



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS

LUCAS MATIAS GOMES MESSIAS

**Melhoramento genético do feijão-comum assistido por  
marcadores moleculares: identificação, caracterização,  
mapeamento e piramidação de alelos de resistência a doenças**

GOIÂNIA  
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese       Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

**Exemplos:** Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Lucas Matias Gomes Messias

#### 3. Título do trabalho

MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-COMUM ASSISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES: IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, MAPEAMENTO E PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Matias Gomes Messias, Discente**, em 20/03/2023, às 20:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza, Usuário Externo**, em 24/03/2023, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3610758** e o código CRC **A90F2F2B**.

LUCAS MATIAS GOMES MESSIAS

**Melhoramento genético do feijão-comum assistido por marcadores moleculares: identificação, caracterização, mapeamento e piramidação de alelos de resistência a doenças**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.

Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Linha de pesquisa: Melhoramento de Espécies Cultivadas

Orientador:

Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza

Coorientadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcela Pedroso Mendes Resende

GOIÂNIA  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Messias, Lucas Matias Gomes

Melhoramento genético do feijão-comum assistido por marcadores moleculares [manuscrito] : identificação, caracterização, mapeamento e piramidação de alelos de resistência a doenças / Lucas Matias Gomes Messias. - 2023.

CIX, 109 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza; co orientadora Marcela Pedroso Mendes Resende.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2023.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui fotografias, gráfico, tabelas.

1. Phaseolus vulgaris L.. 2. Colletotrichum lindemuthianum. 3. Pseudocercospora griseola. 4. Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli. 5. melhoramento molecular. I. de Souza, Thiago Lívio Pessoa Oliveira, orient. II. Título.

CDU 633



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

## ESCOLA DE AGRONOMIA

## ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº PPGGMP/002/2022 da sessão de Defesa de Tese de **Lucas Matias Gomes Messias** que confere o título de **Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas**, na área de concentração em **Genética e Melhoramento de Plantas**.

Aos onze dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e dois, a partir das oito horas, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-COMUM ASSISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES: IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, MAPEAMENTO E PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Doutor Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza (Embrapa Arroz e Feijão) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutora Rosana Pereira Vianello (Embrapa Arroz e Feijão), membro titular externo, Doutor Leonardo Cunha Melo (Embrapa Arroz e Feijão), membro titular externo, Professora Bruna Mendes de Oliveira (EA/UFG), membro titular interno e Doutor Helton Santos Pereira (Embrapa Arroz e Feijão), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **APROVADO** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Doutor Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos onze dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e dois.

## TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Mendes De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2022, às 12:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza, Usuário Externo**, em 11/10/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Cunha Melo, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helton Santos Pereira, Usuário Externo**, em 14/10/2022, às 07:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Rosana Pereira Vianello, Usuário Externo**, em



17/10/2022, às 07:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3252403** e o código CRC **94A79467**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.055881/2022-91

SEI nº 3252403

## **DEDICO**

Aos meus avós maternos, José Inácio Filho e Adélia Inácio Damasceno (*in memoriam*) e aos meus avós paternos, Antônio Gomes da Abadia e Maria Benedita Gomes (*in memoriam*).

## **OFEREÇO**

À minha esposa, Karoline, ao meu filho, Matteo, aos meus pais, Sônia e Manoel, aos meus irmãos, Samuel e Ester, ao meu sobrinho, João Manoel, e as minhas sobrinhas, Valentina e Catarina, vocês são a força motriz da minha vida.

*“A coragem está um passo à frente do medo”*

*Coleman Young*

## AGRADECIMENTOS

Para começar, agradeço a Deus, por ter guiado meu caminho até aqui, abrindo portas que me possibilitaram concluir mais essa etapa.

À minha esposa, Karoline Messias da Silva Gomes, mesmo sabendo das dificuldades, foi paciente, companheira, compreensiva, atenciosa e carinhosa durante toda essa caminhada, desde a graduação. Não mediu esforços para estar ao meu lado a todo momento, sempre passando confiança nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Manoel Gomes da Abadia e Sônia Maria Matias, e meus irmãos, Samuel Antônio Matias Gomes e Ester Matias Gomes, que sempre acreditaram em meus sonhos e apoiaram-me a todo momento.

Ao meu orientador, Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza, por sempre instigar o pensamento crítico, trazendo um olhar mais amplo dos desafios do dia a dia. As conversas que tivemos tanto presencialmente quanto à distância contribuíram muito para meu aprendizado. Pelos ensinamentos, apoio, paciência, conselhos, meus sinceros agradecimentos.

Meu agradecimento especial para a Dr. Rosana Pereira Vianello, uma pesquisadora que admiro e respeito. Agradeço pela parceria, pela disponibilidade em tirar minhas dúvidas, pelos ensinamentos, pelas valiosas correções realizadas em projetos, resumos e artigos.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela Pedroso Mendes Resende, por todo apoio, disponibilidade e, principalmente, pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - PPGGMP, pelos conhecimentos passados durante o período do doutorado, especialmente, ao Prof. Alexandre Coelho, embora muito requisitado sempre conseguiu um tempinho na sua agenda para tirar minhas dúvidas (muitas) sobre as análises.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Rosana Pereira Vianello (Embrapa Arroz e Feijão), Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna Mendes de Oliveira (EA-UFG), Dr. Leonardo Cunha Melo (Embrapa Arroz e Feijão) e Dr. Helton Santos Pereira (Embrapa Arroz e Feijão), pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições na melhoria do presente trabalho.

Aos membros do grupo de pesquisa ‘Melhor Feijão’, pela ajuda nas coletas de campo (Laysla Coelho, Carlos Silva, Sâmela Cavalheiro, Eduardo, Saulo Muniz, Érica Munique), nos experimentos em casa de vegetação (Joney Monteiro-Júnior, Ariela) e em laboratório (Laysla Coelho, Joney Monteiro-Júnior, Sandy, Ariela, José Antônio Paixão), pelos momentos de troca de conhecimento e pelos momentos de descontração que compartilhamos.

Aos colaboradores do setor de Melhoramento de Feijão: Mariana Magaldi pelas inúmeras solicitações de sementes ao Banco Ativo de Germoplasma e por sempre conseguir espaço nas casas de vegetação para eu conduzir os experimentos; Adriano Knupp pela amizade e parceria; Lázaro e Manga por estarem sempre prontos para ajudar; Antônio Cosme, Juraci e Paulinho pela realização de incontáveis cruzamentos, sempre entregando altas taxas de pegamento.

Aos colaboradores do laboratório de Biotecnologia, Zezinho, Gesimária Coelho, Paula Valdisser, Sylvana, Fernanda e, especialmente, a Luana Alves Rodrigues, por todo o treinamento de laboratório que me foi passado e por sua grande capacidade em transmitir conhecimento.

Aos colaboradores do laboratório de Fitopatologia, Gustavo Bezerra pelas nossas conversas e troca de conhecimento e, principalmente, ao Ronair, que foi o braço direito tanto no laboratório, ajudando no preparo de inóculo, como na instalação dos experimentos e nas avaliações fenotípicas, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Francisco José Becker Reifschneider, ao Dr. Werito Fernandes de Melo e à Dra. Cláudia Silva da Costa Ribeiro, por acreditarem no meu potencial quando ainda era estudante do curso técnico agrícola na Escola Agrotécnica Federal de Ceres (EAFCE). A oportunidade de estágio na Embrapa Hortaliças, em 2010, foi meu primeiro contato com Melhoramento de Plantas, área do conhecimento que segui até o doutorado.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram nessa caminhada, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>26</b>
<b>3 GENETIC MAPPING OF THE ANDEAN ANTHRACNOSE RESISTANCE GENE PRESENT IN THE COMMON BEAN CULTIVAR BRSMG REALCE* .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>41</b>
<b>4 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PARENTAL LINES AND VALIDATION OF SNP MARKERS FOR ANTHRACNOSE AND ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN* .....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>56</b>
<b>5 PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, MANCHA-ANGULAR, MURCHA DE FUSARIUM EM FEIJÃO CARIOCA COM ESCURECIMENTO LENTO DOS GRÃOS .....</b>	<b>56</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>58</b>
<b>6 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
7.1 Material genético e alelos-alvo .....	64
7.2 Sistema de cruzamentos e avanço de gerações .....	65
7.3 Seleção assistida por marcadores moleculares - SAM.....	68
7.4 Análise da segregação dos alelos-alvo na geração F <sub>2</sub> .....	71
7.5 Avaliação do mérito comercial dos grãos após armazenamento.....	71
<b>8 RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
8.1 Híbridos simples.....	71
8.2 Híbrido duplo e múltiplo .....	74
8.3 Geração F <sub>2</sub> : seleção precoce de alelos-alvo .....	74
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
9.1 Seleção precoce dos alelos-alvo.....	79
9.2 Cor dos grãos após armazenamento – CGA.....	81
9.3 Valor dos alelos-alvo no melhoramento.....	81
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>11 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>12 APÊNDICES .....</b>	<b>97</b>
<b>13 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>109</b>

## RESUMO GERAL

GOMES-MESSIAS, L. M. **Melhoramento genético do feijão-comum assistido por marcadores moleculares: identificação, caracterização, mapeamento e piramidação de alelos de resistência a doenças.** 2023. 109 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2023.<sup>1</sup>

A produtividade e a qualidade comercial dos grãos de feijão são constantemente desafiadas pela ocorrência de doenças e por alterações bioquímicas pós-colheita como o escurecimento dos grãos. Objetivou-se com esse estudo: 1) mapear a região genômica associada à resistência à antracnose a partir de uma população (BRSMG Realce x BRS FC104) de 161 plantas F<sub>2</sub> que foi fenotipada quanto a reação à raça 475 e genotipada com marcadores SNPs utilizando a tecnologia DArTseq; 2) Validar nove marcadores SNPs previamente identificados como ligados a alelos de resistência à antracnose e à mancha-angular usando um conjunto com 376 genótipos, incluindo linhagens-elite, cultivares e *landraces* de feijão-comum e; 3) Estabelecer um programa de piramidação de alelos de resistência à antracnose, mancha-angular e murcha de *fusarium* em feijão carioca com escurecimento lento dos grãos assistido por marcadores moleculares. Esse estudo revelou que a resistência à antracnose presente na cultivar andina BRSMG Realce é controlada por um único loco de efeito maior ( $R^2=54,6\%$ ), provisoriamente denominado *CoPv04<sup>R</sup>*, mapeado em uma região do cromossomo 4 que possui 44 genes associados com mecanismos de interação patógeno-hospedeiro. Os snp12782 (1,182,123 pb), snp3308 (505,696 pb) e snp1327 (477,285 pb) foram indicados para monitorar a introgressão do alelo *CoPv04<sup>R</sup>*, com 99,0% de eficiência de seleção. A partir desse loco de resistência identificado, o atual estudo propôs que o *CoPv04<sup>R</sup>* seja nomeado oficialmente de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Genética da BIC (Bean Improvement Cooperative). No que tange a validação de marcadores previamente identificados como associados a doenças em feijão, dos nove SNP avaliados, sete apresentaram potencial para serem incorporados à rotina da seleção assistida junto aos programas de melhoramento do feijão-comum da Embrapa (snpPV0025-*Phg-2*; snpPV0027-*Phg-5*; snpPV0046-*Co-u*; snpPV0068-*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0070-*Co-4<sup>2</sup>*; snpP8282v3-817-*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0079-*Phg-5*). Os marcadores snpPV0025 e snpPV0079 são indicados para monitorar a introgressão dos alelos *Phg-2* e *Phg-5*, respectivamente. O sistema de genotipagem baseado em ensaios de hidrólise do tipo TaqMan<sup>TM</sup> para os marcadores snpPV0070, snpP8282v3-817 e snpPV0025 foram específicos para os alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>*, *Co-4<sup>2</sup>* e *Phg-2*, respectivamente. Os marcadores snpPV0070 e snpP8282v3-817 possuem 99,0% de eficiência na seleção. A piramidação de alelos-alvo assistida com os marcadores snpP8282v3-817 e ANAAJK6 permitiu a identificação precoce de nove progênies combinando os alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose, respectivamente. A seleção com o marcador PvbHLHp12804 (*sdsd*) foi 100% coincidente com o fenótipo de escurecimento lento dos grãos após 140 dias de armazenamento. Nossos resultados evidenciaram que a identificação e validação de marcadores moleculares identificados como associados a alelos-alvo para caracteres de importância agrônômica em feijão é essencial para orientar a escolha de genótipos superiores e aprimorar a eficiência de seleção, atribuindo celeridade ao programa de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* melhoramento molecular, seleção precoce.

---

<sup>1</sup>Orientador: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Arroz e Feijão.

<sup>1</sup>Coorientadora: Prof<sup>ca</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela Pedroso Mendes Resende. EA – UFG.

## GENERAL ABSTRACT

GOMES-MESSIAS, L. M. **Common bean breeding assisted by molecular markers: identification, characterization, mapping and pyramiding of disease resistance alleles.** 2023. 109 f. Thesis (Doctor of Science in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2023.<sup>1</sup>

The common bean's yield and commercial grain quality are constantly challenged by more than 45 diseases and post-harvest biochemical changes like grain darkening. The productivity, nutritional quality, and minor post-harvest changes (slow darkening) are of great importance for the acceptance of the product in the market. The aims of this study were: 1) mapping the genomic region associated with anthracnose resistance from a population (BRSMG Realce x BRS FC104) with 161 F<sub>2</sub> plants that were phenotyped for reaction to race 475 of the fungi *Colletotrichum lindemuthianum* and genotyped with SNPs markers using the DArTseq technology; 2) Validation of SNPs markers previously identified as linked to anthracnose and angular leaf spot resistance alleles using a set with 376 genotypes, including elite lines, cultivars, and common bean landraces; 3) Establish an allele pyramiding program by marker-assisted selection for anthracnose, angular leaf spot, and fusarium wilt in common bean of carioca type with slow darkening of grains. The results shown that anthracnose resistance in BRSMG Realce is controlled by a single locus ( $R^2=54,6\%$ ) with complete dominance, provisionally designated as *CoPv04<sup>R</sup>*, and mapped in a genomic region with 704,867 bp comprising 44 putative genes related to the pathogen-host interaction. The SNPs markers snp12782 (1,182,123 bp), snp3308 (505,696 bp) and snp1327 (477,285 bp) were indicated to monitor the *CoPv04<sup>R</sup>* allele introgression with a selection efficiency of 99,0%. Based on these results and the usefulness of *CoPv04<sup>R</sup>* for breeding purposes, it is proposed that the locus be officially nominated in accordance with the rules established by the Bean Improvement Cooperative Genetics Committee. Regarding the validation of markers previously identified as associated with bean diseases, of the nine evaluated SNPs, seven showed the potential to be incorporated into the assisted selection routine along with Embrapa's common bean breeding programs (snpPV0025-*Phg-2*; snpPV0027-*Phg-5*; snpPV0046-*Co-u*; snpPV0068-*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0070-*Co-4<sup>2</sup>*; snpP8282v3-817-*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0079-*Phg-5*). The SNP markers snpPV0025 and snpPV0079 are indicated to monitor the *Phg-2* and *Phg-5* allele introgression, respectively. The genotyped system based on TaqMan™ assay in qPCR for the SNP markers snpPV0070, snpP8282v3-817, and snpPV0025 were specific for target-alleles *Co-4<sup>2</sup>*, *Co-4<sup>2</sup>*, and *Phg-2*, respectively. The markers snpPV0070, and snpP8282v3-817 show a selection efficiency of 99,0%. The target-allele pyramiding assisted by SNP markers snpP8282v3-817, and ANAAJK6 allowed the early selection of nine progenies combining the alleles *Co-4<sup>2</sup>* and *FOP2.3<sup>403H</sup>* in homozygosis, respectively. The selection with the marker PvbHLHp12804 (*sdsd*) was 100% coincident with the grains' slow-darkening phenotype after 140 storage days. Our results showed that the identification and validation of molecular markers identified as associated with target alleles for traits of agronomic importance in the common bean is essential to guide the choice of superior genotypes and improve selection efficiency, attributing speed to the genetic improvement program.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, molecular breeding, early selection.

---

<sup>1</sup>Advisor: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Arroz e Feijão.

<sup>1</sup>Co-Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela Pedroso Mendes Resende. EA – UFG.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie diploide, com 11 pares de cromossomos (Altrock et al., 2011), e está organizada em dois *pools* gênicos (Mesoamericano e Andino) que divergiram a partir de uma população ancestral comum há cerca de 165 mil anos (Geps, 1998; Schmutz et al., 2014; Valdisser et al., 2017). É uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, principalmente para pessoas em vulnerabilidade socioeconômica (Ferreira et al., 2018). Seu alto valor nutricional e a alta taxa de consumo faz do feijão uma importante fonte de alimento e de renda para milhões de pessoas nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (Valentini et al., 2017). Estima-se que 50% da produção de feijão-comum ocorre em países em que há predomínio de indivíduos de baixa renda, tornando-a fundamental para a segurança alimentar (Porch et al., 2013).

No Brasil, as condições favoráveis e diversificadas de clima, solo, relevo e luminosidade favorecem as práticas agrícolas e garantem safras produtivas. Do volume total de feijão-comum produzido nas Américas, o Brasil foi responsável por cerca de 37% da produção, contribuindo com 2,4 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 1,6 milhão de hectare (ha), com rendimento médio de 1498 kg ha<sup>-1</sup> em 2020 (Embrapa Arroz e Feijão, 2022). O fato de o Brasil também figurar como um dos maiores consumidores, limita o volume de produto excedentes exportável e gera pequena demanda de importação para suprir o mercado interno (Conab, 2022).

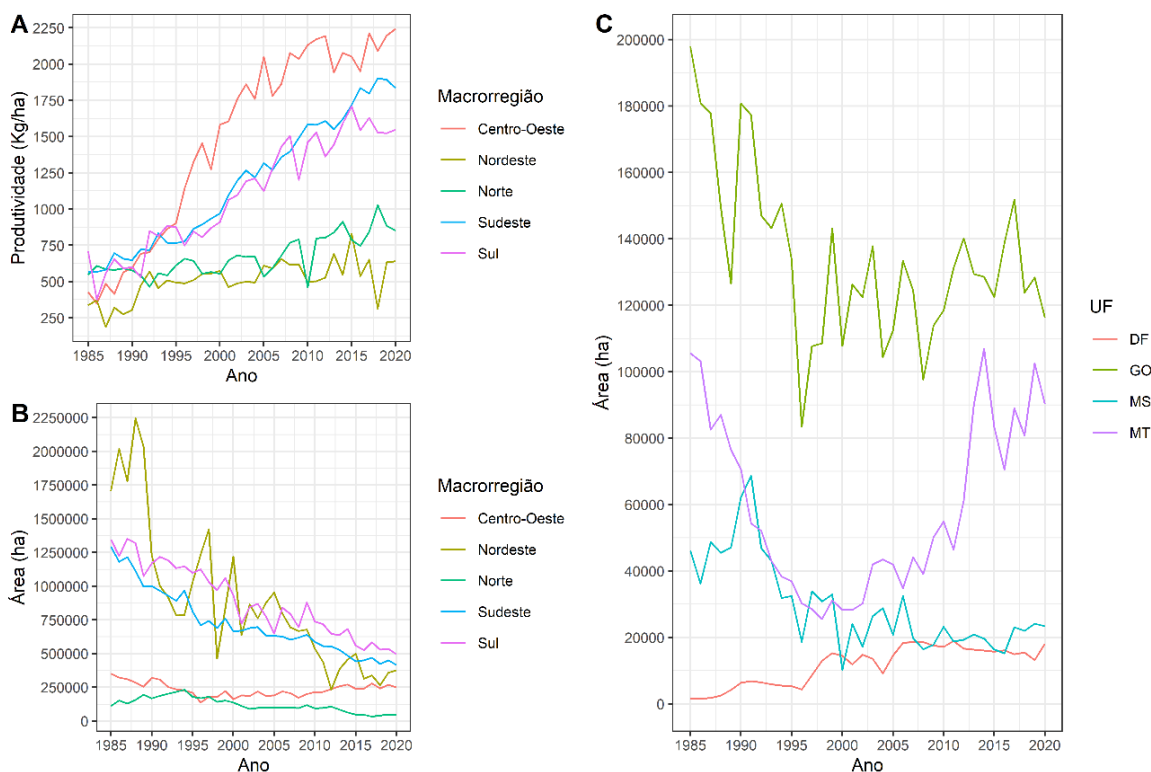
A produção de feijão-comum é realizada por pequenos, médios e grandes produtores, em diversas regiões do país, utilizando diferentes níveis tecnológicos (Brusamarello et al., 2017). Seu cultivo ocorre durante todo o ano, em três safras distintas, “águas”, “seca” e “irrigada”, em que o início da semeadura de cada safra é dependente da região produtora (Brusamarello et al., 2017). A primeira safra, “safra das águas”, com semeadura ocorrendo

entre os meses de agosto a dezembro, contribuiu com 39,4% da produção nacional em 2020 (Embrapa Arroz e Feijão, 2022). A segunda safra, “safra da seca”, com semeadura de janeiro a abril, respondeu por 36,5% da produção nacional em 2020 (Embrapa Arroz e Feijão, 2022). A terceira safra, ocorre sob irrigação, uma vez que o calendário coincide com períodos secos das principais regiões produtoras, com a semeadura entre os meses de maio e julho (Brusamarello et al., 2017). Essa safra concentra-se no Oeste da Bahia, em Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e na região do Distrito Federal (Ana, 2022). A safra sob irrigação possui elevados rendimentos, podendo ser até duas vezes superior ao cultivo sem irrigação (Ana, 2022), sendo responsável por 24% da produção brasileira em 2020 (Embrapa Arroz e Feijão, 2022).

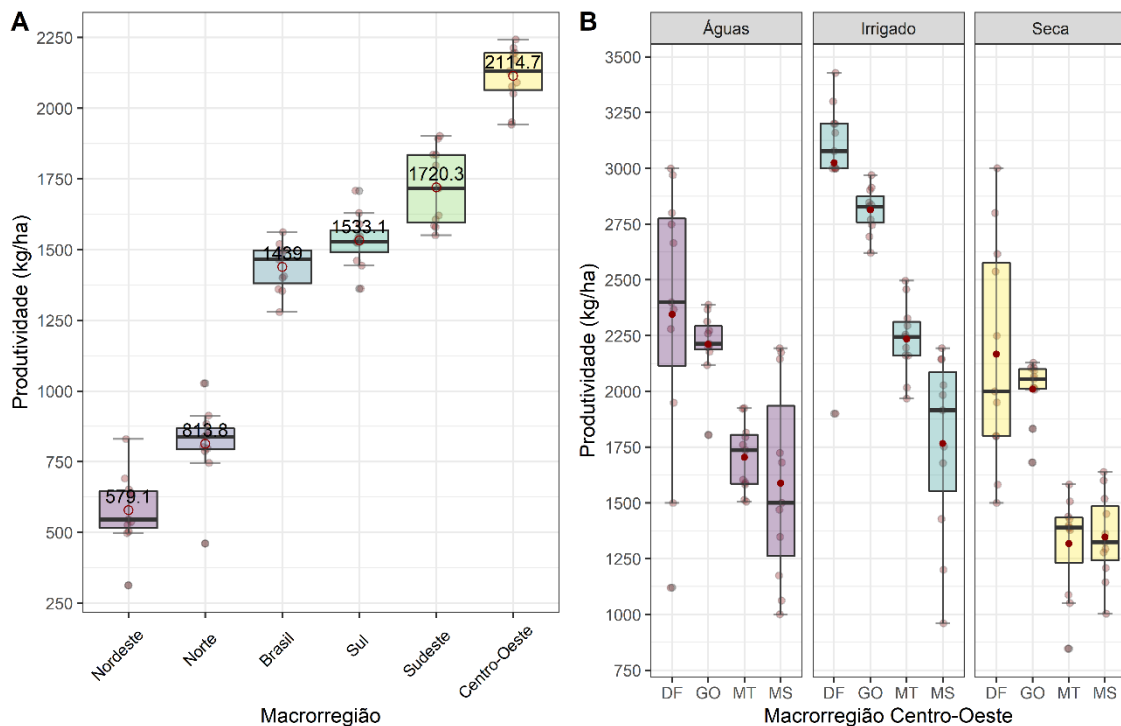
Os avanços em soluções tecnológicas para que a cadeia produtiva do feijão-comum produza cada vez mais com responsabilidade socioambiental estão estreitamente ligadas com as pesquisas desenvolvidas pelo setor público, incluindo universidades, institutos e a Embrapa. O lançamento de cultivares resilientes às condições edafoclimáticas e os avanços no manejo da cultura permitiram que houvesse, ao longo do tempo (1985 – 2020), uma correlação inversamente proporcional entre produtividade e área plantada (**Figura 1A e 1B**). Em uma análise de regressão linear simples realizada com dados do período entre 1985 e 2020 (Embrapa Arroz e Feijão, 2022), a produtividade apresentou incremento anual de +34,6 kg enquanto a área cultivada reduziu cerca de 93.491,0 hectares, fenômeno que pode ser observado pelas linhas de tendência de cada macrorregião produtora (**Figuras 1A e 1B**). Embora tenha ocorrido redução da área cultivada, observa-se na **Figura 1B** que após o ano de 2010 houve uma retomada no crescimento da “safra irrigada” no Centro-Oeste, muito em função do aumento das áreas de cultivo sob pivôs centrais no estado de Mato Grosso (**Figura 1C**).

Considerando um recorte dos últimos dez anos, a produtividade média nacional foi de 1.439,0 kg há<sup>-1</sup>, valor inferior às médias das principais regiões produtoras, onde foram obtidas produtividades de 2.114,7 kg há<sup>-1</sup> (Centro-Oeste), 1.720,3 kg há<sup>-1</sup> (Sudeste) e 1.533,1 kg há<sup>-1</sup> (Sul) (**Figura 2A**). A macrorregião Centro-Oeste, se destaca em termos de produtividade (**Figura 2A**), com média superior as demais macrorregiões produtoras devido à alta tecnologia aplicada à produção de feijão-comum, principalmente, no Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso (**Figura 2C**). Esse destaque em termos de produtividade é explicado

pela adoção do sistema de cultivo em pivô central (3<sup>o</sup> Safra – Irrigado), em que se observa produtividade superior a três toneladas na região produtora do Distrito Federal (**Figura 2C**).



**Figura 1.** **A** – Comportamento temporal da produtividade de feijão-comum nas cinco macrorregiões produtoras a partir dos dados de cultivo do período entre 1985 e 2020, considerando a média anual das três safras (“Águas”, “Seca” e “Irrigado”). **B** – Comportamento temporal da área cultivada de feijão-comum das cinco macrorregiões produtoras a partir dos dados de cultivo do período entre 1985 e 2020, considerando a média anual das três safras (“Águas”, “Seca” e “Irrigado”). **C** – Comportamento temporal da área cultivada de feijão-comum nos estados de GO, MT, MS e o Distrito Federal (macrorregião Centro-Oeste) no período entre 1985 e 2020, considerando a média anual das três safras (“Águas”, “Seca” e “Irrigado”). Fonte dos dados: Embrapa Arroz e Feijão (2022).



**Figura 2. A** – Produtividade de feijão-comum das cinco macroregiões produtoras e do Brasil a partir de um recorte dos últimos dez anos (2010 a 2020) de cultivo, considerando a média anual das três safras (“Águas”, “Seca” e “Irrigado”). **B** – Produtividade de feijão-comum na primeira (“Águas”), segunda (“Seca”) e terceira (“Irrigado”) safra por estado da macroregião Centro-Oeste, a partir de um recorte dos últimos dez anos (2010 a 2020) de cultivo. Fonte dos dados: Embrapa Arroz e Feijão (2022).

Esses dados revelam a grande heterogeneidade ambiental que existe entre e dentro das regiões produtoras de feijão-comum, sendo o posicionamento técnico uma prática indispensável para que as cultivares disponíveis no mercado expressem o máximo do seu potencial produtivo (Pereira et al., 2018). Ao mesmo tempo, evidencia a existência de oportunidades para os programas de melhoramento desenvolverem cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico, como no Norte e Nordeste (**Figura 2<sup>a</sup>**).

Pelo fato de o feijão-comum ser cultivado em todo Brasil, as demandas e os problemas relacionados à produção em cada região são diferentes, necessitando de ações de pesquisa específicas (Faria et al., 2013; Faria et al., 2014; Barili et al., 2016a, 2016b). Apesar de características como produtividade, precocidade, arquitetura de planta, tamanho e coloração dos grãos serem de grande importância para todas as regiões (Faria et al., 2013; Faria et al., 2014; Barili et al., 2016a, 2016b), permanecem ainda muitos desafios relacionados a fatores bióticos e abióticos que tendem a limitar o potencial produtivo, proporcionando uma redução na produção (Valdisser et al., 2020; Barili et al., 2016a,

2016b). Entre os fatores que limitam a produtividade, causam instabilidade e risco de implantação da cultura, encontram-se às doenças (Valentini et al., 2017; Meziadi et al., 2016), sendo relatadas na literatura mais de 45 tipos, de maior ou menor importância (Singh & Schwartz, 2010; Ragagnin et al., 2009). No tocante às doenças fúngicas, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a mancha-angular (*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris), a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), podridão-radicular-seca (*F. solani* f. sp. *phaseoli*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e podridão-radicular de Rhizoctonia (*Rhizoctonia solani*) (Singh & Schwartz, 2010). A capacidade destrutiva destas doenças passa pela interação entre o patógeno, o hospedeiro e o ambiente, em que dependendo do nível de suscetibilidade das cultivares, das condições ambientais favoráveis e da presença do inóculo inicial, leva a perdas na produção e na qualidade dos grãos da ordem de 70 a 100% (Maina et al., 2017; Souza et al., 2014; Ragagnin et al., 2009).

A maioria dos patógenos têm grande variabilidade patogênica e, normalmente, conseguem suplantar a resistência obtida via melhoramento genético (Basavaraja et al., 2020). Por isso, estratégias que possibilitem a obtenção de uma resistência mais estável têm sido adotadas, como a piramidação de alelos de resistência (Terán et al., 2013), retrocruzamentos (Almeida et al., 2021) e a seleção recorrente (Arantes et al., 2010; Pádua et al., 2021). Continuamente, busca-se por genes/alelos mediante a identificação e mapeamento de novas fontes de resistência, procurando desenvolver genótipos com base genética mais ampla, permitindo maximizar os ganhos com a seleção (Assefa et al., 2019).

Os marcadores moleculares, quando validados, prestam auxílio no monitoramento da introgressão de alelos-alvo de resistência por meio de ensaios não destrutivos, promovendo a redução de tempo e de custos durante o processo de avaliação e seleção (Miklas et al., 2006; Assefa et al., 2019). Sanglard et al. (2005) utilizaram o método de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares para monitorar a introgressão dos alelos de resistência à antracnose (*Co-3<sup>d</sup>*), mancha-angular (*Phg-3*) e ferrugem (*Ur-14*) da cultivar ‘Ouro Negro’ para a cultivar ‘Pérola’. Para tanto, além da avaliação fenotípica da reação de resistência, os autores utilizaram os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) OPX-11<sub>550</sub>, OPF-10<sub>1050</sub>, SCARBA-08<sub>560</sub> e SCARF-10<sub>1050</sub> (ligados aos alelos-alvo *Co-3<sup>d</sup>* e *Ur-14*), OPAA-19<sub>400</sub>, OPM-02<sub>425</sub> e OPBA-16<sub>669</sub> (ligados ao alelo *Phg-3*) para monitorar a transferência destes alelos. Ao final de três ciclos de retrocruzamentos (BC<sub>3</sub>F<sub>2:5</sub>), os autores

concluíram que a associação do método de melhoramento convencional com o uso de marcadores moleculares permitiu a rápida e simultânea transferência dos três alelos-alvo de resistência para cultivar ‘Pérola’.

Em um estudo conduzido por Ragagnin et al. (2009) foram introgrididos, por retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares, alelos de resistência à antracnose, mancha-angular e ferrugem utilizando como parental recorrente a cultivar ‘Rudá’. Ao todo, um conjunto de nove marcadores (RAPD e SCAR - *Sequence Characterized Amplified Region*) foram usados, sendo eles: OPH13490 e SCARH13490 ligados ao alelo *Phg-1* que confere resistência à raça 63-23 de *P. griseola*; OC8900 (*Co-4*), OB31800 (*Co-4*), OAZ4560 (*Co-6*), OX11550 (*Ur-14/Co-3<sup>4</sup>*), SCARF101050 (*Ur-14/Co-3<sup>4</sup>*), SCARY20830 (*Co-4*) e SCARZ20940 (*Co-6*), ligados aos alelos que conferem resistência às raças 65 e 89 de antracnose e às raças 32, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 54, 58 e 59 de *U. appendiculatus*. Ao final do estudo, os autores obtiveram quatro linhagens F<sub>4:7</sub> com resistência aos três patógenos. A partir deste estudo, Costa et al. (2010) adotaram a mesma estratégia para realizarem a transferência dos alelos *Co-4*, *Co-6* e *Co-3<sup>4</sup>* (SCARY20830 e SCARAZ20845), *Ur-14* (SACR101050) e *Phg-1* (SACR13490) a partir do cruzamento inicial entre a cultivar ‘Rudá’ (parental doador) e a cultivar ‘Diamante Negro’ (parental recorrente). Como resultado deste trabalho, quatro linhagens de grãos do grupo comercial preto (DNR7, DNR8, DNR9 e DNR10) foram indicadas para serem utilizadas pelos programas brasileiros de melhoramento de feijão-comum, pois cada uma possuem os alelos *Co-4*, *Co-3<sup>4</sup>*, *Ur-14* e *Phg-1*, que conferem resistência aos principais patótipos de antracnose (raças 65, 89, 73 e 81), ferrugem (patótipos 21-3 e 29-15) e mancha-angular (patótipos 63-21 e 63-23) que predominam nos campos de produção no Brasil. Souza et al. (2014) realizaram a piramidação dos alelos-alvo *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-14* de resistência à *U. appendiculatus* na cultivar Rudá (grão carioca) com o auxílio dos marcadores moleculares RAPD SI19, SAE19 e OPX11, respectivamente. Com esta estratégia, os autores selecionaram 16 linhagens F<sub>4:7</sub>, das quais nove (TL-006, TL-009, TL-015, TL-016, TL-026, TL-032, TL-034, TL-035 e TL-037) foram altamente resistentes (HR) às três raças testadas no estudo (21-3, 29-15 e 53-3), indicando que os alelos *Ur-5*, *Ur-11* e *Ur-14* em homozigose.

O melhoramento assistido por marcadores moleculares tem contribuído para o progresso genético quanto à resistência aos principais patógenos que acometem a cultura do feijão-comum (Basavaraja et al., 2020). No entanto, devido à grande variabilidade genética

observada nas populações dos patógenos, os esforços na busca por novas fontes de resistência, no mapeamento de genes de resistência e no desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados aos principais genes de resistência devem ser feitos de forma contínua e ininterrupta (Gomes-Messias et al., 2022a; Vieira et al., 2018). Neste caminho, estudos mais recentes têm focado no mapeamento de alta resolução, reduzindo a distância entre marcadores e alelos de interesse, seguido pela validação desses marcadores em genótipos diversos, conseqüentemente, aumentando a eficiência dos programas de piramidação alélica (Vieira et al., 2018; Miller et al., 2018; Valentini et al., 2017; Persegüini et al., 2016; Fritsche-Neto et al., 2019; Gil et al., 2019, Nay et al., 2019).

Vieira et al. (2018) verificaram que dos quatro marcadores SCAR (SH18, SAS13, SAB03 e SAZ20) validados para a piramidação de alelos de resistência à antracnose, apenas o SH18 foi capaz de discriminar o alelo *Co-4<sup>2</sup>* dos alelos *Co-4* e *Co-4<sup>3</sup>*, sendo este útil para a seleção assistida. Em outro estudo, Miller et al. (2018) verificaram que o alelo *Phg-2*, que confere resistência à raça 63-39 de *P. griseola*, está a uma distância de 3 cM do marcador STS g796. Mais recentemente, Nay et al. (2019) identificaram SNPs-alvo em blocos haplotípicos posicionados nessa região do marcador STS g796 e que poderão ser utilizados para a SAM. Adicionalmente, Valentini et al. (2017) revelaram que os alelos *Co-3<sup>4</sup>* e *Phg-3* co-segregam e estão ligados a uma distância de 0.0 cM do marcador STS g2303. Além disso, com base no mapa altamente saturado produzido nesse estudo, o gene *Ur-14* foi posicionado a 2.2 cM do loco *Co-3<sup>4</sup>/Phg-3* no final do cromossomo Pv04. Com estes resultados, o marcador STS g2303 é indicado para programas de piramidação alélica, visto que este permite a seleção rápida e simultânea dos alelos *Co-3<sup>4</sup>*, *Phg-3* e *Ur-14*, que conferem resistência à raça 73 de *C. lindemuthianum*, às raças 31-23, 31-31, 31-35, 53-47, 63-39 e 63-63 de *P. griseola* e às raças 41, 47, 53 e 58 de *U. appendiculatus*, respectivamente.

