 amplicons, foram identificados três marcadores ligados ao gene de resistência ao vírus do CGMV: E.AAC/M.CCC₅₁₅ a 4,3 cM, E.AGG/M.CTT₂₈₀ a 14,2 cM e E.AAA/M.CAG₃₅₂ a 16,8 cM, com LODs score de 50,4, 24,4 e 28,7, respectivamente, sendo que os dois primeiros amplicons flanquearam o locus de tolerância ao CGMV. Esses marcadores podem ser usados para o desenvolvimento de marcadores tipo SCAR ou mesmo para uma maior saturação dessa região com outros marcadores, visando aumentar a precisão na seleção assistida para o desenvolvimento de linhagens de feijão caupi tolerantes ao CGMV.

ABSTRACT

Golden mosaic is one of the most important viruses in Northeast Brazil, being able to cause reductions of up to 70% in the production of cowpea grains. The AFLP marker, combined with the methodology of Bulk Segregant Analysis, was used with success in the identification of molecular markers associated with the resistance gene to golden mosaic (CGMV) in a population of 286 F₂ cowpea plants (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), derived from the cross between IT97K-499-35 x Canapu T16. The segregation data in the F₂ population suggested that tolerance to CGMV is controlled by a single dominant gene. Among the 196 combinations of AFLP *primers* tested, which generated around 3800 amplicons, three markers linked to the resistance gene to the virus of CGMV were identified: E.AAC/M.CCC₆₁₅ at 4.3 cM, E.AGG/M.CTT₃₈₀ at 14.2 cM, and E.AAA/M.CAG₄₅₂ at 16.8 cM, with LODs scores of 50.4, 24.4, and 28.7, respectively, being that the first two amplicons flanked the loci of tolerance to CGMV. These markers can be used for the development of SCAR type markers or even for a greater saturation of this region with other markers, to increase the precision of assisted selection for the development of cowpea strains tolerant to CGMV.

INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido com vários nomes populares regionais, como feijão-de-corda, feijão-fradinho, feijão miúdo ou feijão-macassar (FREIRE FILHO et al., 1999) é uma das principais culturas da região Nordeste, sendo considerado fonte de renda alternativa e alimento básico para sua população (OLIVEIRA et al., 2002).

A cultura é atacada por diversos agentes patogênicos que infectam e causam perdas na qualidade e no rendimento dos grãos (SOBRINHO et al., 2000). Destas, destacam-se as infecções provocadas por vírus que podem reduzir de 60 a 80% da produção em cultivares mais suscetíveis, o que tem ocorrido predominantemente nas variedades tradicionalmente cultivadas (FREIRE FILHO et al., 1999). Mais de 20 espécies e estirpes de vírus têm sido registrados infectando naturalmente essa cultura (THOTTAPPILLY e ROSSEL, 1985). Dentre os vírus, destaca-se o vírus do mosaico dourado do feijão caupi (Cowpea golden mosaic virus, CGMV) por provocar perdas expressivas na produção, de 40% a 78% (SANTOS e FREIRE FILHO, 1984).

A resistência ao CGMV foi atribuída a dois genes dominantes e independentes em estudo realizado por Sangwan e Rishi (2004), trabalhando com populações F₁, F₂ e retrocruzamentos de duas cultivares resistentes (CS 39 e CS 55) e duas suscetíveis (GC 2 e HFC 42-1). No entanto, outro estudo indicou que a resistência ao mosaico dourado é controlada por um gene dominante (KUMAR et al., 1994). Em *Phaseolus vulgaris* a resistência à virose do mosaico dourado foi atribuída a três genes, um dominante que controla a reação ao nanismo e dois recessivos não ligados responsáveis pela resistência a clorose (VALEZ e BASSETT et al., 1998).

O uso de marcadores moleculares tem contribuído grandemente para o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação em várias espécies vegetais de interesse econômico, incluindo *V. unguiculata*. O sistema do marcador AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*) (VOS et al., 1995) tem sido usado largamente na construção de mapas genéticos em feijão caupi (BOUKAR et al., 2004; MENÉNDEZ et al., 1997; QUÉDRAOGO et al., 2001 e 2002). Devido ao ilimitado número de polimorfismos que podem ser analisados pela técnica de AFLP, é possível saturar regiões específicas do genoma, o que é pré-requisito para a clonagem posicional baseada em mapa de gene - alvo (BORÉM e CAIXETA, 2009).

O marcador AFLP, combinado com a metodologia de análise de grupos segregantes (Bulked segregant analysis - BSA) (Michelmore et al., 1991), tem sido utilizado com sucesso na identificação de marcadores moleculares ligados a genes de importância agrônômica, como os que controlam resistência a pragas e doenças. Por exemplo, Quédrago et al. (2001) adotaram as metodologias AFLP e BSA para identificar marcadores firmemente ligados a dois genes que conferem resistência a duas raças da praga *Striga gesnerioides* Willd.

Estudos visando à aplicação de marcadores moleculares na identificação de genes de resistência a várias doenças provocadas por vírus têm sido realizados em espécies vegetais como: melão (*Cucumis melo* L.) (TEIXEIRA, 2004); ervilha (*Pisum sativum* L.) (Gao et al., 2004); feijão comum (*P. vulgaris* L.) (KELLY et al., 2003).

No que concerne ao mapeamento da resistência ao CGMV, Blair et al. (2007), desenvolveram um marcador 'sequence characterized amplified region' (SCAR) que se encontra a 7,8 cM do gene *bgm-1* que confere resistência ao vírus do mosaico dourado em feijão comum (*P. vulgaris*). Por outro lado, ainda não foi relatado nenhum trabalho sobre o mapeamento de genes de resistência a isolados brasileiros do CGMV.

O objetivo do presente estudo foi a identificação de marcadores moleculares AFLP ligados a genes de resistência ao CGMV numa população F₂ derivada do cruzamento entre IT97K-499-35 x Canapu T16, visando ao desenvolvimento de marcadores SCAR para seleção assistida no desenvolvimento de cultivares de feijão caupi resistentes ao CGMV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material genético e cruzamentos

Foram avaliadas 286 plantas F₂ provenientes de cruzamento artificial entre o genótipo IT97K-499-35 e a linhagem Canapu T16. O IT97K-499-35 é uma cultivar do grupo fradinho, desenvolvido pelo International Institute of Tropical Agriculture (IITA) e introduzido no Brasil pela Embrapa Cenargen para uso no programa de melhoramento da Embrapa Semiárido. Essa cultivar apresenta tolerância múltipla a várias viroses, entre as quais ao CGMV (SINGH et al., 2006). A linhagem T16, resultante do cruzamento entre IPA 206 x Canapu é do grupo das cultivares canapu, tipo bastante cultivado na região do vale do São Francisco e apresenta suscetibilidade ao CGMV.

Outra população F₂, com 186 plantas, proveniente do cruzamento entre os genótipos IT 97K-499-35 e F2-100-P20-1-P1 (originado do cruzamento entre BR 10 Gurguéia x 293588), desenvolvido pela Embrapa Semiárido e susceptível ao mosaico dourado, foi analisada apenas fenotipicamente, como forma de se confirmar o padrão e segregação para a tolerância ao CGMV em feijão caupi.

O cruzamento foi realizado como descrito por Rachie et al., 1975. Após o plantio das sementes resultantes dos cruzamentos, observou-se o sucesso da hibridação por meio do marcador fenotípico do tegumento da semente: todas as sementes F₁ apresentaram tegumento preto, contrastando com os tipos fradinho do parental IT 97K-499-35 e marrom dos outros dois parentais.

Avaliação da resistência da população F₂ ao vírus do mosaico dourado (CGMV)

Sementes F₁ do cruzamento IT 97K-499-35 x Canapu T16 foram plantadas no campo experimental da Embrapa Semiárido entre duas bordaduras de Canapu, variedade suscetível ao vírus do mosaico dourado, que foram plantadas 30 dias antes, com o intuito de aumentar a população de *Bemisia tabaci*, vetor do CGMV, e reduzir as chances de escape. As práticas culturais normais foram adotadas, exceto a não aplicação de inseticidas para não interferir na população do inseto vetor.

Foram consideradas susceptíveis as plantas que apresentaram os sintomas típicos da infecção por CGMV: coloração amarelo-dourado no limbo foliar, enquanto que as plantas saudáveis, que não apresentaram nenhum sintoma, foram consideradas resistentes (Fig. 1). O mesmo procedimento foi adotado na população segregante F₂ do cruzamento IT 97K-499-35 e F2-100-P20-1-P1.

Extração de DNA genômico e reações de AFLP

Folhas jovens do cruzamento IT 97K-499-35 x Canapu T16 foram coletadas, devidamente identificadas e armazenadas em freezer -80 °C. Na extração do DNA genômico da população foi utilizado o protocolo CTAB 2x de Doyle & Doyle (1990), modificado para: 6.000 e 10.000 rpm na primeira e na segunda centrifugação, respectivamente; β-mercaptoetanol a 2% e incubação a 60 °C durante 30 min para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris-EDTA, a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs co-isolados. A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio da comparação visual da intensidade de suas bandas com aquelas obtidas por meio do DNA fago λ (10 a 100 ng), em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo

de etídio. A visualização foi realizada por meio de luz ultravioleta. Com base nas concentrações estimadas, as amostras foram diluídas para 50 ng/ μ l e armazenadas a -20 °C.



Figura 1. Sintomas do vírus do mosaico dourado do feijão-caupi em folhas de indivíduos da população segregante F_2 do cruzamento IT 97K-499-35 x Canapu T16.

A metodologia descrita por Vos et al. (1995) foi utilizada na análise dos marcadores AFLP. Inicialmente, o DNA genômico foi duplamente digerido por meio de duas combinações, uma enzima de corte raro e outra de corte frequente. Para isso, 200 ng de DNA foi duplamente digerido com 0,62 U de cada endonuclease por 2,5 horas, em termociclador, com as combinações entre as enzimas de restrições *EcoR I/Mse I* e *Pst I/Mse I*.