Persegüini et al. (2016) realizaram estudo de associação genômica ampla (GWAS) para resistência à antracnose e mancha-angular utilizando 24 genótipos de origem Andina e 156 genótipos Mesoamericanos. Os autores encontraram 28 marcadores SSRs e 38 SNPs significativamente associados com a resistência aos dois patógenos, sendo que dois SSRs (SSR-IAC167 e PvM95, localizados no cromossomo 3) e um SNP (scaffold00021\_89379) foram associados com a resistência de ambas as doenças, indicando que possa existir efeito pleiotrópico. Além disso, dois marcadores presentes no cromossomo 1 (scaffold00024\_916410 e PvM97) foram mapeados na posição correspondente ao alelo *Co-*

*I*, que confere resistência às raças 73 e 65 de antracnose. Enquanto outros dois marcadores SNP (scaffold0060\_115096 e scaffold00060\_401853) foram localizados na mesma região do cromossomo 4 que corresponde aos alelos *Co-3<sup>4</sup>*, *Phg-3* e *Ur-14*, sendo estes dois marcadores de grande importância para os programas de piramidação alélica. Os marcadores PvM124 e scaffold00045\_345513 mapeados no Pv03 foram associados especificamente a resistência à antracnose, enquanto o marcador BMc225 (Pv04) foi associado a resistência à raça 0-39 de *P. griseola*.

Fritsche-Neto et al. (2019) realizaram a genotipagem (5,398 SNP) de 60 linhagens de feijão-comum que constituem o germoplasma-élite desenvolvido pela Embrapa ao longo de 22 anos, sendo as mesmas avaliadas sob condição de campo quanto a reação à antracnose e à mancha-angular. A partir da análise de associação (GWAS) foi possível identificar dois SNP significativamente (BARCPV\_1.0\_Chr02\_23542475\_A\_G e BARCPV\_1.0\_Chr02\_23644618\_G\_A) associados à reação de resistência à antracnose (explicando 25% da variação fenotípica) e o SNP BARCPV\_1.0\_Chr10\_20935383\_C\_T respondendo por 19% da reação de resistência à mancha-angular. Este estudo revelou novas regiões genômicas relevantes que respondem pela reação de resistência a estes dois patógenos, sendo os marcadores SNP úteis para os programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

Gil et al. (2019) realizaram o mapeamento de alta resolução (fine-map) da região genômica do loco *Phg-2* visando a identificação de marcadores SNP para serem utilizados em programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares. Para isso, foram feitos cruzamentos entre linhagens de feijão-comum de origem Mesoamericana (*Phg-2*) e a cultivar comercial CAL 96 de origem Andina com o objetivo de transferir o alelo *Phg-2* para este *pool* gênico. Em uma das etapas do estudo de mapeamento, os autores avaliaram 97 linhagens F<sub>4</sub> quanto a reação de resistência à mancha-angular após a inoculação com uma mistura de isolados de origem Andina e Mesoamericana. Foi constatado que as linhagens com o alelo ALS\_Chr08\_62193174 (SNP) apresentaram as menores notas de reação de resistência à antracnose tanto na folha quanto nas vagens. Segundo os autores, este marcador SNP não é específico para o alelo *Phg-2* no *pool* gênico Mesoamericano, podendo ser utilizado como marcador desse loco em background Andino. Além disso, os autores concluem que entre os cinco alelos descritos (*Phg-1* ao *Ph-5*), o *Phg-2* é o que promove maior nível resistência a diferentes raças de *P. griseola*.

Um forte aliado ao desenvolvimento crescente das ferramentas para a seleção assistida tem sido o avanço na genômica do feijão-comum. O conhecimento da estrutura, funcionalidade e organização genômica do feijão tem gerado considerável progresso nos programas de melhoramento genético, desde o desenvolvimento de inúmeros recursos genômicos, até a manipulação de genes, permitindo estudos mais específicos (Valdisser et al., 2017). O feijão-comum possui o tamanho do genoma estimado em ~587 milhões de pares de base (Mpb), distribuídos em 11 cromossomos e, atualmente, são muitos os recursos biotecnológicos disponíveis, tanto para o germoplasma de origem Andina (Schmutz et al., 2014), quanto para o de Mesoamericana (Vlasova et al. 2016). A disponibilidade de dois genomas de referência tem facilitado o desenvolvimento de abordagens de re-sequenciamento, pois as informações geradas são facilmente alinhadas e comparadas, revelando diferenças ao longo de todo genoma (Valdisser et al., 2017; Wu et al., 2019). Além de favorecerem enormemente a condução de estudos por busca de genes candidatos e anotação de sequências.

Para o feijão-comum, conjuntos de alguns milhares de SNP amplamente distribuídos no genoma encontram-se desenvolvidos (Song et al. 2015; Cichy et al. 2015; Müller et al. 2015; Valdisser et al. 2016; 2017) e vêm sendo utilizado em pesquisas (Valdisser et al., 2020; Vidigal Filho et al., 2020; Costa et al., 2021). O acesso crescente à abordagem de *whole-genome sequencing* (WGS), ou sequenciamento total do genoma, tem possibilitado avaliar variações a nível de bases em todo genoma (Schmutz et al. 2014; Vlasova et al., 2016). Recentemente, 40 linhagens/cultivares do programa de melhoramento de feijão do Brasil (incluindo importantes fontes de resistência para diversas doenças) tiveram seus genomas integralmente sequenciados e alinhados (cobertura de 10X), possibilitando uma ampla varredura genômica e a identificação de mais de ~10 milhões de SNPs/Indels/CNV (dados ainda não publicados). A capacitação para lidar com esse grande volume de dados genômicos, aliados aos inúmeros recursos de bioinformática em constante desenvolvimento, têm possibilitado acelerar/aumentar a compreensão dos padrões de herança para as mais variadas características que poderão ser convertidas em valiosas ferramentas para manipulação dos genótipos em regiões, por exemplo, de cluster de genes de resistência (Meziadi et al., 2014).

Os objetivos deste estudo foram: **Cap.1)** Mapear a região genômica associada com a resistência à antracnose em uma população F<sub>2</sub> derivada do cruzamento entre a cultivar do

*pool* gênico Andino, BRSMG Realce (Resistente), com uma cultivar do *pool* gênico Mesoamericano, BRS FC104 (Suscetível). **Cap.2)** Avaliar e validar marcadores SNP previamente identificados como ligados a alelos de resistência à antracnose (*Co-4<sup>2</sup>* e *Co-u*) e mancha-angular (*Phg-1*, *Phg-2* e *Phg-5*), usando um painel diverso de genótipos de feijão-comum contendo importantes fontes de resistência e uma população segregante (BRS Cometa x SEL 1308), para serem incorporados à rotina da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) do programa de melhoramento de feijão-comum. **Cap. 3)** Piramidar alelos-alvo de resistência à antracnose, mancha-angular, murcha de *fusarium* e escurecimento lento dos grãos, usando ferramentas modernas de biotecnologia.

## 2 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. P.; PAULINO, J. F. C.; SANTOS, I. L.; BAJAY, M. M.; GONÇALVES, J. G. R.; CARVALHO, C. R. L.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F.; BENCHIMOL-REIS. Marker-assisted backcrossing for disease resistance and agronomic traits in carioca beans. **agronomy**, v. 61, n. 4, 2510-2521, 2021. Doi: 10.1002/csc2.20528.

ALTROCK, S.; FONSÊCA, A.; PEDROSA-HARAND, A. Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 459-463, 2011. Doi: 10.1590/S1415-47572011005000029.

ANA. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Atlas de irrigação: uso da água na agricultura irrigada**. Brasília: Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. 2022. Disponível em: <<https://portal1.snirh.gov.br/ana/apps/storymaps/stories/a874e62f27544c6a986da1702a911c6b>>. Acesso em: 01 de agosto de 2022.

ARANTES, L. O.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 232-237, 2010. Doi: 10.1590/S1984-70332010000300008.

ASSEFA, T.; MAHAMA, A.; BROWN, A. V.; CANNON, E. K. S.; RUBYOGO, J. C.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; CANNON, S. B. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39, 20, 2019. Doi 10.1007/s11032-018-0920-0.

BARILI, L. D.; VALE, N. M.; CARNEIRO, J. E. S.; FONSECA E SILVA, F.; SILVA, F. L. Five decades of black common bean genetic breeding in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 3, p. 259-266, 2016b. Doi: 10.1590/1983-40632016v46a1371.

BARILI, L. D.; VALE, N. M.; MOURA, L. M.; PAULA, R. G.; SILVA, F. F.; CARNEIRO, J. E. S. Genetic progress resulting from forty-three years of breeding of the carioca common bean in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, gmr.15038523, 2016a. Doi: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038523>.

BASAVARAJA, T.; PRATAP, A.; DUBEY, V.; GURUMURTHY, S.; GUPTA, S.; SINGH, N. P. Molecular and conventional breeding strategies for improving biotic stress resistance in common bean. In: GOSAL, S. S.; WANI, S. H. (eds.) **Accelerated Plant Breeding**. v. 3. Switzerland: Springer Nature, 2020. ch. 13, p. 389-421. Doi: 10.1007/978-3-030-47306-8\_13.

BRUSAMARELLO, A. P.; OLIVEIRA, P. H.; SEBIM, D. E.; BARETTA, D. R. Performance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in the second-season under high and low technology management in Parana, Brazil. **Acta Agronômica**, v. 66, n. 3, p. 436-441, 2017. Doi: 10.15446/acag.v66n3.55555.

CICHY, K. A.; PORCH, T. G.; BEAVER, J. S.; CREGAN, P.; FOURIE, D.; GLAHN, R. P.; GRUSAK, M. A.; KAMFWA, K.; KATUURAMU, D. N.; MCCLEAN, P.; MNDOLWA, E.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; PASTOR-CORRALES, M. A.; MIKLAS, P. N.

A *Phaseolus vulgaris* diversity panel for Andean bean improvement. *Crop Science*, v. 55, p. 2149-2160, 2015. Doi 10.2135/cropsci2014.09.0653.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da safra de grãos: 10º Levantamento - Safra 2021/22**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 01 de agosto de 2022.

COSTA, L. C.; NALIN, R. S.; DIAS, M. A.; FERREIRA, M. E.; SONG, Q.; PASTOR-CORRALES, M. A. Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 543–556, 2021. Doi: 10.1007/s00122-020-03713-x.

COSTA, M. R.; TANURE, J. P. M.; ARRUDA, K. M. A.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Development and characterization of common black bean lines resistant to anthracnose, rust and angular leaf spot in Brazil. **Euphytica**, 176:149-156, 2010.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2020): área, produção e rendimento**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2022. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 01 de agosto de 2022.

FARIA, L. C.; MELO, P. G. S.; PEREIRA, H. S.; DEL PELOSO, M. J.; BRÁS, A. J. B. P.; MOREIRA, J. A. A.; CARVALHO, H. W. L.; MELO, L. C. Genetic progress during 22 years of improvement of carioca-type common bean in Brazil. **Field Crops Research**, v. 142, p. 68-74, 2013. Doi.org/10.1016/j.fcr.2012.11.016.

FARIA, L. C.; MELO, P. G. S.; PEREIRA, H. S.; WENDLAND, A.; BORGES, S. F.; PEREIRA-FILHO, I. A.; DIAZ, J. L. C.; CALGARO, M.; MELO, L. C. Genetic progress during 22 years of black bean improvement. **Euphytica**, v. 199, p. 261-272, 2014. Doi 10.1007/s10681-014-1135-z.

FERREIRA, C. M.; FIGUEIREDO, R. S.; LUZ, T. C. L. A. Arroz e Feijão: Intervenção multi-institucional em prol do Brasil. **Revista Política Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 96-112. 2018.

FRITSCHÉ-NETO, R.; SOUZA, T. L. P. O.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; MELO, L. C.; NOVAES, E.; BRUM, I. J. B.; JANNINK, J. L. Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 321-327, 2019. Doi: 10.1590/1678-992X-2017-0306.

GEPTS, P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience**, v. 33, p. 1124-1130. Doi: 10.21273/HORTSCI.33.7.1124.

GIL, J.; SOLARTE, D.; LOBATON, J. D.; MAYOR, V.; BARRERA, S.; JARA, C.; BEEBE, S.; RAATZ, B. Fine-mapping of angular leaf spot resistance gene *Phg-2* in common bean and development of molecular breeding tools. **Theoretical and Applied Genetics**, 4: 1-14, 2019. Doi: 10.1007/s00122-019-03334-z.

GOMES-MESSIAS, L. M.; VIANELLO, R. P.; MONTEIRO-JÚNIOR, J. P.; RODRIGUES, L. A.; MOTA, A. P. S.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; RAATZ, B.;

- SOUZA, T. L. P. O. Molecular characterization of parental lines and validation of SNP markers for anthracnose and angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 218, 49, 2022. Doi 10.1007/s10681-022-03002-2.
- MAINA, P. K.; WACHIRA, P. M.; OKOTH, S. A.; KIMENJU, J. W. Cultural, morphological and pathogenic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* causing wilt in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Advances in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 1-9, 2017. Doi 10.9734/JAMB/2017/32684.
- MEZIADI, C.; RICHARD, M. M. S.; DERQUENNES, A.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; GRATIAS, A.; PFLIEGER, S.; GEFFROY, V. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.006.
- MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to mas breeding. **Euphytica**, 147:105-131, 2006. Doi: 10.1007/s10681-006-4600-5.
- MILLER, T.; GEPTS, P.; KIMMO, S.; ARUNGA, E.; CHILAGANE, L. A.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; NAMUSOKE, A.; NAMAYANJA, A.; TEDLA, Y. R. Alternative markers linked to the *Phg-2* angular leaf spot resistance locus in common bean using the *Phaseolus* genes marker database. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 818-828, 2018. Doi: 10.5897/AJB2018.16493.
- MÜLLER, B. S. F.; PAPPAS, J. R.; G. J.; VALDISSER, P. A. M. R.; COELHO, G. R. C.; MENEZES, I. P. P.; ABREU, A. G.; BORBA, T. C. O.; SAKAMOTO, T.; BRONDANI, C.; BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P. An operational SNP panel integrated to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, p. 1697-1711, 2015. Doi: 10.1007/s11105-015-0866-x.
- NAY, M. M.; MUKANKUSI, C. M.; STUDER, B.; RAATZ, B. Haplotypes at the *Phg-2* locus are determining pathotype-specificity of angular leaf spot resistance in common bean. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 1126, 2019. Doi 10.3389/fpls.2019.01126.
- PÁDUA, P. F.; PEREIRA, R.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Efficiency of a recurrent selection method to achieve resistance of common beans to *Pseudocercospora griseola* in a short period. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, e013421, 2021. Doi: 10.1590/1413-7054202145013421.
- PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; WENDLAND A.; COSTA J. G. C.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C. Genotype by environment interaction for disease resistance and other important agronomic traits supporting the indication of common bean cultivars. **Euphytica**, v. 214, 12, 2018. Doi.org/10.1007/s10681-017-2093-z.
- PERSEGUINI, J. M. K. C.; OBLESSUC, P. R.; ROSA, J. R. B. F.; GOMES, K. A.; CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; GARCIA, A. A. F.; VIANELLO, R. P.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Genome-wide association studies of anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 11, e0150506, 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0150506.

- PORCH, T. G.; BEAVER, J. S.; DEBOUCK, D. G.; JACKSON, S. A.; KELLY, J. D.; DEMPEWOLF, H. Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change. **agronomy**, v. 3, p. 433-461, 2013. Doi:10.3390/agronomy3020433.
- RAGAGNIN, V. A.; SOUZA, T. L. P. O.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; COSTA, M. R.; ALZATE-MARIN, A. L.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, v. 128, p. 156-163, 2009. Doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01549.x.
- SANGLARD, D. A.; SOUZA, T. L. P. O.; SOUSA, C. S.; RAGAGNIN, V. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Molecular marker assisted backcrossing for developing lines with cv. Pérola genetic background, resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot. **Annual report of the Bean Improvement Cooperative**, n. 48, p. 84-85, 2005.
- SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P. E.; MAMIDI, S.; WU, G. A.; CANNON, S. B.; GRIMWOOD, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, p. 707-713, 2014. Doi 10.1038/ng.3008.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, v.v50, p. 2199–2223, 2010. Doi: 10.2135/cropsci2009.03.0163.
- SONG, Q.; JIA, G.; HYTEN, D. L.; JENKINS, J.; HWANG, E.; SCHROEDER, S. G.; OSORNO, J. M.; SCHMUTZ, J.; JACKSON, S. A.; MCCLEAN, P. E.; CREGAN, P. B. SNP assay development for linkage map construction, anchoring whole genome sequence and other genetic and genomic applications in common bean. **G3**, v. 5, p. 2285-2290, 2015. Doi: 10.1534/g3.115.020594.
- SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; DESSAUNE, S. N.; SANGLARD, D. A.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. DNA marker-assisted selection to pyramid rust resistance genes in “carioca” seeded common bean lines. **Euphytica**, 199: 303-316, 2014. Doi: 10.1007/s10681-014-1126-0.
- TERÁN, H.; JARA, C.; MAHUKU, G.; BEEBE, S.; SINGH, S. P. Simultaneous selection for resistance to five bacterial, fungal, and viral diseases in three Andean x Middle American inter-gene pool common bean populations. **Euphytica**, v. 189, p. 283-292, 2013. Doi: 10.1007/s10681-012-0803-0.
- VALDISSER, P. A. M. R.; MÜLLER, B. S. F.; DE ALMEIDA FILHO, J. E.; MORAIS JÚNIOR, O. P.; GUIMARÃES, C. M.; BORBA, T. C. O.; DE SOUZA, I. P.; ZUCCHI, M. I.; NEVES, L. G.; COELHO, A. S. G.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. Genome-wide association studies detect multiple QTLs for productivity in mesoamerican diversity panel of common bean under drought stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 574674, 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.574674.
- VALDISSER, P. A. M. R.; PAPPAS JR, G. J.; MENEZES, I. P. P.; MÜLLER, B. S. F.; PEREIRA, W. J.; NARCISO, M. G.; BRONDANI, C.; SOUZA, T. L. P. O.; BORBA, T. C. O.; VIANELLO, R. P. SNP discovery in common bean by restriction-associated DNA (RAD) sequencing for genetic diversity and population structure analysis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, p. 1277-1291, 2016. Doi: 10.1007/s00438-016-1182-3.

VALDISSER, P. A. M. R.; PEREIRA, W. J.; ALMEIDA FILHO, J. E.; MÜLLER, B. S. F.; COELHO, G. R. C.; DE MENEZES, I. P. P.; VIANNA, J. P. G.; ZUCCHI, M. I.; LANNA, A. C.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, J. P.; MORAES, A. C.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. In-depth genome characterization of a Brazilian common bean core collection using DArTseq high-density SNP genotyping. **BMC Genomics**, v. 18, 423, 2017. Doi: 10.1186/s12864-017-3805-4.

VALENTINI, G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; HURTADO-GONZALES, O. P.; CASTRO, S. A. L.; CREGAN, P. B.; SONG, Q.; PASTOR-CORRALES, M. A. High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, p. 1705-1722, 2017. Doi: 10.1007/s00122-017-2920-6.

VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; BISNETA, M. V.; SOUZA, V. B.; GILIO, T. A. S.; CALVI, A. A.; LIMA, L. R. L.; PASTOR-CORRALES, M. A.; MELOTTO, M. Genome-wide association study of resistance to anthracnose and angular leaf spot in Brazilian Mesoamerican and Andean common bean cultivars. **Crop Science**, v. 60, p. 2931–2950, 2020. Doi: 10.1002/csc2.20308.

VIEIRA, A. F.; ALMEIDA, L. C. S.; RODRIGUES, L. A.; COSTA, J. G. C.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; SANGLARD, D. A.; SOUZA, T. L. P. O. Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, gmr18066, 2018. Doi: 10.4238/gmr18066.

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; RENDÓN-ANAYA, M.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E.; ERB, I. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biology**, v. 17, 32, 2016. Doi 10.1186/s13059-016-0883-6.

WU, J.; WANG, L.; FU, J.; JIBAO, C.; WEI, S.; ZHANG, S. et al. Resequencing of 683 common bean genotypes identifies yield component trait associations across a north–south cline. **Nature Genetics**, v. 52, p. 118-125, 2020. Doi 10.1038/s41588-019-0546-0.

## CAPÍTULO 1

### 3 GENETIC MAPPING OF THE ANDEAN ANTHRACNOSE RESISTANCE GENE PRESENT IN THE COMMON BEAN CULTIVAR BRSMG REALCE\*

Lucas Matias Gomes-Messias<sup>1</sup>, Rosana Pereira Vianello<sup>2</sup>, Gabriella Ribeiro Marinho<sup>3</sup>, Luana Alves Rodrigues<sup>2</sup>, Alexandre Siqueira Guedes Coelho<sup>1</sup>, Helton Santos Pereira<sup>2</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>2</sup>, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>2\*</sup>

---

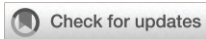
\*Capítulo publicado como artigo no periódico científico *Frontiers in Plant Science*.

<sup>1</sup>Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás-GO, Brazil.

<sup>3</sup>Pontifical Catholic University of Goiás, Goiânia, Brazil

GOMES-MESSIAS, L. M.; VIANELLO, R. P.; MARINHO, G. R.; RODRIGUES, L. A.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; DE SOUZA, T. L. P. O. Genetic mapping of the Andean anthracnose resistance gene present in the common bean cultivar BRSMG Realce. **Frontiers in Plant Science**, 13:1033687. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033687>.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Maria Celeste Gonçalves-Vidigal,  
Universidade Estadual de Maringá,  
Brazil

## REVIEWED BY

James Beaver,  
University of Puerto Rico at Mayagüez,  
Puerto Rico  
Giseli Valentini,  
Beltsville Agricultural Research Center  
(USDA), United States

## \*CORRESPONDENCE

Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza  
thiago.souza@embrapa.br

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Plant Breeding,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 31 August 2022

ACCEPTED 28 October 2022

PUBLISHED 14 November 2022

## CITATION

Gomes-Messias LM, Vianello RP,  
Marinho GR, Rodrigues LA,  
Coelho ASG, Pereira HS, Melo LC and  
de Souza TLPO (2022) Genetic  
mapping of the Andean anthracnose  
resistance gene present in the  
common bean cultivar BRSMG Realce.  
*Front. Plant Sci.* 13:1033687.  
doi: 10.3389/fpls.2022.1033687

## COPYRIGHT

© 2022 Gomes-Messias, Vianello,  
Marinho, Rodrigues, Coelho, Pereira,  
Melo and de Souza. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use,  
distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with  
these terms.

# Genetic mapping of the Andean anthracnose resistance gene present in the common bean cultivar BRSMG Realce

Lucas Matias Gomes-Messias<sup>1</sup>, Rosana Pereira Vianello<sup>2</sup>,  
Gabriella Ribeiro Marinho<sup>3</sup>, Luana Alves Rodrigues<sup>2</sup>,  
Alexandre Siqueira Guedes Coelho<sup>1</sup>,  
Helton Santos Pereira<sup>2</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>2</sup>  
and Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, <sup>2</sup>Embrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás, Brazil, <sup>3</sup>Pontifical Catholic University of Goiás, Goiânia, Brazil

The rajado seeded Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar BRSMG Realce (striped seed coat) developed by Embrapa expressed a high level of anthracnose resistance, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, in field and greenhouse screenings. The main goal of this study was to evaluate the inheritance of anthracnose resistance in BRSMG Realce, map the resistance locus or major gene cluster previously named as *Co-Realce*, identify resistance-related positional genes, and analyze potential markers linked to the resistance allele. F<sub>2</sub> plants derived from the cross BRSMG Realce × BRS FC104 (Mesoamerican) and from the cross BRSMG Realce × BRS Notável (Mesoamerican) were inoculated with the *C. lindemuthianum* races 475 and 81, respectively. The BRSMG Realce × BRS FC104 F<sub>2</sub> population was also genotyped using the DArTseq technology. Crosses between BRSMG Realce and BAT 93 (Mesoamerican) were also conducted and resulting F<sub>2</sub> plants were inoculated with the *C. lindemuthianum* races 65 and 1609, individually. The results shown that anthracnose resistance in BRSMG Realce is controlled by a single locus with complete dominance. A genetic map including 1,118 SNP markers was built and shown 78% of the markers mapped at a distances less than 5.0 cM, with a total genetic length of 4,473.4 cM. A major locus (*Co-Realce*) explaining 54.6% of the phenotypic variation of symptoms caused by the race 475 was identified in Pv04, flanked by the markers snp1327 and snp12782 and 4.48 cM apart each other. These SNPs are useful for marker-assisted selection, due to an estimated selection efficiency of 99.2%. The identified resistance allele segregates independently of the resistance allele *Co-3<sup>3</sup>* (Pv04) present in BAT 93. The mapped genomic region with 704,867 bp comprising 63 putative genes, 44 of which were related to the pathogen-host interaction. Based on all these results and evidence, anthracnose resistance in

BRSMG Realce should be considered as monogenic, useful for breeding purpose. It is proposed that locus *Co-Realce* is unique and be provisionally designated as *CoPv04<sup>R</sup>* until be officially nominated in accordance with the rules established by the Bean Improvement Cooperative Genetics Committee.

#### KEYWORDS

*Phaseolus vulgaris* L., *Colletotrichum lindemuthianum*, molecular breeding, genetic resistance, allelism test, inheritance study

## Introduction

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is grown in more than 120 countries under different temperatures, light intensities, relative humidity, rainfall distributions and technological levels, aspects that contribute to the unstable global production (Pereira et al., 2018; FAO, 2022). Brazil is one of the main producer countries, harvesting 2,366,527 ton in 2020, 85% of which were the *carioca* and black seeded cultivars (Embrapa Rice and Beans, 2022).

The soil and climate conditions in regions with tropical and subtropical climates favor the occurrence of fungal diseases such as anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Basavaraja et al., 2020). This disease, which displays wide geographic distribution and pathogenic variability (Nabi et al., 2022), is more prevalent in areas with temperatures between 15 and 22°C, associated with high relative humidity (RH ≥ 95%) and frequent rainfall (Padder et al., 2017). Depending on the susceptibility level of cultivars, favorable environmental conditions and the presence of the initial inoculum, the disease can cause losses of up to 100% (Singh and Schwartz, 2010). In Brazil, where anthracnose races from the Mesoamerican gene *pool* is predominant, the introgression of resistance alleles from Andean gene *pool* is an important strategy to develop cultivars with durable and broad resistance spectrum (Miklas et al., 2006; Paulino et al., 2022). This strategy is supported by the high level of anthracnose resistance in the Andean cultivars developed by Embrapa in Brazil, particularly in BRSMG Realce, which is resistant to races 65, 73 and 81 (Melo et al., 2014; Aguiar et al., 2021). These races are the most prevalent in the main Brazilian common bean growing areas for the past 30 years (Paulino et al., 2022). The anthracnose resistance of BRSMG Realce has also shown to be stable over time, becoming one of the resistant controls in the final field trials – experiments of Value for Cultivation and Use (VCU) – conducted by the Embrapa breeding program (Aguiar et al., 2021). Thus, identifying resistance sources from the Andean gene *pool* and mapping the resistance alleles present in these genotypes is an indispensable target of common bean pre-breeding programs worldwide, enabling their effective use in the development of cultivars with durable and broad-spectrum resistance.

Disease integrated management and the use of resistant cultivars are considered the most promising, environmentally sustainable and economically profitable methods, in addition to being easily applied by growers (Miklas et al., 2006; Souza et al., 2013). Anthracnose resistance in common bean is largely conditioned by dominant alleles of major quantitative trait loci (QTLs), except for *co-8* (Paulino et al., 2022). Currently, 14 effective resistance loci have been identified; *Co-1* to *Co-17*, excluding *Co-7*, *Co-9* and *Co-10* which have been renamed as alleles from other loci. They were mapped in eight common bean chromosomes (Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv07, Pv08, Pv09 and Pv11). Five of these loci have been identified in resistance sources from the Andean gene *pool*, namely as *Co-1*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14* and *Co-15* (BIC, List of Genes – *Phaseolus vulgaris* L.: <http://www.bic.uprm.edu/wp-content/uploads/2019/10/Bean-Genes-List-2018-v2-1.pdf>). *Co-1* is from the Michigan Dark Red Kidney resistance source and it was mapped in Pv01 (Zuiderveen et al., 2016). In this same genomic region, four alleles were identified: *Co-1<sup>2</sup>* (Melotto and Kelly, 2000), *Co-1<sup>3</sup>* (Melotto and Kelly, 2000), *Co-1<sup>4</sup>* (Gonçalves-Vidigal et al., 2011), and *Co-1<sup>5</sup>* (Gonçalves-Vidigal and Kelly, 2006). *Co-12* is a non-mapped resistance allele identified in the cultivar Jalo Vermelho (Gonçalves-Vidigal et al., 2008). *Co-13* was mapped on Pv03 in the Brazilian *landrace* Jalo Listas Pretas (Gonçalves-Vidigal et al., 2009; Lacanallo and Gonçalves-Vidigal, 2015). *Co-14* was mapped on Pv01, in the Pitanga resistance source (Gonçalves-Vidigal et al., 2012), while *Co-15* was mapped on Pv04 in the Brazilian *landrace* Corinthiano (Sousa et al., 2015).

Recent studies report new genomic regions associated with race-specific resistance to *C. lindemuthianum* in the common bean germplasm from Andean gene *pool*, such as the *Co-BF* (Marcon et al., 2021; Xavier et al., 2022), *Co-AC* (Gilio et al., 2020), *CoPv01<sup>CDRK</sup>* (Gonçalves-Vidigal et al., 2020) and *Co-Pa* alleles (Lima-Castro et al., 2017), which have not been officially named in accordance with the rules established by the Bean Improvement Cooperative Genetics Committee (BIC, Genetics Committee: [http://arsftfbean.uprm.edu/bic/wp-content/uploads/2018/04/Gene\\_Committee\\_Rules.pdf](http://arsftfbean.uprm.edu/bic/wp-content/uploads/2018/04/Gene_Committee_Rules.pdf)).

The main goal of this study was to evaluate the inheritance of anthracnose resistance in BRSMG Realce, map the resistance locus previously named as *Co-Realce*, identify resistance-related

positional genes, and analyze potential markers linked to the resistance allele. In addition, allelism tests have also been done to check if *Co-Realce* segregates independently of the resistance allele *Co-3<sup>3</sup>* present in BAT 93, already used by the Embrapa common bean breeding program.

## Materials and methods

### Genetic material and crosses

BRSMG Realce is a *rajado* (striped seed coat) seeded cultivar from the Andean gene pool developed by Embrapa and partners in Brazil (Supplementary Figure 1). This cultivar presents a type I determinate growth habit, high yield potential and it is well suited to mechanized harvesting. In addition to anthracnose resistance, it is also resistant to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) and bacterial wilt (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) (Melo et al., 2014). BRS FC104 is a Mesoamerican *carioca* seeded cultivar also developed by Embrapa, showing a super-early maturity and high yield potential (Melo et al., 2019). BRS Notável is also a Mesoamerican cultivar from *carioca* market class, but with a medium-early maturing cycle. It is resistant to anthracnose, fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) and bacterial wilt (Pereira et al., 2012). BAT 93 harbors the anthracnose resistance allele *Co-3<sup>3</sup>*. It is a Mesoamerican breeding line developed by Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colombia) from a double cross involving the parents Veranic 2, PI 207262, Jamapa, and Great Northern Tara (Geffroy et al., 2008).

For the inheritance studies, crosses between BRSMG Realce (female parent) and BRS FC104 (male parent) and between BRSMG Realce and BRS Notável (male parent) were carried out at Embrapa Rice and Beans (Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brazil), under controlled conditions (greenhouse). The resulting F<sub>1</sub> plants were checked as true hybrids using 24 microsatellite markers, as described by Morais et al. (2016). F<sub>1</sub> checked plants were then advanced and F<sub>2</sub> seeds were obtained. For the allelism tests, using the same strategy, BRSMG Realce (female parent) was crossed with BAT 93 (male parent) and resulting F<sub>2</sub> seeds were obtained.

### Phenotyping of F<sub>2</sub> populations

An inoculation test of the parents and control lines (BRSMG Realce, BRS FC104, BRS Notável, BAT 93, SEL 1308 and IPA 7419) was carried out under controlled conditions using the

rices 65, 73, 81, 91, 113, 475 and 1609 of *C. lindemuthianum*. The segregating F<sub>2</sub> populations were inoculated using the races that resulted in a better phenotypic contrast between their parents (Supplementary Table 2).

For the inheritance studies, 161 F<sub>2</sub> seedlings from the cross BRSMG Realce × BRS FC104 and 128 F<sub>2</sub> seedlings derived from the cross BRSMG Realce × BRS Notável were grown in expanded polystyrene trays filled with commercial substrate (Plantmax®). Each tray also contained 12 plants of the parents and the control lines (SEL 1308, resistant control; IPA 7419, susceptible control) (Sartorato et al., 2004). Before inoculation, plant tissue samples of each F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104) plant and of their parents were collected and stored in a freezer at -20°C for genomic DNA extraction. For the allelism studies aiming to test the independence between the anthracnose resistance locus present in BRSMG Realce (*Co-Realce*) and *Co-3<sup>3</sup>* present in BAT 93 (chromosome Pv04), which is already used by the Embrapa common bean breeding program, F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT 93) plants were independently inoculated with *C. lindemuthianum* races 65 (132 F<sub>2</sub> plants) and 1609 (183 F<sub>2</sub> plants).

Plants were inoculated seven days after sowing, in the V2 stage (fully expanded primary leaves) (Pastor-Corrales, 1992). The spore solution (1.2 × 10<sup>6</sup> spores/mL) was applied to the abaxial and adaxial leaves, using a manual atomizer (De Vilbiss, No. 15). After inoculation, the plants were incubated in a humidity chamber for 48 h, with temperature adjusted to 20 ± 2°C, 95% relative humidity controlled by nebulization and a 12-hour light/dark photoperiod. Later, nebulization was discontinued, and the inoculated plants were kept in a controlled environment under the same temperature and photoperiod conditions described above, where they remained until disease symptoms were screened.

Symptoms were evaluated seven days after inoculation, based on a 1-to-9 scale, where 1 = absence of symptoms; 2 to 3 = very small lesions, mostly on primary leaves; and 4 to 8 = numerous enlarged lesions or sunken cancers on the lower sides of leaves or hypocotyls; 9 = dead plants due to symptoms caused by the disease (Pastor-Corrales and Tu, 1989). Biologically, scores 1 to 3 represent incompatibility reactions between *C. lindemuthianum* and *P. vulgaris* and, therefore, are typical resistance reactions. On the other hand, the scores 4 to 9 indicate compatibility reactions and are characteristic susceptibility reactions (Pastor-Corrales, 1992). Thus, plants with scores between 1 and 3 are considered resistant (R) and the others susceptible (S). This threshold for R/S disease reactions is widely accepted and used by the bean research community (BIC, Research Techniques – Anthracnose: <http://arsftfbean.uprm.edu/bic/wp-content/uploads/2018/04/Anthracnose.pdf>).

## Genotyping with SNP and SilicoDArT markers

Genomic DNA extraction from parental lines and F<sub>2</sub> plants (BRSMG Realce × BRS FC104) was performed according to the protocol described by Ferreira and Grattapaglia (1998). DNA concentration was estimated by fluorescence, using a Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen by Life Technology), and DNA integrity was checked *via* 1.0% agarose gel electrophoresis. The genotyping protocol was accomplished based on DArTseq technology, developed by DArT Pty Ltd (Kilian et al., 2012), from which SNP and SilicoDArT markers were extracted, as described by Valdisser et al. (2020).

## Genetic mapping with SNP markers

The polymorphic SNP markers between parental lines were tested for Mendelian segregation at an expected ratio of 1:2:1 using the chi-squared test ( $\chi^2$ ; P-value < 0.05), followed by FDR (False Discovery Rate, P-value < 0.05) correction proposed by Benjamini and Hochberg (1995). The linkage groups were established using a LOD-score (logarithm of the odds) of 5 and maximum recombination fraction of 0.1. The order of markers was estimated using the RCD (Rapid Chain Delineation) method with a LOD-score of 3.0. In addition, the most likely position of each marker on the map was obtained using the safe function and later, the ripple function (5-marker windows and LOD-score of 3). Genetic distances were estimated using the Kosambi function (Kosambi, 1944). The coefficient of Spearman's correlation was estimated for the genetic marker positions and the physical marker positions on the reference genomes. The linkage map was constructed in the R software (R Core Team, 2022), using the OneMap package (Margarido et al., 2007).