Para ligar os adaptadores aos terminais clivados por cada enzima foi acrescentado ao material digerido uma reação contendo 0,5 μ M dos adaptadores *EcoR I* ou *Pst I* e 0,5 μ M dos adaptadores *Mse I*, 0,72 U da enzima *T4 DNA Ligase* e água ultrapura para o volume final de 6,25 μ L. A reação de ligação foi realizada em termociclador a 22 °C por 2 h e a enzima foi inativada a 65 °C por 10 min. A solução ligada foi para 1:5 com água ultra pura. Na amplificação pré-seletiva os fragmentos de

DNA diluídos resultantes da etapa de ligação foram amplificados com *primers* que são complementares aos adaptadores com mais um nucleotídeo seletivo na extremidade 3'. As reações constituíram-se 1,75 mM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, 1x tampão de PCR (100 mM de Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase, 2,0 µL do DNA ligado para volume final de 15µL. A programação do Termociclador para ampliações pré-seletivas consistiu de 20 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C durante 1 min e 72°C durante 1 min. Cada reação pré-amplificada foi diluída 20 vezes em água ultra pura. Nas reações de PCR seletivas foram utilizados 100 pares de iniciadores *EcoRI* + *MseI* e 96 pares de iniciadores *PstI* + *MseI*. As reações foram preparadas para um volume final de 10 µL de acordo com as concentrações: 0,2 mM do *primer* da *EcoRI* ou *PstI*, 0,3 mM do *primer* da *MseI*, 0,2 mM de dNTPs, 1x tampão de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase e 2,0 µL do DNA pré-amplificado e diluído. A programação do termociclador para as ampliações seletivas consistiu de: a) um ciclo de 94 °C durante 30 s, seguido de 65 °C durante 30 s e de 72 °C durante 60 s, repetidos 13 vezes e com a temperatura de anelamento de 65 °C diminuindo 0,7 °C no ciclo subsequente; b) 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56°C durante 30 s e 72°C durante um min.

Para a desnaturação (um ciclo a 94 °C por 5 minutos), foram previamente adicionados aos produtos de PCR 5 µl de tampão desnaturante, composto por formamida 98%, EDTA pH 8,0 10 mM, 1mg/mL de xileno cianol e 1 mg/mL de azul de bromofenol. Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% [acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7,5 M de uréia e tampão TBE 5x], preparado em placa de vidro tipo sanduíche com capacidade para 60 poços.

As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido com etanol. A placa de adesão foi tratada com 1,1 mL de uma solução contendo 95% de Etanol + 0,5% de Ácido Acético e 1 µL de *Bind silane* (Bioscience), enquanto a placa de repulsão foi tratada como descrito anteriormente, porém, substituindo-se a solução de *Binde silane* pelo repelente de água comercial Waterlux (Luxcar). No preparo do gel, utilizou-se 80 mL da solução estoque de poliacrilamida a 6%, 40 µL de Temed (Amresco) e 410 µL de persulfato de amônio 10%. O gel foi polimerizado por 30 min e, após uma pré-corrída de 30 min a 40 W, os géis foram carregados com 2,5 µL dos produtos de PCR desnaturados, bem como com o marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb (Invitrogen).

A corrida de eletroforese foi realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 40 W. Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Creste et al, (2001). Após secagem dos géis procedeu-se a análise dos fragmentos e digitalização em scanner Epson GT-15000.

Identificação de marcas AFLP associadas com locos de resistência

Foi adotada a estratégia de análise de segregantes agrupados (*Bulk Segregant Analysis* - BSA), como descrito originalmente por Michelmore et al. (1991). Essa metodologia utiliza dois grupos de DNA contrastantes de uma população segregante, dentro de cada *pool*, os genes são identificados para características de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Sendo assim, dois grupos em duplicata, contendo cada um, DNA de cinco indivíduos foram formados, um composto por plantas resistentes e outro por susceptíveis ao vírus do mosaico dourado. Quantidades equimolares do DNA desses indivíduos foram utilizadas para a preparação dos dois *bulks* susceptíveis (BS) e dois resistentes (BR) (Fig. 2). Cento e noventa e seis combinações de *primers* AFLP foram testadas. Os *primers* que amplificaram fragmentos candidatos, ou seja, presentes no BS e ausentes no BR, ou vice-versa, foram novamente avaliados na amostra individual dos cinco indivíduos resistentes e suscetíveis que formaram os *bulks* (Fig. 3) e numa amostra maior, formada por 35 indivíduos tolerantes e 15 susceptíveis. Somente os *primers* que segregaram que se aproximaram da proporção de 3:1 foram selecionados para fenotipar os 286 indivíduos F₂ (Fig.4).

A estimativa do tamanho em pares de bases (pb) para cada fragmento AFLP foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50 pb da Fermentas (EUA), aplicado em um poço extra do gel de poliacrilamida.

Análise estatística

Os dados obtidos pelos marcadores AFLP e pela avaliação visual de resistência/susceptibilidade foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) a 0,05 para verificação do padrão mendeliano de segregação esperado na população F₂ de 3:1. As análises de ligação foram realizadas usando-se o programa JoinMap versão 2.0 (Stam and van Ooijen, 1995). Foram adotados o LOD mínimo de 3,0, frequência máxima de recombinação de 0,45, limite de 'jump' 3,0 e limite de 'triplet' 3,0. Os valores obtidos

pelas frequências de recombinação foram convertidos em mapas de distância genética (centiMorgans) usando a função Kosambi (KOSAMBI, 1944), para ilustração em diagrama.

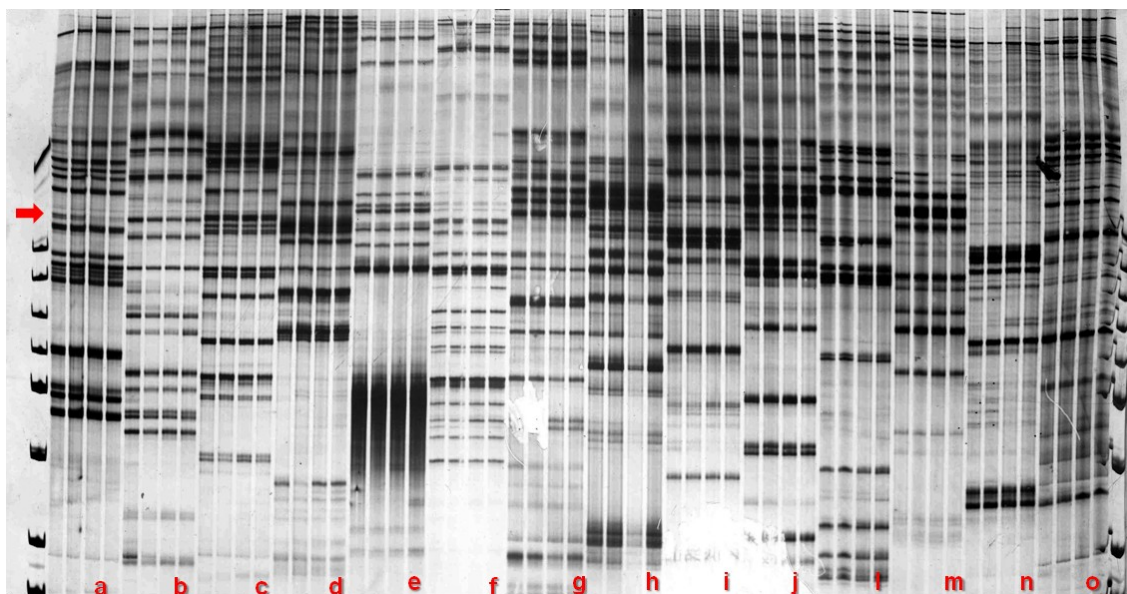


Figura 2. Gel de poliacrilamida demonstrando quatorze *bulks* de indivíduos resistentes e susceptíveis (representados pelas letras a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,l,m,n,o), em duplicata, dois *bulks* resistentes (BR) e dois susceptíveis (BS), respectivamente e polimorfismo entre os *bulks* indicado pela seta.

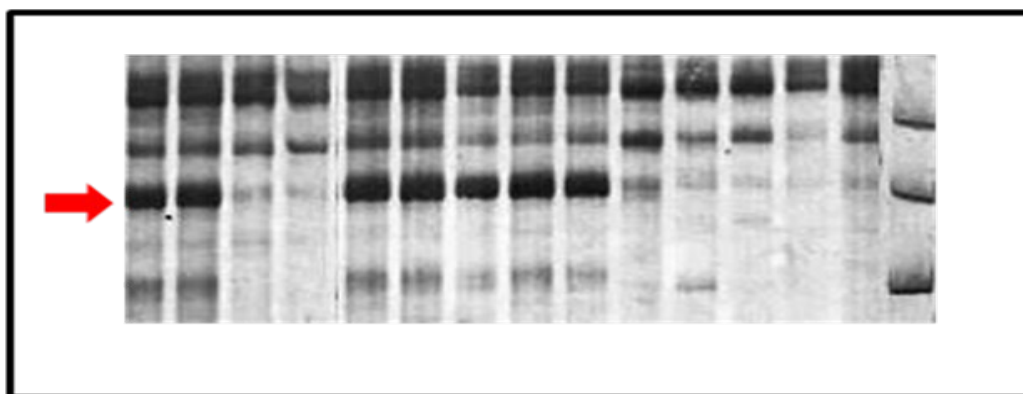


Figura 3. Marcador AFLP de 515 pb amplificado com a combinação de *primers* E.AAC/M.CCC. Visualiza-se da esquerda para a direita o *Bulk* de indivíduos resistentes e susceptíveis, logo em seguida os cinco indivíduos do *Bulk* analisados individualmente. A seta indica localização das bandas polimórficas.

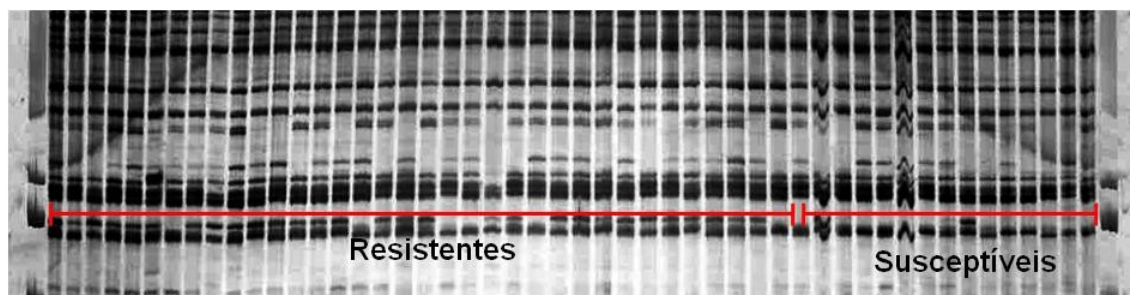


Figura 4. Gel de poliacrilamida com 50 indivíduos, sendo que os 35 primeiros indivíduos são resistentes e os 15 últimos susceptíveis ao vírus do mosaico dourado analisados com a combinação E.AAA/M.CAG.

RESULTADOS

Avaliação da herança à resistência ao vírus do mosaico dourado (CGMV) nas populações F₂.