## QTL analysis and physical mapping

QTL (Quantitative Trait Loci) analysis was carried out using composite interval mapping (CIM) (Zeng, 1993), with a walkspeed of 0.5 cM and window size of 1.0 cM. The coefficient of determination (R<sup>2</sup>) was calculated separately for each interval to determine the percentage of phenotypic variation explained by a single locus. The likelihood ratio values were converted into LOD values using the equation  $LOD = 0.2171 * LTR$  (Churchill and Doerge, 1994). The minimum LOD value to declare the existence of a QTL was estimated using the criterion proposed by Churchill and Doerge (1994), with 1,000 permutations. Analyses were conducted using QTL-Cartographer software (Wang et al., 2012). The *Co-Realce*

genomic region on the Pv04 was graphically represented using the software MapChart (Voorrips, 2002). The physical map was obtained using the positions of each marker linked with target alleles provided in base pairs (bp), according to the reference genome (Schmutz et al., 2014) and using the software MapChart (Voorrips, 2002).

## Gene annotation

The genes annotated in the current version of the bean genome (Schmutz et al., 2014) were extracted from the sequences included in the locus interval identified in this study, using the Phytozome platform (*Phaseolus vulgaris* v2.1, DOE-JGI and USDA-NIFA, <http://phytozome.jgi.doe.gov/>).

## Selection efficiency

Selection efficiency (%SE) of the SNP markers identified in the resistance locus interval was estimated according to the methodology described by Liu (1998), using the following estimator:  $SE (\%) = (1 - 4r^2)$ , where “r” is the recombination frequency between marker pairs.

## Results

### Reaction of parents to selected *C. lindemuthianum* races

Out of the seven *C. lindemuthianum* races used to screen the parents and controls (65, 73, 81, 91, 113, 475 and 1609), BRSMG Realce was resistant to six races, with mean score of 1.0, being susceptible only to race 113 (mean score of 5.2). BRS Notável was susceptible only to race 81 (mean score of 9.0). As expected, the resistant control SEL 1308 was resistant to all seven races, with mean score of 1.0, and the susceptible control IPA 7419 was susceptible, with mean score of 9.0. BRS FC104 was screened with five races (73, 81, 91, 475 and 1609), showing susceptibility to the races 81, 91, 475 and 1609. For the inheritance studies and allelism tests, the *C. lindemuthianum* races causing strongest contrasts for disease symptoms among parents were those selected and used to inoculate the segregating populations (Supplementary Table 2).

### Inheritance studies and allelism tests

The screening of 161 F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104) plants with the race 475 shown 127 resistant (scores 1-to-3) and

34 susceptible plants (scores 4-to-9), resulting in a segregation ratio of 3R:1S ( $\chi^2 = 1.29$ ; P-value = 26%). A total of 128 F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS Notável) plants were inoculated with the *C. lindemuthianum* race 81. The segregation ratio observed was also 3R:1S ( $\chi^2 = 1.04$  and P-value = 31%) (Table 1; Supplementary Table 1).

A total of 132 and 183 F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT 93) plants were inoculated with the *C. lindemuthianum* races 65 and 1609, respectively. In both cases, the segregation ratio observed was 15R:1S ( $\chi^2 = 0.98$  and P-value = 32%, and  $\chi^2 = 0.55$ ; P-value = 46%). The joint analysis using data from all 315 F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT 93) also shown a segregation ratio of 15R:1S ( $\chi^2 = 0.005$  and P-value = 94%) (Table 1).

These results strongly suggest that anthracnose resistance in BRSMG Realce is controlled by a single locus with complete dominance. In addition, that the resistance allele present in

BRSMG Realce segregates independently of the resistance allele *Co-3<sup>3</sup>* present in BAT 93 and mapped in Pv04.

## Genetic map

The genotyping approach based on DArTseq technology resulted in 13,083 SNP and 16,186 DArT markers (Supplementary Table 3), with call rates ranging from 0.68 to 1.00 and from 0.56 to 1.00, respectively (Supplementary Table 4). A total of 6,304 (48.2%) SNP markers were polymorphic in the F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104) population. The segregation test identified 4,175 (31.9%) of these markers as undistorted SNPs, once they fit to the segregation ratio of 1:2:1 (FDR ≥ 5%) and therefore were used for genetic mapping. Out of these markers, 4,129 (31.6%)

TABLE 1 Inheritance of anthracnose resistance in the Andean common bean cultivar BRSMG Realce from the rajado (striped seed coat) market class, and allelism test between BRSMG Realce (*Co-Realce*) and BAT93 (*Co-3<sup>3</sup>*).

Race <sup>a</sup>	Genotype	Hypothesis <sup>d</sup> R:S	Observed		Expected		$\chi^2$	P-value
			R	S	R	S		
81	BRSMG Realce ( <i>Co-Realce</i> )	1:0	12	0	12	0	–	–
	BRS Notável	0:1	0	12	0	12	–	–
	IPA 7419 <sup>b</sup>	0:1	0	12	0	12	–	–
	F <sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS Notável)	3:1	101	27	96	32	1.0	0.31
475	BRSMG Realce ( <i>Co-Realce</i> )	1:0	12	0	12	0	–	–
	BRS FC104	0:1	0	12	0	12	–	–
	IPA 7419	0:1	0	12	0	12	–	–
	F <sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104)	3:1	127	34	121	40	1.3	0.26
65	BRSMG Realce ( <i>Co-Realce</i> )	1:0	12	0	12	0	–	–
	BAT93	1:0	12	0	12	0	–	–
	IPA 7419	0:1	0	12	0	12	–	–
	F <sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT93)	3:1	121	11	99	33	19.6	9.77e <sup>-06</sup>
		9:7	121	11	74	58	67.3	2.36e <sup>-16</sup>
	13:3	121	11	107	25	9.4	0.002	
	15:1	121	11	124	8	0.98	0.32	
1609	BRSMG Realce	1:0	12	0	12	0	–	–
	BAT93 ( <i>Co-3<sup>3</sup></i> )	1:0	12	0	12	0	–	–
	IPA7419	0:1	0	12	0	12	–	–
	F <sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT93)	3:1	174	9	137	46	39.4	3.52e <sup>-10</sup>
		9:7	174	9	103	80	112.1	< 2.2e <sup>-16</sup>
	13:3	174	9	149	34	22.9	1.64e <sup>-06</sup>	
	15:1	174	9	172	11	0.55	0.46	
F <sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT93) – Joint analysis <sup>c</sup>		3:1	295	20	236	79	58.4	2.10e <sup>-14</sup>
		9:7	295	20	177	138	179.1	< 2.2e <sup>-16</sup>
		13:3	295	20	256	59	31.8	1.71e <sup>-08</sup>
		15:1	295	20	295	20	0.01	0.94

<sup>a</sup>Race of *Colletotrichum lindemuthianum*.

<sup>b</sup>Susceptible control.

<sup>c</sup>Joint allelism test performed using all resistant (121 + 174) and susceptible (11 + 9) F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BAT93) plants, considering the reaction to races 65 and 1609.

<sup>d</sup>R – Number of resistant plants, and S – Number of susceptible plants.

performed well for linkage analysis. Among them, 395 and 60 markers were positioned in *contigs* and *scaffolds*, respectively (Supplementary Figure 2; Supplementary Table 4).

A linkage map was built including 4,074 SNP markers covering the entire common bean genome. The linkage groups with the largest and smallest number of markers were Pv02 and Pv04, with 505 and 152 SNP markers, respectively. The average number of markers per linkage group was 370 (Supplementary Table 5). The SNPs mapped on *contigs* and *scaffolds* were allocated to the 11 chromosomes (Supplementary Table 6). When keeping only the markers with high statistical support (SAFE map), a total of 1,315 markers were mapped and well distributed in the common bean genome (Supplementary Figure 2), with an average of 120 markers per linkage group. The total genetic linkage distance of the SAFE map was 4,473.44 cM, with an average of 406.68 cM. Pv01 was the largest linkage group, with 561.32 cM, and the smallest one was Pv04, with 196.82 cM. In average, 78.1% of the markers were mapped at distances less than or equal to 5.0 cM, with an average distance of 4.07 cM between markers along the 11 chromosomes (Supplementary Table 5). Pv02 shown highest density (Supplementary Figure 2), with an average distance of 2.91 cM between markers and 89.7% of the markers were mapped at  $\leq 5.0$  cM (Supplementary Table 5). Markers ordered with a LOD-score  $< 3.0$  were represented as accessory markers in their most likely position (Supplementary Table 6). The Spearman's correlation coefficients ( $\rho$ ) between the positions of the markers on linkage map and physical map were positive (0.996-to-0.999) and highly significant ( $p$ -value  $< 2.2e^{-16}$ ), with an average of 0.999 (Supplementary Table 5).

## Major locus associated with anthracnose resistance

The QTL analysis identified a major locus associated with anthracnose resistance in the Andean common bean cultivar BRSMG Realce on Pv04 (*Co-Realce*), with a LOD-score of 15.3 and explaining 54.60% of the phenotypic variation considering the symptoms incited by the *C. lindemuthianum* race 475. The size of this QTL was 4.48 cM flanked by the SNP markers snp1327 (position 477,285 bp) and snp12782 (1,182,123 bp) (Table 2;

Figure 1). Simple linear regression analysis shown that markers snp1327 and snp12782 explain, respectively, 29% and 33% of the phenotypic variation (Table 3). The homozygous plants for the snp1327 reference allele (TT) associated with disease resistance shown a mean severity score of 1.62, while the mean score of homozygous plants for the respective susceptibility allele (CC) was 4.54 (Figure 2). Considering the locus snp12782, the homozygous plants for the resistance allele (CC) shown a mean severity score of 1.59, while the mean score of homozygous plants for the respective susceptibility allele (TT) was 4.86 (Figure 2). The joint selection of homozygous and heterozygous plants for *Co-Realce* using the markers snp1327 and snp12782 resulted in a set of plants showing a mean severity score of 1.54. The size of *Co-Realce* genomic region was 704,867 bp long (Pv04: 477,217 bp...1,182,084 bp) (Table 2) and a total of 63 genes were observed to be located in this interval, of which 44 are involved in signaling pathways of response to pathogen attack (Supplementary Table 7).

## Increasing of mapping resolution in *Co-Realce* genomic region

In order to increase the mapping resolution in the genomic region containing the major locus *Co-Realce*, an additional set of 246 markers, including 135 SNPs and 111 SilicoDARTs previously known as located on Pv04 and with call rate of 0.58-to-1.0, were included in the genetic linkage analysis. The recombination fraction was estimated and 229 markers were mapped (Supplementary Table 8). By increasing markers density in the *Co-Realce* genomic region, its interval reduced from 704,867 bp to 20,405 bp (LOD of 16.3) and the phenotypic variation explained was 54% (Table 2). After this new approach, the closest and significantly markers identified as associated with *Co-Realce* were dart9817 (position 485,246 bp) and snp3308 markers (position 505,696 bp) spanning 2.9 cM (Table 2; Figure 1). A total two putative candidate genes associated with cell membrane processes were identified in the *Co-Realce* region. The Phvul.004G006800 transcript encodes proteins from the nuclear pore complex involved in the membrane transport system (Nuclear Pore Complex NPC - Nup210 GP210), and the transcript Phvul.004G006900 that encodes a protein from the glycosylphosphatidylinositol transamidase complex

TABLE 2 SNP and DArT markers flanking the major locus (*Co-Realce*) controlling anthracnose resistance in the Andean common bean cultivar BRSMG Realce, recombination frequency between the pair of markers flanking *Co-Realce*, interval size of the *Co-Realce* region, LOD-score and percentage of phenotypic variation explained by major locus *Co-Realce*.

Interval <sup>a</sup>	Pair of markers <sup>b</sup>	rf	Interval size	LOD-score	R <sup>2</sup> (%)
Pv04: 477,217...1,182,084	snp1327 and snp12782	4.48 cM	704,867 pb	15.3	54.60
Pv04: 485,246...505,651	dart9817 and snp3308	2.91 cM	20,405 pb	16.3	54.02

<sup>a</sup>Chromosome Pv04 (Chr04).

<sup>b</sup>Markers flanking the major locus *Co-Realce*.

rf - recombination frequency between the markers flanking *Co-Realce*.

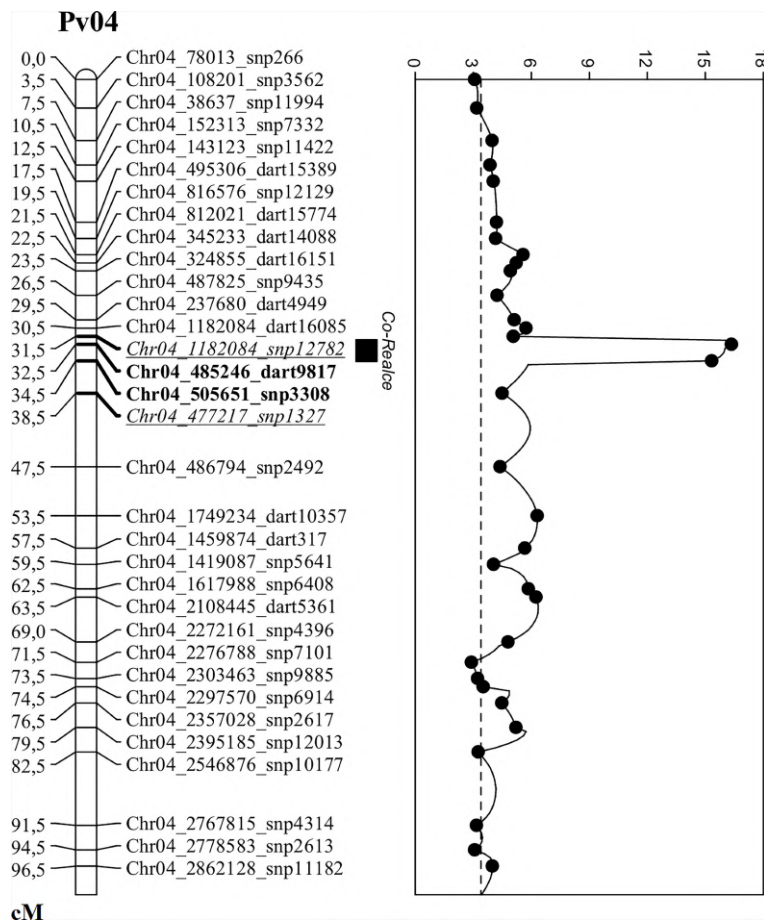


FIGURE 1

Genetic map of the *Co-Realce* genomic region on the common bean chromosome Pv04. QTL analysis was used to increase the mapping resolution in *Co-Realce* genomic region, performed using the  $F_2$  population derived from the cross BRSMG Realce  $\times$  BRS FC104 phenotyped with the *Colletotrichum lindemuthianum* race 475 and genotyped with SNP and SilicoDArT markers. The two underlined and italicized markers delimit the *Co-Realce* genomic region. The two bold markers delimit the *Co-Realce* genomic region after increasing the mapping resolution. The highest peak on Pv4 represents the major locus in the *Co-Realce* genomic region and the horizontal dashed line is the LOD-score threshold estimated after 1,000 permutations.

(Glycosylphosphatidylinositol transamidase-GAA1; Phvul.004G006900-GAA1; Phvul.004G006900), which generally act as membrane anchors for many cell surface proteins (Supplementary Table 7).

## Discussion

Based on inheritance and allelism studies, and considering additional information from genetic and physical mapping, this study identified a major anthracnose resistance locus in the Andean common bean cultivar BRSMG Realce developed by Embrapa and partners in Brazil. This cultivar shows several important agronomic traits (Melo et al., 2014), including a high level, wide and durable resistance to anthracnose disease caused

by the fungus *C. lindemuthianum*. It has been used as parent in crosses and as a resistant control in final field trials conducted by the Embrapa breeding program at least for the last decade (Aguar et al., 2021), and its resistance has shown to be stable and durable over time. The use of genetic resistance is the most effective and sustainable tool to manage plant pathogens (Assefa et al., 2019). The potential to exploit resistance increases when the genetic control of the trait is well known, as well as its effects (Vollmann and Buerstmayr, 2016). For these reasons, and considering that the majority of anthracnose resistance genes described and mapped in common bean are from Mesoamerican gene pool, the efforts of the present work on characterization and mapping a new resistance allele in the Andean cultivar BRSMG Realce should be of great interest to the bean research community worldwide.

**TABLE 3** Simple linear regression analysis between molecular markers (snp1327, snp12782, snp3308 and dart9817) flanking the genomic region of the major locus *Co-Realce* and the phenotype of F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104) plants inoculated with the *C. lindemuthianum* race 475.

Source of variation	Df	SS	MS	F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Inclination <sup>c</sup>
<u>snp1327<sup>a</sup></u>							
Genotype	2	300.4	150.2	32.7	1.48E-12	0.29	–
<u>TT</u> vs CC <sup>b</sup>	1	203.5	203.5	44.33	4.68E-10	–	-0.13
<u>CT</u> vs CC	1	96.9	96.9	21.11	9.02E-06	–	-2.12
Residual	153	702.4	4.59	–	–	–	–
Total	155	1002.8	154.79	–	–	–	–
<u>snp12782</u>							
Source of variation	Df	SS	MS	F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Inclination
Genotype	2	338.6	169.2	39.7	1.10E-14	0.33	–
<u>CC</u> vs TT	1	225.9	225.9	52.91	1.53E-11	–	-3.32
<u>TC</u> vs TT	1	112.8	112.8	26.42	8.02E-07	–	-2.24
Residual	158	674.5	4.27	–	–	–	–
Total	160	1013.1	173.47	–	–	–	–
<u>snp3308</u>							
Source of variation	Df	SS	MS	F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Inclination
Genotype	2	381.5	190.8	47.1	< 2e-16	0.37	–
<u>CC</u> vs TT	1	250.8	250.8	61.97	5.64E-13	–	-3.53
<u>TC</u> vs TT	1	130.7	130.7	32.29	6.39E-08	–	-2.43
Residual	155	627.3	4.05	–	–	–	–
Total	157	1008.8	194.81	–	–	–	–
<u>dart9817</u>							
Source of variation	Df	SS	MS	F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Inclination
<u>1</u> vs 0	1	356.7	356.7	81.56	1.06E-15	0.36	-1.72
Residual	143	625.4	4.4	–	–	–	–
Total	144	982.1	361.1	–	–	–	–

<sup>a</sup>Df – degree of freedom, SS – sum of squares, MS – mean squares; the underline alleles are linked to disease resistance.

<sup>b</sup>Contrast considered in the regression analysis between marker alleles and the disease severity of *C. lindemuthianum* race 475.

<sup>c</sup>Angular coefficient of the linear regression equation; the negative sign on the inclination score indicates that the allele is associated with disease resistance.

The recent advances of genotyping by sequencing (GBS) methods resulted in the consequent development of high-density genetic maps using SNP markers. This approach allowed the identification of a large number of associations between genetic markers and genomic regions (major genes or QTLs), broadening the perspectives for marker-assisted selection (MAS) (Cobb et al., 2019). Berry et al. (2020) developed a linkage map for common bean containing 1,951 SNPs, with an average density of one marker every 0.52 cM and a total size of 1,011.7 cM, from a total of 48,244 SNPs and n = 146 RILs. Almeida et al. (2021) used a population of 91 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> individuals and an initial set of 791,361 SNPs to develop a *P. vulgaris* genetic map with 1,091 markers and a total size of 1,923.16 cM, with an average distance between markers of 1.90 cM. In the present study, 13,083 SNPs were identified and a linkage map with 1,118 SNPs (n = 161 F<sub>2</sub>) was developed, with a total size of 4,473.4 cM and an average distance of 4.07 cM (Supplementary Table 5). However, it is important to highlight that in the present study only high quality not-distorted markers were used and that the markers' orders correlated well with their

physical map positions (Spearman's coefficient > 99%) (Supplementary Table 5).

The resolution of a genetic map depends directly on the number of recombination events between the marker loci and potential target loci, what can be limited by the population size (Liu, 1998). In the perspective of value and usefulness for plant breeding, a low genetic distance could be redressed by the identification of markers flanking the target locus and explaining a significant part of the phenotypic variation (Ferreira et al., 2006). In this study, the initial genetic map built by linkage analysis shown a limitation of the population size to identify recombinant individuals, once the inclusion of *Co-Realce* locus inflated the genetic distances in its genomic region on Pv04. In addition, regarding the phenotypic data from the F<sub>2</sub> mapping population, the categorization of nine symptom-scores into only two phenotypic classes (1-to-3, resistance; and 4-to-9, susceptibility) may also explain the lack of precision in positioning the *Co-Realce* locus in the initial linkage map. For these reasons, and considering that the *Co-Realce* locus segregates as a major gene (Table 1) and that it has shown a

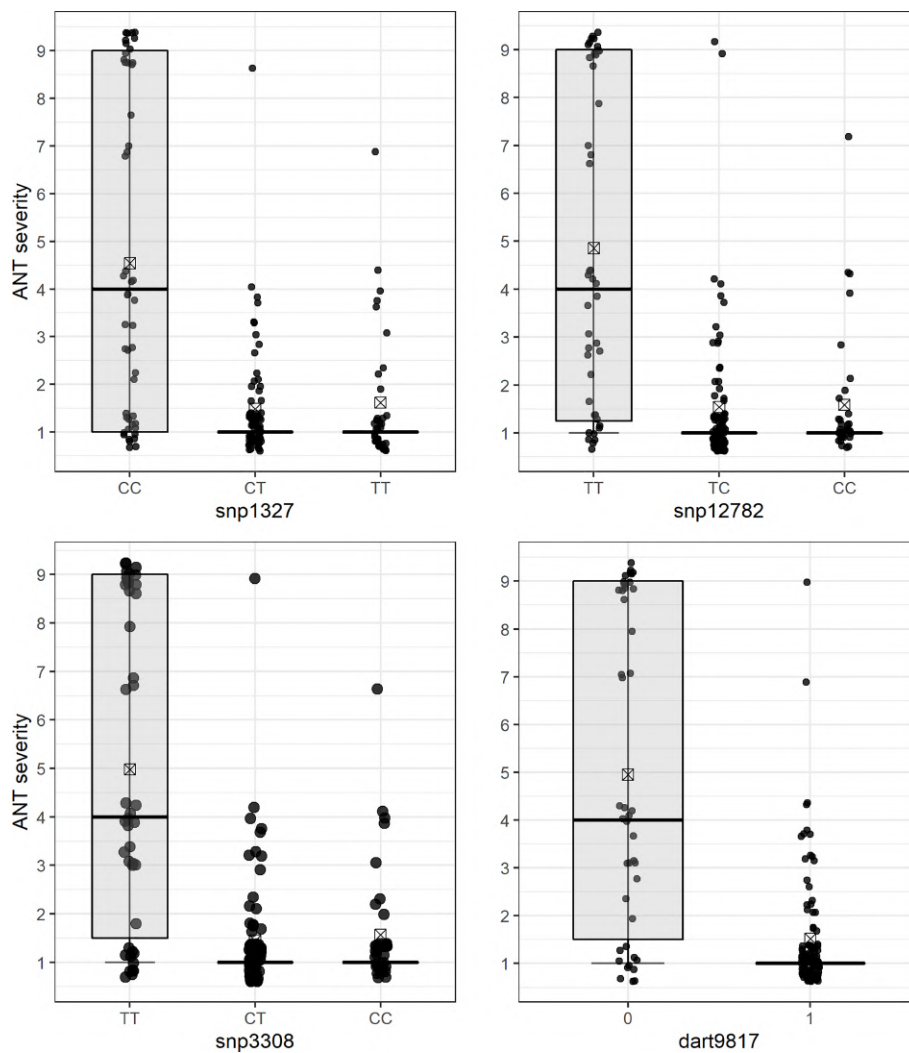


FIGURE 2

Differential reaction of  $F_2$  (BRSMG Realce  $\times$  BRS FC104) plants to *Colletotrichum lindemuthianum* race 475 for each molecular genotype class of SNP markers flanking the *Co-Realce* genomic region: snp1327 (CC, CT and TT), snp12782 (TT, TC and CC), snp3308 (TT, CT and CC) and dart9817 (0 and 1). The mean phenotypic scores are represented by a rectangle inside each box plot.

real value for the common bean breeding programs in Brazil, the QTL analysis was the approach used to map the major locus in the genomic region associated to anthracnose resistance and to identify useful SNP markers for MAS.

Using a panel of 189 common bean genotypes inoculated with the isolates Lv134 and Lv238 of the *C. lindemuthianum* race 65, Costa et al. (2021) identified by association study two genomic regions on Pv04 related with the resistance to Lv134 and Lv238. The SNP marker ss715649771 (96,165 bp) associated with the resistance to Lv134 and explaining 64.4% of the phenotypic variation and ss715646893 (1,165,722 bp) associated with the resistance to Lv238 and explaining 72.2% of the phenotypic variation. Mungalu et al. (2020) also report a major QTL (*ANT02.1<sup>UC,SA</sup>*) for anthracnose resistance on Pv02,

which explained 79.0 and 76.8% of the phenotypic variation. In both cases, major loci for resistance to anthracnose were identified by mapping using quantitative approaches.

The major anthracnose resistance locus (*Co-Realce*) identified in BRSMG Realce on over an interval of 704,867 bp (477,217-to-1,182,084 bp) of the *P. vulgaris* chromosome Pv04 explained 54.6% of the total phenotypic variation (Table 2). For this reason, anthracnose resistance in BRSMG Realce should be considered as a major gene or complex gene locus for breeding. It was also verified that *Co-Realce* segregates independently from *Co-3* (Table 1), the physically closest anthracnose resistance locus on Pv04 that has already been used by the Embrapa common bean breeding program to develop elite germplasm (Vieira et al., 2018). Still considering physical map evidences, the

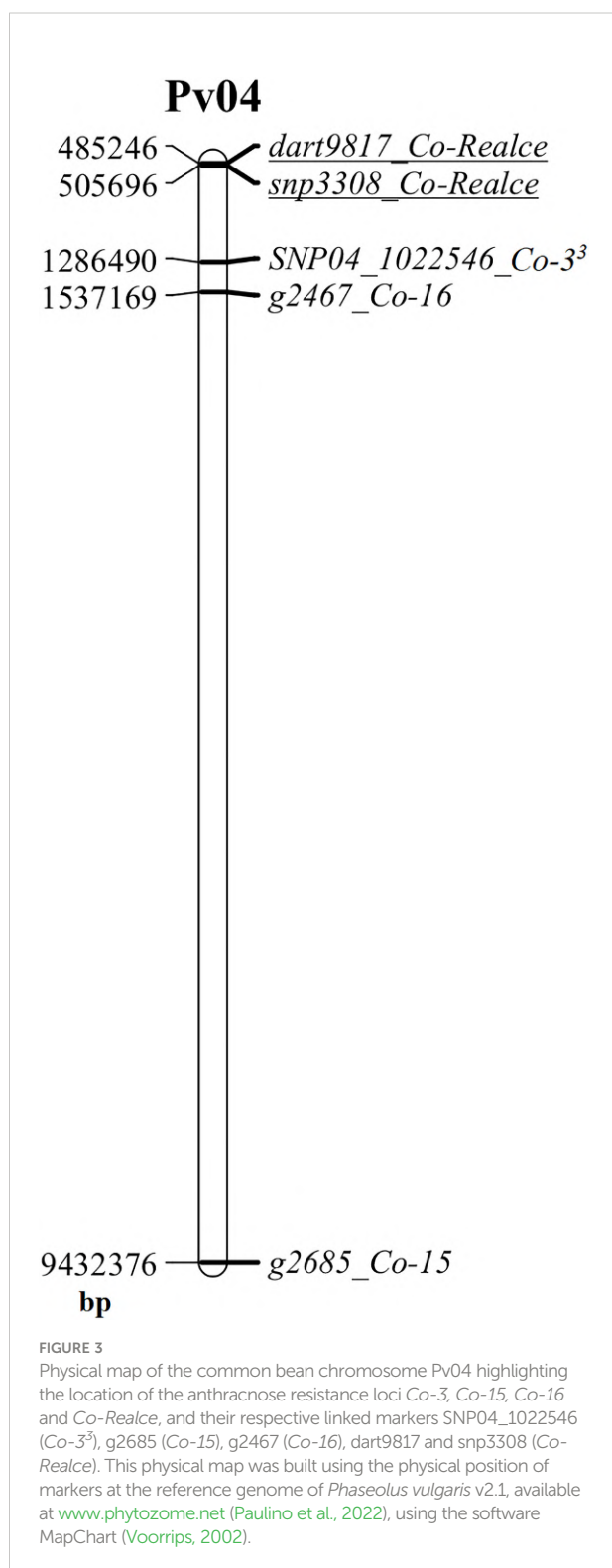
positions of *Co-3* (1,286,490 bp) (Murube et al., 2019), *Co-15* (9,432,376 bp) (Sousa et al., 2015) and *Co-16* (1,537,169 bp) (Coimbra-Gonçalves et al., 2016) on Pv04 shown that those anthracnose resistance loci are distant from *Co-Realce* by 780,839 bp, 8,926,725 bp and 1,031,518 bp, respectively (Figure 3). The locus *Co-3* is the physically closest to *Co-Realce* but allelism tests demonstrated that they are distinct and independent from each other (Table 1). This evidence also indicates that the physically more distant loci *Co-15* and *Co-16* are also distinct and independent of *Co-Realce* (Figure 3). These results corroborate the hypothesis that BRSMG Realce harbors a new anthracnose resistance locus on Pv04. As already reported by Souza et al. (2016) and Nay et al. (2019b), physical position analysis using information from molecular markers linked to known resistance genes and the reference genome sequence of *P. vulgaris* has been used as an additional criterion to support the characterization of new disease resistance loci in common bean, as for angular leaf spot caused by *Pseudocercospora griseola*. However, to fully verify that *Co-Realce* does not coincide with any of the other two resistance loci previously mapped on Pv04, allelism tests between BRSMG Realce and Corinthiano (*Co-15*) and between BRSMG Realce and Crioulo 159 (*Co-16*) are also being carried out at Embrapa Rice and Beans. Other disease resistance genes have been mapped on Pv04, such as *Pse-6* for resistance to *Pseudomonas syringae*, *Ur-5* for resistance to *Uromyces appendiculatus*, *Phg-3* for resistance to *P. griseola*, and *Pm-2* for resistance to *Erysiphe diffusa* (Pérez-Vega et al., 2013; Gonçalves-Vidigal et al., 2013; Cabrera, 2020). Some of these genes were mapped close to the genomic position of *Co-Realce* on Pv04, showing that this region is an important gene cluster for the coevolution between *P. vulgaris* and some of its relevant pathogen species.

Forty-four candidate genes related to pathogen-host interaction were annotated on *Co-Realce* genomic region (Supplementary Table 7). Among these genes, it is important to highlight those associated with response mechanisms to pathogen attack, including immunological receptors (Bent and Mackey, 2007), cellular communication between cytoplasm and nucleus (Zuiderveen et al., 2016; Vidigal Filho et al., 2020), association with kinase receptors (Zhou, 2019), elicitor molecule recognition and degradation (Craig et al., 2009), post-translational processing (Manna, 2015), phosphate transport (Dong et al., 2019), transcription regulation and translation (Grafi et al., 2007; Woloshen et al., 2011), and extracellular pH modulation (Elmore and Coaker, 2011). There were also candidate genes that encode LRR proteins in different common bean chromosomes and that are associated with defense against fungi (Nay et al., 2019a; Mungalu et al., 2020; Nabi et al., 2022), bacteria (Wu et al., 2017) and virus (Seo et al., 2006). Furthermore, the upper portion of Pv04 contains a large cluster of resistance genes (Meziadi et al., 2016), over an interval of ~650 kb (from 345,784-to-993,499 bp) and including 28 genes

related to resistance mechanisms in beans (Phytozome v11.0; *Phaseolus vulgaris* v2.1).

Three SNP markers linked to *Co-Realce* were identified by the QTL analysis (Figure 2). The snp12782 (position 1,182,123 bp) is positioned at around 5,164 bp from the Phvul.004G009500 gene (LRR), and the presence of the reference allele C (C/T) in homozygosis resulted in the selection of F<sub>2</sub> plants with an average score three times lower than that of plants without this allele ( $p < 0.05$ ) (Figure 2). In addition, we assigned the markers snp1327 (position 477,285 bp) and dart9817 (position 485,246 bp) close to the Phvul.004G006800 gene region. This gene encodes the glycoprotein (NUP210) of the nuclear pore complex (NPC) and it has already been reported as associated with *P. vulgaris* resistance to anthracnose (Vidigal Filho et al., 2020; Shafi et al., 2022). It plays an important role in plant defense mechanisms, since they depend on the communication between the cytoplasm and the cell nucleus to be activated (Fang and Gu, 2021). NPC glycoproteins are necessary to make the nuclear envelope permeable to signaling macromolecules (Tamura and Hara-Nishimura, 2013). The snp3308 (position 505,696 bp) was mapped in the region of the Phvul.004G006900 (GAA1), which encodes the protein glycosylphosphatidylinositol transferase and helps recognize extracellular signals by associating with receptor-like kinases (Zhou, 2019). There are other candidate genes positioned in the *Co-Realce* genomic region, such as the Phvul.004G007600 and Phvul.004G009401 protein-encoding genes (RBP-RNA binding proteins) (Supplementary Table 7), essential to activate the defense response to pathogen attack in plants (Albà and Pagès, 1998; Woloshen et al., 2011). The main activities performed by RBP occur in the post-transcriptional processing of pre-RNA, and act to control splicing, polyadenylation of 3' extremity of RNA in the cap (modified guanine) added to the 5' extremity (Albà and Pagès, 1998; Woloshen et al., 2011). The Phvul.004G007600 gene is associated with *P. vulgaris* resistance to race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Tock et al., 2017). Recently, Vidigal Filho et al. (2020) identified the gene Phvul.004G020900, which encodes RBP associated with *P. vulgaris* resistance to anthracnose race 65 ( $R^2 = 15\%$ ), corroborating the results of the present study.

The markers snp1327 (position 477,285 bp) and dart9817 explained 29 and 36% of phenotypic variation, respectively (Table 3). Selecting efficiency of the marker pairs snp1327/snp12782, snp1327/snp3308 and snp12782/snp3308 flanking the *Co-Realce* genomic region was 98.9%, 99.1% and 99.6%, respectively. This result support the high potential of these for MAS of *Co-Realce* during its introgression in elite lines and cultivars (Table 4; Supplementary Table 9). They are already being used by the Embrapa common bean breeding program in an allele pyramiding approach aiming to stack *Co-Realce* and the Mesoamerican resistance allele *Co-4<sup>2</sup>*, present in the SEL 1308



(Supplementary Table 2), in carioca seeded advanced lines. This breeding strategy aims to broadening the genetic resistance to anthracnose in the Brazilian common bean elite germplasm.

**TABLE 4** Selection efficiency and recombination frequency of SNP markers positioned in the genomic interval of the major locus *Co-Realce*.

	snp1327	snp3308	snp12782	
snp1327	–	99.1	98.9	ES (%) <sup>a</sup>
snp3308	0.047	–	99.6	
snp12782	0.053	0.032	–	rf (cM) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>rf – Recombination frequency; ES – Selection efficiency.

## Conclusions

Results obtained by the present work from inheritance studies, allelism tests, genetic and physical mapping shown that anthracnose resistance in the Andean common bean cultivar BRSMG Realce is controlled by a major locus (or complex gene locus) on Pv04, which has been previously named as *Co-Realce*. SNP markers useful for marker-assisted selection have been identified as linked to the dominant allele of this locus, showing a selection efficiency higher than 99.0%. Allelism tests and physical mapping of *Co-Realce* genomic region on Pv04 support that *Co-Realce* is different from other major loci already mapped on this same chromosome. The mapped genomic region included candidate genes related to pathogen-host interaction. Based on all these results and evidences, anthracnose resistance in BRSMG Realce should be considered as monogenic (major gene or complex gene locus) for breeding purpose. It is proposed that locus *Co-Realce* is unique and be provisionally designated as *CoPv04<sup>R</sup>* until be officially nominated in accordance with the rules established by the Bean Improvement Cooperative Genetics Committee.

The cultivar BRSMG Realce is being already used by the Embrapa common bean breeding program as an anthracnose resistant donor parent from the Andean gene pool. This is because its resistance has shown to be stable and durable over time, even in final field trials conducted by the Embrapa in Brazil at least for the last 10 years. After the characterization of the anthracnose resistance in BRSMG Realce by the present work, this cultivar can now be used as a relevant donor source of an Andean resistance allele by common bean breeding programs worldwide, once it is already been successfully used for this propose in Brazil.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

LMG-M, RPV, HSP, LCM, and TLPOS contributed to the conception and design of the study. LMG-M and LAR were in charge of laboratory analysis on DNA extraction and samples preparation and shipment. LMG-M, GRM, and TLPOS carried out crosses, plant material development, and the phenotyping assays. LMG-M, ASGC, and TLPOS performed the statistical analysis and elaborated graphs and figures. RPV, HSP, LCM, and TLPOS contributed with research grant funding application and management. LMG-M and RPV wrote the first draft of the manuscript. LMG-M and TLPOS wrote the final version of the manuscript. All authors reviewed and contributed to the article, and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA (Grants Number: 20.18.01.009.00.00 and 23.16.04.042.00.00) and by CNPq, the National Council for Scientific and Technological Development (Grant Number: 442062/2019-2); Brazilian Government. LMG-M was supported by CAPES, the Coordination of Superior Level Staff Improvement (Grant Number: 88882.386267/2019-01). RPV, HSP, LCM, and TLPOS are supported by CNPq. The funders were not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

## Acknowledgments

The authors are grateful to staff from Embrapa Rice and Beans (Antônio de Goiás-GO, Brazil) and Federal University of

Goiás (Goiânia-GO, Brazil) for technical support and facilities availability to perform this work.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1033687/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Seeds of BRSMG Realce, an Andean common bean rajado (striped seed coat) seeded cultivar developed by Embrapa and partners in Brazil (Melo et al., 2014).

### SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Genetic map of the F<sub>2</sub> (BRSMG Realce × BRS FC104) population containing 1,118 SNP markers distributed across all 11 common bean chromosomes (Pv01-to-Pv11).

## References

- Aguiar, M. S., Pereira, H. S., Faria, L. C., Souza, T. L. P. O., Da Costa, J. G. C., Contadora, N. P. S., et al. (2021). BRS FS311: common bean cultivar with striped seed coat, high yield, and commercial quality. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 21, e388121412. doi: 10.1590/1984-70332021v21n4c61
- Albà, M. M., and Pagès, M. (1998). Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *Trends Plant Sci.* 3, 15–21. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01151-5
- Almeida, C. P., De Carvalho Paulino, J. F., Bonfante, G. F. J., Persegui, J. M. K. C., Santos, I. L., Gonçalves, J. G. R., et al. (2021). Angular leaf spot resistance loci associated with different plant growth stages in common bean. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.647043
- Assefa, T., Mahama, A., Brown, A. V., Cannon, E. K. S., Rubyogo, J. C., Rao, I. M., et al. (2019). A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol. Breed.* 39, 1–23. doi: 10.1007/s11032-018-0920-0
- Basavaraja, T., Pratap, A., Dubey, V., Gurumurthy, S., Gupta, S., and Singh, N. P. (2020). "Molecular and conventional breeding strategies for improving biotic stress resistance in common bean," in *Accelerated plant breeding*. Eds. S. S. Gosal and S. H. Wani (Switzerland: 3rd Springer Nature), 389–421.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bent, A. F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and r genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399–436. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427
- Berry, M., Izquierdo, P., Jeffery, H., Shaw, S., Nchimbi-Msolla, S., and Cichy, K. (2020). QTL analysis of cooking time and quality traits in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 133, 2291–2305. doi: 10.1007/s00122-020-03598-w
- Cabrera, E. R. I. (2020). Mapping the Ur-5 gene conferring resistance to common bean rust (Fargo: North Dakota State University), 55.
- Churchill, G. A., and Doerge, R. W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963–971. doi: 10.1093/genetics/138.3.963

- Cobb, J. N., Biswas, P. S., and Platten, J. D. (2019). Back to the future: revisiting MAS as a tool for modern plant breeding. *Theor. Appl. Genet.* 132, 647–667. doi: 10.1007/s00122-018-3266-4
- Coimbra-Gonçalves, G. K., Gonçalves-Vidigal, M. C., Coelho, R. T., Valentini, G., Vidigal Filho, P. S., and Lacanallo, G. F. (2016). Characterization and mapping of anthracnose resistance gene in mesoamerican common bean cultivar crioulo 159. *Crop Sci.* 56, 2904–2915. doi: 10.2135/cropsci2015.10.0651
- Costa, L. C., Nalin, R. S., Dias, M. A., Ferreira, M. E., Song, Q., Pastor-Corrales, M. A., et al. (2021). Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 134, 543–556. doi: 10.1007/s00122-020-03713-x
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A. (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 60, 1123–1132. doi: 10.1093/jxb/erp059
- Dong, Z., Li, W., Liu, J., Li, L., Pan, S., and Liu, S. (2019). The rice phosphate transporter protein OsPT8 regulates disease resistance and plant growth. *Sci. Rep.* 9, 5408. doi: 10.1038/s41598-019-41718-9
- Elmore, J. M., and Coaker, G. (2011). The role of the plasma membrane H1-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant* 4, 416–427. doi: 10.1093/mp/ssq083
- Embrapa Rice and Beans (2022) *Dados conjunturais da produção de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e caupi (Vigna unguiculata (L.) walp) no Brasil, (1985 a 2020): área, produção e rendimento*. Available at: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm> (Accessed August 7, 2022).
- Fang, Y., and Gu, Y. (2021). Regulation of plant immunity by nuclear membrane-associated mechanisms. *Front. Immunol.* 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.771065
- FAO (2022) *Food and agriculture organization of the united nations -statistical database*. Available at: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (Accessed June 14, 2022). Disponível em.
- Ferreira, M. E., and Grattapaglia, D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (Brasília: Embrapa Cenargen, Documento 20).
- Ferreira, A., Silva, M. F., Costa e Silva, L., and Cruz, C. D. (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29, 187–192. doi: 10.1590/S1415-47572006000100033
- Geffroy, V., Sévignac, M., Billant, P., Dron, M., and Langin, T. (2008). Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. *Theor. Appl. Genet.* 116, 407–415. doi: 10.1007/s00122-007-0678-y
- Gilio, T. A. S., Hurtado-Gonzales, O. P., Gonçalves-Vidigal, M. C., Valentini, G., Ferreira Elias, J. C., Song, Q., et al. (2020). Fine mapping of an anthracnose-resistance locus in Andean common bean cultivar amendoim cavalo. *PLoS One* 15, e0239763. doi: 10.1371/journal.pone.0239763
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Cruz, A. S., Garcia, A., Kami, J., Vidigal Filho, P. S., Sousa, L. L., et al. (2011). Linkage mapping of the phg-1 and Co-1<sup>4</sup> genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. *Theor. Appl. Genet.* 122, 893–903. doi: 10.1007/s00122-010-1496-1
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Cruz, A. S., Lacanallo, G. F., Vidigal Filho, P. S., Sousa, L. L., Pacheco, C. M. N. A., et al. (2013). Co-Segregation analysis and mapping of the anthracnose Co-10 and angular leaf spot phg-ON disease-resistance genes in the common bean cultivar ouro Negro. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2245–2255. doi: 10.1007/s00122-013-2131-8
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Gilio, T. A. S., Valentini, G., Vaz-Bisneto, M., Vidigal Filho, P. S., Song, Q., et al. (2020). New Andean source of resistance to anthracnose and angular leaf spot: Fine-mapping of disease-resistance genes in California dark red kidney common bean cultivar. *PLoS One* 15, e0235215. doi: 10.1371/journal.pone.0235215
- Gonçalves-Vidigal, M. C., and Kelly, J. D. (2006). Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar widusa. *Euphytica* 151, 411–419. doi: 10.1007/s10681-006-9164-x
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Lacanallo, G. F., and Vidigal Filho, P. S. (2008). A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'Jalo vermelho'. *Plant Breed.* 127, 592–596. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01530.x
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Meirelles, A. C., Poletine, J. P., Sousa, L. L., Cruz, A. S., Nunes, M. P., et al. (2012). Genetic analysis of anthracnose resistance in 'Pitanga' dry bean cultivar. *Plant Breed.* 131, 423–429. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01939.x
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Vidigal Filho, P. S., Medeiros, A. F., and Pastor-Corrales, M. A. (2009). Common bean landrace jalo listras pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. *Crop Sci.* 49, 133–138. doi: 10.2135/cropsci2008.01.0004
- Graf, G., Zemach, A., and Pitto, L. (2007). Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 287–294. doi: 10.1016/j.bbexp.2007.02.004
- Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., et al. (2012). "Diversity arrays technology: A generic genome profiling technology on open platforms," in *Data production and analysis in population genomics: Methods and protocols, methods in molecular biology*. Eds. François Pompanon and Aurélie Bonin (New York: Springer Science+Business Media), 67–89.
- Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12, 172–175. doi: 10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x
- Lacanallo, G. F., and Gonçalves-Vidigal, M. C. (2015). Mapping of an Andean gene for anthracnose resistance (Co-13) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) jalo listras pretas landrace. *Aust. J. Crop Sci.* 9, 394–400. Available at: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:55136646>.
- Lima-Castro, S. A., Gonçalves-Vidigal, M. C., Gilio, T. A. S., Lacanallo, G. F., Valentini, G., Martins, V. S. R., et al. (2017). Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean paloma. *BMC Genom.* 18, 306. doi: 10.1186/s12864-017-3685-7
- Liu, B. H. (1998). *Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis* (Boca Raton: CRC press).
- Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie* 113, 93e99. doi: 10.1016/j.biochi.2015.04.004
- Marcon, J. R. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Paulino, J. F. C., Vidigal Filho, P. S., and Coelho, M. (2021). Genetic resistance of common bean cultivar beija flor to *Colletotrichum lindemuthianum*. *Acta Sci. Agron.* 43, e44910. doi: 10.4025/actasciagron.v43i1.44910
- Margarido, G. R. A., Souza, A. P., and Garcia, A. A. F. (2007). OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144, 78–79. doi: 10.1111/j.2007.0018-0661.02000.x
- Melo, L. C., Abreu, A. F. B., Ramalho, M. A. P., Carneiro, J. E. S., de Paula Júnior, T. J., Del Peloso, M. J., et al. (2014). BRSMG realce: Common bean cultivar with striped grains for the state of Minas Gerais. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 14, 61–64. doi: 10.1590/S1984-70332014000100010
- Melo, L. C., Pereira, H. S., de Faria, L. C., Aguiar, M. S., da Costa, J. G. C., Wendland, A., et al. (2019). BRS FC104 – super-early carioca seeded common bean cultivar with high yield potential. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 19, 471–475. doi: 10.1590/1984-70332019v19n4c67
- Melotto, M., and Kelly, J. D. (2000). An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. *Euphytica* 116, 143–149. doi: 10.1023/A:1004005001049
- Meziadi, C., Richard, M. M. S., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratias, A., et al. (2016). Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Sci.* 242, 351–357. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.006
- Miklas, P. N., Kelly, J. D., Beebe, S. E., and Blair, M. W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147, 105–131. doi: 10.1007/s10681-006-4600-5
- Morais, S. R. P., Vieira, A. F., Almeida, L. C. S., Rodrigues, L. A., Melo, P. G. S., de Faria, L. C., et al. (2016). Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 16, 234–239. doi: 10.1590/1984-70332016v16n3n35
- Mungalu, H., Sansala, M., Hamabwe, S., Mukuma, C., Gepts, P., Kelly, J. D., et al. (2020). Identification of race-specific quantitative trait loci for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in an Andean population of common bean. *Crop Sci.* 60, 2843–2856. doi: 10.1002/csc.2.20191
- Murube, E., Campa, A., and Ferreira, J. J. (2019). Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. *PLoS One* 14, e0212298. doi: 10.1371/journal.pone.0212298
- Nabi, A., Lateef, I., Nisa, Q., Banoo, A., Rasool, R. S., Shah, M. D., et al. (2022). *Phaseolus vulgaris*–*Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem in the post-genomic era: an update. *Curr. Microbiol.* 79, 36. doi: 10.1007/s00284-021-02711-6
- Nay, M. M., Mukankusi, C. M., Studer, B., and Raatz, B. (2019a). Haplotypes at the phg-2 locus are determining pathotype-specificity of angular leaf spot resistance in common bean. *Front. Plant Sci.* 10. doi: 10.3389/fpls.2019.01126
- Nay, M. M., Souza, T. L. P. O., Raatz, B., Mukankusi, C. M., Gonçalves-Vidigal, M. C., Abreu, A. F. B., et al. (2019b). A review of angular leaf spot resistance in common bean. *Crop Sci.* 59, 1376–1391. doi: 10.2135/cropsci2018.09.0596
- Padder, B. A., Sharma, P. N., Awale, H. E., and Kelly, J. D. (2017). *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *J. Plant Pathol.* 99, 317–330. doi: 10.4454/jpp.v99i2.3867
- Pastor-Corrales, M. A. (1992). *La antracnosis del frijol común, phaseolus vulgaris, en américa latina* (Cali: CIAT Documento de trabajo n°113).
- Pastor-Corrales, M. A., and Tu, J. C. (1989). "Anthracnose," in *Bean production problems in the tropics*. Eds. H. F. Schwartz and M. A. Pastor-Corrales (Cali: CIAT), 77–104.

- Paulino, P. P. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Vaz Bisneta, M., Vidigal Filho, P. S., Nunes, M. P. B. A., Xavier, L. F. S., et al. (2022). Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. *Agron. Sci. Biotechnol.* 8, 1–21. doi: 10.33158/ASB.r140.v8.2022
- Pereira, H. S., Faria, L. C., Wendland, A., Costa, J. G. C., Souza, T. L. P. O., and Melo, L. C. (2018). Genotype by environment interaction for disease resistance and other important agronomic traits supporting the indication of common bean cultivars. *Euphytica* 214, 12. doi: 10.1007/s10681-017-2093-z
- Pereira, H. S., Wendland, A., Melo, L. M., Del Peloso, M. J., Faria, L. C., Costa, J. G. C., et al. (2012). BRS notável: a medium-early-maturing, disease-resistant carioca common bean cultivar with high yield potential. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 12, 220–223. doi: 10.1590/S1984-70332012000300010
- Pérez-Vega, E., Trabanco, N., Campa, A., and Ferreira, J. J. (2013). Genetic mapping of two genes conferring resistance to powdery mildew in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126, 1503–1512. doi: 10.1007/s00122-013-2068-y
- R Core Team (2022) *R: a language and environment for statistical computing* (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing). Available at: <https://www.R-project.org/> (Accessed March 10, 2022).
- Sartorato, A., Del Peloso, M. J., Rava, C. A., da Costa, J. G. C., de Faria, L. C., and Melo, L. C. (2004). Bean reactions to 24 pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 47, 247–248.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., et al. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. Genet.* 46, 707–713. doi: 10.1038/ng.3008
- Seo, Y.-S., Rojas, M., Lee, J.-Y., Lee, S.-W., Jeon, J.-S., Ronald, P., et al. (2006). A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *PNAS* 103, 11856–11861. doi: 10.1073/pnas.0604815103
- Shafi, S., Saini, D. K., Khan, M. A., Bawa, V., Choudhary, N., Dar, W. A., et al. (2022). Delineating meta-quantitative trait loci for anthracnose resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Front. Plant Sci.* 13. doi: 10.3389/fpls.2022.966339
- Singh, S. P., and Schwartz, H. F. (2010). Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Sci.* 50, 2199–2223. doi: 10.2135/cropsci2009.03.0163
- Sousa, L. L., Gonçalves, A. O., Gonçalves-Vidigal, M. C., Lacanallo, G. F., Fernandez, A. C., Awale, H., et al. (2015). Genetic characterization and mapping of anthracnose resistance of common bean landrace cultivar corinthiano. *Crop Sci.* 55, 1900–1910. doi: 10.2135/cropsci2014.09.0604
- Souza, T. L. P. O., Faleiro, F. G., Dessaune, S. N., Paula-Júnior, T. J., Moreira, M. A., and Barros, E. G. (2013). Breeding for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rust resistance in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 38, 361–374. doi: 10.1590/S1982-56762013005000027
- Souza, T. L. P. O., Gonçalves-Vidigal, M. C., Raatz, B., Mukankusi, C. M., Abreu, A. F. B., Melo, L. C., et al. (2016). Major loci controlling resistance to the angular leaf spot of common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 59, xv–xviii.
- Tamura, K., and Hara-Nishimura, I. (2013). The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *J. Exp. Bot.* 64, 695–709. doi: 10.1093/jxb/ers258
- Tock, A. J., Fourie, D., Walley, P. G., Holub, E. B., Soler, A., Cichy, K. A., et al. (2017). Genome-wide linkage and association mapping of halo blight resistance in common bean to race 6 of the globally important bacterial pathogen. *Front. Plant Sci.* 8, 1170. doi: 10.3389/fpls.2017.01170
- Valdisser, P. A. M. R., Müller, B. S. F., Almeida Filho, J. E., Morais Júnior, O. P., Guimaraes, C. M., Borba, T. C. O., et al. (2020). Genome-wide association studies detect multiple QTLs for productivity in mesoamerican diversity panel of common bean under drought stress. *Front. Plant Sci.* 11. doi: 10.3389/fpls.2020.574674
- Vidigal Filho, P. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Bisneta, M. V., Souza, V. B., Gilio, T. A. S., Calvi, A. A., et al. (2020). Genome-wide association study of resistance to anthracnose and angular leaf spot in Brazilian mesoamerican and Andean common bean cultivars. *Crop Sci.* 60, 2931–2950. doi: 10.1002/csc2.20308
- Vieira, A. F., Almeida, L. C. S., Rodrigues, L. A., Costa, J. G. C., Melo, L. C., Pereira, H. S., et al. (2018). Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. *Genet. Mol. Res.* 17, gmr18066. doi: 10.4238/gmr18066
- Vollmann, J., and Buerstmayr, H. (2016). From phenotype to genotype: celebrating 150 years of mendelian genetics in plant breeding research. *Theor. Appl. Genet.* 129, 2237–2239. doi: 10.1007/s00122-016-2817-9
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93, 77–78. doi: 10.1093/jhered/93.1.77
- Wang, S., Basten, C. J., and Zeng, Z. B. (2012) *Windows QTL cartographer 2.5*. Available at: <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm> (Accessed March 29, 2022).
- Woloshen, V., Huang, S., and Li, X. (2011). RNA-Binding proteins in plant immunity. *J. Pathog.* 2011, 278697. doi: 10.4061/2011/278697
- Wu, J., Zhu, J., Wang, L., and Wang, S. (2017). Genome-wide association study identifies NBS-LRR-encoding genes related with anthracnose and common bacterial blight in the common bean. *Front. Plant Sci.* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01398
- Xavier, L. F. S., Pastor-Corrales, M. A., Valentini, G., Hurtado-Gonzales, O. P., Poletine, J. P., and Gonçalves-Vidigal, M. C. (2022). Mapping an anthracnose resistance locus in Andean common bean landrace beija flor. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 65, 51–52.
- Zeng, Z. B. (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *PNAS* 90, 10972–10976. doi: 10.1073/pnas.90.23.10972
- Zhou, K. (2019). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in arabidopsis and one of their common roles in signaling transduction. *Front. Plant Sci.* 10. doi: 10.3389/fpls.2019.01022
- Zuiderveen, G. H., Padder, B. A., Kamfwa, K., Song, Q., and Kelly, J. D. (2016). Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS One* 11, e0156391. doi: 10.1371/journal.pone.0156391

## CAPÍTULO 2

### 4 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PARENTAL LINES AND VALIDATION OF SNP MARKERS FOR ANTHRACNOSE AND ANGULAR LEAF SPOT IN COMMON BEAN\*

Lucas Matias Gomes-Messias<sup>1</sup>, Rosana Pereira Vianello<sup>2</sup>, Joney Pereira Monteiro-Júnior<sup>1</sup>, Luana Alves Rodrigues<sup>2</sup>, Ana Paula Simplício Mota<sup>3</sup>, Helton Santos Pereira<sup>2</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>2</sup>, Bodo Raatz<sup>4</sup>, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>2</sup>

---

\*Capítulo publicado como artigo no periódico científico *Euphytica*.

<sup>1</sup>Agronomy School, Department of Genetics and Plant Breeding, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7121-9275>

<sup>2</sup>Embrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brazil

<sup>3</sup>AgroRosso Seeds, São Miguel do Passa Quatro, Goiás, Brazil

<sup>4</sup>Limagrain, Rue du Manoir, 49250 La Méniltrie, France

GOMES-MESSIAS, L. M.; VIANELLO, R. P.; MONTEIRO-JÚNIOR, J. P.; RODRIGUES, L. A.; MOTA, A. P. S.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; RAATZ, B.; SOUZA, DE. T. L. P. O. Molecular characterization of parental lines and validation of SNP markers for anthracnose and angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 218:49, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10681-022-03002-2>.



# Molecular characterization of parental lines and validation of SNP markers for anthracnose and angular leaf spot in common bean

Lucas Matias Gomes-Messias<sup>1</sup> · Rosana Pereira Vianello · Joney Pereira Monteiro-Júnior · Luana Alves Rodrigues · Ana Paula Simpício Mota · Helton Santos Pereira · Leonardo Cunha Melo · Bodo Raatz · Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>1</sup>

Received: 30 November 2021 / Accepted: 6 March 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

**Abstract** The implementation of molecular tools that help the early selection of genotypes carrying target alleles increases efficiency and reduces the time and costs of breeding programs. The present study aimed the molecular characterization and validation of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) targeting disease resistance alleles for assisted selection. A total of 376 common bean lines with contrasting responses for anthracnose and angular leaf spot resistance were used, as well as 149 F<sub>2</sub> plants from the cross between BRS Cometa × SEL 1308 (carrying the Anthracnose resistance gene *Co-4<sup>2</sup>*). Seven of the ten SNP markers evaluated showed potential for assisted

breeding: snpPV0025 (*Phg-2*), snpPV0027 (*Phg-5*), snpPV0079 (*Phg-5*), snpPV0046 (*Co-u*), snpPV0068 (*Co-4<sup>2</sup>*), snpPV0070 (*Co-4<sup>2</sup>*) and snpP8282v3-817 (*Co-4<sup>2</sup>*). Markers snpPV0070 and snpP8282v3-817 showed high efficiency of selection (99.7 and 99.8%, respectively). These markers exhibit great potential to assist in the selection at different stages of the breeding program and may be readily incorporated into marker-assisted selection.

**Keywords** *Phaseolus vulgaris* · *Colletotrichum lindemuthianum* · *Pseudocercospora griseola* · Disease resistance · Marker-assisted selection · Molecular breeding

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10681-022-03002-2>.

L. M. Gomes-Messias · J. P. Monteiro-Júnior  
Department of Genetics and Plant Breeding, Agronomy School, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

L. M. Gomes-Messias · R. P. Vianello · L. A. Rodrigues · H. S. Pereira · L. C. Melo · T. L. P. O. de Souza (✉)  
Embrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brazil  
e-mail: thiago.souza@embrapa.br

A. P. S. Mota  
AgroRosso Seeds, São Miguel do Passa Quatro, Goiás, Brazil

B. Raatz  
Limagrain, Rue du Manoir, 49250 La Méniltré, France

## Introduction

Brazil is the world's largest producer and consumer country of common beans (*Phaseolus vulgaris*), an important nutritional source and socioeconomically significant crop (Kotue et al. 2018; Embrapa Arroz e Feijão 2021). This legume is widely cultivated in the country, being produced in three growing seasons and grown by farmers with different technological profiles, at different scales and production systems (Brusamarello et al. 2017). In this scenario, numerous challenges limit production potential, one of the main causes being biotic stresses (Basavaraja et al. 2020).

The common bean is host to a wide range of diseases caused by different pathogens that affect, to a

greater or lesser extent, all cultivars recommended by genetic improvement programs (Assefa et al. 2019). Numerous studies made it possible to deepen knowledge on the variability of pathogens (Padder et al. 2017; Nietsche et al. 2002), inheritance of disease resistance (Souza et al. 2016; Costa et al. 2017), inoculation methods (Bigirimana and Höfte 2001; Rezende et al. 2018), standardization of disease response rating scales (Pastor-Corrales et al. 1992; Van-Schoonhoven and Pastor-Corrales 1987), in addition to identifying numerous resistance loci to different pathogen lines throughout genomes (QTL and genes with greater effect) using molecular markers (Keller et al. 2015; Bassi et al. 2017).

In Brazil, at least 15 epidemiologically important diseases can potentially cause severe damage (Wendland et al. 2018). Among the diseases that affect common bean crop, anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) and angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola* Sacc.) stand out due to the significant production losses in major producing regions worldwide (Singh and Schwartz 2010). These diseases are caused by pathogens that exhibit pathotype diversity and a monogenic and/or quantitative inheritance pattern of resistance (Padder et al. 2017; Nay et al. 2019b), which hinder the development of genetically resistant cultivars. Depending on the level of susceptibility of the cultivar, these diseases can cause losses of 80–100% (Singh and Schwartz, 2010).

Genomic advances incorporated into breeding programs have enabled the identification of molecular tools for more effective marker-assisted selection (MAS). The strategy of identifying markers linked to disease resistance loci in the common bean has been widely used and once validated, many of the markers show significant MAS application potential (Burt et al. 2015; Perseguini et al. 2016; Zuiderveen et al. 2016; Wu et al. 2017; Lobaton et al. 2018; Gil et al. 2019; Nay et al. 2019a; Fritsche-Neto et al. 2019). In regards to the potential impacts, the implementation of molecular tools that aid the selection of resistant genotypes in breeding programs is a strong strategy in the early selection of target alleles, increasing efficiency and reducing time and costs in the selection of superior genotypes for breeding programs (Alvares et al. 2019).

For anthracnose, currently, 14 genes are characterized and officially accepted by the Genetics Committee of the Bean Improvement Cooperative - BIC, of

which four have allelic series: *Co-1* (*Co-1*, *Co-1*<sup>2</sup>, *Co-1*<sup>3</sup>, *Co-1*<sup>4</sup> and *Co-1*<sup>5</sup>); *Co-2*; *Co-3* (*Co-3*, *Co-3*<sup>2</sup>, *Co-3*<sup>3</sup>, *Co-3*<sup>4</sup> and *Co-3*<sup>5</sup>); *Co-4* (*Co-4*, *Co-4*<sup>2</sup> and *Co-4*<sup>3</sup>); *Co-5* (*Co-5* and *Co-5*<sup>2</sup>); *Co-6*; *co-8*; *Co-11*; *Co-12*; *Co-13*; *Co-14*; *Co-15*; *Co-16*; and *Co-17* [Chen et al. 2017; <http://www.bic.uprm.edu>]. For angular leaf spot, three resistance loci were mapped and named according to the BIC Genetics Committee, as *Phg-1* (AND 277), *Phg-2* (Mexico 54) and *Phg-3* (Ouro Negro). The *Phg-1* locus, of Andean origin, was mapped in the subtelomeric region of chromosome Pv01 in the AND 277 cultivar (Meziadi et al. 2016; Gonçalves-Vidigal et al. 2011) and has been used by breeding programs in Brazil. More recently, two QTLs ALS 4.1 (G5686) and ALS 10.1 (G5686 and CAL143) were renamed as *Phg-4* and *Phg-5* locus, respectively (Souza et al. 2016).

The main objective of this study was to evaluate and validate several SNP markers previously identified as linked to anthracnose resistance loci (*Co-4*<sup>2</sup> and *Co-u*) and angular leaf spot resistance loci (*Phg-1*, *Phg-2* and *Phg-5*). Using a common bean diverse panel that included important sources of resistance for Brazilian agriculture and a segregating population (BRS Cometa × SEL 1308), we characterized these genotypes for the presence of resistance alleles to these diseases and validated potential SNP markers to be incorporated into MAS routine of Embrapa common bean breeding program.

## Material and methods

### Genetic material

We used 376 diverse common bean genotypes from several Brazilian and international breeding programs that show stable resistance responses to anthracnose and angular leaf spot diseases, including cultivars, elite parent plants and sources of resistance (donor parent plants). Information on the institution of origin, gene pool, grain type and reaction to anthracnose and angular leaf spot are presented in Table S1. Phenotypic information regarding the reaction to the two diseases was obtained for 240 of the 376 lines in this study, of which 139 were phenotyped for anthracnose and 101 for angular leaf spot (Table S1).

Ten seeds from each genotype were deposited on sheets of germitest paper, moistened with autoclaved

distilled water and then placed in a germinator (Mangelsdorf) at a constant temperature of 25 °C and 27% humidity for seven days. Two leaf discs obtained from the primary leaves through a puncher were individually collected and transferred to 96 sterile deep well plates. The plates were stored in a freezer at – 80 °C for 24 h and then submitted to lyophilization for six hours using a freeze dryer (Liotop® model L101). Finally, the plates were sent to Intertek Agritech (Sweden) for genotyping. This genotyping service performs KASP marker analysis (Rasheed et al. 2016).

### Molecular analysis with SNP markers

Nine SNPs linked to disease resistance genes in common bean were selected from a portfolio of molecular markers made available by the “High Throughput Genotyping (HTPG)” project (Bohar et al. 2020) [<https://cegsb.icrisat.org/marker-panels-2/>].

Three of them are linked to anthracnose resistance genes (two with the *Co-4<sup>2</sup>* from *Co-4* locus and one with the *Co-u* locus) (Cieslak et al. 2015; Oblessuc et al. 2015; Burt et al. 2015; Zuiderveen et al. 2016) and six are linked to angular leaf spot (one with the *Phg-1* gene, three with *Phg-2* and two with *Phg-5*) (Gonçalves-Vidigal et al. 2011; Lobaton et al. 2018; Nay et al. 2019a, Gil et al. 2019), as described in Table 1. Genotyping was performed at the genotyping

provider Intertek AgriTech, through an agreement with HTPG (Bohar et al. 2020).

The snpPV0071 marker, linked to the *Phg-2* locus (Nay et al. 2019a), was the only one that displayed a monomorphic profile for the susceptible allele (G:G) and was discarded from the analysis. This marker is specific to tag the resistance *Phg-2* locus at G10474 line, not genotyped in this study.

Additionally, the snpP8282v3-817 (GRAF1) linked to the *Co-4* resistance locus (Cieslak et al. 2015) was evaluated through experiments with a TaqMan® hydrolysis probe (ThermoFisher) (Shen et al. 2009; Applied Biosystems 2021) conducted at the Biotechnology Laboratory at Embrapa Rice and Beans, as described below (DNA extraction and genotyping of target alleles).

A simple linear regression analysis was performed using R software, version 4.1.2 (R Core Team 2021), at significance level of  $p < 0.05$ , based on the genotypes of the SNP markers associated with phenotypic values.

### Validation of snpPV0070 and snpP8282v3-817 (*Co-4<sup>2</sup>*), and snpPV0025 (*Phg-2*) markers

From the nine SNP markers, genotyped by Intertek Agritech, four SNPs that showed an association between the marker and disease resistance were submitted to an additional validation step as described

**Table 1** SNP markers associated with common bean disease resistance genes and their respective identification, position in the genome and indication of genotypes carrying the target alleles

SNP	Allele	Chromosome	Pathogen	Gene pool	Resistant parent	Susceptible parent	Reference <sup>a</sup>
snpPV0051	<i>Phg-1</i>	Pv01	ALS	A	AND 277	–	GonçalvesVidigal et al. (2011)
snpPV0025	<i>Phg-2</i>	Pv08	ALS	M	G10474 e México 54	Sprite e VAX1	Lobaton et al. (2018)
snpPV0033	<i>Phg-2</i>	Pv08	ALS	M	G10474	Sprite e VAX1	Lobaton et al. (2018)
snpPV0071	<i>Phg-2</i>	Pv08	ALS	M	G10474	–	Nay et al. (2019a, b) <sup>a</sup>
snpPV0027	<i>Phg-5</i>	Pv10	ALS	A	G5686	Sprite	Lobaton et al. (2018)
snpPV0079	<i>Phg-5</i>	Pv10	ALS	A	G5686	–	Nay et al. (2019a, b) <sup>a</sup>
snpPV0068	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Pv08	AN	M	SEL 1308 e B09197	Black Magic e Nautica	Oblessuc et al. (2015). Burt et al. (2015)
snpPV0070	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Pv08	AN	M	SEL 1308 e B09197	Black Magic e Nautica	Oblessuc et al. (2015), Burt et al. (2015)
P8282v3-817	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	Pv08	AN	M	SEL 1308	BRS Cometa	Cieslak et al. (2015)
snpPV0046	<i>Co-u</i>	Pv02	AN	M	Montcalm G	–	Zuiderveen et al. (2016)

SNP single nucleotide polymorphism, R resistant, S susceptible, ALS angular leaf spot, AN anthracnose, M Mesoamerican, A Andean

<sup>a</sup>Full references are in the references section

below. These markers were converted into TaqMan® (ThermoFisher) probes (Shen et al. 2009; Applied Biosystems 2021). In order to design the probes, the sequences containing target SNPs were aligned to the common bean reference genome (Schmutz et al. 2014) using the BLAST command, and a search for repetitive elements was conducted using RepeatMasker, with both analyses available on the Phytozome platform [Phytozome v12.1: Home (doe.gov)]. Probes were designed using the online Custom TaqMan Assay Design Tool (Thermo Fisher) available at [<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>].

### Segregating population and contrasting lines

The TaqMan® SNP markers linked to the anthracnose resistance allele *Co-4<sup>2</sup>* were validated using an F<sub>2</sub> population of 149 plants, derived from the cross between BRS Cometa ♀ (female parent, susceptible to *C. lindemuthianum* pathotype 73) and SEL 1308 ♂ (male parent, harboring the allele *Co-4<sup>2</sup>*, resistant to pathotype 73) (Table S2), which was phenotyped for the reaction to *C. lindemuthianum* pathotype 73. The TaqMan® SNP marker linked with angular leaf spot (*Phg-2*) was validated in a set of 30 contrasting common bean genotypes for the angular leaf spot reaction (Table S3), evaluated under field conditions in different tests performed by the Embrapa common bean breeding program.

### Inoculation of *Colletotrichum lindemuthianum* and disease evaluation

The *C. lindemuthianum* isolate CL1869 (pathotype 73) was used to inoculate 149 F<sub>2</sub> plants from the cross between BRS Cometa × SEL 1308. F<sub>2</sub> seeds, as well as ten seeds from each parent plant and the susceptible control (Rosinha G2) were sown in polystyrene seedling trays. Plants were inoculated seven days after sowing, at stage V2 (fully expanded primary leaves) (Pastor-Corrales et al. 1992). The spore solution ( $1.2 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>) was applied to the abaxial and adaxial surfaces of the primary leaves with the aid of a hand sprayer (De Vilbiss, No. 15). After inoculation, the plants were incubated in a humidity chamber for 48 h, at  $20 \pm 2$  °C, with relative humidity of around 95%, controlled by a misting system, and a 12-hour light/dark photoperiod. Next, misting

was interrupted, and the inoculated plants were kept in a controlled environment under the same temperature and photoperiod described above, where they remained until the disease symptoms were evaluated.

Symptoms were assessed seven days after inoculation, based on a grading scale proposed by Pastor-Corrales and Tu (1989), in which grade 1 represents no symptoms and 9 dead plants due to fungal disease. Plants with grades between 1 and 3 were considered resistant and the others susceptible (Table S2).

### DNA extraction and genotyping of markers for target alleles

Genomic DNA from 149 F<sub>2</sub> plants (BRS Cometa × SEL 1308) (Table S2) and from the set of 30 contrasting genotypes related to angular leaf spot reaction (Table S3) was extracted using the CTAB method, according to the protocol proposed by Doyle and Doyle (1990), modified by Ferreira and Grattapaglia (1998). DNA concentration was estimated using a Qubit® (Thermo Scientific®, Waltham, USA) fluorometer, and integrity visualized by electrophoresis on 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

TaqMan® SNP genotyping assays were amplified with the Taqman® GTXpress™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) reagent, according to the manufacturer's guidelines. Amplification was conducted using the QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems) under the following conditions: 60 °C for 30 s, 95 °C for 20 s, followed by 50 cycles of 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s, and a final extension of 60 °C for 30 s. This was followed by allele analysis using the Genotyping Analysis Module, V.3.7.

### Genetic-statistical analysis

The phenotypic and genotypic data for anthracnose reaction in the F<sub>2</sub> generation (BRS Cometa × SEL 1308) were submitted to the chi-square test ( $\chi^2$ ) to test the 3R<sub>-</sub>:1rr and 1RR:2Rr:1rr segregation hypotheses (R: resistant; rr: susceptible), respectively, adopting a 5% significance level. Linkage analysis between the SNP marker and the *Co-4<sup>2</sup>* allele was performed using the OneMap package (Margarido et al. 2007) and the estimated recombination

frequency converted into genetic distance (cM). All analyses were conducted using R software, version 4.1.2 (R Core Team 2021).

The selection efficiency (SE) for codominant markers was estimated according to the methodology described by Liu (1998), using the following estimator:

$SE(\%) = (1 - 4rI^2) \times 100$ , where “ $rI$ ” is the recombination frequency.

## Results and discussion

Eight of the nine SNPs that were selected out of the HTPG project data and genotyped at Intertek (88.8%) were polymorphic and were considered suitable for genotyping analysis.

### SNP markers linked to the *Phg* resistance alleles

Of the seven markers that exhibit a technically adequate genotyping profile, snpPV0033 did not amplify the target allele in the sources carrying the *Phg-2* allele.