A identificação visual das plantas suscetíveis e resistentes foi de fácil observação, pois o sintoma característico do mosaico dourado são pontuações amareladas que é contrastante no campo (Fig.1). Das 286 plantas avaliadas na população F₂ IT 97K-499-35 x Canapu T16, foi verificada resistência em 223 plantas, enquanto outras 63 apresentaram-se susceptíveis aos sintomas do vírus do mosaico dourado. Na população segregante F₂ IT 97K-499-35x F2-100-P20-1-P1, 51 plantas apresentaram sintomas ao mosaico dourado e 186 foram consideradas resistentes.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste do qui-quadrado (χ^2) (Tabela 1) que validaram a segregação mendeliana de 3:1 (resistentes: susceptíveis). Estes dados sugerem segregação de 3:1(resistentes: susceptíveis), com dominância do gene que confere resistência à doença. Esses resultados são esperados para alelos com genótipo de herança dominante na progênie F₂.

Tabela 1. Segregação da resistência ao mosaico dourado em dois cruzamentos segregantes F₂ com o genitor **IT 97K-499-35 resistente ao mosaico dourado.**

Cruzamento	Resistentes	Susceptíveis	Total	Esperado	χ^2
IT 97K-499-35 x Canapu T16	223	63	286	3:1	1,35 ^{ns}
IT 97K-499-35 x F2-100-P20-1-P1	135	51	186	3:1	0,58 ^{ns}

^{ns} Não significativo ao nível de 5% pelo teste quadrado

Identificação de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência

Dos 100 pares de iniciadores *EcoRI/MseI* e 96 pares de iniciadores *PstI/MseI* testados nos *bulks* de indivíduos resistentes e susceptíveis do cruzamento IT97K-499-35 x Canapu T16 foram amplificadas 3.768 bandas, sendo 2022 na combinação *EcoRI/MseI* e 1746 para *PstI/MseI*. Foram identificadas 30 bandas polimórficas entre os *bulks* resistentes/susceptíveis, sendo 22 nos pares de iniciadores *EcoRI/MseI* (1,1%) (Anexo I) e oito nos pares de *primers PstI/MseI* (0,49%) (Anexo II).

Das combinações de *primers* que apresentaram polimorfismo entre os *bulks*, apenas três mostraram-se consistentes quando foram analisadas em 35 indivíduos resistentes e 15 susceptíveis, confirmando resultado da avaliação inicial com os *bulks* resistentes e susceptíveis (Fig. 4).

Os marcadores E.AAC/M.CCC, E.AGG/M.CTT e E.AAA/M.CAG, correspondem a fragmentos de DNA amplificados de 515 pb, 280 pb e 352 pb, respectivamente. A ligação desses três marcadores com o locus de resistência, o qual foi denominado *Mdo-1*, o símbolo do gene de resistência, foi confirmada nos 286 indivíduos da população F₂, sendo que as distâncias para o locus *Mdo-1* variou de 4,3 a 21,1 cM.

Por meio de análise de recombinação, estimou-se que o marcador E.AAC/M.CCC₅₁₅ situa-se a 4,3 cM de distância do gene mosaico dourado (*Mdo-1*), com LOD score de 50,8, enquanto os marcadores E.AGG/M.CTT₂₈₀ e E.AAA/M.CAG₃₅₂ e posicionam-se a 14,2 cM e 16,8 cM e LOD scores 24,4 e 28,7, respectivamente, com os marcadores E.AAC/M.CCC₅₁₅ e E.AAA/M.CAG₃₅₂ o flanqueando (Fig. 5)

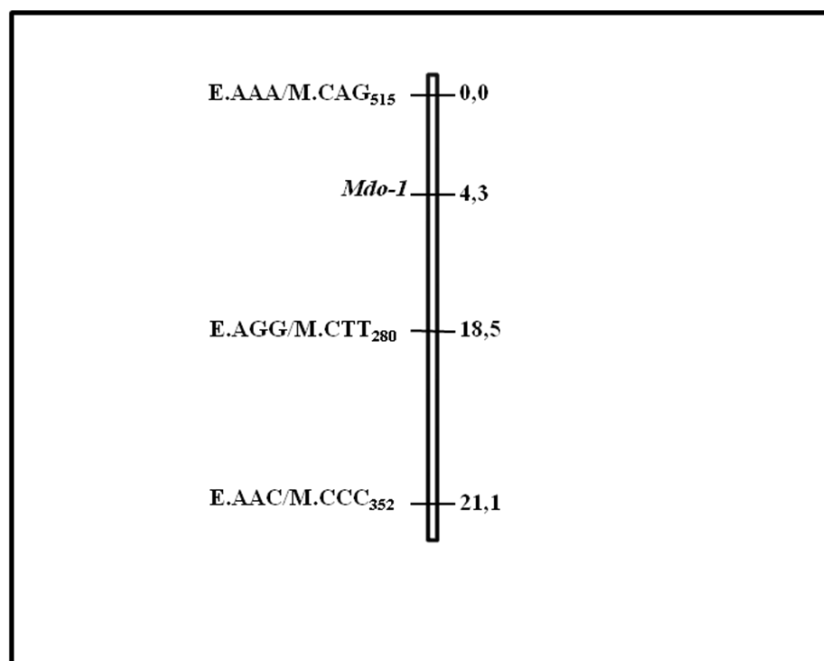


Figura 5. Mapa de ligação do *locos* de resistência para o mosaico dourado (*Mdo-1*) com as posições dos marcadores AFLP identificados e suas respectivas distâncias (cM). LOD scores de 50,4, 24,4 e 28,7, respectivamente, para os marcadores E.AAC/M.CCC₅₁₅, E.AGG/M.CTT₂₈₀ e E.AAA/M.CAG₃₅₂.

DISCUSSÃO

O estudo de herança genética realizado na população segregante F_2 ao CGMV indica que a resistência a doença é controlada por um gene dominante segregando na proporção de 3:1 (resistente: suscetível). Os resultados obtidos diferem dos reportados por Sangwan e Rishi (2004), os quais relatam que a resistência ao CGMV é atribuída a dois genes dominantes segregando na proporção de 15:1 em plantas F_2 e 3:1 em retrocruzamentos, indicando que a resistência é condicionada por dois genes dominantes e independentes. No entanto, estes autores citam dois trabalhos em que a resistência é atribuída a apenas um gene (BLISS e ROBERTSON, 1971; KUMAR et al., 1994). Por outro lado, em feijão comum (*P. vulgaris* L.), a resistência ao mosaico dourado é conferida a dois genes recessivos não ligados (VALEZ e BASSETT, 1998). Os dados obtidos no presente estudo foram confirmados em 186 plantas de uma população F_2 do cruzamento entre os genótipos IT97K-499-35 x F2-100-P20-1-P1, que também segregaram na proporção 3:1. Estudos avaliando populações segregantes de retrocruzamentos desses progenitores serão necessários para a confirmação da herança genética ao vírus do mosaico dourado.

Os resultados mostraram que a combinação entre marcadores AFLP e a técnica BSA foi eficiente na localização de marcadores ligados ao gene de resistência ao mosaico dourado. Apesar de a grande maioria dos trabalhos utilizarem oito ou mais indivíduos para compor os *Bulks* ou grupos (BOUKAR et al., 2004; QUÉDRAOGO et al., 2001), o fato da utilização de apenas cinco indivíduos em cada *Bulk* não comprometeu os resultados, já que foram identificados três marcadores ligados ao gene de resistência, como adotado por Boiteux et al. (2000) e Brito (2007), em cenoura e café, respectivamente.

A metodologia AFLP foi também utilizada satisfatoriamente em outros estudos com feijão caupi: na identificação de marcadores moleculares ligados a genes resistentes a doenças e pragas (QUÉDRAOGO et al., 2001; 2002; BOUKAR et al., 2004; MENÉNDEZ et al., 1997), em análises fenéticas e de diversidade genética (COULIBALY et al., 2002) e na localização de QTLs (MUCHERO et al., 2010). O amplo uso do marcador AFLP em análises moleculares, sobretudo no mapeamento genético do feijão-caupi, demonstra sua eficiência em identificar locos ligados a características de interesse comercial segregantes. Apesar de gerar marcas dominantes, ou seja, não ser capaz de distinguir locos heterozigotos, a técnica tornou-se uma importante ferramenta no melhoramento genético do feijão caupi, bem como de outras espécies do gênero *Vigna*.

As combinações das enzimas de corte raro e frequente, *EcoRI/MseI* e *PstI/MseI*, amplificaram 20,2 bandas e 18,2, respectivamente. Esses valores são inferiores aos encontrados por Menéndez et al. (1997), que ao analisar um cruzamento entre dois genótipos de *V. unguiculata* (IT84S-2049 x 524) desenvolvidos na Nigéria e Califórnia, contrastantes para diversas características morfológicas e resistência a pestes e doenças, constataram uma média de aproximadamente 55 fragmentos/*primer* e 12% de polimorfismo por combinação de *primer* AFLP, usando sistema fluorescente e sequenciador semi-automático. Oliveira et al. (2001) obtiveram a média de 7,6 bandas amplificadas usando marcadores RAPD no mapeamento genético e na seleção de híbridos entre *Citrus reticulata* Blanco e *C. sinensis* (L.) Osbeck. Boiteux et al. (2000) reportaram a média de 2,4 amplicons de RAPD no mapeamento de nematóide em população F₂ de cenoura.

As enzimas *EcoRI/MseI* produziram número superior dos fragmentos amplificados totais e dos fragmentos polimórficos entre os *bulks* segregantes, 53,6% e 73,3%, respectivamente. Estes valores demonstram que a combinação *EcoRI/MseI* é

mais eficiente para detectar locos polimórficos. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Campos et al. (2005) em que as combinações de enzimas *EcoRI/MseI* produziram maior número de bandas e polimorfismos do que as combinações *PstI/MseI*, quando usadas em estudo de diversidade genética entre cultivares de *Citrus* ssp.

A quantidade de marcadores AFLP identificados nesse estudo são próximos ao obtido por Boukar et al. (2004), que identificaram quatro marcadores AFLP ligados ao gene de resistência ao *Striga gesnerioides* com distâncias genéticas estimadas em 3,2 cM (E.ACT/M.CTC₁₁₅), 4,8 cM (E.ACT/M.CAC₁₁₅), 10,3 cM (E.ACA/M.CAG₁₀₈) e 18,2 cM (E.AAG/M.CTA₁₉₀). O marcador E-ACT/M-CAC₁₁₅ foi sequenciado e convertido em SCAR, e quando testado na população F₂ mostrou-se eficiente em distinguir indivíduos susceptíveis e resistentes.

Quédraogo et al. (2002) utilizaram marcadores AFLP para desenvolver um mapa de ligação, que serve de referência por sua alta densidade e ampla cobertura do genoma de feijão-caupi (*V. unguiculata*). Nesse estudo, foram identificados vários marcadores ligados a genes de resistência a doenças, dentre as quais, as viroses *Cowpea mosaic virus* (CPMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV), *Southern bean mosaic virus* (SBMV).

Souframani e Gopalakrishna (2006) aplicaram a técnica ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) para identificar o marcador ISSR811₁₃₅₇, localizado a 6,8 cM de distância do gene de resistência ao vírus MYMV em linhagens recombinantes (RILs) F8 de genótipos de feijão-mungo (*Vigna mungo* (L.) Hepper). O marcador ISSR811₁₃₅₇ foi convertido com sucesso em SCAR, sendo capaz de distinguir plantas susceptíveis e resistentes ao vírus MYMV, concordando com os dados fenotípicos.

No presente estudo foram identificados três marcadores ligados ao gene de resistência ao vírus do mosaico dourado, sendo que dois marcadores flanqueiam o gene de resistência ao mosaico, com E.AAC/M.CCC₅₁₅ a 4,3 cM de distância, enquanto que o marcador E.AGG/M.CTT₂₈₀ localiza-se a 14,2 cM de distância. Anteriormente a este estudo, não foi identificado nenhum marcador ligado ao gene de resistência ao mosaico dourado em feijão caupi, sendo este o primeiro mapa de ligação em uma população de *V. unguiculata* segregando para a resistência ao vírus do mosaico dourado.

CONCLUSÕES

Os dados de segregação na população F_2 sugerem que a tolerância ao GMCV é controlada por um único gene de caráter dominante. A técnica AFLP combinada com a metodologia BSA mostram-se úteis na construção de mapas de ligação em feijão caupi.

Os marcadores AFLP gerados com a enzima EcoRI mostram-se mais polimórficos, sendo mais indicados em estudos moleculares em feijão caupi do que aqueles gerados pela enzima PstI.

O marcador E.AAC/M.CCC₅₁₅ obtido no presente estudo mostra-se um forte candidato para ser utilizado em seleção assistida por marcadores moleculares, dada a sua maior proximidade do gene de resistência. É ainda um forte candidato para ser convertido em marcador SCAR, que é superior ao marcador AFLP. A disponibilidade de marcadores SCAR para genes que conferem resistência ao vírus do mosaico dourado poderá auxiliar programas de melhoramento, aumentando a precisão na seleção assistida para o desenvolvimento de linhagens de feijão caupi tolerantes ao CGMV.

REFERÊNCIAS

- BLAIR, M. W.; RODRIGUEZ, L. M.; PEDRAZA, F.; MORALES, F.; BEEBE, S. Genetic mapping of bean golden yellow mosaic gemonivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistanc in commom bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, n. 4, p. 261-271, 2007.
- BRITO, de G. G. **Mapeamneto genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro à *Hemileila vastatrix* Berk. & Br.** 2007. 66 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: UFV, 2009. 374 p.
- BOUKAR, O.; KONG, L.; SINGH, B. B.; MURDOCK, L.; OHM, W. H. AFLP and AFLP-Derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea, **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 1259-1264, 2004.
- BOITEUX, S. L.; BELTER, G. J.; ROBERTS, A. P.; SIMON, W. P. RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, n. 3-4, p. 439-336, 2000.
- CAMPOS, T. E.; ESPINOSA, M. A. G.; WARBURTON, M. L.; VARELA, A. S.; MONTER, A.; V. Characterization of mandarin (*Citrus spp.*) using morphological and AFLP markers. **Interciencia**, Caracas, v. 30, n. 11, p. 687-693, 2005.
- CRESTE, S.; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 19, p.299-301, 2001.
- COULIBALY, S; PAQUET, R. S.; PAPA, P.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phonetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104,n. 2-3, p. 3358-366, 2002.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, n. 13-15, p. 13-15. 1990.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região Nordeste. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** Petrolina: Embrapa Semi-Arido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html>>. Acesso em 15 out. 2010.

GAO, Z.; EYERS, S.; THOMAS, C.; ELLIS, N.; MAULE, A. Identification of markers tightly linked to *sbm* recessive genes for resistance to *Pea seed-borne mosaic virus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 3, p. 488-494, 2004.

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.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v. 12, n. 3, p. 172-175, 1944.

KUMAR, K.; DAHIYA, S. B. RISHI, N. Inheritance to cowpea yellow mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: RISHI, N.; AHUJA, K. L.; SINGH, B. P. (Ed.). **Virology in the tropics**. New Delhi: Malhotra Publishing House, 1994.

MENÉNDEZ, M. C.; HALL, E. A.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 8, p. 1210-1217, 1997.

MICHELMORE, R.W., I. PARAN, AND R.V. KESSELI. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, 1991.

OLIVEIRA, R. P. de.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores rapd para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

OLIVEIRA, A. P.; TAVARES SOBRINHO, J.; NASCIMENTO, J. T.; ALVES, A. U.; ALBUQUERQUE, I. C.; BRUNO, G. B. Avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi, em Areia, PB. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 180-182, 2002.

QUÉDRAOGO, T. J.; MAHESHWARI, V.; BERNER., K. D.; ST-PIERRE., A. C.; BELZILE, F.; TIMKO, P. M. Identification of AFLP markers linked to resistance os cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.102,n. 6-7, p. 1029-1036, 2001.

QUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; JEAN, M.; CLOSE, T. J.; EHLERS, J. D.; HALL, A. E.; GILLASPIE, A. G.; ROBERTS, P. A.; ISMAIL, A. M.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M. P.; BELZILE, F. J. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 175-188, 2002.

RACHIE, K. O.; RAWAL, K. M.; FRANCKOWIAK, J. D. **A rapid method for hand crossing cowpeas**. Ibadan: IITA, 1975. 5 p. (IITA. Technical Bulletin, 2).

SANTOS, A. A. dos.; FREIRE-FILHO, F. R. Redução da produção do feijão massacar causado pelo vírus do mosqueado amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, n. 2, p. 407, 1984.

SANGWAN, S. R.; RISH, N. Inheritance to Cowpea Golden mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v. 34, n. 2, p. 620-622, 2004.

SINGH, B. B.; OLUFAJO, O. O.; ISHIYAKU, M. F.; ADELEKE, R. A.; AJEIGBE, H. A. MOHAMMED, S. G. Registration of six improved germplasm lines of cowpea with combined resistance to *Striga gesnerioides* and *Alectra vogelii*. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 5, p. 2332-2233, 2006

STAM, P. VAN OOIJEN, J. W. van. **JOINMAP TM version 2.0**: software for the calculation of genetic maps. Wageningen, The Netherlands: CPRO-DLO, 1995.

SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264 p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. ISSR and SCAR markers linked to the *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, p. 619-622, 2006.

TEIXEIRA, M. P. A. **Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.)**. 2004. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba.

THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Worldwide occurrence and distribution of virus diseases. In: SINGH, S. R.; RICHAIIE, K. O. (Ed.). **Cowpea research, production and utilization**. Chichester: John Wiley, 1985. p. 155-171.

VALEZ, J.; BASSETT, M. J.; BEAVER, J. S.; MOLINA, A. Inheritance of resistance to *Bean golden mosaic virus* in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 123, n. 4, p. 628-631, 1998.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR DE LOCOS AFLP LIGADOS AO VIRUS DO MOSAICO DOURADO

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento e validação de marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) provenientes de marcas AFLP ligadas ao gene de resistência ao vírus mosaico dourado (CGMV) em *Vigna unguiculata*, visando a seleção assistida de linhagens de feijão de corda tolerantes a essa virose. Foram desenvolvidos oito marcadores SCARs a partir dos amplicons E.AAC_M.CCC₅₁₅ e E.AAA/M.CAG₃₅₂, que apresentaram distâncias estimadas em 4,3 cM e 16,8 cM do gene de resistência ao GMCV. Os dois amplicons de AFLP foram excisados, reamplificados em géis de agarose com sucesso. A identidade das sequências ‘forward’ e ‘backward’ alinhadas foi baixa, 40% para E.AAA/M.CAG₃₅₂ e 57% para E.AAC_M.CCC₅₁₅, dificultando o desenho de *primers* SCARs. Testes realizados com oito *primers* SCARs não resultaram na mesma segregação observada na análise AFLP entre indivíduos resistentes e suscetíveis da população F₂ do cruzamento entre IT97K-499-35 x Canapu T16. Esforços para melhorar a qualidade do sequenciamento dos amplicons reamplificados e desenvolver marcadores SCARs eficientes em detectar o gene de resistência a partir dos marcadores AFLP obtidos no mapeamento do gene que confere resistência ao GMCV continuam sendo realizados.

ABSTRACT

The objective of this work was the development and validation of SCAR markers (Sequence Characterized Amplified Region) from AFLP markers linked to the resistance gene to golden mosaic virus (CGMV) in *Vigna unguiculata*, aimed at the assisted selection of cowpea strains tolerant to this virus. Eight SCAR markers were developed from the amplicons E.AAC_M.CCC₅₁₅ and E.AAA/M.CAG₃₅₂, which presented estimated distances of 4.3 cM and 16.8 cM of the resistance gene to CGMV. The two AFLP amplicons were excised and then re-amplified in agar gels with success. The identity of the aligned sequences ‘forward’ and ‘backward’ was low, 40% for E.AAA/M.CAG₃₅₂ and 57% for E.AAC_M.CCC₅₁₅, making the design of SCAR *primers* difficult. Tests done with eight SCAR *primers* did not result in the same segregation observed in the AFLP analysis between resistant and susceptible individuals of the F₂ population of the cross between IT97K-499-35 x Canapu T16. Efforts to improve the quality of sequencing of the re-amplified amplicons and develop SCAR markers efficient in detecting the resistance gene from the AFLP markers obtained in the mapping of the gene that confers resistance to CGMV continue being done.

INTRODUÇÃO

O feijão caupi, quando comparado a outras culturas, tem seu potencial genético pouco explorado, apesar de possuir uma ampla variabilidade genética para praticamente todos os caracteres de interesse agrônômico (FREIRE-FILHO et al., 2005). Entre os principais objetivos do melhoramento dessa cultura está à incorporação de resistência a doenças e pragas (SINGH et al., 1997).

Dentre os patógenos que atacam o feijão caupi, destaca-se o vírus do mosaico dourado do feijão caupi (Cowpea golden mosaic virus, CGMV) por provocar perdas expressivas na produção, de 40% a 78% (SANTOS e FREIRE FILHO, 1984). Trabalhos utilizando marcadores moleculares na localização de genes de resistência a essa virose só foram relatos em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) (BLAIR et al., 2007).