The *Phg-1* allele was amplified by the snpPV0051 marker (A:G, where the underline allele is linked to resistance) in only 103 (27.4%) of the 376 lines evaluated. This SNP marker is located in a repetitive region of the common bean genome, identified using the RepeatMasker tool (Table 2), which may explain why the fragment was not amplified well. Of the 103 genotyped lines, the “A” allele linked to *Phg-1* was

amplified in 11 lines (Table S4), including AND 277, the source of the *Phg-1* (Souza et al. 2016) and resistant to the 11 most important *P. griseola* pathotypes in Brazil, such as 63–23, 63–31, 63–47 and 63–63 (Damasceno-Silva et al. 2015). Pathotype 63–63 is considered the most aggressive, causing susceptibility symptoms in all differential cultivars from the Andean and Mesoamerican common bean gene pool (Nay et al. 2019b). The angular leaf spot resistant line CAL 143 was derived from the cross between G12229 and AND 277 (Nay et al. 2019b) and contains the allele “A” at the snpPV00051 for the *Phg-1* resistance locus in its genome (Table S4). Furthermore, the *Phg-1* and *Co-1*<sup>4</sup> alleles were reported to be strongly linked, at a distance of 0.0 cM (Gonçalves-Vidigal et al. 2011), jointly conferring resistance to the *P. griseola* pathotype 63–23 and *C. lindemuthianum* pathotypes 65, 73 and 2047 (Gonçalves-Vidigal et al. 2011). Due to the inconsistent amplification of snpPV0051 marker in the evaluated lines, it was not validated in a reduced set of contrasting lines for resistance to angular leaf spot. However, the snpPV0051 marker has potential for use in the assisted selection of populations from crosses with known sources of the *Phg-1* allele.

The snpPV0025 marker (G:T) linked to *Phg-2* allele, located on the Pv08 chromosome, exhibited the “G” allele in the Mexico 54 and Cornell 49–242 breeding lines (Table S5), which are known sources of *Phg-2* (Souza et al. 2016; Nay et al. 2019b). *Phg-2* has a wide diversity of functional haplotypes for a resistance gene in common bean (Nay et al. 2019b),

**Table 2** Genotyping summary of 10 SNP markers associated with common bean disease resistance genes

SNP	Locus/ Allele	Polymorphism	Allele 1	Allele 2	Amplified?	NA	%NA	Monomorphic?	RepeatMasker?
snpPV0051	<i>Phg-1</i>	A:G	A:A (R)	G:G	Yes	273/376	72.60		Yes
snpPV0025	<i>Phg-2</i>	<u>G</u> :T	<u>G</u> :G (R)	T:T (S)	Yes	0/376	0.00		No
snpPV0033	<i>Phg-2</i>	T:C	T:T (R)	C:C (S)	Yes	0/376	0.00		No
snpPV0071	<i>Phg-2</i>	T:G	T:T (R)	G:G (S)	Yes	0/376	0.00	Yes	No
snpPV0027	<i>Phg-5</i>	T:C	T:T (R)	C:C (S)	Yes	1/376	0.26		No
snpPV0079	<i>Phg-5</i>	A:G	A:A (R)	G:G (S)	Yes	2/376	0.53		No
snpPV0068	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	<u>G</u> :C	<u>G</u> :G (R)	C:C (S)	Yes	0/376	0.00		No
snpPV0070	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	<u>G</u> :T	<u>G</u> :G (R)	T:T (S)	Yes	25/376	6.60		No
snpP8282v3-817	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	A:G	A:A (R)	G:G (S)	Yes	1/181	0.55		No
snpPV0046	<i>Co-u</i>	<u>A</u> :G	<u>A</u> :A (R)	G:G (S)	Yes	2/376	0.53		No

SNP single nucleotide polymorphism, R resistant, S susceptible, NA no amplification

The underline alleles are linked to resistance

confers resistance to *P. griseola* pathotypes 63–19 and 63–39, and was found to be the most relevant allele for angular leaf spot resistance in Brazil (Bassi et al. 2017). It was also detected in the PT 65 line, which has shown a high level of resistance to angular leaf spot under controlled inoculation and in the field (Pereira et al. 2019; Pereira et al. 2016). The line MAIII 16.159 from the recurrent selection program for angular leaf spot resistance conducted at the Universidade Federal de Lavras (Pereira et al. 2019) and 11 lines from Embrapa's breeding program also displayed the "G" allele of the snpPV0025 marker, suggesting the presence of the resistant *Phg-2* allele (Table S5). In addition, studies showed that *Phg-2* was responsible for the resistance found in breeding lines evaluated under field and greenhouse conditions, and effective against *P. griseola* isolates from Colombia, Uganda and Brazil (Sartorato et al. 2000; Nay et al. 2019b). *Phg-2* different resistance haplotypes that confer a broad spectrum of resistance to different *P. griseola* pathotypes from the Andean and Mesoamerican gene pool were described by Nay et al. (2019a).

Due to its importance for breeding programs, the use of *Phg-2* allele sources has been frequently adopted in crossing blocks, in addition to studies that seek to develop markers strongly linked to *Phg-2* (Gil et al. 2019; Miller et al. 2018; Sartorato et al. 2000). For example, the improved MAB 348, MAB 349, MAB 351, MAB 352, MAB 353, MAB 354 and MAB 484 lines, with high angular leaf spot resistance, contain the G10474 line, source of *Phg-2*, as one of their parents (Gil et al. 2019). The results of this study indicate that the *Phg-2* allele is present in elite germplasms developed by Embrapa, Universidade Federal de Lavras—UFLA, Instituto Agronômico de Campinas—IAC, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná—IDR/IAPAR, Agropecuária Terra Alta—TAA and International Center for Tropical Agriculture—CIAT, and it has been detected in 72 lines/cultivars (Table S5). However, as pointed out by Gi et al. (2019), care should be taken when using the snpPV0025 (ALS\_08\_62193174) for MAS, since it has been used to tag and introgress the *Phg-2* allele from Mesoamerican MAB sources into Andean breeding lines, and do not tag specific Mesoamerican alleles. Nay et al. (2019a) shed greater light on this by identifying pathotype-specific

haplotypes at the *Phg-2* gene and offering new molecular markers to be tested and used in MAS.

The markers snpPV0027 (T:C) and snpPV0079 (A:G), both linked to the *Phg-5* allele, contained the "T" and "A" alleles, respectively, only in the G5686 line identified as a *Phg-5* source (Keller et al. 2015). The *Phg-5* gene from the line G5686 originates from the Andean gene pool and confers resistance to several *P. griseola* pathotypes from the Andean and Mesoamerican origins. Mahuku et al. (2009) studied the reaction of the G5686 line against 15 *P. griseola* pathotypes and reported resistance for 53 and 72% of the Andean and Mesoamerican isolates tested, respectively. However, for some races reported as the most frequent and wide distributed in Brazil, such as 63–23, 63–31, 63–47 and 63–63, the line G5686 carrying the *Phg-5* resistance allele was characterized as moderately susceptible or susceptible (Mahuku et al. 2009), limiting their use as source of resistance by the common bean breeding programs in Brazil.

In the common bean—*P. griseola* pathosystem, combining the *Phg-1* (Andean) and *Phg-2* (Mesoamerican) alleles would be important to develop plants resistant to the pathotypes 63–19, 63–23 and 63–39 (Bassi et al. 2017). The molecular characterization of Embrapa's breeding germplasm allowed the identification of elite lines containing pyramided alleles, such as CNFC 16636 (*Phg-1* + *Phg-2*) (Table S4) and the differential varieties for anthracnose G2333, G2858 and PI 207262 (*Co-u* + *Co-4*<sup>2</sup>) (Table S6). This result demonstrates the need to obtain lines that simultaneously combine alleles that confer resistance to anthracnose and angular leaf spot, in addition to the other agronomic characteristics demanded by the market.

#### SNP markers linked to the *Co* resistance alleles

The *Co-4* locus is located close to a telomeric region of the chromosome Pv08, characterized by containing about 18 copies of the *COK-4* gene and described as being associated with anthracnose resistance in the common bean (Oblessuc et al. 2015). In the present study, four SNP markers linked with the anthracnose-resistant locus were analyzed. In case of the markers snpPV0068 (G:C) and snpPV0070 (G:T), the "G" alleles (of both SNPs) were identified in the G-2333, SEL 1308, PI 207262, K-10, K-13, and CNFC 5547 lines (Table S6), which are

known sources of the resistant allele *Co-4<sup>2</sup>* (Kelly and Vallejo 2004; Vieira et al. 2018). Another 22 black seeded lines also shown this same allele (Table S6). Some of these lines, already characterized in terms of resistance/susceptibility, are part of the differential varieties of anthracnose pathotypes or are originated from anthracnose resistance breeding programs (Table S6). The presence of “G” alleles in the two SNPs also coincided with the polymorphisms identified in the snpP8282v3-817 marker (GRAF1, A:G) (Cieslak et al. 2015) in detecting the *Co-4<sup>2</sup>* allele in the lines K-10, K-13 and CNFC 5547 (Table S6). However, there was no “A” allele amplification of the snpP8282v3-817 marker in the 22 black seeded lines amplified by snpPV0070 (Table S6). This result indicates that snpPV0070 is not specific for the *Co-4<sup>2</sup>* allele, but capable of detecting resistance alleles for the *Co-4* locus. An alternative to snpPV0070 are the markers snpPV0068 and snpP8282v3-817, both amplified in lines that are known to carry the *Co-4<sup>2</sup>* allele (Table S6). Portilla et al (2021) when evaluating the *Co-4* marker snpPV0069 (closely linked to the snpPV0068 and snpPV0070), developed as tagging the resistance from G2333 genotype (Lobaton et al. 2018) and available at HTPG portfolio, did not identify any significant effect of association, which was suggestive of a race specific resistance gene interaction. The *Co-4<sup>2</sup>* is a dominant allele of the *Co-4* locus and has been used by breeding programs worldwide (Kelly and Vallejo 2004; Vieira et al. 2018). This is because its broad spectrum of resistance to several *C. lindemuthianum* pathotypes (Balardin and Kelly 1998; Silvério et al. 2002).

For the snpPV0046 (A:G, *Co-u* locus), associated with the *Co-u* allele, the “A” allele is linked to the resistance to anthracnose (Zuiderveen et al. 2016; Oblessuc et al. 2014; Geffroy et al. 2008). In this study, the “A” allele was identified in 51 of the 376 lines genetically characterized with snpPV0046, including the BAT 93 breeding line (Table S7), which contains the parental genotype PI 207262 (Geffroy et al. 2008) and is a source of the *Co-u* allele (Geffroy et al. 2008). In the present study, the “A” allele was also amplified in PI 207262, suggesting that *Co-u* may come from this parent or from a mutation that occurred during the development of BAT 93. Of the 51 lines that contain the “A” allele, 13 are from the black seeded group, 4 from the Carioca group and the remainder belong to different commercial

classes, such as “rajado”, jalo, white, and calima (Table S7), which are detected in Andean and Mesoamerican gene pools. Of these, 12 are resistant cultivars that belong to differentiating varieties for anthracnose pathotypes (Table S7). The *Co-u* locus is located in the Pv02, very close to *I* locus, conferring resistance to important common bean viruses, such as the *Bean common mosaic virus*, potyviruses and comovirus (Meziadi et al. 2016; Geffroy et al. 2008). At the molecular level, these two loci may have a common origin, since most resistance genes in plants encode nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) proteins, responsible for recognizing several pathogens (Geffroy et al. 2009). Recent information confirms this hypothesis, since the functional annotation of resistance genes has revealed common protein motifs, such as: Leucine Zipper-LZ, Leucine Rich Repeat-LRR and protein kinase domains (Protein Kinase—PK) (Fritsche-Neto et al. 2019; Nogueira et al. 2019; Queiroz et al. 2019; Nay et al. 2019a; Banoo et al. 2020; Gonçalves-Vidigal et al. 2020; Costa et al. 2021). Thus, validating the snpPV0046 marker for assisted selection is particularly important for programs aimed at incorporating multiple resistance into elite germplasms.

In addition, the introgression of resistance alleles from different gene pools (Andean and Mesoamerican) in the same line by marker-assisted selection is an important strategy for developing common bean cultivars with broad and long-term resistance (Miller et al. 2018; Vieira et al. 2018; Miklas et al. 2006; Kelly and Miklas 1998; Guzmán et al. 1995). In Brazil, an example of an important combination of anthracnose resistance alleles is that of the Mesoamerican allele *Co-4<sup>2</sup>* and the Andean allele *Co-1<sup>4</sup>* in SEL1308 and K13 breeding lines (Vieira et al. 2018; Souza et al. 2014).

#### Simple linear regression analysis of SNP marker effects

Of the eight SNP markers analyzed, five (snpPV0046, snpPV0068, snpPV0070, snpP8282v3-817 and snpPV0025) showed potential for indirect selection of common bean genotypes containing the *Co-4<sup>2</sup>* and *Phg-2* alleles and were therefore submitted to simple linear regression analysis. Only for the marker snpPV0046 the regression model was significant (Table S8), and it does not explain much

of the variability (low  $R^2$  of 3%). Although marker effects were not significant in the sample set of lines containing information regarding the reaction to anthracnose and angular leaf spot (snpPV0046=133; snpPV0068=134; snpPV0070=115; snpP8282v3-817=46 and snpPV0025=78), all lines carrying the target SNPs showed resistance, suggesting that these alleles can be monitored by the linked markers in the lines of interest, parental screening and even during the population breeding. The absence of significance in the regression test is certainly because many lines, even though resistant, did not exhibit the target allele of this study, suggesting the presence of other anthracnose and angular leaf spot resistance alleles. When the regression analysis was applied in a subset of genotypes contrasting for the resistance/susceptibility to the anthracnose and angular leaf spot diseases (Table S9), the *Co-4<sup>2</sup>* and *Phg-2* marker effects were significant (Table 3) and the slope values were negative for all markers (Table 3), revealing an association between the SNP markers and resistance alleles for anthracnose and angular leaf spot. The introgression of resistance

alleles into elite bean germplasms assisted by molecular markers is a promising strategy in breeding programs, given that it reduces time and costs in the initial selection stages (Sakiyama et al. 2014). Figure 1 illustrates the importance of the resistance genes *Co-u* ("A") and *Phg-2* ("G"), and the resistance allele *Co-4<sup>2</sup>* ("G") in reducing mean phenotypic values in the lines that contain them.

Additionally, gene annotation revealed that snpPV0046 (*Co-u*), snpPV0068 (*Co-4<sup>2</sup>*), snpPV0070 (*Co-4<sup>2</sup>*) and snpP8282v3-817 (*Co-4<sup>2</sup>*) are located in gene regions that encode defense proteins in plants (Table 4). The snpPV0046 marker is found in the gene that encodes the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), which interacts with salicylic acid, a plant hormone known to play a role in plant-acquired resistance against pathogen infection (Jagodzik et al. 2018). The snpPV0068 marker is located in the MYB Transcription Factor coding region, playing an essential role in the control of cellular processes in response to biotic and abiotic stresses (Ambawat et al. 2013), such as resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000) in *Arabidopsis* (Zhang

**Table 3** Summary of the regression analysis framework between SNP markers and resistance reaction to anthracnose or angular leaf spot of common bean elite genotypes

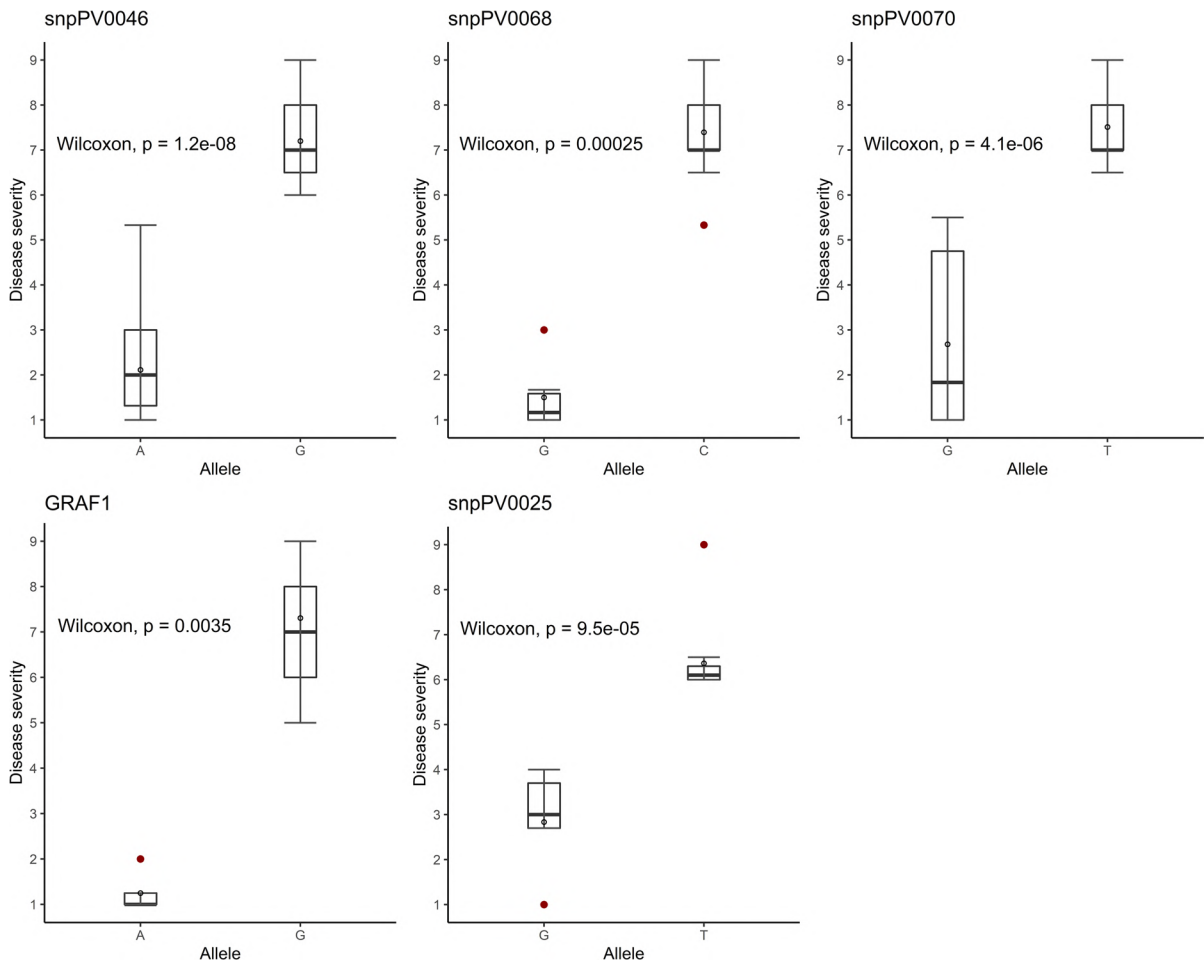
Source of variation	Df	SS	MS	F-value	<i>p</i> -value	$R^2$	Inclination <sup>b</sup>
snpPV0046 ( <i>Co-u</i> )—Anthracnose							
<u>A</u> versus G <sup>a</sup>	1	283.9	283.9	255.7	2.2E–16	0.86	– 2.54
Residual	42	46.6	1.1				
snpPV0068 ( <i>Co-4<sup>2</sup></i> )—Anthracnose							
<u>G</u> versus C	1	158.5	158.5	175.7	2.97E–12	0.88	– 2.95
Residual	23	20.7	0.9				
snpPV0070 ( <i>Co-4<sup>2</sup></i> )—Anthracnose							
<u>G</u> versus T	1	167.9	167.9	93.0	2.14E–10	0.77	– 2.41
Residual	28	50.6	1.8				
snpP8282v3-817 ( <i>Co-4<sup>2</sup></i> )—Anthracnose							
<u>A</u> versus G	1	112.2	112.2	78.2	2.45E–07	0.83	– 3.03
Residual	15	21.5	1.4				
snpPV0025 ( <i>Phg-2</i> )— Angular Leaf Spot							
<u>G</u> versus T	1	66.2	66.2	72.2	4.52E–08	0.78	– 1.76
Residual	20	18.3	0.9				

*Df* degree of freedom, *SS* sum of squares, *MS* mean squares

The underline alleles are linked to resistance

<sup>a</sup>Contrast considered in the regression analysis between marker alleles and the severity of anthracnose or angular leaf spot

<sup>b</sup>Angular coefficient of the linear regression equation. The negative sign on the slope indicates that the allele is associated with resistance



**Fig. 1** Difference in phenotypic variance between common bean genotypes containing the ‘A’ (*Co-u*—snpPV0046), ‘G’ (*Co-4<sup>2</sup>*—snpPV0068, snpPV0070 and GRAF1-snpP8282v3-817) and ‘G’ alleles (*Phg-2*—snpPV0025) for resistance to anthracnose (*Co*) and angular leaf spot (*Phg*)

diseases. The non-parametric Wilcoxon test (1945) was performed considering 44, 30, 21, 17 and 22 lines for markers snpPV0046, snpPV0068, snpPV0070, snpP8282v3-817 and snpPV0025, respectively

**Table 4** Gene annotation performed on the Phytozome platform for the five SNP regions associated with common bean disease resistance genes selected for analysis, validation and marker-assisted selection

SNP marker	Locus/Allele	Primary transcript	Description
snpPV0025	<i>Phg-2</i>	PhvuI.008G280700.2	PTHR11132:SF38—GB
snpPV0046	<i>Co-u</i>	PhvuI.002G328300.1	Mitogen-Activated Protein Kinase 16-Related
snpPV0068	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	PhvuI.008G028000.1	MYB Transcription Factor
snpPV0070	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	PhvuI.008G028400.1	Dominio Serine Threonine Kinase/homólogo ao gene <i>COK-4</i>
snpP8282v3-817	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	PhvuI.008G028200	Dominio Serine Threonine Kinase

SNP single nucleotide polymorphism

et al. 2019). The snpPV0070 and snpP8282v3-817 markers are located in the Phvul.008G028400 and Phvul.008G028200 transcripts, respectively, homologous to the *Co-4* locus (STK domain) (Table 4), previously described as an anthracnose resistance source in common bean (Melotto and Kelly 2001).

#### Validation of the snpPV0070, snpP8282v3-817 and snpPV0025 markers

TaqMan® hydrolysis probes were developed for the snpPV0070 and snpP8282v3-817 markers linked to the *Co-4* allele. 149 F<sub>2</sub> plants from the cross between BRS Cometa and SEL1308 were genotyped with these two probes and phenotyped for reaction to *C. lindemuthianum* pathotype 73 (Table S2). Of these, 110 were characterized as resistant and 39 as susceptible, in line with the expected ratio of 3R:1S ( $\chi^2=0.11$ ;  $p=0.74$ ) (Table 5). Previous studies support the hypothesis that resistance to anthracnose in SEL 1308 is controlled by a single major gene, with complete dominance (Young et al. 1998; Oblessuc et al. 2015). Markers snpPV0070 and snpP8282v3-817 maintained 1RR:2Rr:1rr ratio (Table 5), segregating as expected for codominant

markers. Linkage analysis revealed that the snpPV0070 and snpP8282v3-817 used to genotype the F<sub>2</sub> population (BRS Cometa x SEL 1308) are strongly linked to the *Co-4* allele, with a recombination frequency of 0.026 (2.6 cM) and 0.019 (1.9 cM), respectively (Table 5). Markers snpPV0070 and snpP8282v3-817 showed selection efficiency (SE) of 99.7% and 99.8%, respectively, indicating the high potential value of molecular markers in strong linkage disequilibrium in MAS routine of breeding programs.

The TaqMan® probe developed for snpPV0025 (G:T) linked to the *Phg-2* allele was evaluated in a set of contrasting elite lines for resistance to angular leaf spot (Table S3). This target SNP was able to detect the *Phg-2* allele, despite its amplification in varieties that are susceptible to angular leaf spot (Table S3). This is in accordance with previously reported that snpPV0025 would only effectively tag *Phg-2* in Andean genetic backgrounds. Additional SNP markers have been identified as associated to with *Phg-2* and should be tested (Gil et al. 2019; Nay et al. 2019a). On the other hand, the complementary analysis performed with RAPD\_SEO4 (Sartorato et al. 1999) and STS\_g796 (Miller et al. 2018) markers resulted in specific markers for the

**Table 5** Genotypic and phenotypic segregation of individuals from the F<sub>2</sub> population derived from the crossing between BRS Cometa × SEL 1308 (*Co-4*), evaluated for reaction to *Cole-*

*totrichum lindemuthianum* pathotype 73, the causal agent of anthracnose in the common bean

Genotype/Phenotype	Observed ratio	Expected ratio	Hypothesis	$\chi^2$	<i>P</i> -value	rf	Distance <sup>a</sup>	SE
snpPV0070								
T:T	40	37	1:2:1	0.72	0.70	0.026	2.6 cM	99.7%
<u>G</u> :T	76	75						
<u>G</u> : <u>G</u>	33	37						
P8282v3-817								
G:G	39	37	1:2:1	0.65	0.72	0.019	1.9 cM	99.8%
<u>A</u> :G	77	75						
<u>A</u> : <u>A</u>	33	37						
Class								
Resistant (1–3)	110	112	3:1	0.11	0.74	–	–	–
Susceptible (4–9)	39	37						
Total	149	149	–	–	–	–	–	–

The underline alleles are linked to resistance

rf recombination fraction, SE selection efficiency

<sup>a</sup>Distance in centiMorgans; *P*-value associated to the null hypothesis not rejected (1:2:1 for molecular markers data and 3:1 for phenotype data);  $\chi^2$ , chi-square; snpPV0070: "G:G" dominant homozygous for *Co-4*, "G:T" heterozygous for *Co-4* and "T:T" recessive homozygous for *Co-4*; snpP8282v3-817: "A:A" dominant homozygous for *Co-4*, "A:G" heterozygous for *Co-4* and "G:G" recessive homozygous for *Co-4*

*Phg-2* locus, amplifying in the resistance sources Mexico 54 and MAR-2 (Table S3). These two markers have been frequently used in studies aimed at *Phg-2* gene introgression (Sanglard et al. 2016; Miller et al. 2018). In addition, SEO4 also amplified in lines DM 108, CNFC 17142, CNFC 17395 and CNFC 18710; while *g796* amplified in lines CNFC 15086 and CNFC 17153 (Table S3). Among the parental lines used by the Embrapa breeding program in crossing blocks, DM108 stands out, originating from the cross between BRS Rudá and MAR-2 (Sanglard et al. 2016). The MAR-2 line contains the resistant *Phg-2* allele in its genome; however, the allelic variation of this locus in this variety is still not clear (Nay et al. 2019a). Thus, the presence of the *Phg-2* allele in the elite lines from Embrapa common bean breeding program may be related to the previous use of the DM108 line as parental line in the crossing blocks. The *Phg-2* allele is particularly important in angular leaf spot resistance, since it confers resistance to the most prevalent pathotypes in Brazilian common bean growing areas (Bassi et al. 2017).

## Conclusion

Seven of the nine SNP markers provided by the HTPG project showed potential for routine use in MAS at Embrapa common bean breeding program (snpPV0025—*Phg-2*; snpPV0027—*Phg-5*; snpPV0046—*Co-u*; snpPV0068—*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0070—*Co-4<sup>2</sup>*; snpP8282v3-817—*Co-4<sup>2</sup>*; snpPV0079—*Phg-5*) and other breeding programs interested in these resistance alleles.

The markers snpPV0025 and snpPV0070 linked to *Phg-2* and *Co-4* loci, respectively, are indicated to monitor the presence of target alleles in crosses involving well-characterized parental lines, such as Mexico 54 (*Phg-2*) and SEL1308 (*Co-4<sup>2</sup>*).

The genotyping systems based on hydrolysis probes developed in this study (TaqMan® SNP) for the snpPV0070 and snpP8282v3-817 markers (*Co-4<sup>2</sup>*), and snpPV0025 marker (*Phg-2*) enabled the specific amplification of target alleles and are therefore suitable for use in MAS.

In addition, snpPV0070 and snpP8282v3-817 markers showed high selection efficiency (99.7 and

99.8%, respectively) for the allele *Co-4<sup>2</sup>* that confers anthracnose resistance and may be used to considerably improve efficiency in identifying superior genotypes in the common bean breeding programs.

**Acknowledgements** This paper is a cooperative contribution on validation of SNP markers linked to disease resistance genes for their effective use in the routine of Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) common bean breeding program. The main goal was to characterize and select elite parent lines according the presence of disease resistance alleles, as well as validate SNP markers for MAS of superior genotypes from populations derived from these parent lines. It reports an elegant example of cross validation and effective use of SNP markers for MAS in an applied breeding program of a very social important orphan crop (common bean or dry bean).

**Author contributions** LG-M, RV, LM and TS planned the study; LG-M, LR and JM-J were responsible for the laboratory analysis; APM developed and phenotyped the F<sub>2</sub> population; BR provided the sequence and expertise of the SNP markers; LG-M, HP and TS was responsible for the data analysis; LG-M and RV drafted the manuscript; The final version of the manuscript was revised by all authors.

**Funding** The authors are grateful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the Grant to Lucas Gomes-Messias (Grant Number: 88882.386267/2019-01) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the Grants to Rosana Vianello, Helton Pereira, Leonardo Melo and Thiago Souza. This work was supported by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA; Grant Number: 02.12.12.005.00.00) and the Research Foundation of the State of Goiás (FAPEG; Grant Number: 201410267001711).

**Data availability** Relevant data are included in this paper and its associated Online Resources.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

**Consent for publication** The authors give consent for the publication.

## References

- Alvares RC, Stonehouse R, Souza TLPO, Miklas P, Bett KE, Melo LM, Rodrigues LA, Souza LL, Pereira HS (2019) Generation and validation of genetic markers for the selection of carioca dry bean genotypes with the slow-darkening seed coat trait. *Euphytica* 215:141. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2461-y>

- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 19:307–321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
- Applied Biosystems (2021) TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays USER GUIDE. [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0009593\\_TaqManSNP\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf). Accessed 29 June 2021
- Assefa T, Mahama A, Brown AV, Cannon EKS, Rubyogo JC, Rao IM, Blair MW, Cannon SB (2019) A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breed* 39:20. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0920-0>
- Balardin RS, Kelly JD (1998) Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. *J Am Soc Hort Sci* 123:1038–1047
- Banoo A, Nabi A, Rasool RS, Mahiya-Farooq Shah MD, Ahmad M, Sofi PA, Aasiya-Nabi Itoo H, Sharma PN, Padder BA (2020) North-western himalayan common beans: population structure and mapping of quantitative anthracnose resistance through genome wide association study. *Front Plant Sci* 11:571618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.571618>
- Basavaraja T, Pratap A, Dubey V, Gurumurthy S, Gupta S, Singh NP (2020) Molecular and conventional breeding strategies for improving biotic stress resistance in common bean. In: Gosal SS, Wani SH. (eds) Accelerated plant breeding 3: 389–421. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-47306-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-47306-8_13)
- Bassi D, Briñez B, Rosa JS, Oblessuc PR, Almeida CP, Nucci SM, Silva LCD, Chiorato AF, Vianello RP, Camargo LEA, Blair MW, Lasry L (2017) Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. *Genet Mol Biol* 40:109–122. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0314>
- Bigirimana J, Höfte M (2001) Bean anthracnose: inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *J Phytopathol* 149:403–408. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2001.tb03870.x>
- Bohar R, Chitkineni A, Varshney RK (2020) Genetic molecular markers to accelerate genetic gains in crops. *Biotechniques* 69:158–160. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0066>
- Brusamarello AP, Oliveira PH, Sebim DE, Baretta DR (2017) Performance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in the second-season under high and low technology management in Parana, Brazil. *Acta Agron* 66:436–441. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.55555>
- Burt AJ, William HM, Perry G, Khanal R, Pauls KP, Kelly JD, Navabi A (2015) Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS One* 10:e0139450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139450>
- Chen M, Wu J, Wang L, Mantri N, Zhang X, Zhu Z, Wang S (2017) Mapping and genetic structure analysis of the anthracnose resistance locus *Co-1HY* in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE* 12:e0169954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169954>
- Cieslak JF, Coelho GRC, Souza TLPO, Vianello RP (2015) SNP discovery in genomic regions flanking the common bean anthracnose resistance locus *Co-4*. *Annu Rep Bean Improv Coop* 58:39–40
- Costa LC, Nalin RS, Dias MA, Ferreira ME, Song Q, Pastor-Corrales MA, Hurtado-Gonzales OP, Souza EA (2021) Diferent loci control resistance to diferent isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Theor Appl Genet* 134:543–556. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03713-x>
- Costa LC, Nalin RS, Ramalho MAP, de Souza EA (2017) Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? *PLoS One* 12:e0173789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173789>
- Damasceno-Silva KJ, Souza EA, Freire CNS, Ishikawa FH (2015) Anastomosis groups and molecular variation in *Pseudocercospora griseola*. *Gen Mol Res* 14:7436–7445. <https://doi.org/10.4238/2015.July.3.19>
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Embrapa Arroz e Feijão (2021) Dados conjunturais da produção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2019): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Accessed 27 June 2021
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, Brasília
- Fritsche-Neto R, Souza TLPO, Pereira HS, Faria LC, Melo LC, Novaes E, Brum IJB, Jean-Luc Jannink (2019) Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. *Sci Agric* 76:321–327. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2017-030>
- Geffroy V, Macadré C, David P, Pedrosa-Harand A, Sévignac M, Dauga C, Langin T (2009) Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181:405–419. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.093583>
- Geffroy V, Sévignac M, Billant P, Dron M, Langin T (2008) Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. *Theor Appl Genet* 116:407–415. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0678-y>
- Gil J, Solarte D, Lobaton JD, Mayor V, Barrera S, Jara C, Beebe S, Raatz B (2019) Fine-mapping of angular leaf spot resistance gene *Phg-2* in common bean and development of molecular breeding tools. *Theor Appl Genet* 132:2003–2016. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03334-z>
- Gonçalves-Vidigal MC, Cruz AS, Garcia A, Kami J, Vidigal Filho PS, Sousa LL, McClean P, Gepts P, Pastor-Corrales MA (2011) Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1<sup>d</sup>* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. *Theor Appl Genet* 122:893–903. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1496-1>
- Gonçalves-Vidigal MC, Gilio TAS, Valentini G, Vaz-Bisnetta M, Vidigal Filho OS, Song Q, Oblessuc PR, Melotto M (2020) New Andean source of resistance to anthracnose

- and angular leaf spot: Fine-mapping of disease-resistance genes in California Dark Red Kidney common bean cultivar. PLoS ONE 15:e0235215. <https://doi.org/10.1371/journal>
- Guzmán P, Gilbertson RL, Nodari R, Johnson WC, Temple SR, Mandala D, Mkandawire ABC, Gepts P (1995) Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Phytopathology 85:600–607
- Jagodzick P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A (2018) Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. Front Plant Sci 9:1387. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01387>
- Keller B, Manzanares C, Jara C, Lobaton JD, Studer B, Raatz B (2015) Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 128:813–826. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2472-6>
- Kelly JD, Miklas PN (1998) The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. Mol Breed 4:1–11
- Kelly JD, Vallejo VA (2004) A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. HortScience 39:1196–1207
- Kotue TC, Marlyne JM, Wirba LY (2018) Nutritional properties and nutrients chemical analysis of common beans seed. MOJ Biol Med 3:41–47. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2018.03.00074>
- Liu BH (1998) Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, Boca Raton, p 648
- Lobaton JD, Miller T, Gil J, Ariza D, Hoz JF, Soler A, Beebe S, Duitama J, Gepts P, Raatz B (2018) Resequencing of common bean identifies regions of inter-gene *pool* introgression and provides comprehensive resources for molecular breeding. Plant Genome 11:170068. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.08.0068>
- Mahuku GS, Iglesias AM, Jara C (2009) Genetics of angular leaf spot in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. Euphytica 167:381–396. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9897-4>
- Margarido G, Souza A, Garcia A (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. Hereditas 144:78–79. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0018-0661.02000.x>
- Melotto M, Kelly JD (2001) Fine mapping of the *Co-4* locus of common bean reveals a resistance gene candidate, *COK-4*, that encodes for a protein kinase. Theor Appl Genet 103:508–517
- Meziadi C, Richard MMS, Derquennes A, Thareau V, Blanchet S, Gratias A, Pflieger S, Geffroy V (2016) Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. Plant Sci 242:351–357. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.006>
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW (2006) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica 147:105–131. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-4600-5>
- Miller T, Gepts P, Kimmo S, Arunga E, Chilagane LA, Nchimbi-Msolla S, Namusoke A, Namayanja A, Tedla YR (2018) Alternative markers linked to the *Phg-2* angular leaf spot resistance locus in common bean using the *Phaseolus* genes marker database. Afr J Biotechnol 17:818–828. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16493>
- Nay MM, Mukankusi CM, Studer B, Raatz B (2019) Haplotypes at the *Phg-2* Locus are determining pathotype-specificity of Angular Leaf Spot resistance in common bean. Front Plant Sci 10:1126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01126>
- Nay MM, Souza TLPO, Raatz B, Mukankusi CM, Gonçalves-Vidigal MC, Abreu AFB, Melo LC, Pastor-Corrales MA (2019) A review of angular leaf spot resistance in common bean. Crop Sci 59:1376–1391. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.09.0596>
- Nietsche S, Borém A, Alzate-Marin AL, Costa M, Rocha RC, Caixeta ET, Barros EG, Moreira MA (2002) Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. Summa Phytopathol 28:331–335
- Nogueira GB, Santos LV, Queiroz CB, Corrêa TLR, Menicucci RP, Bazzoli DMS, Araújo EF, Queiroz MV (2019) The histidine kinase *slnC11* of *Colletotrichum lindemuthianum* as a pathogenicity factor against *Phaseolus vulgaris* L. Microbiol Res 219:110–122. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.005>
- Oblessuc PR, Baroni RM, Pereira GS, Chiorato AF, Carbonell SAM, Briñez B, Costa e Silva L, Garcia AAF, Camargo LEA, Kelly JD, Benchimol-Reis LL (2014) Quantitative analysis of race-specific resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. Mol Breed 34:1313–1329. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0118-z>
- Oblessuc PR, Francisco C, Melotto M (2015) The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 *COK-4* genes and is regulated by immune response in common bean. Theor Appl Genet 128:1193–1208. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2500-6>
- Padder BA, Sharma PN, Awale HE, Kelly JD (2017) *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. J Plant Pathol 99:317–330
- Pastor-Corrales MA (1992) Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: Pastor-Corrales MA (ed) La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. CIAT, Cali, pp 240–250
- Pastor-Corrales MA, Tu JC (1989) Anthracnose. In: Schwartz HF, Pastor-Corrales MA (eds) Bean production problems in the tropics. CIAT, Cali, pp 77–104
- Pereira R, Abreu AFB, Nalin RS, Souza EA (2019) Phenotyping for angular leaf spot severity and its implication in breeding common bean for resistance. Sci Agric 76:415–423. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2017-0394>
- Pereira R, Souza EA, Costa LC, Abreu AFB (2016) Reaction of common bean lines to *Pseudocercospora griseola* in different environmental conditions. Annu Rep Bean Improv Coop 59:121–122
- Persegui JM, Oblessuc PR, Rosa JRBF, Gomes KA, Chiorato AF, Carbonell SAM, Garcia AAF, Vianello RP, Benchimol-Reis LL (2016) Genome-wide association studies of anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). PLoS ONE 11:e0150506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150506>