O uso de marcadores moleculares na identificação de genes de resistência é particularmente desejável quando comparado a programas de melhoramentos baseados apenas em análises fenotípicas, pois eliminam consideravelmente o tempo gasto na obtenção de cultivares resistentes (SOUFRAMANIEN e GOPALAKRISHNA, 2006).

O marcador AFLP (VOS et al., 1995) vem crescendo em popularidade e tem sido usado expressivamente na construção de mapas de ligação e identificação de marcas ligadas a genes de interesse agrônômico, como resistência a doenças e pragas. Alguns trabalhos com esse intuito foram realizados em população do gênero *Vigna* (BOUKAR et al., 2004; QUÉDRAOGO et al., 2001; 2002).

A conversão de marcas AFLP em marcadores PCR – específicos, como SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) (PARAN e MICHELMORE, 1993) e STSs (*Sequence Tagged Sites*) (OLSON et al., 1989), tem aumentado a eficiência em localizar locos de interesse e distinguir de forma rápida e segura indivíduos contrastantes, o que tem conferido um grande avanço na seleção assistida por marcadores (MAS).

Na literatura vários estudos foram realizados com sucesso na transformação de bandas AFLP relacionadas com resistência a pragas e doenças em marcadores PCR – específicos. Merksen et al.(2001) desenvolveram seis marcadores STS a partir de dez bandas AFLP relacionadas com os genes *Rhg1* e *Rhg4* que conferem resistência ao nematóide *Heterodera glycines* em soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Em estudo semelhante, De Jong et al. (1997) desenvolveram marcadores PCR-específicos ligados ao gene *Nb* resistente ao vírus X(PUX) em batata (*Solanum tuberosum*). Em feijão-caupi (*Vigna un-*

guiculata (L.) Walp.), Boukar et al. (2004) transformaram bandas AFLP em marcadores SCAR capazes de diferenciar indivíduos resistentes e susceptíveis a raça *Rsg1* de *Striga gesnerioides*.

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento e validação de marcadores SCAR provenientes de bandas AFLP ligadas aos locos de resistência ao CGMV visando à seleção assistida de linhagens tolerantes a essa virose.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foi utilizada a população segregante F₂ proveniente do cruzamento IT97K-499-35 x Canapu T16. A avaliação da resistência ao vírus do mosaico dourado, extração de DNA genômico, assim como, a identificação de marcadores AFLP ligados aos locos de resistência, procederam de acordo com a metodologia descrita no capítulo 1.

Desenvolvimento do marcador SCAR

Reamplificação de fragmentos resultantes de marcadores AFLP

Marcadores AFLP específicos foram cuidadosamente excisados do gel seco de poliacrilamida 6% (Fig.1) com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril. O material foi transferido para tubos de 2 ml com 500 µl de TE, sendo posteriormente congelado por 20 min a - 80 °C e logo em seguida aquecido a 94 °C por 5 min. Foi acrescentado 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitado por 2 horas, sendo centrifugado a 9000 g. O sobrenadante foi retirado e precipitado com 2/3 de álcool isopropílico.

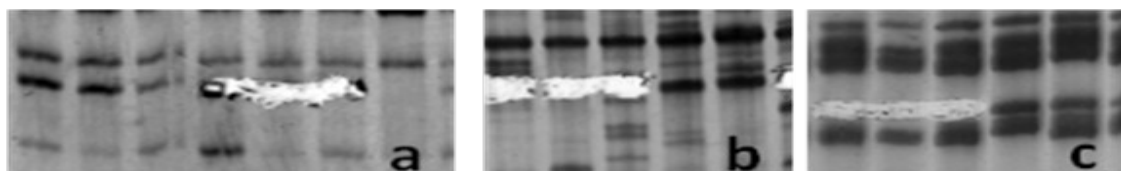


Figura 1. **Marcas AFLP específicas excisadas do gel seco de poliacrilamida 6% (a) primer E.AAA/M.CAG₃₅₂, (b) AAC/M.CCC₅₁₅ e em (c) E.AGG/M.CTT₂₈₀.**

O produto purificado foi reamplificado, adotando-se as mesmas combinações de *primers* e as mesmas condições descritas anteriormente (capítulo 1), com exceção da programação que foi de um ciclo de 94 °C durante 2 min e 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C durante 30 s e 72 °C durante um min. Os fragmentos reamplificados foram

submetidos a uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (p/v), para confirmar a amplificação dos fragmentos.

Sequenciamento dos fragmentos resultantes de marcadores AFLP.

O sequenciamento dos fragmentos reamplificados do gel de poliacrilamida foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNNNN-3' e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min. seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 60 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min., resfriados em gelo por 5 min. e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

Desenho dos primers

O alinhamento das sequências conservadas dos fragmentos AFLP foi efetuado com o auxílio do programa Clustal X e os *primers* SCARs foram desenhados com o auxílio do software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), os quais foram sintetizados pela ERVIEGAS (São Paulo, SP, Brasil). Das sequências dos fragmentos usadas para síntese dos *primers* foram excluídos os nucleotídeos dos adaptadores sintéticos acoplados na etapa de ligação do AFLP.

Amplificação e análise do marcador SCAR

A reação do marcador SCAR foi composta de 25 ng de DNA molde, 1X PCR Buffer 10X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,3 U de Taq DNA Polimerase e 0,3 μM de cada *primer*, para um volume final de 20 μl. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial de 2 min a 94 °C e 32 ciclos de 45 s a 94 °C; 1 min a 56 °C e 1 min a 72 °C. As amostras foram submetidas a uma extensão final de 5 min a 72 °C e mantidas a 4 °C até sua retirada do termociclador. Os produtos da reação foram amplificados em gel de agarose 1,6 %, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Foram realizados testes com temperatura de anelamento de 52 °C, 56 °C, 64 °C, 68 °C e quantidade de ciclos variando entre 32 e 42 ciclos.

Para validação dos marcadores, os *primers* foram amplificados utilizando-se o DNA de indivíduos contrastantes da população F₂ oriundos do cruzamento entre IT97K-499-35 e Canapu T16.

RESULTADOS

Os fragmentos de AFLP E.AAC/M.CCC₅₁₅, E.AAA/M.CAG₃₅₂ e E.AGG/M.C-TT₂₈₀ excisados e reamplificados em gel de agarose apresentaram tamanhos de 300 pb, 250 pb e 200 pb, respectivamente. Os comprimentos em pares de base aproximaram-se dos estimados no gel de poliacrilamida, exceto o do fragmento E.AAC/M.CCC₅₁₅ (Fig. 2).



Figura 2. Fragmentos reamplificados de marcadores AFLP, o primeiro poço contém *Ladder* de 100 pb, seguido de três fragmentos oriundos da combinação E.AAA/M.CAG₃₅₂, E.AGG/M.CTT₂₈₀, E.AAC/M.CCC₅₁₅ e *Ladder* de 50 pb, visualizados em gel de agarose a 1,6% (p/v).

O alinhamento dos fragmentos do amplicon E.AAC/M.CCC₅₁₅ encontra-se na Figura 3, assim como as sequências utilizadas no desenho dos *primers* SCAR. As sequências do fragmento E.AGG/M.CTT₂₈₀ não foram alinhadas, pois os adaptadores não se encontravam nos dados fornecidos pelo sequenciamento, razão pela qual foram desconsideradas na obtenção dos *primers*. Apesar dos adaptadores não terem sido encontrados na maioria das sequências do fragmento E.AAA/M.CAG₃₅₂ (Fig.4) estas foram utiliza-

das na síntese dos *primers*. A identidade foi estimada em 57 % e 40 % para E.AAC/M.CCC₅₁₅ e E.AAA/M.CAG₃₅₂, respectivamente.

```

ACTGene281_G06ul.ab1      -----GAG-TGCTCACCTCTTGG-ATAGCAGAGA
ACTGene281_G08ul.ab1      -----TGAGGGGCTCACTTCATGGGATAGCAGAAA
ACTGene281_G10ul.ab1      -----TGGGGTGCTCACT-CTTGG-ATAGCAGAAA
ACTGene281_G05ul.ab1      GATGAGTCCTAAGTAACCCCTGAAGGTGCTCAAT-CATGG-ATAGCAGAAA
ACTGene281_G071ul.ab1     GATGAGTCCTGAGTAACCCTGAAGGTGCTCAAT-CATGG-ATAGCAGAAA
                               . .*  *****.  *:***  *****.*

ACTGene281_G06ul.ab1      TTGAG-ACTTTTTTCATCGCAATGACGTGTGCAGATGCAA-TAGAGTCACA
ACTGene281_G08ul.ab1      TTGAGAAAATTTTCATCGCAATGACGTGTGCAGATGCAATAGAGTCACA
ACTGene281_G10ul.ab1      TTGAGATATTTTTTCATCGCAATGCCGTGTGCTGATGCAAATAGAGTCACA
ACTGene281_G05ul.ab1      TTGAGAAAAATTTTCATCGCAATGACGTGTGCAGATGCAAATAGAGTCACA
ACTGene281_G071ul.ab1     TTGAGAAAAATTTTCATCGCAATGACGTGTGCAGATGCAAATAGAGTCACA
                               *****  .: :*****.*****:*****  *****

ACTGene281_G06ul.ab1      TTTGCTACATTTATGCTCGTTGAAGAAGCTGAAAACTGGTGGAGATTTAC
ACTGene281_G08ul.ab1      TTTGCTACATTTATGCTCGTTGAAGAAGCTGAAAACTGGTGGAGATTTAC
ACTGene281_G10ul.ab1      TTTGCTACATTTATGCTCGTTGAAGAAGCTGAAAACTGGTGGAGATTTAC
ACTGene281_G05ul.ab1      TTTGCTACATTTATGCTCGTTGAAGAAGCTGAAAACTGGTGGAGATTTAC
ACTGene281_G071ul.ab1     TTTGCTACATTTATGCTCGTTGAAGAAGCTGAAAACTGGTGGAGATTTAC
                               *****

ACTGene281_G06ul.ab1      AAAACAACAATTGGAGGATGAAGGGAGACAAATTACTTGGGAAGCCTTCA
ACTGene281_G08ul.ab1      AAAACAACAATTGGAGGATGAAGGGAGACAAATTACTTGGGAAGCCTTCA
ACTGene281_G10ul.ab1      AAAACAACAATTGGAGGATGAAGGGAGACAAATTACTTGGGAAGCCTTCA
ACTGene281_G05ul.ab1      AAAACAACAATTGGAGGATGAAGGGAGACAAATTACTTGGGAAGCCTTCA
ACTGene281_G071ul.ab1     AAAACAACAATTGGAGGATGAAGGGAGACAAATTACTTGGGAAGCCTTCA
                               *****

ACTGene281_G06ul.ab1      AACAAAAGTTTCTGGAAAAATATTTTCCAGAGGATCTTCGAAGGAGGAAA
ACTGene281_G08ul.ab1      AACAAAAGTTTCTGGAAAAATATTTTCCAGAGGATCTTCGAAGGAGGAAA
ACTGene281_G10ul.ab1      AACAAAAGTTTCTGGAAAAATATTTTCCAGAGGATCTTCGAAGGAGGAAA
ACTGene281_G05ul.ab1      AACAAAAGTTTCTGGAAAAATATT-ACCAGAGGATCT-CGGAGGAGAAA-
ACTGene281_G071ul.ab1     AACAAAAGTTTCTGGAAAAATATT-ACCAGAGGATCT-CGGAGC-----
                               *****  :*****  **.*

ACTGene281_G06ul.ab1      GAAGTTGAATTGGG-TACGCAGTC
ACTGene281_G08ul.ab1      GAAGTTGAATTGGGGTACGCAGTC
ACTGene281_G10ul.ab1      GAAGTTGAATTGGT--ACGCAGTC
ACTGene281_G05ul.ab1      -----
ACTGene281_G071ul.ab1     -----