- Portilla AE, Mayor-Duran VM, Buendia HF, Blair MW, Cichy K, Raatz B (2021) Climbing bean breeding for disease resistance and grain quality traits. *Legum Sci.* <https://doi.org/10.1002/leg3.122>
- Queiroz CB, Correia HLN, Santana MF, Batista DS, Vidigal PMP, Brommonschenkel SH, Queiroz MV (2019) The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:2295–2309. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09639-9>
- R Core Team (2021) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rasheed A, Wen W, Gao FM, Zhai S, Jin H, Liu JD, Guo Qi, Zhang Y, Dreisigacker S, Xianchun X, Zhonghu H (2016) Development and validation of KASP assays for functional genes underpinning key economic traits in wheat. *Theor Appl Genet* 129:1843–1860. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2743-x>
- Rezende Y, Tesfaye K, Mukankusi C, Arunga E, Gepts P (2018) Simple and rapid detached leaf technique for screening common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in vitro against angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*) disease. *Afr J Biotechnol* 17:1076–1081. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16584>
- Sakiyama NS, Ramos HCC, Caixeta ET, Pereira MG (2014) Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil. *Crop Breed Appl Biotechnol* 14:54–60
- Sanglard DA, Machado MAM, Batista FER, Rocha FS, Souza TLPO, Barros EG (2016) Pyramided lines of ‘Carioca’ common bean and their reaction to *Pseudocercospora griseola*. *Annu Rep Bean Improv Coop* 59:197–198
- Sartorato A, Nietsche S, Barros EG, Moreira MA (1999) Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. *Annu Rep Bean Improv Coop* 42:21–22
- Sartorato A, Nietsche S, Barros EG, Moreira MA (2000) RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. *Fitopatol Bras* 25:637–642
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J et al (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46:707–713. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- Shen GQ, Abdullah KG, Wang QK (2009) The TaqMan Method for SNP Genotyping. In: Komar A (ed) *Single nucleotide polymorphisms. Methods in molecular biology™ (methods and protocols)*. Humana Press, Totowa
- Silvério L, Vidigal-Filho MC, Vidigal Filho PS, Barelli MAA, Thomazella C, Nunes WMC (2002) Genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* race 2047 in G 2333. *Annu Rep Bean Improv Coop* 45:74–75
- Singh SP, Schwartz HF (2010) Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Sci* 50:2199–2223
- Souza TLPO, Gonçalves-Vidigal MC, Raatz B, Mukankusi CM, Abreu AFB, Melo LC, Pastor-Corrales MA (2016) Major loci controlling resistance to the angular leaf spot of common bean. *Annu Rep Bean Improv Coop* 58:xv–xviii
- Souza TLPO, Wendland A, Rodrigues MS, Almeida LCS, Correia FR, Rodrigues LA, Pereira HS, Faria LC, Melo LC (2014) Anthracnose resistance sources to be explored by the common bean breeding programs in Brazil. *Annu Rep Bean Improv Coop* 57:217–218
- Van-Schoonhoven A, Pastor-Corrales MA (1987) Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm. CIAT, Cali, Colombia, 1987
- Vieira AF, Almeida LCS, Rodrigues LA, Costa JGC, Melo LC, Pereira HS, Sanglard DA, Souza TLPO (2018) Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. *Gen Mol Res* 17:gmr18066. <https://doi.org/10.4238/gmr18066>
- Wendland A, Lobo Júnior M, Faria JC (2018) Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. Embrapa, Brasília
- Wu J, Zhu J, Wang L, Wang S (2017) Genome-wide association study identifies NBS-LRR-encoding genes related with anthracnose and common bacterial blight in the common bean. *Front Plant Sci* 8:1398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01398>
- Young RA, Melotto M, Nodari RO, Kelly JD (1998) Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, ‘G 2333.’ *Theor Appl Genet* 96:87–94
- Zhang Y-L, Zhang C-L, Wang G-L, Wang Y-X, Qi C-H, Zhao Q, You C-X, Li Y-Y, Hao Y-J (2019) The R2R3 MYB transcription factor MdMYB30 modulates plant resistance against pathogens by regulating cuticular wax biosynthesis. *BMC Plant Biol* 19:362. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1918-4>
- Zuiderveen GH, Padder BA, Kamfwa K, Song Q, Kelly JD (2016) Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean Beans (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS ONE* 11:e0156391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156391>

**Publisher’s Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **CAPÍTULO 3**

### **5 PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE, MANCHA-ANGULAR, MURCHA DE FUSARIUM EM FEIJÃO CARIOCA COM ESCURECIMENTO LENTO DOS GRÃOS**

## RESUMO

As doenças causam prejuízos à produção e à qualidade dos grãos do feijão-comum em todo o mundo. Além disso, as alterações bioquímicas comprometem à qualidade e o valor comercial dos grãos armazenados. O objetivo desse estudo foi selecionar precocemente progênies de feijão carioca que combinem os alelos-alvo de resistência à antracnose (*CoPv04<sup>R</sup>* e *Co-4<sup>2</sup>*), à mancha-angular (*Phg-2*), à murcha de *fusarium* (*FOP2.3<sup>403H</sup>*) e do escurecimento lento dos grãos (*sd*), usando modernas ferramentas biotecnológicas. Seis genitores compuseram o bloco de cruzamentos, Progênie-218311376 (BRSMG Realce x BRS Cometa, *CoPv04<sup>R</sup>*), K10 (*Co-4<sup>2</sup>*), BRS ELO FC423 (*sd*), DM103 (*Phg-2*), BRS Sublime (*Phg-Sublime*) e BRS FC415 (*sd* + *FOP2.3<sup>403H</sup>*). Foram obtidas 387 plantas F<sub>2</sub> a partir da autofecundação do híbrido múltiplo envolvendo todos os genitores supracitados. As plantas da geração F<sub>2</sub> foram genotipadas com os marcadores P8282v3-817 (A/G - *Co-4<sup>2</sup>*, o alelo-alvo está sublinhado), g796 (209/233 - *Phg-2*), SE04 (640 - *Phg-2*), ANYMUJW (G/T - *Phg-2*), ANAAJK6 (G/C - *FOP2.3<sup>403H</sup>*) e PvbHLHp12804 (A/G - *sd*). Foram selecionadas onze plantas F<sub>2</sub> combinando os alelos *Co-4<sup>2</sup>* (AA) e *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) e outras onze plantas F<sub>2</sub> com os alelos *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) e *sd* (AA), todas em homozigose para os alelos-alvo. Os marcadores SNP P8282v3-817, ANAAJK6 e PvbHLHp12804 são úteis para a seleção precoce de plantas portadoras dos alelos *Co-4<sup>2</sup>*, *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd*. Os marcadores g796, SE04 e ANYMUJW não foram específicos para o alelo de resistência à mancha-angular presente no genitor DM103, inviabilizando a seleção de plantas contendo, simultaneamente, os alelos *Co-4<sup>2</sup>*, *Phg-2*, *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd*. Visando combinar todos os alelos-alvo, nove progênies F<sub>2:3</sub> com os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* serão cruzadas com outras cinco progênies F<sub>2:3</sub> que carregam os alelos *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd*. Além disso, a linhagem-elite MAIII-16.159 do programa de seleção recorrente da Universidade Federal de Lavras é indicada como fonte de resistência à mancha-angular nos próximos blocos de cruzamentos. A partir dessas análises moleculares, a eficiência da seleção precoce dos alelos-alvo via marcadores moleculares deve ser confirmada através da inoculação em condição controlada ou em avaliação de campo.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, genética molecular, seleção precoce, melhoramento genético.

## PYRAMIDING OF RESISTANCE ALLELES TO DISEASES AND SLOW DARKENING IN CARIOCA BEANS ASSISTED BY MOLECULAR MARKERS

### ABSTRACT

The diseases cause damage to the production and quality of common beans grains worldwide. In addition, biochemical changes compromise the quality and commercial value of stored grains. The objective was to select early carioca bean progenies that combine the target alleles of resistance to anthracnose (*CoPv04<sup>R</sup>* and *Co-4<sup>2</sup>*), angular leaf spot (*Phg-2*), fusarium wilt (*FOP2.3<sup>403H</sup>*), and slow darkening (*sd*), using modern biotechnological tools. Six parents composed the crossing block, Progeny-218311376 (BRSMG Realce x BRS Cometa, *CoPv04<sup>R</sup>*), K10 (*Co-4<sup>2</sup>*), BRS ELO FC423 (*sd*), DM103 (*Phg-2*), BRS Sublime (*Phg-Sublime*) and BRS FC415 (*sd* + *FOP2.3<sup>403H</sup>*). 387 F<sub>2</sub> plants were obtained from the self-fertilization of the multiple-hybrid involving all the parents mentioned above. The plants of the F<sub>2</sub> generation were genotyped with the markers P8282v3-817 (A/G - *Co-4<sup>2</sup>*, the target allele is underlined), g796 (209/233 - *Phg-2*), SE04 (640 - *Phg-2*), ANYMUJW (G/T - *Phg-2*), ANAAJK6 (G/C - *FOP2.3<sup>403H</sup>*) and PvbHLHp12804 (A/G - *sd*). Eleven F<sub>2</sub> plants were selected combining the *Co-4<sup>2</sup>* (AA) and *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) alleles and another eleven F<sub>2</sub> plants with the *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) and *sd* (AA) alleles, all in homozygosity. The SNP markers P8282v3-817, ANAAJK6 and PvbHLHp12804 are useful for the early selection of progenies carrying the *Co-4<sup>2</sup>*, *FOP2.3<sup>403H</sup>*, and *sd* alleles. In addition to the target alleles, it was possible to identify 28,8% of them with commercial carioca grain. The markers g796, SE04, and ANYMUJW were not specific for the angular leaf spot resistance allele present in the DM103 parent, making it impossible to select plants containing, simultaneously, the *Co-4<sup>2</sup>*, *Phg-2*, *FOP2.3<sup>403H</sup>* and *sd* alleles. In order to combine all the target alleles, the nine F<sub>2:3</sub> progenies with the *Co-4<sup>2</sup>* and *FOP2.3<sup>403H</sup>* alleles will be crossed with another five F<sub>2:3</sub> progenies that carry the *FOP2.3<sup>403H</sup>* and *sd* alleles. Furthermore, the elite-line MAIII-16.159 from the recurrent selection program of the Federal University of Lavras should be used as an angular leaf spot-resistant parent in the next crossing blocks. The efficiency of early selection of target alleles via molecular markers must be confirmed through inoculation under controlled conditions or in-field evaluation.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, molecular genetics, molecular breeding, early selection.

## 6 INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em mais 120 países (Long et al., 2020), sendo fonte de macro e micronutrientes essenciais à dieta humana (Kotue et al., 2018). Com alto valor nutricional, o feijão é umas das fontes de proteína vegetal mais consumida no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, com as maiores médias de consumo *per capita* podendo chegar a 40 - 60 kg ano<sup>-1</sup> em Ruanda, Quênia e Uganda (Mukankusi et al., 2019). O Brasil figura entre os principais produtores de feijão-comum do mundo e com um consumo per capita de 15 kg ano<sup>-1</sup> (Ferreira et al., 2018). A importância socioeconômica do feijão-comum torna-o uma cultura-chave para a segurança alimentar (Nadeen et al., 2021), sendo necessário um incremento de 30% em sua produção até 2050 (Porch et al., 2013).

A estabilidade da produção de feijão-comum é constantemente desafiada pela ocorrência de doenças nas regiões produtoras (Brown & Hovmoller, 2002; Bebber et al., 2014). Estima-se que cerca de 45 doenças, de maior ou menor importância, causam perdas significativas na produção e na qualidade dos grãos de feijão (Singh & Schwartz, 2010). No tocante as doenças fúngicas, a antracnose, a mancha-angular e a murcha de *fusarium* apresentam ampla variabilidade patogênica e podem causar perdas de até 100% na produção e na qualidade dos grãos (Ragagnin et al., 2009; Souza et al., 2014; Maina et al., 2017).

Para antracnose, já foram relatadas cerca de 182 raças em todo o mundo (Padder et al., 2017), em que 71 foram descritas no Brasil (Pereira et al., 2018). A resistência à antracnose é conferida, principalmente, por genes de efeito principal (genes R) e independentes, identificados pelo símbolo *Co* (Kelly & Young, 1996; Kelly & Vallejo, 2004; Gonçalves-Vidigal et al., 2013). Atualmente, 14 genes R foram mapeados em diferentes cromossomos de *P. vulgaris* (Paulino et al., 2022) e que seguem a nomenclatura ‘*Co*’: *Co-1* ao *Co-6*, *co-8* (recessivo) e *Co-11* ao *Co-17* (<http://www.bic.uprm.edu>). Séries alélicas foram identificadas para os locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*. O loco *Co-1* (*Co-1*<sup>2</sup>, *Co-1*<sup>3</sup>, *Co-*

*I*<sup>4</sup> e *Co-I*<sup>5</sup>) foi mapeado no cromossomo Pv01 (Gonçalves-Vidigal & Kelly, 2006), o *Co-2* no Pv11 (Mastenbroek, 1960), o *Co-3* (*Co-3*<sup>2</sup>, *Co-3*<sup>3</sup>, *Co-3*<sup>4</sup> e *Co-3*<sup>5</sup>) no Pv04 (Gonçalves-Vidigal et al., 2013), o *Co-4* (*Co-4*<sup>2</sup> e *Co-4*<sup>3</sup>) no Pv08 (Young et al., 1998; Oblessuc et al., 2015), o *Co-5* (*Co-5*<sup>2</sup>) no Pv07 (Vallejo & Kelly, 2009), o *Co-6* no Pv07 (Schwartz et al., 1982), o *co-8* ainda não mapeado (Alzate-Marin et al., 1997), o *Co-11* ainda não mapeado (Gonçalves-Vidigal et al., 2007), o *Co-12* ainda não mapeado (Gonçalves-Vidigal et al., 2008), o *Co-13* no Pv03 (Lacanallos & Gonçalves-Vidigal, 2015), o *Co-14* no Pv01 (Gonçalves-Vidigal et al., 2012; Lima-Castro et al., 2017), o *Co-15* no Pv04 (Sousa et al., 2015), o *Co-16* no Pv04 (Coimbra-Gonçalves et al., 2016) e o *Co-17* no Pv03 (Trabanco et al., 2015). Além destes, outros locos de efeito principal que condicionam resistência à antracnose também foram identificados, como o *Co-Pa* (Lima-Castro et al., 2017), o *Co-AC* (Gilio et al., 2020), o *CoPv01*<sup>CDRK</sup> (Gonçalves-Vidigal et al., 2020), o *Co-BF* (Marcon et al., 2021; Xavier et al., 2022) e o *CoPv04*<sup>R</sup> (Gomes-Messias et al., 2022b), os quais ainda não foram oficialmente nomeados seguindo as regras do comitê de genética da BIC (Bean Improvement Cooperative Genetics Committee - <http://bic.css.msu.edu/Genetics.cfm>).

No âmbito dos programas de piramidação alélica para resistência às raças Mesoamericanas de antracnose predominantes na América Central, recomenda-se a combinação do alelo *Co-1* (Andino) com os alelos *Co-2*, *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-5* e/ou *Co-6* (Mesoamericanos) (Kelly & Miklas, 1998). Enquanto na América do Norte, a resistência efetiva contra este patógeno pode ser obtida quando os alelos *Co-5* e *Co-6* estão juntos no mesmo genótipo (Kelly & Miklas, 1998). Na América do Sul, mais especificamente no Brasil, onde os programas de melhoramento de feijão-comum possuem boas fontes de resistência à antracnose (Vieira et al., 2018), a melhor combinação seria dos alelos de origem Mesoamericana *Co-3*<sup>4</sup> (Ouro Negro), *Co-4*<sup>2</sup> ('SEL1308' e 'K13'), *Co-5* ('TU' e 'K23') e/ou *Co-6* ('AB136') com os alelos de origem Andina *Co-1* e *CoPv04*<sup>R</sup> (Vieira et al., 2018; Gomes-Messias et al., 2022b). O alelo *CoPv04*<sup>R</sup> (BRSMG Realce), com herança monogênica dominante (Gomes-Messias et al., 2022b), confere amplo espectro de resistência a diferentes raças de antracnose, incluindo as raças 65, 73, 91, 475 e 1609, sendo as três primeiras de maior relevância no Brasil devido ao maior nível de agressividade e prevalência nos campos de produção (Paulino et al., 2022).

A mancha-angular também é conhecida pela alta variabilidade. De um total de 316 isolados de *P. griseola* coletados de diferentes regiões geográficas do mundo e inoculados

contra o painel de cultivares diferenciadoras foram identificados 82 isolados Andinos, 193 Mesoamericanos e 41 de origem não conhecida da América Latina e África (Pastor-Corrales et al., 1998). No Brasil, foram avaliados 72 isolados coletados em dez estados brasileiros, sendo caracterizados em 26 raças diferentes, em que as raças 63-31, 63-23, 63-55, 63-39, 63-47 e 63-63 foram as mais frequentes (Nietsche et al., 2002). Entre estas, a raça 63-63 apresenta-se como a mais agressiva, sendo capaz de superar a resistência presente em todas as cultivares diferenciadoras (Pereira et al., 2015). Até o presente, sabe-se que a resistência à mancha-angular é governada por cinco genes R: *Phg-1* ('AND 277', Andino) mapeado no cromossomo Pv01, *Phg-2* ('México 54', Mesoamericano) no Pv08, *Phg-3* ('Ouro Negro', Mesoamericano) e *Phg-4* ('G5686', Andino) no Pv04 e o *Phg-5* ('CAL143', Andino) no Pv10 (Souza et al., 2016; Nay et al., 2019). No Brasil, onde são encontradas cultivares e raças de *P. griseola* dos dois *pools* gênicos, esforços em prol da combinação de alelos de resistência de ambos (Andino e Mesoamericano) devem ser feitos pelos programas de melhoramento de feijão-comum. Com isso, a combinação do alelo *Phg-1*, presente no genótipo 'AND 277' (Andino) que confere resistência a uma das raças (63-23) de *P. griseola* mais relevantes no Brasil (Bassi et al., 2017; Souza et al., 2016), com o alelo *Phg-2*, identificado nas cultivares 'México 54' e 'BAT322' (Mesoamericanas), conferindo resistência às raças 63-19 e 63-39 (sendo a primeira de maior relevância no Brasil) (Bassi et al., 2017), pode ser o caminho para o desenvolvimento de cultivares com maior nível de resistência à *P. griseola* (Miller et al., 2018).

No que tange à murcha de *fusarium*, principal doença de solo da cultura do feijão-comum, os isolados patogênicos geralmente apresentam alto grau de especificidade de hospedeiros, o que permite a subdivisão em *formae speciales* e em raças, com base nas espécies de plantas hospedeiras e nas cultivares infectadas, respectivamente (Cruz et al., 2018). Inicialmente, este fungo foi classificado como possuindo sete raças fisiológicas, em diferentes regiões geográficas: raça 1 - Carolina do Sul (USA) e Portici (Itália) (Ribeiro & Hagedorn, 1979a), raça 2 – Brasil (Ribeiro & Hagedorn, 1979b), raça 3 – Colômbia (Salgado et al., 1995), raça 4 - Colorado (USA) (Salgado & Schwartz, 1993), raça 5 – Castória (Grécia) (Woo et al., 1996), raça 6 - Espanha e raça 7 – Chrysoupoli (Grécia) (Alves-Santos et al., 2002). Recentemente, Henrique et al. (2014) propuseram a classificação das raças fisiológicas baseando-se em códigos binários a partir da reação observada em um grupo de 12 cultivares diferenciadoras de feijão-comum. Nesse estudo, foi possível identificar 27 raças, indicando que a variabilidade na população de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* é superior

a previamente relatada na literatura (Woo et al., 1996). No entanto, os resultados obtidos por Henrique et al. (2014) ainda carecem de confirmação, como por exemplo, a inclusão de dados moleculares e ampliação da região geográfica amostrada, saindo do nível de país para um nível global. Estudos indicam que o controle genético da resistência à murcha de *fusarium* em feijão-comum pode ser monogênica (Batista et al., 2017; Fall et al., 2001), oligogênica (até três genes) (Batista et al., 2017) ou mesmo poligênica (Cross et al., 2000; Torres, 2020; Paulino et al., 2021). Torres et al. (2020) observaram, a partir da população de mapeamento do cruzamento entre BRS FP403 (resistente) e BRS Horizonte (suscetível), que a herança da resistência à murcha de *fusarium* é complexa, sendo identificadas sete QTLs associados à resistência em cinco cromossomos distintos, Pv01, Pv02, Pv03, Pv04 e Pv11. Os autores destacaram o QTL presente no cromossomo 2, provisoriamente denominado de *FOP2.3*<sup>403H</sup>, que sozinho explicou 40,5% da variação fenotípica em decorrência dos sintomas causados por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. O QTL *FOP2.3*<sup>403H</sup> foi introgridido para o germoplasma-élite de feijão carioca com o auxílio do marcador SNP SNP\_Chr02\_26953819\_M2554 em ensaio TaqMan™, o que resultou no lançamento da cultivar BRS FC415 (Pereira et al., 2022). Atualmente, apenas dois genes de resistência foram oficialmente nomeados pela BIC, *Fop-1* e *Fop-2*, que conferem resistência às raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* que ocorrem no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente (Gene List, 2022).

Para reduzir os danos causados por essas doenças, as principais estratégias de manejo são baseadas na aplicação de produtos químicos, rotação de culturas e uso de cultivares resistentes (Batista et al., 2016). O uso da resistência genética é considerado o método mais promissor, ambientalmente sustentável e economicamente mais rentável, além de fácil adoção pelo produtor (Assefa et al., 2019). Adicionalmente, garante a maior estabilidade do desempenho agrônômico das cultivares, reduz o custo de produção e minimiza os riscos de contaminação do ambiente por moléculas químicas aplicadas no controle das doenças (Miklas et al., 2006). Com isso, a obtenção de cultivares com resistência efetiva contra raças de um patógeno ou combinando resistência à dois ou mais patógenos tem sido o grande desafio dos programas de melhoramento (Valentini et al., 2017).

A piramidação de alelos de resistência oriundos de fontes de resistência de *pool* gênicos distintos pode ser uma estratégia útil ao melhoramento para o desenvolvimento de cultivares com resistência ampla e duradoura às principais doenças que acometem o feijão-

comum (Meziadi et al., 2016; Rodríguez et al., 2019). Essa estratégia é embasada nas evidências da coevolução entre patógeno e hospedeiro (*P. vulgaris*), onde isolados de origem Andina são mais patogênicos, principalmente, aos genótipos de feijão oriundos deste mesmo *pool* gênico (Miklas et al., 2006). Por sua vez, os isolados de origem Mesoamericana, além de serem patogênicos aos genótipos Mesoamericanos, também podem infectar feijões de origem Andina (Kelly & Miklas, 1998; Miklas et al., 2006; Terán et al., 2013). O conhecimento desta particularidade em termos evolutivos dentro e entre *pools* gênicos é imprescindível para o desenvolvimento de cultivares resistentes (Paulino et al., 2022). Além disso, o entendimento acerca da diversidade populacional do patógeno bem como as raças que ocorrem em regiões específicas são cruciais para o sucesso do programa de piramidação alélica (Stam & Mcdonald, 2018; Paulino et al., 2022).

O emprego da piramidação encontra limitações quando são utilizados métodos de melhoramento convencionais, visto que o efeito individual de um alelo de resistência nem sempre é facilmente identificado ou mensurado quando se têm outros alelos de resistência presentes no mesmo genótipo (Ragagnin et al., 2009). Isso ocorre porque os alelos de resistência que estão presentes em um genótipo de feijão-comum podem conferir resistência a mais de uma raça de um mesmo patógeno, dificultando a mensuração do efeito individual do alelo a ser piramidado. No entanto, com a validação de marcadores moleculares ligados aos alelos-alvo, tornou-se viável a introgressão de dois ou mais alelos de resistência ao mesmo tempo (Kelly & Miklas, 1998). Além do mais, a adoção da seleção assistida promove uma redução de tempo e de custos durante o processo de avaliação e seleção (Miklas et al., 2006; Kelly & Miklas, 1998).

Por intermédio do Programa Nacional de Melhoramento de Feijão-Comum, liderado pela Embrapa Arroz e Feijão, novas cultivares de grão carioca são lançadas no Brasil a cada ano com algum nível de resistência aos principais patógenos de relevância para a cultura do feijão-comum, como a BRS FC402, resistente à antracnose e moderadamente resistente à murcha de *fusarium* (Melo et al., 2017), a BRS FC406, resistente à mancha-angular e antracnose (Pereira et al., 2021a), a BRS Notável, moderadamente resistente à antracnose e murcha de *fusarium* (Pereira et al., 2012), BRS FC415, resistente a doenças de solo, como a murcha de *fusarium*, com escurecimento lento dos grãos e suscetível à antracnose (Pereira et al., 2022). Até o presente momento, não foram desenvolvidas cultivares que combinem resistência à antracnose, mancha-angular, murcha de *fusarium* e escurecimento lento dos

grãos, havendo então, a necessidade de buscarmos por soluções tecnológicas nesse sentido. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer um programa de piramidação alélica que permita a retirada de progênes de feijão carioca contendo alelos de resistência à antracnose, mancha-angular e murcha de *fusarium*, além de possuírem escurecimento lento dos grãos, usando ferramentas modernas de biotecnologia.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Material genético e alelos-alvo

Para este estudo foram selecionados seis genitores-elite, que além da resistência genética, também possuíam atributos relacionados à qualidade comercial dos grãos (**Tabela 3.1**).

**Tabela 3.1.** Genitores utilizados nos blocos de cruzamentos visando a piramidação de alelos-alvo de resistência à antracnose, mancha-angular, murcha de *fusarium* e escurecimento lento dos grãos.

Genitor	Critério de seleção	Alelo-alvo	Fenótipo	Pool gênico	Referência
K10	ANT	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	R	M	Vieira et al. (2018)
Progênie-218311376	ANT	<i>CoPv04</i> <sup>R</sup>	R	A	Gomes et al. (2019)
DM103	MA	<i>Phg-2</i>	R	M	Sanglard (2010)
BRS Sublime	MA	<i>Phg-Sublime</i>	R	M	Wendland et al. (2018)
BRS FC415	FU + EL	<i>FOP2.3</i> <sup>403H</sup> + <i>sd</i>	R + EL	M	Rodrigues et al. (2019a, 2019b); Torres (2020) e Pereira et al. (2022)
BRS ELO FC423	EL	<i>Sd</i>	EL	M	Pereira et al. (2021b)

M: Mesoamericano; A: Andino; ANT: Resistência à antracnose; MA: Resistência à mancha angular; FU: Resistência à murcha de *fusarium*; EL: Escurecimento lento; R: Resistente.

O genitor K10 é de origem Mesoamericana e carrega os alelos *Co-3*<sup>4</sup>, *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-5* e *Co-6*, que conferem às plantas de feijão-comum o fenótipo de reação de resistência à antracnose (Vieira et al., 2018). A Progênie-218311376, obtida do cruzamento entre BRSMG Realce e BRS Cometa, possui o alelo *CoPv04*<sup>R</sup> e pertence ao *background* genético carioca (Gomes et al., 2019). Essa progênie foi avaliada em condição de campo em Ponta Grossa – PR, principal campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão para fenotipagem das linhagens-elite quanto a reação à antracnose, mostrando-se altamente resistente. Adicionalmente, a Progênie-218311376 mostrou-se resistente quando inoculada com a mistura das raças 81 e 475 em condição controlada de temperatura, humidade e luminosidade

(Gomes et al., 2019). A linhagem DM103, de origem Mesoamericana, foi selecionada por carregar o alelo *Phg-2* (Mesoamericano) de resistência à mancha-angular, com nota média de severidade igual a 3,0 (Sanglard, 2010). BRS Sublime foi incluída no bloco de cruzamentos por ser uma cultivar de grão carioca líder no mercado, resistente à mancha-angular (alelo *Phg-Sublime*), com aptidão para a colheita mecanizada e por apresentar grãos com alta qualidade nutricional e potencial produtivo estimado em 4667 kg ha<sup>-1</sup> (Wendland et al., 2018). As cultivares BRS FC415 e BRS ELO FC423 carregam o alelo *sd* em homozigose, que confere o fenótipo de escurecimento lento em grãos de feijão carioca (Rodrigues et al., 2019a; Pereira et al., 2021b). Além do escurecimento lento dos grãos, a cultivar BRS FC415 é resistente à murcha de *fusarium*, sendo fonte do alelo *FOP2.3*<sup>403H</sup> (Rodrigues et al., 2019b; Torres, 2020). A cultivar BRS ELO FC423 é a primeira cultivar de feijão oriunda da parceria entre a Embrapa Arroz e Feijão e empresas produtoras de sementes (sementeiros) que atendem diferentes regiões do Brasil.

## 7.2 Sistema de cruzamentos e avanço de gerações

O planejamento dos cruzamentos foi realizado de modo que os genitores a serem cruzados apresentassem coincidência de florescimento. Para tanto, a semeadura foi realizada em duas épocas e com intervalos de aproximadamente uma semana entre si. As hibridações artificiais foram conduzidas em casa de vegetação climatizada, durante o período de temperatura mais amena (das 8 horas às 11 horas). A emasculação, na fase de botão floral (antes da liberação do pólen), foi realizada com o auxílio de uma pinça e a exposição do estigma foi promovida retorcendo as duas pétalas maiores (estandarte) no sentido horário. A confirmação dos cruzamentos e o monitoramento da introgressão dos alelos-alvo foram feitos via Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM) (**Tabela 3.2; Apêndice 3.A**).

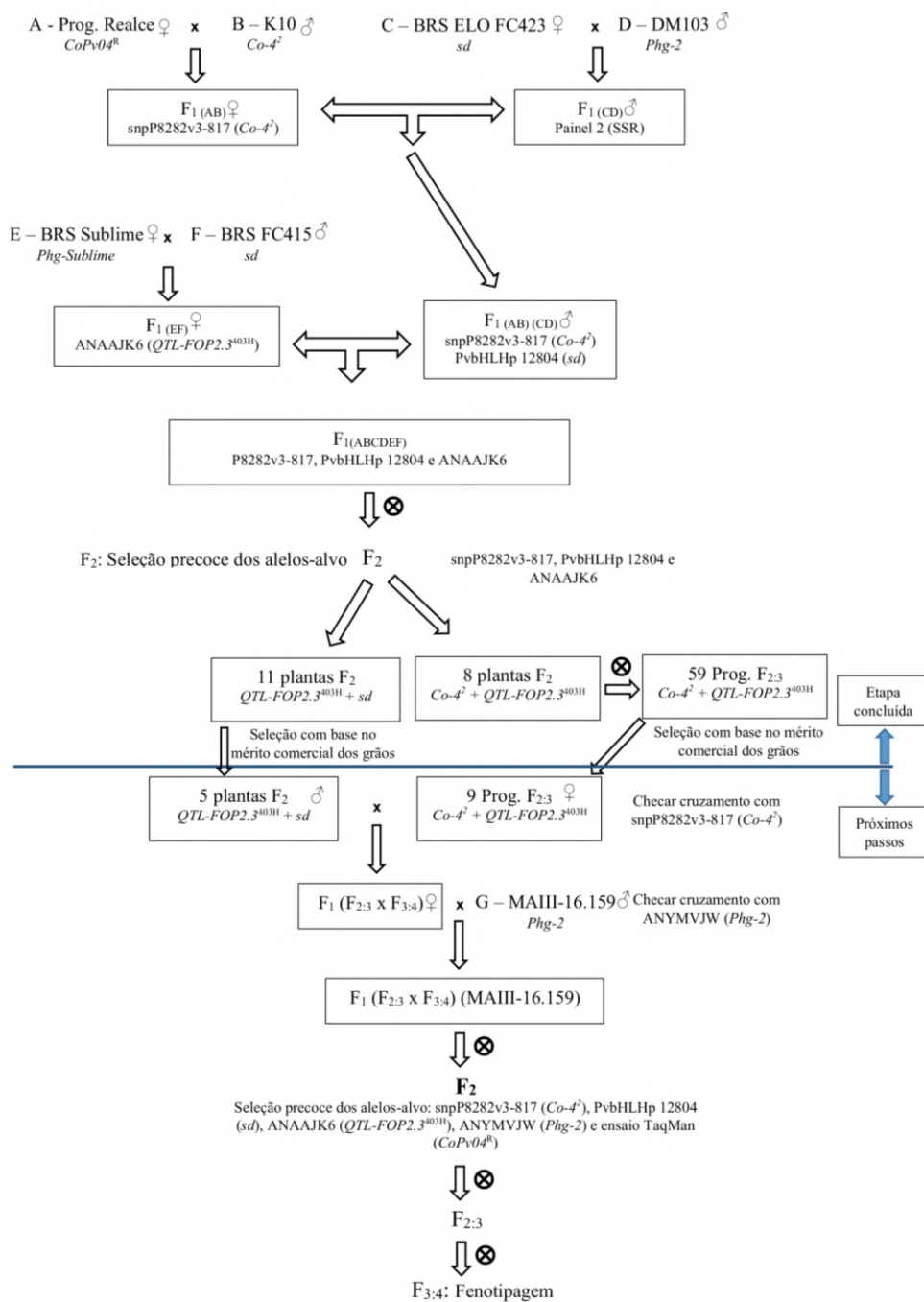
O número mínimo de plantas para identificar pelo menos uma com o genótipo de interesse na geração F<sub>t</sub> foi obtido conforme descrito por Ramalho et al. (2012), com a seguinte expressão:

$$n = \frac{\log(1 - P)}{\log(1 - p)}$$

Em que n é o tamanho mínimo da geração F<sub>t</sub> para que se tenha pelo menos uma planta com os alelos *CoPv04*<sup>R</sup>, *Co-4*<sup>2</sup>, *Phg-2*, *FOP2.3*<sup>403H</sup> e *sd*; P é a probabilidade de ocorrência

do genótipo desejado ( $P = 0,95$ ) e  $p$  a frequência esperada na geração  $t$  de obter pelo menos uma planta com todos os alelos-alvo ( $k$ ) em homozigose ou em heterozigose, que pode ser obtida pelas equações  $p = \left(\frac{(2^{t-1} - 1)}{2^t}\right)^k$  e  $p = \left(\frac{(2^{t-1} + 1)}{2^t}\right)^k$ , sendo a primeira para genótipos homozigotos e a segunda para genótipos heterozigotos.