```

Figura 3. Alinhamento de cinco fragmentos sequenciados do amplicon E.AAC_M.CCC₅₁₅. Sequências em vermelho, verde e azul correspondem as combinações de *primers* SCAR31_39A R e F, SCAR31_39B R e F e SCAR31_39C R e F, respectivamente. Identidade dos fragmentos de 57%.

```

e281_H08.ab1 -----
e281_H07.ab1 GATGAGTCCTGAGGAGCTCCACAGAGTTTCTTAAGCTGGGAACATGTCTGGTCAGCCGCC
e281_H12.ab1 -----
e281_H09.ab1 -----
e281_H11.ab1 -----

e281_H08.ab1 -----
e281_H07.ab1 ATCATTCTCGGCGCTACCCAGCAAAACAGACTCAGTCAAATGAGAAGGATGAGTGACG
e281_H12.ab1 -----
e281_H09.ab1 -----
e281_H11.ab1 -----TCGTTGACG

e281_H08.ab1 -----GATGAGTCCTGAGTAACTTATTTGTATCGTAATAATGGAC
e281_H07.ab1 AGTCCTTCTTAACTCCTGATGATGAGTCCTGAGTAACTGATTTGTATCGTACTAATGGAT
e281_H12.ab1 -----GATGAGTCCTGAGTAACTGATACATATCGTAACAATGGAT
e281_H09.ab1 -----GATGAGTCCTGAGTAACTGGTATGTATCGTTCTAATGGAA
e281_H11.ab1 AGTCTAGGGTTACGCTCCTTGATGTTTCTGAGTAACTGATCAGTATCGTTGTAATGGAT
          ****: ***** . * .*****: *****

e281_H08.ab1 GCGGGCTCTCTCTTTTCATACCAGAAACCTCA-TTTGGGGGTGCGAATCAGAAGCGGAGAG
e281_H07.ab1 GCGGCTTCTCTCTTTTCATATCATAAACGTCA-TTTGGGCGTTTGAATCAGAAGCGGAGAG
e281_H12.ab1 GTGTGTGCTCTG-AACATACCATAATCGCCC-TTTCGGCGT-TGAACCAGAAGCGGAGAG
e281_H09.ab1 GTGGGTTCTGGG-AACATACGATAACTGTCAGTTTGGGGGGATCAATCCGAAGCGGAGCC
e281_H11.ab1 GTGGGTTTCTCTTTTCATTC-ATAATCCCCA-TTTGGGCGA-TGAATCAGAAGCT-TCCC
          * * * * :;***: * ** * . *** * * * * * .***** : .

e281_H08.ab1 ATGGATG-GGC-CAACACATGATGAG-TCCTGAG-----
e281_H07.ab1 ATGCATC-GGAGCAACAATGATGAG-TCCTGAGTACCTCGATACG--
e281_H12.ab1 ATGGATC-GGG-CAACAACTGATGAG-ACCTGAGTAAGTCCAAGCATT
e281_H09.ab1 TCGCATC-GATGCACCACATGATGAGACCCTGAGTAAGCATTCTCGC-
e281_H11.ab1 CCGCATCGGGTACTCTAGGTGATGAG-TCC-----
          * * * * . * :. * ***** **

```

Figura 4. Alinhamento de cinco fragmentos sequenciados do amplicon E.AAA/M.CAG₃₅₂. Seqüências em marrom, vermelho, sublinhada, azul e verde correspondem as combinações de primers SCAR38_38D R e F, SCAR38_38E R e F, SCAR38_38F R e F, SCAR38_38G R e F e SCAR38_38H R e F, respectivamente. Identidade dos fragmentos de 40%.

A partir dos alinhamentos realizados, foram desenhados oito pares de *primers* SCARs, destes, três pares de *primers* foram derivados do fragmento E.AAC/M.CCC₅₁₅ e cinco do fragmento E.AAA/M.CAG₃₅₂. As temperaturas de anelamento variaram de 52 a 68 °C e o comprimento, de 18 a 23 pares de bases (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências das combinações de *primers* SCARs desenhados a partir de marcadores AFLP, tamanho (pb), temperatura de anelamento (T_a), e presença de polimorfismo. Petrolina, 2010.

Código do <i>primer</i>	Sequência dos <i>Primers</i> F e R (5'3')	Tamanho	T_a	Polimórfico
		(pb)	(°C)	
SCAR31_39A_F	5'- TAACTTATTTGTATCGTAAT -3'	20 mer	68	Não
SCAR31_39A_R	5'-TTGTTTGAAGGCTTCCCAAG-3'	20mer		
SCAR31_39B_F	5'-TAACCCTGAAGGTGCTCAAT-3'	20mer	68	-
SCAR31_39B_R	5'-AATTCAACTTCTTTCCTCC-3'	19mer		
SCAR31_39C_F	5'-TTTTTCATGCCAATGACGTGT-3'	20mer	68	Não
SCAR31_39C_R	5'-TTCCAGAACTTTTGTTTGAAGG-3'	23mer		
SCAR38_38D_F	5'-TAACTGGTATGTATGGTTCT-3'	20 mer	52	Sim
SCAR38_38D_R	5'-ATGTGGTGCATGGATGCGA-3'	19 mer		
SCAR38_38E_F	5'-TAACTGATCAGTATCGTTGT-3'	20mer	52	-
SCAR38_38E_R	5'-ACCTAGAGTACCCGATGCGG-3'	20mer		
SCAR38_38F_F	5'-TAACTGATTTGTATGGTACT-3'	20mer	52	Não
SCAR38_38F_R	5'-ATTTGTTGCTCCGATGCAT-3'	19mer		
SCAR38_38G_F	5'-TAACTGATACATATCGTAAC-3'	20mer	52	Não
SCAR38_38G_R	5'-AGTTGTTGCCCGATGCAT-3'	18 mer		
SCAR38_38H_F	5'-TAACTTATTTGTATGGTAAT-3'	20 mer	52	Não
SCAR38_38H_R	5'-ATGTGTTGGCCCATCCAT-3'	18mer		

Apesar da proximidade do marcador E.AAC/M.CCC₅₁₅ com o loco de interesse (4,3 cM), dos três pares de *primers* SCAR derivados desse marcador dois foram monomórficos e um não amplificou, quando analisados em indivíduos resistentes e susceptíveis da população F₂ (Fig 5). Das cinco combinações provenientes do marcador E.AAA/M.CAG₃₅₂ (Fig.6), apenas um par de *primer* apresentou polimorfismo (Fig.7).

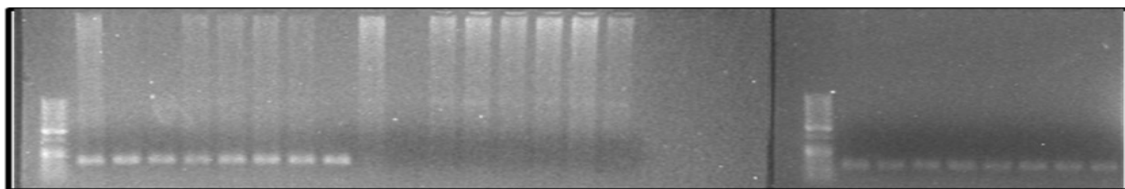


Figura 5. Amplificação das combinações de iniciadores SCAR31_39A, SCAR 31_39B e SCAR31_39C R e F derivadas do marcador E.AAC/M.CCC₅₁₅.

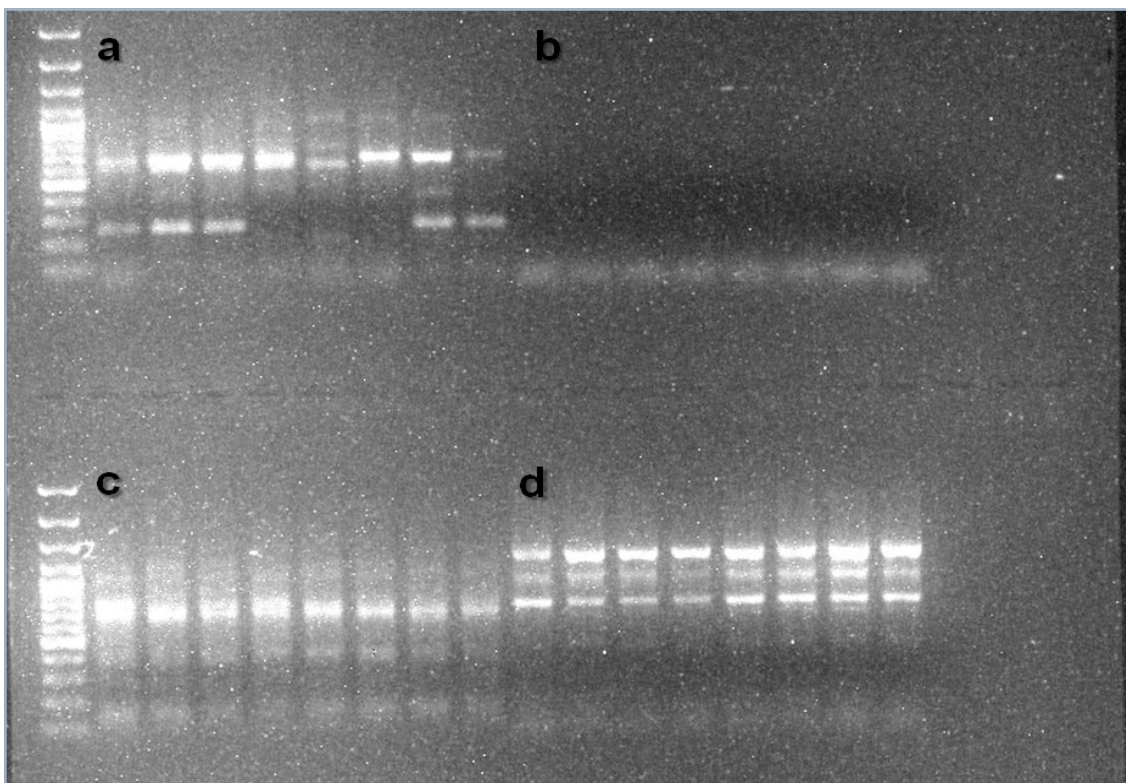


Figura 6. Amplificação das combinações de iniciadores SCARs, SCAR38_38D (a), SCAR38_38E (b), SCAR38_38F (c), SCAR38_38G (d) e SCAR38_38H (e) R e F, derivadas do marcador E.AAA/M.CAG₃₅₂ .