Inicialmente, foram obtidos dois híbridos simples:  $F_{1(AB)}$  [Prog. 218311376♀ X K10♂] e  $F_{1(CD)}$  [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂] (**Figura 3.1**). O híbrido duplo  $F_{1(AB)(CD)}$  (**Figura 3.1**) foi obtido intercruzando as plantas oriundas os híbridos simples  $F_{1(AB)}$  e  $F_{1(CD)}$ . Simultaneamente a obtenção do híbrido duplo, obteve-se o híbrido simples  $F_{1(EF)}$  [BRS Sublime♀ x BRS FC415♂] (**Figura 3.1**). O híbrido múltiplo foi obtido cruzando as plantas do híbrido duplo  $F_{1(AB)(CD)}$  com as plantas do híbrido simples  $F_{1(EF)}$  (**Figura 3.1**). As sementes híbridas do cruzamento múltiplo foram semeadas para o avanço de geração  $F_1 \rightarrow F_2$ . Após um período de aproximadamente três meses, as plantas contendo os alelos-alvo tiveram suas sementes  $F_2$  colhidas individualmente. Com objetivo de se obter maior número de sementes, avançou-se mais uma geração,  $F_{2,3} \rightarrow F_{3,4}$  (**Figura 3.1**). Todas as etapas de cruzamentos e avanço de gerações foram conduzidas em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão usando vasos de 10 litros preenchidos com solo. A adubação de semeadura foi realizada com fosfato monoamônico (MAP), com 48% de  $P_2O_5$ . A adubação de cobertura foi realizada com ureia (44% de N) em dois momentos, o primeiro aos 15 dias após a semeadura e o segundo no início da floração. Em cada etapa do avanço de geração, realizou-se o tratamento das sementes com fungicida Vitavax®-Thiram na dose de 250 mL  $100\text{kg}^{-1}$  de semente para o controle da podridão radicular e do tombamento, ambos causados pelo fungo *Rhizoctonia solani*. Quando necessário, o controle da mosca minadora (*Liriomyza huidobrensis*) foi realizada com o inseticida Benevia® (FMC) na dose de 250 mL  $\text{ha}^{-1}$ .



**Figura 3.1.** Esquema ilustrativo dos cruzamentos visando a piramidação dos alelos-alvo  $CoPv04^R$ ,  $Co-4^2$ ,  $Phg-2$ ,  $FOP2.3^{403H}$  e  $sd$ . Genitores: **A** - Progênie 218311376 (Prog. Realce,  $CoPv04^R$ ); **B** - K10 ( $Co-4^2$ ); **C** - BRS ELO FC423 ( $sd$ ); **D** - DM103 ( $Phg-2$ ); **E** - BRS Sublime ( $Phg-Sublime$ ) e **F** - BRS FC415 ( $sd + FOP2.3^{403H}$ ). Os marcadores snpP8282v3-817, ANAAJK6, PvbHLHp 12804 foram utilizados para monitorar a introgressão dos alelos-alvo  $Co-4^2$ ,  $FOP2.3^{403H}$  e  $sd$ , respectivamente. O marcador ANYMVJW é indicado para monitorar a introgressão do alelo  $Phg-2$  quando a linhagem MAIII-16.159 for incluída no bloco de cruzamento. A linha azul indica o limite entre as etapas que já foram concluídas e os próximos passos.

### 7.3 Seleção assistida por marcadores moleculares - SAM

Todas as etapas de genotipagem foram realizadas no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão. A extração do DNA genômico foi realizada a cada geração de cruzamentos com o objetivo de monitorar a introgressão dos alelos-alvo bem como eliminar plantas oriundas de autofecundação. Foram coletados, em microtubos devidamente identificados, dois discos foliares de aproximadamente 5 mm de diâmetro de cada planta (estádio V3) oriundas dos cruzamentos exemplificados na **Figura 3.1**. As amostras de tecido foliar foram armazenadas em freezer com temperatura ajustada para -20°C. A extração foi realizada com base no protocolo CTAB, adaptado de Brondani et al. (1998) para isolamento de DNA genômico de *Phaseolus vulgaris* L.

A concentração do DNA extraído foi estimada por espectrometria em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Waltham/EUA) e a integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR Green (Life Technologies®, São Paulo, Brasil). O resultado foi fotodocumentado por fotografia sob luz UV, utilizando-se o equipamento transiluminador (Geldoc – Bio-Rad) e programa computacional QuantityOne. As amostras foram diluídas em água ultrapura e foram padronizadas em 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para serem utilizadas nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

A introgressão dos alelos-alvo e a natureza híbrida das plantas foram monitoradas utilizando-se os marcadores descritos nas **Tabela 3.2 e Apêndice 3.A**.

Cada reação de PCR com o marcador g796 foi realizada com um volume final de 5,0  $\mu\text{L}$ , sendo 0,5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O RNase-free, 2,5  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Thermo Fisher) [2X], 0,5  $\mu\text{L}$  de Q-Solution (Qiagen), 0,5  $\mu\text{L}$  do F-g796/R-g796 [10 $\mu\text{M}$ ] e 1  $\mu\text{L}$  de DNA [100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]. As reações de PCR para o marcador SE04 foram conduzidas com volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 0,5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O RNase-free, 2,5  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Thermo Fisher™) [2X], 0,5  $\mu\text{L}$  de Q-Solution (Qiagen), 0,25  $\mu\text{L}$  do F-SE04 [10 $\mu\text{M}$ ], 0,25  $\mu\text{L}$  do R-SE04 [10 $\mu\text{M}$ ] e 1  $\mu\text{L}$  de DNA [100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems™, USA) e os programas de amplificação específicos para cada marcador molecular estão apresentados no **Apêndice 3.B**. Os fragmentos específicos para os marcadores g796 (209/233 pb) e SE04 (640 pb) foram obtidos via eletroforese em gel de agarose 2,5% com marcador de peso molecular conhecido. As reações de PCR loco-específicas para os marcadores em ensaio de hidrólise do tipo TaqMan™ (Thermo Fisher) (Shen et al., 2009; Applied Biosystems™, 2022) foram

constituídas de 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA, 2,5  $\mu\text{L}$  de TaqMan™ GTXpress™ Master Mix (Applied Biosystems™), 0,125  $\mu\text{L}$  do ensaio TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific™) e 1,375  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O RNase-free, totalizando 5  $\mu\text{L}$ . As condições de amplificação, anelamento e extensão usando o equipamento QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems™) podem ser observadas no **Apêndice 3.B**. Ao final, a análise dos alelos foi realizada utilizando o programa Genotyping Analysis Module, V.3.7.

Na ausência de marcadores polimórficos entre os genitores para os alelos-alvo, a natureza híbrida das plantas foi determinada com marcadores SSR (Morais et al., 2016) (**Apêndice 3.A**). A amplificação dos locos SSR foi conduzida com o kit Qiagen PCR Multiplex (Qiagen), conforme descrito pelo fabricante. O volume final de cada reação foi de 5  $\mu\text{L}$ , contendo 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA e as concentrações de pares de primers individuais variando de 0,06  $\mu\text{M}$  a 1,2  $\mu\text{M}$ , dependendo da intensidade do produto amplificado (Valdisser et al., 2013). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems™), com uma etapa inicial de desnaturação do DNA e ativação da enzima HotStar Taq DNA Polimerase à 95 °C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 56 °C por 1 minuto e 30 segundos e extensão à 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada uma etapa de extensão à 72 °C por 10 minutos (Valdisser et al., 2013).

Após a reação de PCR, os produtos derivados da amplificação foram diluídos na proporção de 10 vezes com água Milli-Q estéril para reduzir o nível de intensidade da fluorescência e proporcionar melhor padrão de detecção dos fragmentos (Valdisser et al., 2013). Após esta etapa, foi preparado o mix contendo uma alíquota de 0,5  $\mu\text{L}$  do produto da PCR diluído, 9,4  $\mu\text{L}$  de formamida (Hi-Di™, Applied Biosystems™) e 0,08  $\mu\text{L}$  do marcador padrão (GeneScan™ 500 Rox™ Size Standard). Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese capilar conduzida em analisador automático de DNA (ABI 3100 Genetic Analyzer™, Applied Biosystems™). Os dados de saída foram coletados utilizando o programa Data Collection versão 2.0 (Applied Biosystems™) e analisados usando programa GeneMapper versão 4.1 (Applied Biosystems™) para a chamada dos alelos em pares de base (Valdisser et al., 2013).

**Tabela 3.2.** Descrição dos marcadores moleculares que foram utilizados para monitorar a introgressão dos alelos-alvo no programa de pirâmidação alélica.

Marcador	Tipo	Posição (pb)	Cromossomo	Polimorfismo	Alelo-alvo	Fonte	Caráter*	Referência
g796	STS	61514592	Pv08	209/ <u>233</u> pb	<i>Phg-2</i>	México 54	Mancha-angular	Miller et al. (2018)
SE04	SCAR	-	Pv08	<u>640</u> pb	<i>Phg-2</i>	MAR-2	Mancha-angular	Sanglard (2010)
ANYMVJW	SNP	62193174	Pv08	T/ <u>G</u>	<i>Phg-2</i>	México 54	Mancha-angular	Lobaton et al. (2018)
P8282v3-817 (AHGKAA9)	SNP	2278285	Pv08	G/ <u>A</u>	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	SEL1308	Antracnose	Gomes-Messias et al. (2022a)
ANAAJK6	SNP	26864618	Pv02	G/ <u>C</u>	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i>	BRS FP403	Murcha de <i>fusarium</i>	Torres (2020)
ANCFFDU	SNP	26953858	Pv02	<u>T</u> /A	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i>	BRS FP403	Murcha de <i>fusarium</i>	Torres (2020)
PvbHLHp12804 (AHFBB41)	SNP	28765330	Pv07	G/ <u>A</u>	<i>sd</i>	BRSMG Madrepérola	Escurecimento lento	Alvares et al. (2019)
snp12782 (AN7D9RV)	SNP	1182123	Pv04	<u>C</u> /T	<i>CoPv04<sup>R</sup></i>	BRSMG Realce	Antracnose	Gomes-Messias et al. (2022b)
snp3308 (NA9H3CT)	SNP	505696	Pv04	<u>C</u> /T	<i>CoPv04<sup>R</sup></i>	BRSMG Realce	Antracnose	Gomes-Messias et al. (2022b)
snp1327 (ANAAUPH)	SNP	477285	Pv04	<u>T</u> /C	<i>CoPv04<sup>R</sup></i>	BRSMG Realce	Antracnose	Gomes-Messias et al. (2022b)

O alelo-alvo associado ao fenótipo de interesse está sublinhado; \*Refere-se ao fenótipo de resistência à antracnose, mancha-angular, murcha de *fusarium* e do escurecimento lento dos grãos.

#### 7.4 Análise da segregação dos alelos-alvo na geração F<sub>2</sub>

Realizou-se a análise de segregação dos alelos-alvo na população F<sub>2</sub> oriunda do híbrido múltiplo F<sub>1(ABCDE)</sub> com base na informação genotípica dos marcadores P8282v3-817 (G/A – Co-4<sup>2</sup>), ANAAJK6 (G/C – FOP2.3<sup>403H</sup>) e PvbHLHp12804 (G/A – sd). A estatística qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi estimada para testar a aderência das frequências observadas às frequências esperadas, ao nível de 5% de probabilidade e considerando a segregação 1:2:1 (marcadores codominantes).

#### 7.5 Avaliação do mérito comercial dos grãos após armazenamento

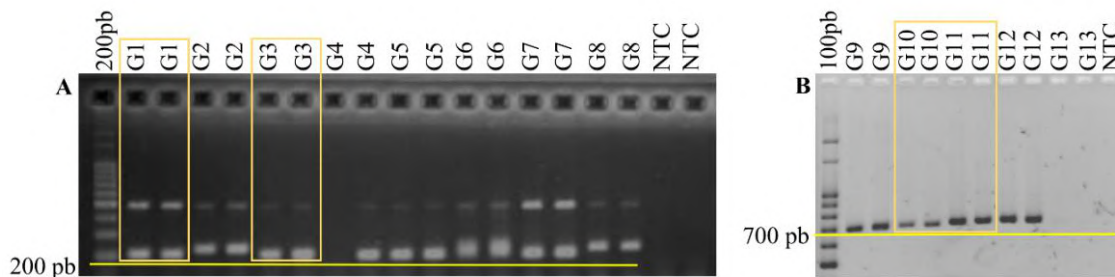
Avaliou-se a cor dos grãos após um período de armazenamento (CGA) de 147 dias em câmara fria, visando identificar aquelas com mérito comercial dos grãos. A escala de notas variou de 1 a 5: nota 1 - grãos com a cor do tegumento muito clara; 2 - grãos com a cor do tegumento intermediária tendendo para clara; 3 - grãos com a cor do tegumento intermediária sem tendência; 4 - grãos com a cor do tegumento intermediária tendendo para escura e 5 - grãos com a cor do tegumento escura (Silva et al., 2008). Além das observações em relação a cor dos grãos, observou-se no momento da avaliação, a presença/ausência de estrias, presença/ausência de rajas típicas de grão carioca, formato reniforme dos grãos e a presença/ausência de halo. Nessa etapa, objetivou-se selecionar progênies, que além da combinação dos alelos-alvo, apresentassem grãos com algum mérito comercial.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Híbridos simples

O cruzamento F<sub>1(AB)</sub> [Prog-218311376♀ X K10♂] gerou 33 plantas, as quais foram genotipadas com o SNP P8282v3-817, resultando em 32 plantas heterozigotas (A/G, o polimorfismo associado ao alelo-alvo está sublinhado) e uma oriunda de autofecundação (GG), sendo, portanto, excluída. Do híbrido F<sub>1(CD)</sub> [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂] foram obtidas 35 plantas, e como os marcadores g796 (209/233), SE04 (640/-) e ANYMVJW (G/T) ligados ao alelo *Phg-2* (**Tabela 3.2**) foram monomórficos entre os genitores DM103 e BRS ELO FC423 ou não amplificaram o alelo-alvo no parental doador (**Figuras 3.2A e 3.2B; Tabela 3.3**), a natureza híbrida das plantas foi confirmada usando os marcadores microssatélites do painel 2 (**Apêndice 3.A**). Os marcadores microssatélites PV5 e PV35 foram polimórficos entre os genitores DM103 e BRS ELO FC423, amplificando em 24 das 35 plantas, sendo todas híbridas (**Apêndice 3.C**). As plantas híbridas dos cruzamentos F<sub>1(AB)</sub>

e  $F_{1(CD)}$  foram intercruzadas para a obtenção do híbrido duplo, tendo o  $F_{1(AB)}$  como parental masculino (**Figura 3.1**). Um total de 33 plantas do híbrido simples  $F_{1(EF)}$  [BRS Sublime♀ x BRS FC415♂] foram genotipadas com o marcador ANAAJK6 (G/C), sendo seis homozigotas (GG) para o alelo do parental feminino e, portanto, eliminadas do bloco de cruzamentos com o híbrido duplo por serem frutos de autofecundação. A taxa de sucesso do processo de hibridação variou de 81,8% para o  $F_{1(EF)}$  a 100% para o híbrido  $F_{1(CD)}$ .



**Figura 3.2.** **A** - Gel de agarose à 2,5% do produto da PCR com o marcador codominante *g796* (*Phg-2*): DM103 (G1), México54 (G2), BRS ELO FC423 (G3), BRS Sublime (G4), DM103 x BRS ELO FC423 (G5), México54 x BRS ELO FC423 (G6), DM103 x BRS Sublime (G7) e México54 x BRS Sublime. Suscetível (209 pb); Resistente (233 pb). **B** - Gel de agarose à 2,5% do produto da PCR com o dominante marcador *SE04* (*Phg-2*): MAR-2 (G9), DM103 (G10), BRS ELO FC423 (G11), México54 (G12) e Rudá (G13). Suscetível (Ausência); Resistente (640 pb).

**Tabela 3.3.** Perfil molecular dos genitores utilizados neste estudo quanto à presença dos alelos-alvo em ensaios TaqMan™.

Genótipo	P8282v3-817 ( <i>Co-4<sup>2</sup></i> )		ANYMVJW ( <i>Phg-2</i> )		ANAAJK6 ( <i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> )		PvbHLHp12804 ( <i>sd</i> )	
	<u>A/G</u>	ANT	<u>G/T</u>	MA	<u>G/C</u>	FOP	<u>A/G</u>	EL
BRS Sublime	GG	-	TT	R	GG	-	GG	ER
BRS FC415	GG	-	TT	-	<u>CC</u>	R	<u>AA</u>	EL
BRS ELO FC423	GG	-	TT	-	-	-	<u>AA</u>	EL
DM 103	GG	-	TT	MR	-	-	GG	-
K10	<u>AA</u>	R	TT	-	-	-	-	-
Prog-218311376	GG	R	TT	-	-	-	-	-
MAIII-16.159	-	-	<u>GG</u>	R	-	-	-	-
BRS Horizonte	GG	-	-	S	GG	S	-	-
BRS MG BRS Madrepérola	GG	-	TT	-	-	-	<u>AA</u>	EL
BRS FP403	GG	-	TT	-	<u>CC</u>	R	-	-
México 54	GG	-	<u>GG</u>	R	-	-	-	-
IPA 7419	GG	S	TT	-	-	-	-	-

O alelo-alvo associado ao fenótipo de interesse está sublinhado, ANT – Reação à antracnose; MA – Reação à mancha-angular; FOP – Reação à murcha de *fusarium*; Fenótipo: R - Resistente; MR – Moderadamente Resistente; S – Suscetível; EL – Escurecimento Lento; ER – Escurecimento Regular

## 8.2 Híbrido duplo e múltiplo

Do cruzamento duplo, foram obtidas 151 plantas, das quais 77 e 75 plantas foram heterozigotas para os alelos *Co-4<sup>2</sup>* (A/G) e *sd* (A/G), respectivamente. Entre as plantas heterozigotas, obteve-se 33 combinando os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *sd*. As 27 plantas híbridas do cruzamento F<sub>1(EF)</sub> foram cruzadas com as plantas heterozigotas do híbrido duplo para obtenção do híbrido múltiplo F<sub>1(ABCDEF)</sub>. A etapa de obtenção do híbrido múltiplo ocorreu durante o período de pandemia (Set/2020), em que a redução da jornada de trabalho levou a redução do número de cruzamentos realizados diariamente, o que resultou em apenas três hibridações efetivas (**Apêndice 3.D**). Foram obtidas sete plantas do híbrido F<sub>1(ABCDEF)</sub>, as quais foram individualizadas, sendo codificadas como LM01, LM02, LM03, LM04, LM05, LM06 e LM07 (**Tabela 3.4**). A genotipagem dessas plantas revelaram diferentes combinações dos alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>*, *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd* (**Tabela 3.4**). Apenas a planta LM04 foi homozigota para o alelo associado à suscetibilidade à antracnose (GG – *co-4<sup>2</sup>/co-4<sup>2</sup>*), homozigota para o alelo associado ao fenótipo de resistência à murcha de *fusarium* (CC – *FOP2.3<sup>403H</sup> / FOP2.3<sup>403H</sup>*) e para o alelo associado ao escurecimento lento dos grãos (AA – *sd/sd*) (**Tabela 3.4**). As demais plantas apresentaram pelo menos um dos alelos-alvo em heterozigose (**Tabela 3.4**). As plantas F<sub>2</sub> oriundas de LM04 (F<sub>1</sub>) não foram usadas na análise de segregação dos marcadores P8282v3-817 (G/A – *Co-4<sup>2</sup>*), ANAAJK6 (G/C - *FOP2.3<sup>403H</sup>*) e PvbHLHp12804 (G/A - *sd*) por serem homozigotas para os alelos-alvo. Para a análise de aderência das frequências observadas às esperadas, foram utilizadas apenas as plantas F<sub>2</sub> oriundas das plantas do híbrido F<sub>1(ABCDEF)</sub> que eram heterozigotas em relação aos alelos-alvo desse estudo (**Tabela 3.4**). As sete plantas F<sub>1</sub> supracitadas foram autofecundadas e geraram 394 sementes F<sub>2</sub> (**Apêndice 3.D**).

## 8.3 Geração F<sub>2</sub>: seleção precoce de alelos-alvo

As plantas LM01 e LM07 produziram o maior (97) e o menor (14) número de sementes F<sub>2</sub>, respectivamente (**Apêndice 3.D**). Ao todo, foram obtidas 387 plantas F<sub>2</sub>. Nesta etapa, realizou-se a genotipagem com os marcadores em ensaios TaqMan™ P8282v3-817 (A/G), ANAAJK6 (G/C) e PvbHLHp12804 (A/G) (**Tabela 3.2**), o que resultou na seleção de onze plantas combinando os alelos *Co-4<sup>2</sup>* (AA) e *FOP403* (CC) em homozigose e de outras 82 plantas combinando os alelos *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) e *sd* (AA) em homozigose. Das onze plantas F<sub>2</sub> homozigotas para os alelos *Co-4<sup>2</sup>* (AA) e *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC), sete produziram sementes F<sub>2:3</sub> (**Tabela 3.5**). As sementes da planta P1551-LM01-p63 (AA/CC) (**Tabela 3.5**)

foram subdivididas em pequenas e graúdas. Com essa subdivisão, foram gerados oito grupos de progênies F<sub>2:3</sub> oriundos das sete plantas F<sub>2</sub>, G01 ao G08 (**Tabela 3.6**). Os maiores números de progênies F<sub>2:3</sub> foram obtidos nos grupos G02 e G03, por outro lado, o menor número foi obtido no grupo G02 (**Tabela 3.6**), totalizando de 59 progênies F<sub>2:3</sub>. Entre as 82 plantas homozigotas para os alelos *FOP2.3*<sup>403H</sup> (CC) e *sd* (AA), cinco foram selecionadas por possuírem escurecimento lento (nota da CGA = 1), grãos do tipo carioca, com fundo creme claro, rajadas marrons claras e sem halo (**Tabela 3.5**), atributos que atendem o padrão comercial (**Apêndice 3.E**).

**Tabela 3.4.** Genotipagem das sete plantas do cruzamento múltiplo F<sub>1(ABCDEF)</sub> com os P8282v3-817 (G/A - *Co-4*<sup>2</sup>), ANAAJK6 (G/C - *FOP2.3*<sup>403H</sup>) e PvbHLHp12804 (G/A - *sd*).

Planta F <sub>1</sub>	P8282v3-817	Alelo-alvo	ANAAJK6	Alelo-alvo	PvbHLHp12804	Alelo-alvo
LM01	<u>GA</u>	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <u><i>Co-4</i><sup>2</sup></u>	<u>GC</u>	<i>fop2.3</i> <sup>403H</sup> / <u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u>	GG	<i>Sd/Sd</i>
LM02	GG	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <i>co-4</i> <sup>2</sup>	<u>GC</u>	<i>fop2.3</i> <sup>403H</sup> / <u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u>	<u>GA</u>	<i>Sd/sd</i>
LM03	<u>GA</u>	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <u><i>Co-4</i><sup>2</sup></u>	<u>GC</u> <sup>1</sup>	<i>fop2.3</i> <sup>403H</sup> / <u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u>	GG	<i>Sd/Sd</i>
LM04	GG	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <i>co-4</i> <sup>2</sup>	<u>CC</u> <sup>2</sup>	<u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u> / <u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u>	<u>AA</u>	<i>sd/sd</i>
LM05	GG	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <i>co-4</i> <sup>2</sup>	GG <sup>3</sup>	<i>fop2.3</i> <sup>403H</sup> / <i>fop2.3</i> <sup>403H</sup>	<u>GA</u>	<i>Sd/sd</i>
LM06	<u>GA</u>	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <u><i>Co-4</i><sup>2</sup></u>	GG	<i>fop2.3</i> <sup>403H</sup> / <i>fop2.3</i> <sup>403H</sup>	<u>GA</u>	<i>Sd/sd</i>
LM07	GG	<i>co-4</i> <sup>2</sup> / <i>co-4</i> <sup>2</sup>	<u>CC</u>	<u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u> / <u><i>FOP2.3</i><sup>403H</sup></u>	<u>AA</u>	<i>sd/sd</i>

O alelo-alvo associado ao fenótipo de interesse está sublinhado. <sup>1</sup>Planta heterozigota em relação ao alelo-alvo; <sup>2</sup>Planta homozigota em relação ao alelo-alvo; <sup>3</sup>Planta homozigota para o alelo alternativo ao alelo-alvo.

Com o objetivo de aumentar o número de sementes, avançou-se uma geração com as 59 progênies F<sub>2:3</sub>, sendo obtidas 2964 sementes F<sub>3:4</sub> (**Tabela 3.6**). 43 progênies F<sub>2:3</sub> tem como genealogia a planta LM01 e 16 a planta LM03 (**Tabela 3.6**). Como era esperado considerando a genealogia das plantas F<sub>2</sub> selecionadas com os alelos *Co-4*<sup>2</sup> e *FOP2.3*<sup>403H</sup> (**Tabela 3.5**), as 59 progênies F<sub>2:3</sub> foram homozigotas para os alelos *Co-4*<sup>2</sup> (AA) e *FOP2.3*<sup>403H</sup> (CC). Os fenótipos das sementes das progênies F<sub>2:3</sub> podem ser observados nos **Apêndices 3.F (A) ao 3.F (G)** e na **Tabela 3.6**.

**Tabela 3.5.** Plantas F<sub>2</sub> com os alelos-alvo piramidados. Plantas codificadas com a genealogia LM01 e LM03 possuem os alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>* (AA) e *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) piramidados. Plantas com a genealogia LM04 possuem os alelos-alvo *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC) e *sd* (AA) piramidados.

	Planta F <sub>2</sub>	Sementes F <sub>2:3</sub>	Genótipo Molecular			Combinação Alélica
			P8282v3-817	ANAAJK6	PvbHLHp12804	
LM01	P1489-LM01-p1	0	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	<i>Co-4<sup>2</sup></i> + <i>FOP2.3<sup>403H</sup></i>
	P1493-LM01-p5	32	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1505-LM01-p17	1	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1540-LM01-p52	0	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1542-LM01-p54	0	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1551-LM01-p63	22	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1556-LM01-p68	0	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1557-LM01-p69	16	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
	P1581-LM01-p93	5	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
LM03	P1635-LM03-p9	30	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	<i>Co-4<sup>2</sup></i> + <i>FOP2.3<sup>403H</sup></i>
	P1678-LM03-p52	22	<u>AA</u>	<u>CC</u>	GG	
LM04	<b><u>P1719 21-LM04-p23</u></b>	50	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>sd</i>
	P1721_21-LM04-p25	19	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	<b><u>P1722 21-LM04-p26</u></b>	47	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	P1724_21-LM04-p28	21	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	P1726_21-LM04-p30	17	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	<b><u>P1727 21-LM04-p31</u></b>	35	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	<b><u>P1730 21-LM04-p34</u></b>	44	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	P1733_21-LM04-p37	26	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	P1734_21-LM04-p38	19	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	P1745_21-LM04-p49	46	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	
	<b><u>P1757 21-LM04-p61</u></b>	25	GG	<u>CC</u>	<u>AA</u>	

O alelo-alvo associado ao fenótipo de interesse está sublinhado. Plantas F<sub>2</sub> sublinhadas e em negrito foram selecionadas para o próximo ciclo de cruzamentos com base no mérito comercial dos grãos.

**Tabela 3.6.** Descrição das 59 progênies F<sub>2:3</sub> obtidas a partir das plantas F<sub>2</sub> homocigotas para os alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>* (AA) e *FOP2.3<sup>403H</sup>* (CC).

Planta F <sub>2</sub>	Nº plantas F <sub>2:3</sub>	Progênie F <sub>2:3</sub>	Nº sementes F <sub>3:4</sub>	Massa de 20 sementes	MCGA	Combinação alélica
P1493-LM01-P5		LM2906	81	5.35	4	
P1493-LM01-P5		LM2907	40	5.43	3	
P1493-LM01-P5		LM2908	32	5.63	4	
P1493-LM01-P5		LM2909	52	4.78	2	
P1493-LM01-P5	G01 (9)	LM2910	80	6.29	4	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 + FOP2.3^{403H})$
P1493-LM01-P5		LM2911	31	5.22	2	
P1493-LM01-P5		LM2912	64	4.63	4	
P1493-LM01-P5		LM2913	25	4.97	4	
P1493-LM01-P5		LM2914	75	5.53	3	
P1505-LM01-P17	G02 (1)	<b>LM2915</b>	61	7.33	3	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2916	59	6.13	5	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2917	36	5.81	2	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2918	50	6.15	4	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2919	21	6.14	4	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2920	22	5.06	3	
P1551-LM01-P63 (1)	G03 (11)	LM2921	18	-	2	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 + FOP2.3^{403H})$
P1551-LM01-P63 (1)		LM2922	22	6.16	5	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2923	35	6.15	4	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2924	23	5.74	4	
P1551-LM01-P63 (1)		<b>LM2925</b>	57	6.98	2	
P1551-LM01-P63 (1)		LM2926	40	6.55	3	
P1551-LM01-P63 (2)		LM2927	34	6.08	4	
P1551-LM01-P63 (2)		LM2928	16	-	4	
P1551-LM01-P63 (2)		<b>LM2929</b>	40	6.11	2	
P1551-LM01-P63 (2)	G04 (8)	LM2931	15	-	4	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 + FOP2.3^{403H})$
P1551-LM01-P63 (2)		LM2932	37	6.38	4	
P1551-LM01-P63 (2)		LM2933	47	6.45	4	
P1551-LM01-P63 (2)		LM2934	29	7.21	4	
P1551-LM01-P63 (2)		LM2935	18	-	4	
P1557-LM01-P69	G05 (8)	LM2936	51	4.83	2	

**Tabela 3.6. Continuação.**

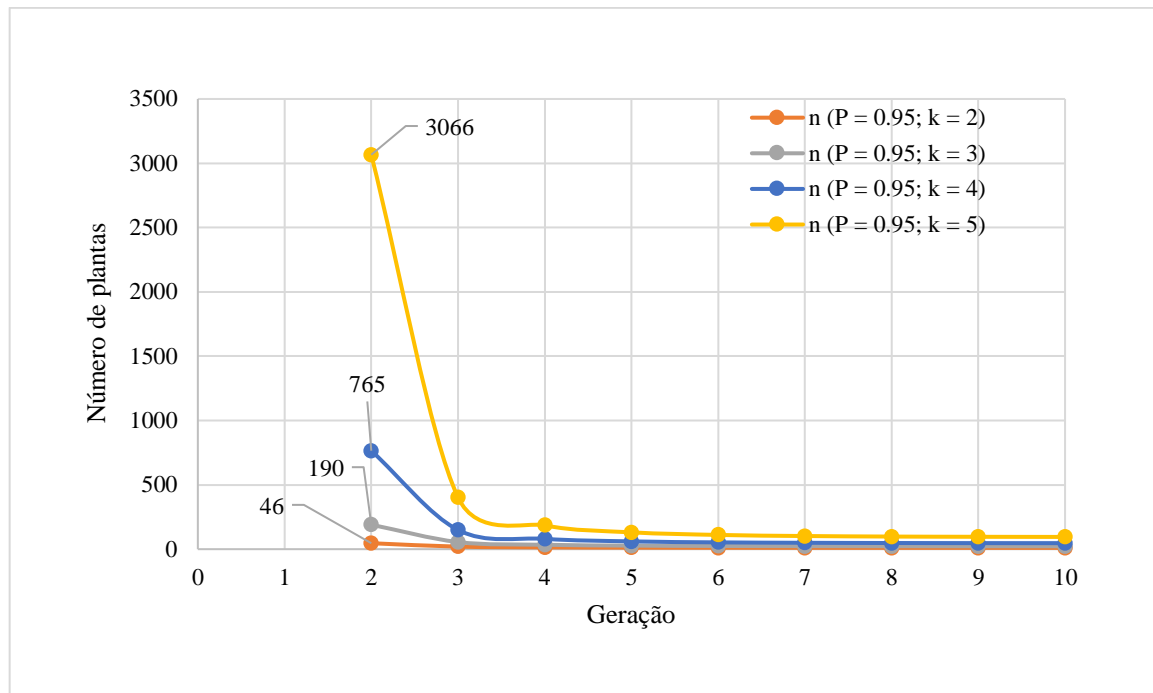
P1557-LM01-P69		LM2937	48	5.14	3	
P1557-LM01-P69		LM2938	128	5.22	4	
P1557-LM01-P69		LM2939	37	4.8	4	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 +$
P1557-LM01-P69		LM2940	22	5.48	4	
P1557-LM01-P69		<b>LM2941</b>	56	5.56	2	
P1557-LM01-P69		LM2942	50	5.2	3	
P1557-LM01-P69		LM2943	52	6.25	3	
P1581-LM01-P93		LM2944	114	5.75	2	
P1581-LM01-P93		LM2945	76	5.32	3	
P1581-LM01-P93	G06 (6)	LM2946	6	-	3	
P1581-LM01-P93		LM2947	69	4.24	4	
P1581-LM01-P93		LM2949	10	-	3	
P1581-LM01-P93		LM2950	57	4.6	4	
P1635-LM03-P9		LM2951	65	6.7	2	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 +$
P1635-LM03-P9		LM2952	51	6.33	4	
P1635-LM03-P9		LM2953	35	6.45	3	
P1635-LM03-P9		LM2954	22	6.02	2	
P1635-LM03-P9		LM2955	14	-	2	
P1635-LM03-P9	G07 (11)	LM2956	99	5.37	3	
P1635-LM03-P9		<b>LM2957</b>	90	5.84	2	
P1635-LM03-P9		LM2958	26	6.67	3	
P1635-LM03-P9		LM2959	158	5.99	3	
P1635-LM03-P9		LM2960	35	6.24	2	
P1635-LM03-P9		<b>LM2961</b>	84	6.65	2	
P1678-LM03-P52		<b>LM2962</b>	128	5.92	2	$\frac{AA+CC}{FOP2.3^{403H}} (Co-4^2 +$
P1678-LM03-P52		<b>LM2963</b>	71	6.58	3	
P1678-LM03-P52	G08 (5)	<b>LM2964</b>	36	7.43	3	
P1678-LM03-P52		LM2965	27	7.22	2	
P1678-LM03-P52		LM2966	87	5.74	3	

G0<sub>n</sub>– Grupos de progênies F<sub>2:3</sub> oriundas de cada planta F<sub>2</sub> selecionada com alelos-alvo *Co-4*<sup>2</sup> (**AA**) e *FOP403* (**CC**) em homozigose; CGA – Mérito comercial dos grãos após armazenamento por um período de 147 dias em câmara fria. Progênies F<sub>2:3</sub> sublinhadas e em negrito foram selecionadas para o próximo ciclo de cruzamentos com base no mérito comercial dos grãos.

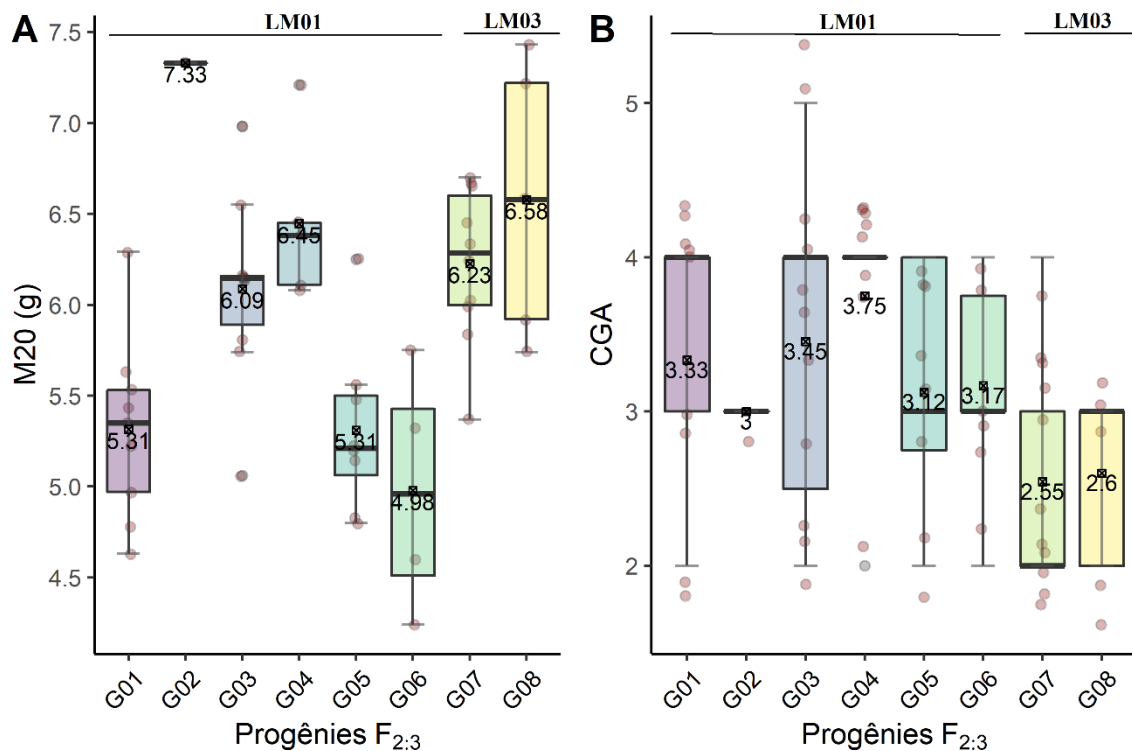
## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 Seleção precoce dos alelos-alvo

O sucesso na identificação do genótipo desejado, combinando os alelos-alvo, depende da probabilidade de ocorrência simultânea ( $P = 0,95$ ), da frequência esperada de dada combinação e do número de alelos-alvo ( $k$ ) (Ramalho et al., 2012). Neste estudo, cujo objetivo central foi selecionar precocemente plantas que combinassem os alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>*, *CoPv04<sup>R</sup>*, *Phg-2* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose, o número mínimo de plantas estimado da geração  $F_2$  foi de 765 plantas (**Figura 3.3**). A simulação de quatro cenários (**Figura 3.3**) mostra que o número mínimo de plantas necessárias para se obter pelo menos uma combinando os alelos-alvo em homozigose reduz consideravelmente com o avanço das gerações, visto que a taxa de homozigose aumenta em 50% em relação à geração  $F_2$  (Ramalho et al., 2012). Nesse estudo, a geração  $F_2$  foi composta de 387 plantas, número inferior ao estimado para a identificação de pelo menos uma planta combinando os quatro alelos de resistência, além do escurecimento lento. No entanto, as 387 plantas  $F_2$  foram oriundas de plantas que possuíam apenas dois alelos-alvo piramidados (**Tabela 3.4**), neste caso, o número de plantas avaliadas foi oito vezes maior do que o estimado quando se tem um cenário com  $k = 2$  (**Figura 3.4**). Isso ocorreu porque as onze plantas selecionadas com os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose (**Tabela 3.5**) vieram das plantas LM01 e LM03, ambas combinando esses dois alelos (**Tabela 3.4**). Da mesma forma, as plantas combinando os alelos *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd* (**Tabela 3.5**) foram obtidas da planta LM04, que possuía essa combinação em seu genoma (**Tabela 3.4**). Portanto, para os próximos ciclos de cruzamentos, quando houver a probabilidade de selecionar plantas combinando todos os alelos-alvo e número suficiente de sementes, recomenda-se a adoção do número mínimo de plantas estimado conforme descrito por Ramalho et al. (2012).