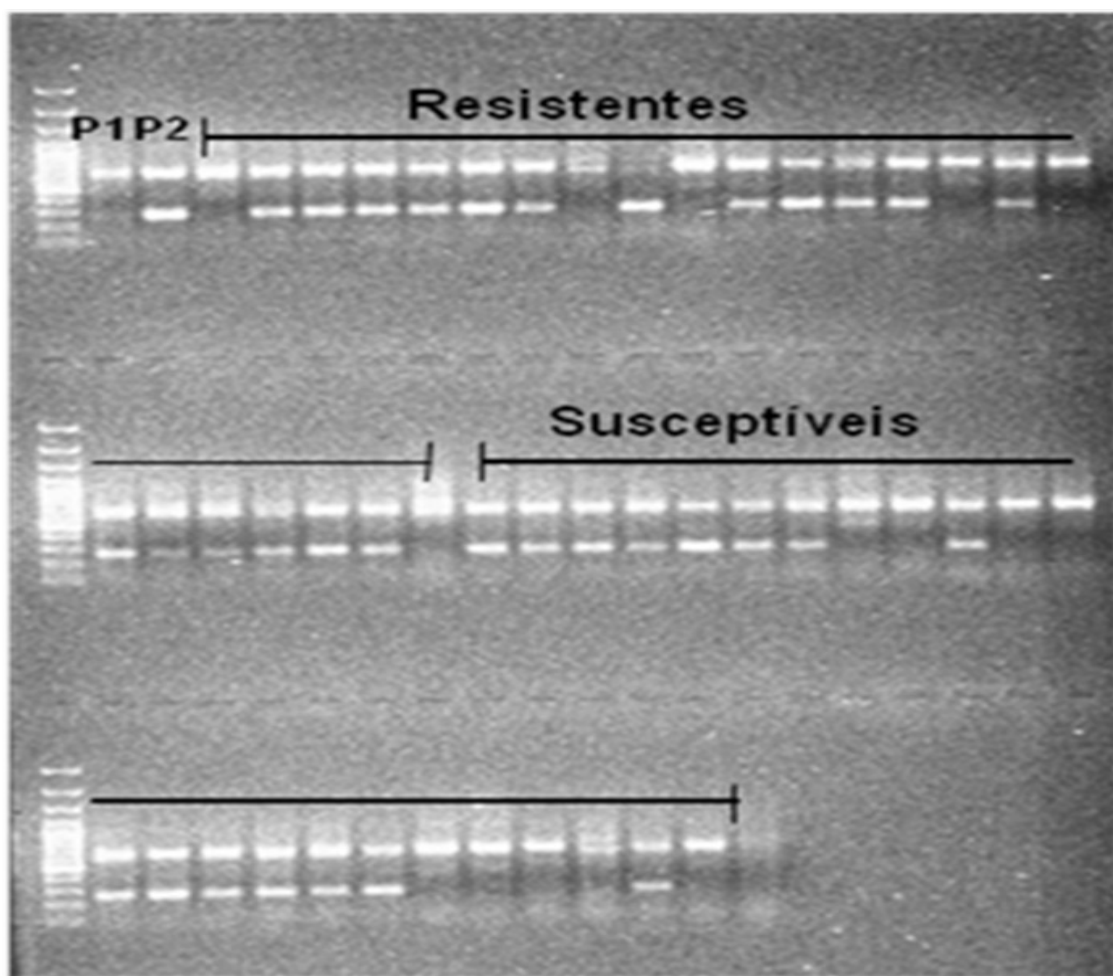


Figura 7. Reação de PCR com o par de iniciadores SCAR 38_38D, Ladder, parental resistente (P1), susceptível (P2) e indivíduos F₂ resistentes e susceptíveis, respectivamente.

DISCUSSÃO

A técnica AFLP tem sido largamente utilizada em estudos de genes resistentes a pragas e doenças em várias espécies vegetais. A conversão de marcas AFLP em marcadores PCR-específicos, como SCAR, para determinado loco de interesse agrônômico amplia a sua aplicação em larga escala no melhoramento assistido por marcadores.

A excisão dos fragmentos AFLP dos géis de poliacrilamida, reamplificação e visualização em gel de agarose realizadas no presente trabalho foi tão eficiente quanto o trabalho realizado por Santos e Simon, (2002) que utilizaram fósforo 33 para revelação dos marcadores AFLP. No presente estudo, a coloração com nitrato de prata foi bastante eficiente, tendo a vantagem de não ser radioativo como o fósforo 33.

A qualidade do sequenciamento não foi satisfatória, o que limitou a aplicação dos resultados obtidos, como no caso dos dados fornecidos pelo amplicon E.AGG/M.CTT₂₈₀, que não foram utilizados na síntese dos *primers* SCAR devido à não localização dos adaptadores AFLP. Apesar de terem sido desenhados mais de um par de *primers* para os fragmentos AFLP sequenciados, não foi possível obter a mesma segregação observada na análise AFLP, resultado que pode ser atribuído à má qualidade do sequenciamento.

Em estudo realizado por Santos e Simon (2002), foram sequenciados trinta e um fragmentos AFLP de uma população F₂ de cenoura, sendo que vinte e seis (84%) tiveram identidade superior a 91% e cinco deles apresentaram identidade completa de 100%. Esses resultados indicam que fragmentos AFLP, quando sequenciados, podem ser facilmente alinhados com um grau de identidade satisfatório. A identidade obtida nos fragmentos E.AAC/M.CCC₅₁₅, E.AAA/M.CAG₃₅₂ (57% e 40%) deste trabalho foi inferior à obtida por Santos e Simon (2002).

Na literatura, estudos relacionados ao desenvolvimento de SCAR em feijão caupi foram realizados com sucesso, como é o caso do estudo realizado por Boukar et al. (2004), no qual um fragmento de 115 pb, proveniente do marcador AFLP E-ACT/M-CTC, ligado ao gene de resistência *Rsg1* a *S. gesneriodes*, estimado a 3,2 cM de distância, foi convertido com sucesso no SCAR SEACTM-CAC83/85. Marcadores ISSR também foram convertidos em marcadores SCAR em estudo realizado por Soufremanien & Golakrishna (2006). O marcador ISSR811₁₃₅₇, ligado ao gene de resistência a virose *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) foi identificado em uma população de linhagens recombinantes (RIL) segregando para suscetibilidade e resistência em *V. mungo*, sendo posteriormente sequenciado e convertido nos marcadores SCAR MYMV-F e MYMV-R. Os marcadores SCAR foram validados em diversos genótipos de *V. Mungo* mostrando-se eficientes na identificação de plantas susceptíveis e resistentes à virose.

No presente estudo, das três combinações SCARs oriundas do marcador E.AAC/M.CCC₅₁₅, que se encontra a 4,3 cM do gene de resistência, duas amplificaram bandas monomórficas nos indivíduos resistentes e susceptíveis e uma não amplificou (Fig. 3). Resultados semelhantes foram obtidos para as cinco combinações de SCARs resultantes do fragmento E.AAA/M.CAG₃₅₂, com exceção da combinação dos iniciadores SCAR38_38D F e R que, apesar de apresentar polimorfismos entre os parentais, não foi eficiente em diferenciar indivíduos susceptíveis e resistentes (Fig.5).

Esforços no intuito de desenvolver marcadores SCARs capazes de diferenciar indivíduos resistentes e susceptíveis a partir das marcas AFLP obtidas no mapeamento do gene que confere resistência ao mosaico dourado continuam sendo realizados. A inabilidade dos marcadores obtidos em fornecer bandas polimórficas que segreguem com a característica estudada pode ter tido causas variadas, dentre as quais, os dados obtidos no sequenciamento, tendo em vista que foi impossível, em algumas sequências, identificar os adaptadores, bem como fazer o alinhamento pelas sequências reversas.

Em virtude disso, a metodologia da obtenção de marcadores SCARs foi reiniciada a partir da excisão dos fragmentos relacionados com a resistência do gel de poliacrilamida, assim como a reamplificação dos mesmos com seus respectivos *primers* de origem e visualização em gel de agarose. As etapas do sequenciamento e desenho dos *primers*, por serem mais laboriosas e dispendiosas, ainda encontram-se em andamento.

CONCLUSÕES

Os marcadores SCAR gerados no presente estudo não reproduzem a mesma segregação observada pelos marcadores AFLP, mostrando-se inviáveis para uso na seleção assistida por marcadores.

REFERÊNCIAS

- BLAIR, M. W.; RODRIGUEZ, L. M.; PEDRAZA, F.; MORALES, F.; BEEBE, S. Genetic mapping of bean golden yellow mosaic gemonivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistanc in commom bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, n. 4, p. 261-271, 2002.
- BOUKAR, O.; KONG, L.; SINGH, B. B.; MURDOCK, L.; OHM, W. H. AFLP and AFLP-Derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea, **Crop science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 1259-1264, 2004.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J.A.A, F.M.P.; RIBEIRO,V.Q. **Feijão caupi**: avanços tecnológicos. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.
- JONG, W. de; FORSYTH. A.; LEISTER, D.; GEBHARDT, C.; BAULCOMBE, D. C. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 1-2, p. 246–252, 1997.
- MERKSEM, S.; RUBEN, E.; HYTEN, D.; TRIWITAYAKORN, K.; LIGHFOOT, D. A. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 265, n. 2, p. 207-214, 2001.
- OLSON, M.; HOOD, L.; CANTOR, C.; DOTSTEIN, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. **Science**, v. 245, p.1434-1435, 1989.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.
- QUÉDRAOGO, T. J.; MAHESHWARI, V.; BERNER., K. D.; ST-PIERRE., A. C.; BELZILE, F.; TIMKO, P. M. Identification of AFLP markers linked to resistance os cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, n. 6-7, p. 1029-1036, 2001.
- QUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; JEAN, M.; CLOSE, T. J.; EHLERS, J. D.; HALL, A. E.; GILLASPIE, A.G.; ROBERTS, P. A.; ISMAIL, A. M.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M. P.; BELZILE, F. J. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 1, p. 175-188, 2002.
- SANTOS, A. A. dos.; FREIRE-FILHO, F. R. Redução da produção do feijão massacar causado pelo vírus do mosqueado amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, n. 2, p. 407, 1984.
- SANTOS, C. A. F.; SIMON, F. W. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F2 population of carrot. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 195-201, 2002.

SINGH, B. B.; CHAMBLISS, O. L.; SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. **Advances in cowpea research**. Ibadan: IITA, 1997. p. 31-32.

SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. ISSR and SCAR markers linked to the *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, p. 619-622, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

Os dados de segregação na população F_2 sugerem que a tolerância ao GMCV é controlada por um único gene de caráter dominante.

Os marcadores AFLP combinados com a técnica BSA mostram-se úteis na construção de mapas de ligação em feijão caupi.

Os marcadores AFLP gerados com a enzima EcoRI mostram-se mais polimórficos, sendo mais indicados em estudos moleculares em feijão caupi do que aqueles gerados pela enzima PstI.

Obtiveram-se três marcadores ligados ao gene de resistência, entre os quais dois flanqueando o gene, aumentando a eficiência de seleção.

Os marcadores SCAR gerados não reproduzem a mesma segregação observada pelos marcadores AFLP.

ANEXOS

Anexo I: Número de bandas monomórficas e polimórficas para as combinações de *primer* EcoRI e MseI avaliadas na população F₂ IT97K-499-35 x Canapu T16 Petrolina, Pe, 2011.

Combinação de <i>primers</i> EcoRI/MseI	Nº de bandas monomórficas entre os <i>Bulks</i> R e S	Nº de bandas polimórficas entre os <i>Bulk</i> R e S	Combinação de <i>primers</i> EcoRI/MseI	Nº de bandas monomórficas entre os <i>Bulks</i> R e S	Nº de bandas polimórficas entre os <i>Bulk</i> R e S
E.AAC/M.CAA	31	-	E.ACT/M.CTA	25	-
E.AAC/M.CAC	24	-	E.ACT/M.CTC	23	-
E.AAC/M.CAG	26	-	E.ACT/M.CTG	18	-
E.AAC/M.CAT	26	-	E.ACT/M.CTT	19	-
E.AAC//M.CTA	24	-	E.ACT/M.CCC	25	-
E.AAC/M.CTC	20	-	E.ACT/M.CGG	34	-
E.AAC/M.CTG	17	2	E.AGC/M.CAA	29	1
E.AAC/M.CTT	5	-	E.AGC/M.CAC	16	1
E.AAC/M.CCC	11	1	E.AGC/M.CAG	14	-
E.AAC/M.CGG	39	-	E.AGC/M.CAT	17	-
E.AAG/M.CAA	39	-	E.AGC/M.CTA	16	-
E.AAG/M.CAC	24	-	E.AGC/M.CTC	14	-
E.AAG/M.CAG	24	-	E.AGC/M.CTG	12	-
E.AAG/M.CAT	24	-	E.AGC/M.CTT	18	-
E.AAG/M.CTA	38	-	E.AGC/M.CCC	17	-
E.AAG/M.CTC	32	1	E.AGC/M.CGG	19	-
E.AAG/M.CTG	18	-	E.AGG/M.CAA	15	-
E.AAG/M.CTT	30	-	E.AGG/M.CAC	10	3
E.AAG/M.CCC	32	-	E.AGG/M.CAG	10	-
E.AAG/M.CGG	25	-	E.AGG/M.CAT	12	-
E.ACA/M.CAA	27	-	E.AGG/M.CTA	12	-
E.ACA/M.CAC	25	-	E.AGG/M.CTC	5	-
E.ACA/M.CAG	27	1	E.AGG/M.CTG	12	-
E.ACA/M.CAT	20	2	E.AGG/M.CTT	17	3
E.ACA/M.CTA	27	-	E.AGG/M.CCC	12	-
E.ACA/M.CTC	30	-	E.AGG/M.CGG	21	-
E.ACA/M.CTG	17	-	E.ATT/M.CAA	16	2
E.ACA/M.CTT	34	-	E.ATT/M.CAC	20	-
E.ACA/M.CCC	20	-	E.ATT/M.CAG	17	-
E.ACA/M.CGG	31	-	E.ATT/M.CAT	25	-
E.ACC/M.CAA	16	-	E.ATT/M.CTA	11	-
E.ACC/M.CAC	15	-	E.ATT/M.CTC	17	-
E.ACC/M.CAG	16	-	E.ATT/M.CTG	14	-
E.ACC/M.CAT	16	-	E.ATT/M.CTT	15	-
E.ACC/M.CTA	18	-	E.ATT/M.CCC	13	-
E.ACC/M.CTC	23	-	E.ATT/M.CGG	23	-
E.ACC/M.CTG	12	-	E.AAA/M.CAA	31	-
E.ACC/M.CTT	21	-	E.AAA/M.CAC	23	-
E.ACC/M.CCC	19	-	E.AAA/M.CAG	17	1
E.ACC/M.CGG	16	-	E.AAA/M.CAT	34	1
E.ACG/M.CAA	20	-	E.AAA/M.CTA	18	-
E.ACG/M.CAC	14	-	E.AAA/M.CTC	20	-
E.ACG/M.CAG	13	-	E.AAA/M.CTG	20	-
E.ACG/M.CAT	11	-	E.AAA/M.CTT	37	-
E.ACG/M.CTA	12	-	E.AAA/M.CCC	21	-
E.ACG/M.CTC	15	-	E.AAA/M.CGG	40	-
E.ACG/M.CTG	10	2	E.ACT/M.CAA	15	-
E.ACG/M.CTT	15	-	E.ACT/M.CAC	15	-
E.ACG/M.CCC	9	1	E.ACT/M.CAG	15	-
E.ACG/M.CGG	15	-	E.ACT/M.CAT	30	-

Anexo II: Número de bandas monomórficas e polimórficas para as combinações de *primer* PstI e MseI avaliadas na população IT97K-499-35 x Canapu T16 Petrolina, Pe, 2011.

Combinação de <i>primers</i> PstI/MseI	Nº de bandas monomórficas entre os <i>Bulks</i> R e S	Nº de bandas polimórficas entre os <i>Bulk</i> R e S	Combinação de <i>primers</i> PstI/MseI	Nº de bandas monomórficas entre os <i>Bulks</i> R e S	Nº de bandas polimórficas entre os <i>Bulk</i> R e S
P.GGA/M.CAA	36	-	P.GCT/M.CAA	33	-
P.GGA/M.CAC	23	-	P.GCT/M.CAC	21	-
P.GGA/M.CAG	24	-	P.GCT/M.CAG	23	1
P.GGA/M.CAT	18	-	P.GCT /M.CAT	27	-
P.GGA/M.CTA	14	-	P.GCT /M.CTA	21	-
P.GGA/M.CTC	13	-	P.GCT /M.CTC	27	-
P.GGA/M.CTG	26	-	P.GCT /M.CTG	21	-
P.GGA/M.CTT	29	-	P.GCT /M.CTT	19	-
P.GGA/M.CCC	20	-	P.GCT /M.CCC	20	-
P.GGA/M.CGG	34	2	P.GCT/M.CGG	27	-
P.GGT/M.CAA	19	-	P.GCG/M.CAA	10	-
P.GGT/M.CAC	14	-	P.GCG/M.CAC	14	-
P.GGT/M.CAG	19	-	P.GCG/M.CAG	17	-
P.GGT/M.CAT	13	1	P.GCG/M.CAT	8	-
P.GGT/M.CTA	16	-	P.GCG/M.CTA	10	-
P.GGT /M.CTC	10	-	P.GCG/M.CTC	16	-
P.GGT/M.CTG	16	-	P.GCG M.CTG	14	-
P.GGT /M.CTT	16	-	P.GCG /M.CTT	6	-
P.GGT/M.CCC	12	-	P.GCG/M.CCC	15	-
P.GGT/M.CGG	12	-	P.GCG M.CGG	7	-
P.GGG/M.CAA	10	-	P.GCC/M.CAA	15	-
P.GGG/M.CAC	12	-	P.GCC/M.CAC	-	-
P.GGG/M.CAG	15	-	P.GCC/M.CAG	18	-
P.GGG/M.CAT	17	-	P.GCC/M.CAT	21	1
P.GGG/M.CTA	12	-	P.GCC/M.CTA	16	-
P.GGG/M.CTC	12	-	P.GCC /M.CTC	15	-
P.GGG/M.CTG	12	-	P.GCC/M.CTG	22	-
P.GGG/M.CTT	16	-	P.GCC /M.CTT	12	-
P.GGG/M.CCC	-	-	P.GCC M.CCC	11	-
P.GGG/M.CGG	24	-	P.GCC/M.CGG	25	-
P.GGC/M.CAA	22	-	P.GAG/M.CAA	21	1
P.GGC/M.CAC	15	-	P.GAG/M.CAC	15	-
P.GGC/M.CAG	13	-	P.GAG/M.CAG	22	-
P.GGC/M.CAT	15	-	P.GAG/M.CAT	25	-
P.GGC/M.CTA	10	-	P.GAG/M.CTA	15	-
P.GGC M.CTC	12	-	P.GAG/M.CTC	12	-
P.GGC/M.CTG	9	-	P.GAG/M.CTG	12	-
P.GGC /M.CTT	14	-	P.GAG/M.CTT	24	-
P.GGC/M.CCC	12	-	P.GAG/M.CCC	13	-
P.GGC/M.CGG	17	-	P.GAG/M.CGG	22	1
P.GCA/M.CAA	35	-	P.GAT/M.CAA	24	-
P.GCA M.CAC	33	-	P.GAT/M.CAC	15	-
P.GCA/M.CAG	38	-	P.GAT/M.CAG	14	-
P.GCA/M.CAT	30	-	P.GAT/M.CAT	15	-
P.GCA/M.CTA	29	-	P.GAT/M.CTA	27	-
P.GCA/M.CTC	22	1	P.GAT /M.CTC	14	-
P.GCA/M.CTG	25	-			
P.GCA /M.CTT	29	-			
P.GCA/M.CCC	24	-			
P.GCA/M.CGG	27	-			