**Figura 3.3.** Simulação do número mínimo de plantas na geração  $t$  para identificar pelo menos um genótipo desejado.  $P$  é a probabilidade de ocorrência de determinada combinação e  $k$  é o número de alelos-alvo.



**Figura 3.4.** **A** – Variação dentro e entre grupos de progênies  $F_{2:3}$  quanto a massa de 20 sementes (M20). **B** – Variação dentro e entre grupo de progênies  $F_{2:3}$  em relação a nota da cor dos grãos após armazenamento (CGA).

## 9.2 Cor dos grãos após armazenamento – CGA

Existe variabilidade genética quanto cor do grão após o armazenamento por um período de 147 dias (**Figura 3.4B**). Observou-se que 28,8% das progênies  $F_{2:3}$ , combinando os alelos  $Co-4^2$  (AA) +  $FOP2.3^{403H}$  (CC), apresentaram nota de CGA igual a 2 (**Tabela 3.6**). As progênies dos grupos G07 e G08 apresentaram as menores médias para CGA (**Figura 3.4B**). Como comparativo, as cultivares BRS Sublime e BRS Estilo, com padrão de grão carioca que atende o mercado consumidor, possuem notas iguais a 3,0 e 3,1, respectivamente (Alvares et al., 2019). Das 59 progênies  $F_{2:3}$  combinando os alelos  $Co-4^2$  (AA) +  $FOP2.3^{403H}$  (CC), nove foram selecionadas considerando o mérito comercial dos grãos: LM 2915, LM 2925, LM 2929, LM 2941, LM 2957, LM 2961, LM 2962, LM 2963 e LM 2964 (**Tabela 3.6**). Entre as progênies selecionadas, 55,5% pertencem aos grupos G07 e G08, os quais apresentaram as menores médias de CGA (**Figura 3.4B**). Os grãos das onze plantas  $F_2$  selecionadas com os alelos  $FOP2.3^{403H}$  (CC) e  $sd$  (AA) em homozigose apresentaram nota de CGA semelhante ao da cultivar BRSMG Madrepérola, padrão comercial para escurecimento lento dos grãos (Carneiro et al., 2012). Com o objetivo de manter apenas aquelas com mérito comercial dos grãos, cinco das onze plantas  $F_2$  foram selecionadas para o próximo ciclo de cruzamentos (**Tabela 3.5; Figura 3.1**).

## 9.3 Valor dos alelos-alvo no melhoramento

O  $Co-4^2$  é um alelo do loco  $Co-4$  e foi mapeado próximo a região telomérica do cromossomo 8 a partir da fonte de resistência do *pool* gênico Mesoamericano SEL1308 (Oblessuc et al., 2015). Esse alelo confere resistência às raças 65, 73, 81, 91, 113, 475 e 1609 do fungo *C. lindemuthianum*, sendo as três primeiras as mais frequentes nas principais regiões produtoras de feijão-comum do Brasil (Paulino et al., 2022). Entre os genitores selecionados para este estudo, o alelo  $Co-4^2$  está presente apenas no genitor K10 (AA) e foi monitorado via SAM usando o marcador SNP P8282v3-817 (**Tabela 3.3**). O SNP P8282v3-817 possui eficiência de seleção de 99,8% (Gomes-Messias et al., 2022a). Nesse estudo, o marcador P8282v3-817 segregou conforme o esperado para marcadores codominantes, sendo os desvios entre as frequências observadas e esperadas devido ao acaso (**Tabela 3.7**). A eficiência de seleção deverá ser confirmada por meio da avaliação da reação às raças mais comuns nos campos de produção brasileiros, 65, 73 e 81 (Paulino et al., 2022). O alelo-alvo  $CoPv04^R$  confere resistência às raças 65, 73, 81, 91, 475 e 1609, sendo mapeado no cromossomo 4 a partir da fonte de resistência do *pool* gênico Andino BRSMG Realce

(Gomes-Messias et al., 2022b). No próximo ciclo de cruzamentos e avanço de geração, a presença do alelo *CoPv04<sup>R</sup>* poderá ser monitorada com os marcadores snp3308 (C/T), snp1327 (T/C) e snp12782 (C/T) (**Tabela 3.2**). A combinação de alelos oriundos de fontes de resistência à antracnose de *pool* gênicos distintos é uma importante estratégia para o desenvolvimento de cultivares com resistência ampla e duradoura (Paulino et al., 2022).

**Tabela 3.7.** Segregação genotípica dos marcadores P8282v3-817 (G/A – Co-4<sup>2</sup>), ANAAJK6 (G/C - FOP2.3<sup>403H</sup>) e PvbHLHp12804 (G/A - sd) na geração F<sub>2</sub>.

SNP	Genótipo	Hipótese	Observado	Esperado	$\chi^2$	p-valor
P8282v3-817	<u>GG</u> <sup>1</sup>		49	55		
	<u>GA</u> <sup>2</sup>	1:2:1	122	111	2,4	0,30
	<u>AA</u> <sup>3</sup>		50	55		
	Total	-	221	221		-
ANAAJK6	<u>GG</u>		40	48		
	<u>GC</u>	1:2:1	95	97	3,4	0,18
	<u>CC</u>		58	48		
	Total	-	193	193		-
PvbHLHp12804	<u>GG</u>		38	34		
	<u>GA</u>	1:2:1	72	69	2,1	0,35
	<u>AA</u>		27	34		
	Total	-	137	137		-

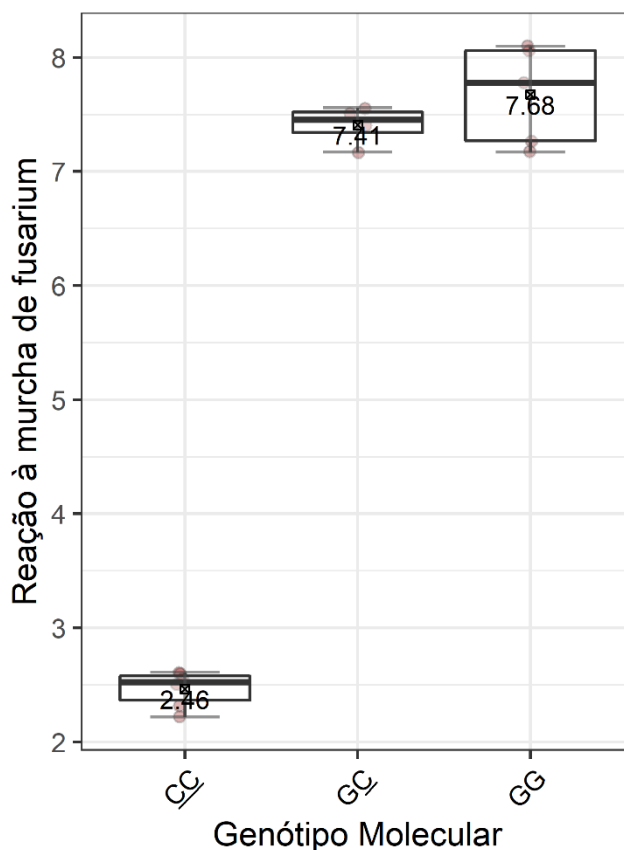
O alelo-alvo associado ao fenótipo de interesse está sublinhado. <sup>1</sup>Planta homocigota para o alelo alternativo ao alelo-alvo; <sup>2</sup>Planta heterocigota em relação ao alelo-alvo; <sup>3</sup>Planta homocigota em relação ao alelo-alvo.

O alelo *Phg-2* confere resistência às raças 63-39, 63-19 e 63-63 do fungo *P. griseola*, sendo as duas últimas mais relevantes no Brasil (Bassi et al., 2017; Pereira et al., 2019). Esse alelo foi mapeado no cromossomo 8 a partir da fonte de resistência México 54 (Souza et al., 2016; Nay et al., 2019). Os marcadores g796 (209/233), SE04 (640/-) e ANYMVJW (G/T), embora estejam em desequilíbrio de ligação com o alelo *Phg-2* (Sanglard, 2010; Miller et al., 2018; Lobaton et al., 2018), não foram úteis para monitorar a introgressão do alelo *Phg-2* nesse estudo. O marcador codominante g796 amplificou o tamanho de banda associada à suscetibilidade nos genitores DM103 e BRS ELO FC423 (**Figura 3.2A**). Embora esteja a uma distância de 3,0 cM do loco *Phg-2*, a não especificidade do marcador g796 pode ser devido a fonte de resistência usada nesse estudo, visto que o mesmo foi desenvolvido utilizando o genitor México 54 (Miller et al., 2018). O marcador dominante SE04 (presença e ausência), além de amplificar o tamanho de banda associada à resistência nos genótipos MAR-2, DM103 e México 54 (**Figura 3.2B**), também amplificou na linhagem BRS ELO FC423, que não possui em sua genealogia nenhum parental doador do alelo *Phg-2*. O SE04

foi usado pelo obtentor da linhagem DM103 para monitorar o alelo *Phg-2* oriundo do parental doador MAR-2 (Sanglard, 2010). O SNP ANYMVHW (G/T) foi mapeado no cromossomo 8 a partir da fonte de resistência México 54 (Lobaton et al., 2018). Esse marcador foi utilizado por Gomes-Messias et al. (2022a), o qual foi específico para o alelo *Phg-2* nas linhagens México 54, PT-65 e MAIII-16.159, todas resistentes à mancha-angular (Nay et al., 2019; Pereira et al., 2019; Pádua, 2022). No entanto, o ANYMVHW amplificou o alelo T associado à suscetibilidade nos genitores DM103 e BRS ELO FC423 (**Tabela 3.3**). Segundo Nay et al. (2019), o alelo de resistência à mancha-angular presente na linhagem MAR-2, utilizada como parental doador no desenvolvimento da linhagem DM103 (Sanglard et al., 2007; Sanglard, 2010), pode ser uma variação alélica na mesma região do *Phg-2*. Diante disso e visando a continuidade do programa de piramidação alélica, recomenda-se que a linhagem MAIII-16.159, *background* carioca, seja utilizada como fonte do alelo *Phg-2* em cruzamentos futuros. Essa linhagem foi obtida pelo programa de seleção recorrente da Universidade Federal de Lavras, sendo resistente à raça 63-63 de *P. griseola* e indicada para participar do novo grupo de cultivares diferenciadoras proposto para mancha-angular (Pádua, 2022). Outro fato importante que pode ser aproveitado é a presença do alelo *Co-3<sup>4</sup>* no genitor K10 (Vieira et al., 2018). Esse alelo co-segrega com o alelo *Phg-3* de resistência à mancha-angular (Gonçalves-Vidigal et al., 2013) e está fortemente ligado ao marcador g2303 (0,0 cM), permitindo a seleção da combinação alélica *Co-3<sup>4</sup>/Phg-3* (Gonçalves-Vidigal et al., 2013). Portanto, recomenda-se que o marcador g2303, quando validado, seja utilizado para genotipar as progênes selecionadas nesse estudo para aferir a presença da combinação *Co-3<sup>4</sup>/Phg-3*.

Torres (2020) identificou dois SNP significativamente associados ao fenótipo de resistência à murcha de *fusarium* com avaliação a campo, os quais foram convertidos em ensaios TaqMan™ ANAAJK6 (G/C) e ANCFFDU (T/A). O ensaio ANAAJK6 amplificou o alelo C no genitor BRS FC415 (**Tabela 3.3**) e, portanto, sendo útil para monitorar a introgressão do alelo *FOP2.3<sup>403H</sup>*. Em análise realizada com quinze progênes oriundas do cruzamento BRS FP403 (*FOP2.3<sup>403H</sup>*) x BRS Horizonte, revelou que aquelas homozigotas para o alelo de referência, CC, apresentaram o fenótipo resistente, com nota média menor que 3,0 (**Figura 3.5**). A média de severidade à murcha de *fusarium* apresentada pelas progênes heterozigotas (GC) ou homozigotas para o alelo alternativo (GG) foi três vezes maior do que a observada nas progênes contendo o alelo de referência em homozigose, CC (**Figura 3.5**). Adicionalmente, o ensaio ANCFFDU foi 100% coincidente ao amplificar o

alelo T nas mesmas progênes resistentes que apresentaram o alelo C do SNP ANAAJK6 (Comunicação pessoal, Dr. Helton Santos Pereira<sup>1</sup>). Portanto, recomenda-se a adoção do SNP ANCFFDU nos próximos ciclos de cruzamentos. Nesse estudo, o SNP ANAAJK6 segregou conforme esperado para marcadores codominantes, 1:2:1 (Tabela 3.7), havendo a necessidade da avaliação das progênes F<sub>2:3</sub> selecionadas com o alelo CC – FOP2.3<sup>403H</sup> (Tabela 3.6) quanto à reação à murcha de *fusarium*.

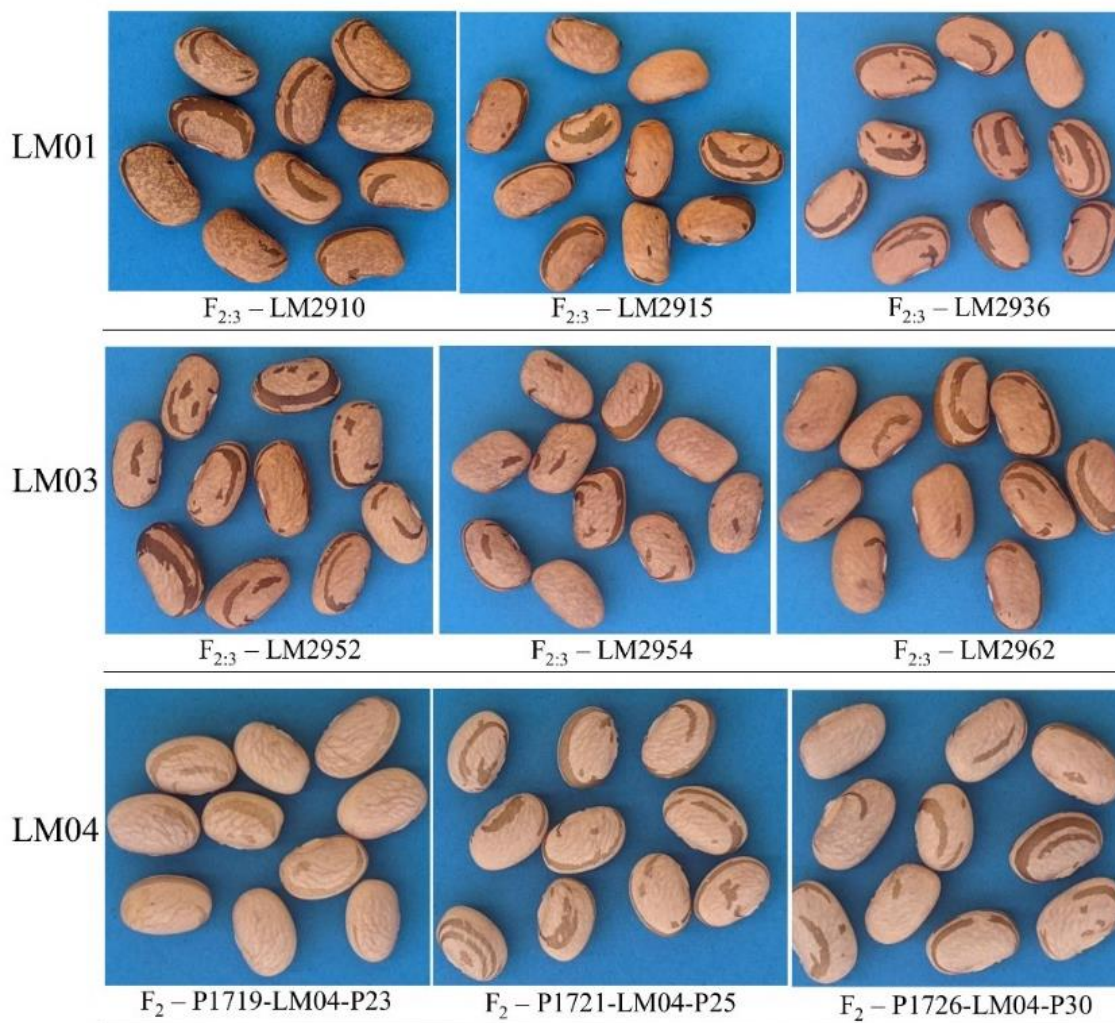


**Figura 3.5.** Diferença fenotípica da reação à murcha de *fusarium* entre progênes contendo os genótipos moleculares CC, GC e GG. Genotipagem realizada com o SNP ANAAJK6 (Torres, 2020). O alelo referência está sublinhado.

O escurecimento lento é controlado pela ação de dois genes, *J* e *Sd*, com interação do tipo epistasia recessiva (Elsadr et al., 2011). A presença do alelo dominante *J* é responsável pela ocorrência ou não do escurecimento, sendo que a presença da condição recessiva (*sdsd*) do gene *Sd* inibe a ação do gene *J* e resulta no escurecimento lento dos grãos (Elsadr et al., 2011). O loco *Sd* foi mapeado no cromossomo 7 e a introgressão do alelo *sd* pode ser monitorada com o marcador SNP PvbHLHp12804 (A/G), com eficiência de seleção

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão – Melhoramento de Feijão.

superior a 90% (Rodrigues et al., 2019a; Alvares et al., 2019). As onze plantas  $F_2$  selecionadas neste estudo combinando os alelos CC ( $FOP2.3^{403H}/FOP2.3^{403H}$ ) e AA ( $sd/sd$ ) apresentaram fenótipo de escurecimento lento dos grãos (**Figura 3.6; Apêndice 3.E**), com nota média igual a 1,0 aos 147 dias após a colheita. Os desvios entre as frequências observadas e esperadas do genótipo molecular do marcador PvbHLHp12804 foram devido ao acaso e, portanto, houve aderência à segregação mendeliana 1:2:1 (**Tabela 3.7**).



**Figura 3.6.** Comparação entre os fenótipos das sementes das progênes  $F_{2:3}$  e das plantas  $F_2$  selecionadas. LM01 e LM03 - Progênes com a combinação  $Co-4^2$  e  $FOP2.3^{403H}$ . LM04 - progênes selecionadas com os alelos  $FOP2.3^{403H}$  e  $sd$ .

As doenças causam prejuízos à produção e à qualidade dos grãos em todo o mundo, comprometendo a segurança alimentar das pessoas em vulnerabilidade social (Dormatey et al., 2020; Nadeem et al., 2021). Portanto, o acúmulo de alelos de resistência em um mesmo genótipo é uma importante estratégia para garantir maior estabilidade à produção de cada região e, conseqüentemente, assegurar o alimento para milhões de pessoas (Dormatey et al.,

2020; Nadeem et al., 2021). Os avanços das tecnologias de genotipagem, o mapeamento de genes e a validação de marcadores ligados aos genes de interesse facilitaram a piramidação simultânea de dois ou mais alelos de resistência (Meziadi et al., 2016). Além da produtividade, para todos os tipos de grãos de feijão, a qualidade tecnológica, comercial e menores alterações pós-colheita são de grande relevância para a aceitação do produto no mercado (Siqueira et al., 2014; Dias et al., 2015). Dentre esses, características relacionadas à qualidade comercial dos grãos, como o escurecimento lento dos grãos armazenados, continuam mantendo sua relevância ao longo dos últimos anos frente exigência dos consumidores brasileiros (Silva et al., 2018; Duwadi et al., 2018). No Brasil, o feijão carioca com cores mais claras é o preferido pelos consumidores (Siqueira et al., 2014) e responde 70% do mercado consumidor. O escurecimento do tegumento limita o armazenamento dos grãos por longos períodos visando a comercialização em épocas de melhores preços, tornando-o um dos mais importantes atributos na comercialização de feijão tipo carioca.

Nesse estudo, utilizando-se de marcadores ligados aos alelos-alvo (**Tabela 3.2**), foi possível selecionar precocemente plantas  $F_2$  e  $F_{2:3}$  combinando os alelos-alvo  $Co-4^2 + FOP2.3^{403H}$  e  $FOP2.3^{403H} + sd$  (**Tabelas 3.5 e 3.6**). Devido ao mérito comercial dos grãos após o armazenamento, as progênies  $F_{2:3}$  LM2915, LM2925, LM2929, LM2941, LM2957, LM2961, LM2962, LM2963 e LM2964 e as plantas  $F_2$  P1719\_21-LM04-p23, P1722\_21-LM04-p26, P1727\_21-LM04-p31, P1730\_21-LM04-p34 e P1757\_21-LM04-p61 foram selecionadas e devem ser utilizadas no próximo ciclo cruzamentos. As progênies  $F_{2:3}$  dos grupos G2, G3, G4, G7 e G8 são indicadas para obtenção de linhagens com grãos mais pesados (**Figura 3.4A; Tabela 3.6**). Além disso, recomenda-se que a linhagem MAII-16.159 seja incluída como fonte de resistência à mancha-angular nos blocos de cruzamentos futuros (Pádua, 2022). Atualmente, a cultivar BRS FC402 combina resistência à antracnose e à murcha de *fusarium* (Melo et al., 2017) e a cultivar BRS FC406 mostrou-se resistente à antracnose e à mancha-angular (Pereira et al., 2021a). Portanto, faz-se necessária a continuidade do programa de piramidação alélica iniciado neste trabalho para o desenvolvimento de cultivares de feijão carioca combinando, simultaneamente, resistência efetiva contra à antracnose, à mancha-angular e à murcha de *fusarium*, além de apresentar o fenótipo do escurecimento lento dos grãos.

Como perspectiva, espera-se que as progênies selecionadas neste estudo sejam fenotipadas quanto a reação à antracnose, mancha-angular, murcha de *fusarium* e o escurecimento lento para estimar a eficiência da seleção precoce dos alelos-alvo via SAM.

## 10 CONCLUSÕES

As progênies LM2915, LM2925, LM2929, LM2941, LM2957, LM2961, LM2962, LM2963 e LM2964 possuem a combinação dos alelos-alvo *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose e grão carioca com atributos que atendem aos padrões comerciais.

A eficiência da seleção de progênies nas fases iniciais do programa de piramidação alélica usando os marcadores P8282v3-817 (*Co-4<sup>2</sup>*) e ANAAJK6 (*FOP2.3<sup>403H</sup>*) deverá ser estimada após a fenotipagem quanto a reação à antracnose e murcha de *fusarium*, respectivamente.

As plantas F<sub>2</sub> P1719\_21-LM04-p23, P1722\_21-LM04-p26, P1727\_21-LM04-p31, P1730\_21-LM04-p34 e P1757\_21-LM04-p61 possuem a combinação alélica *FOP2.3<sup>403H</sup>* e *sd* em homozigose.

O marcador PvbHLHp12804 (*sd*) é eficiente na seleção precoce de plantas com escurecimento lento dos grãos. As onze plantas F<sub>2</sub> selecionadas com o marcador PvbHLHp12804 contendo o alelo *sd* em homozigose (*sdsd*) apresentaram o fenótipo de escurecimento lento dos grãos.

## 11 REFERÊNCIAS

ALVARES, R. C.; STONEHOUSE, R.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, P. G. S.; MIKLAS, P. N.; BETT, K. E.; MELO, L. C.; RODRIGUES, L. A.; SOUZA, L. L.; PEREIRA, H. S. Generation and validation of genetic markers for the selection of carioca dry bean genotypes with the slow-darkening seed coat trait. **Euphytica**, v. 215:141, 2019. Doi: 10.1007/s10681-019-2461-y.

ALVES-SANTOS, F. M.; CORDEIRO-RODRIGUES, L.; SAYAGUÉS, J. M.; MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M. C.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; ESLAVA, A. P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, v. 51, p. 605-611, 2002.

ALZATE-MARIN, A. L. BAÍA, G. S.; de PAULA JÚNIOR, T. J.; de CARVALHO, G. A.; de BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB136. **Plant Disease**, v. 81, p. 996-998, 1997.

APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan™ SNP Genotyping Assays**. USER GUIDE. Disponível em: <  
[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TaqMan\\_SNP\\_Genotyping\\_Assays\\_manual.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_manual.pdf)>. Acessado em: 18 set. 2022.

ASSEFA, T.; MAHAMA, A.; BROWN, A. V.; CANNON, E. K. S.; RUBYOGO, J. C.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; CANNON, S. B. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39:20, 2019. Doi: 10.1007/s11032-018-0920-0.

BASSI, D.; BRÍÑEZ, B.; ROSA, J. S.; OBLESSUC, P. R.; ALMEIDA, C. P.; NUCCI, S. M.; SILVA, L. C. D.; CHIORATO, A. F.; VIANELLO, R. P.; CAMARGO, L. E. A.; BLAIR, M. W.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 109-122, 2017. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0314.

BATISTA, R. O.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, J. L. O.; NICOLI, A.; CARNEIRO, P. C. S.; CARNEIRO, J. E. S.; JÚNIOR, T. J. P.; QUEIROZ, M. V. Resistance to *Fusarium* wilt in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 226-233, 2016. Doi: 10.1590/1984-70332016v16n3a34

BATISTA, R. O.; SILVA, L. C.; MOURA, L. M.; SOUZA, M. H.; CARNEIRO, P. C. S.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; CARNEIRO, J. E. S. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in common bean. **Euphytica**, v. 213:133, 2017. Doi: 10.1007/s10681-017-1925-1.

BEBBER, D. P.; HOLMES, T.; GURR, S. J. The global spread of crop pests and pathogens. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, p. 1398-1407, 2014. Doi: 10.1111/geb.12214.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998. Doi: 10.1007/s001220050961.

BROWN, J. K. M.; HOVMØLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, v. 297, p. 537-541, 2002.

CARNEIRO, J. E. S.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PELOSO, M. J. Del; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARTINS, M.; VIEIRA, R. F.; MARTINS, F. A. D.; COELHO, M. A. O.; CARNEIRO, P. C. S.; MOREIRA, J. A. A.; SANTOS, J. B.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; TEIXEIRA, H. BRSMG Madrepérola: common bean cultivar with late-darkening carioca grain. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 12, p. 281-284, 2012. Doi: 10.1590/S1984-70332012000400008.

COIMBRA-GONÇALVES, M. C. GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; COELHO, R. R.; VALENTINI, G.; FILHO VIDIGAL, P. S.; LACANALLO, G. F.; SOUSA, L. L.; ELIAS, H. T. Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance Gene in Mesoamerican Common Bean Cultivar Crioulo 159. **Crop Science**, v. 56, p. 2904-2915, 2016.

CROSS, H.; BRICK, M. A.; SCHWARTZ, H. F.; PANELLA, L. W.; BYRNE, P. F. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in two common bean races. **Crop Science**, v. 40, p. 954-958, 2000. Doi: 10.2135/cropsci2000.404954x.

CRUZ, A. F.; SILVA, L. F.; SOUSA, T. V.; NICOLI, A.; JUNIOR, T. J. P.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. Molecular diversity in *Fusarium oxysporum* isolates from common bean fields in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, p. 343-354, 2018. Doi: 10.1007/s10658-018-1479-7.

DIAS, D. M.; MOREIRA, M. E. C.; GOMES, M. J. C.; TOLEDO, R. C. L.; NUTTI, M. R.; SANT'ANA, H. M. P.; MARTINO, H. S. D. Rice and Bean targets for biofortification combined with high carotenoid content crops regulate transcriptional mechanisms increasing iron bioavailability. **nutrients**, v. 7, p. 9683-9696, 2015. Doi: 10.3390/nu7115488.

DORMATEY, R.; SUN, C.; ALI, K.; COULTER, J. A.; BI, Z.; BAI, J. Gene pyramiding for sustainable crop improvement against biotic and abiotic stresses. **agronomy**, n. 10:1255, 2020. Doi: 10.3390/agronomy10091255.

DUWADI, K.; AUSTIN, R. S.; MAINALI, H. R.; BETT, K.; MARSOLAIS, F.; DHAUBHADEL, S. Slow darkening of pinto bean seed coat is associated with significant metabolite and transcript differences related to proanthocyanidin biosynthesis. **BMC Genomics**, v. 19:260, 2018. Doi: 10.1186/s12864-018-4550-z.

ELSADR, H. T.; WRIGHT, L. C.; PAULS, K. P.; BETT, K. E. Characterization of seed coat post-harvest darkening in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 1467-1472, 2011. Doi: 10.1007/s00122-011-168.

FALL, A. L.; BYRNE, P. F.; JUNG, G.; COYNE, D. P.; BRICK, M. A.; SCHWARTZ, H. F. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. **Crop Science**, v. 41, p. 1494-1498, 2001. Doi: 10.2135/cropsci2001.4151494x.

FERREIRA, C. M.; FIGUEIREDO, R. S.; LUZ, T. C. L. A. Arroz e Feijão: Intervenção multi-institucional em prol do Brasil. **Revista Política Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 96-112. 2018.

GENE LIST – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 65, p. xiv–xlvi, 2022.

GILIO, T. A. S.; HURTADO-GONZALES, O. P.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VALENTINI, G.; FERREIRA, ELIAS J. C.; SONG, Q.; PASTOR-CORRALES, M. A. Fine mapping of an anthracnose-resistance locus in Andean common bean cultivar Amendoim Cavallo. **PLoS ONE**, v.15, n.10: e0239763, 2020. Doi: 10.1371/journal.pone.0239763.

GOMES, L. M.; PEREIRA, H. S.; COSTA, J. G. C.; AGUIAR, M. S.; MELO, L. C.; SOUZA, T. L. P. O. Seleção de progênies de feijão carioca contendo o alelo *Co-Realce* de resistência à antracnose. In: XIII Seminário Jovens Talentos, 13. **Resumos**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão: ISBN 978-65-86056-69-3, 2019, p. 66.

GOMES-MESSIAS, L. M.; VIANELLO, R. P.; MARINHO, G. R.; RODRIGUES, L. A.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; SOUZA, T. L. P. O. Genetic mapping of the Andean anthracnose resistance gene present in the common bean cultivar BRSMG Realce. **Frontiers in Plant Science**, v. 13:1033687, 2022b. Doi: 10.3389/fpls.2022.1033687.

GOMES-MESSIAS, L. M.; VIANELLO, R. P.; MONTEIRO-JÚNIOR, J. P.; RODRIGUES, L. A.; MOTA, A. P. S.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; RAATZ, B.; SOUZA, T. L. P. O. Molecular characterization of parental lines and validation of SNP markers for anthracnose and angular spot in common bean. **Euphytica**, v. 218:49, 2022a. Doi: 10.1007/s10681-022-03002-2.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. GILIO, T. A. S.; VALENTINI, G.; VAZ-BISNETA, M.; VIDIGAL FILHO, P. S.; SONG, Q.; OBLESSUC, P. R.; MELOTTO, M. New Andean source of resistance to anthracnose and angular leaf spot: Fine-mapping of disease-resistance genes in California Dark Red Kidney common bean cultivar. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6: e0235215, 2020.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. SILVA, C. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, V. Genetic control on the performance of common bean differential cultivars to *Colletotrichum lindemuthianum* races. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 579–586, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; CRUZ, A. S.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL FILHO, P. S.; SOUSA, L. L.; PACHECO, C. M. N. A.; MCCLEAN, P. GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M. A. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose *Co-10* and angular leaf spot *Phg-ON* disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 2245-2255, 2013. Doi: 10.1007/s00122-013-2131-8.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, p. 411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL FILHO, P. S. A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Jalo Vermelho. **Plant Breeding**, v. 127, p. 592-596, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; MEIRELLES, A.; POLETINE, J.; SOUSA, L. L.; CRUZ, A. S.; NUNES, M. P.; LACANALLO, G. F.; VIDIGAL FILHO, P. S. Genetic analysis of anthracnose resistance in Pitanga dry bean cultivar. **Plant Breeding**, 131:423-429, 2012.

HENRIQUE, F. H.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; SASSERON, G. R.; CHIORATO, A. F. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2014. Doi: 10.1590/1678-4499.0265.

KELLY, J. D.; MIKLAS, P. N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, n. 4, p. 1-11, 1998. Doi: 10.1023/A:1009612002144.

KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004. Doi: 10.21273/HORTSCI.39.6.1196.

KELLY, J. D.; YOUNG, R. A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 20-24, 1996.

KOTUE, T. C.; MARLYNE JOSEPHINE, M.; WIRBA, L. Y.; AMALENE, S. R. H.; NKENMENI, D. C.; KWUIMGOIN, I.; DJOTE, W. N. B.; KANSKI, G.; FOKOU, E.; FOKAM, D. P. Nutritional properties and nutrients chemical analysis of common beans seed. **MOJ Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 41-47. 2018. Doi: 10.15406/mojbm.2018.03.00074.

LACANALLO, G. F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Mapping of an andean gene for anthracnose resistance (*Co-1<sup>3</sup>*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo Listras Pretas landrace. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, p. 394-400, 2015.

LIMA-CASTRO, S. A.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; GILIO, T. A. A.; LACANALLO, G. F.; VALENTINI, G.; MARTINS, V. S. R.; SONG, Q.; GALVÁN, M. Z.; HURTADO-GONZALES, O. P.; PASTOR-CORRALES, M. A. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, v. 18:306, 2017. DOI 10.1186/s12864-017-3685-7.

LOBATON, J. D.; MILLER, T.; GIL, J.; ARIZA, D.; DE LA HOZ, J. F.; SOLER, A.; BEEBE, S.; DUITAMA, J.; GEPTS, P.; RAATZ, B. Resequencing of common bean identifies regions of inter-gene pool introgression and provides comprehensive resources for molecular breeding. **Plant Genome**, v. 11:170068, n. 2, 2018. Doi: 10.3835/plantgenome2017.08.0068.

LONG, J.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; WU, J.; CHEN, H.; WANG, P.; WANG, Q.; DU, C. Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm resources in chongqing, evidenced by morphological characterization. **Frontiers in Genetics**, v. 11:697. 2020. Doi: 10.3389/fgene.2020.00697.

MAINA, P. K.; WACHIRA, P. M.; OKOTH, S. A.; KIMENJU, J. W.; (2017) Cultural, morphological and pathogenic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* causing wilt in French Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Advances in Microbiology** 2 (4): 1-9. Doi: 10.9734/JAMB/2017/32684.

MARCON, J. R. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; PAULINO, J. F. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; COÊLHO, M. Genetic resistance of common bean cultivar Beija Flor to *Colletotrichum lindemuthianum*. **Acta Scientiarum**, v. 43: e44910, 2021. Doi: 10.4025/actasciagron.v43i1.44910.

MASTENBROEK, C. A breeding program for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177-184, 1960.

MELO, C. M.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; WENDLAND, A.; DÍAZ, J. L. C.; CARVALHO, H. W. L.; MELO, C. L. P.; COSTA, A. F.; MAGALDI, M. C. S.; COSTA, J. G. C. BRS FC402: high-yielding common bean cultivar with carioca grain,

resistance to anthracnose and fusarium wilt. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 17, p. 67-71, 2017. Doi: 10.1590/1984-70332017v17n1c11.

MEZIADI, CH.; RICHARD, M. M. S.; DERQUENNES, A.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; GRATIAS, A.; PFLIEGER, S.; GEFFROY, V. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, v. 242, p. 351-357, 2016. Doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.006.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to mas breeding. **Euphytica**, v. 147, p. 105-131, 2006. Doi: 10.1007/s10681-006-4600-5.

MILLER, T.; GEPTS, P.; KIMMO, S.; ARUNGA, E.; CHILAGANE, L. A.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; NAMUSOKE, A.; NAMAYANJA, A.; TEDLA, Y. R. Alternative markers linked to the *Phg-2* angular leaf spot resistance locus in common bean using the Phaseolus genes marker database. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 26, p. 818-828, 2018. Doi: 10.5897/AJB2018.16493.

MORAIS, S. R. P.; VIERA, A. F.; ALMEIDA, L. C. S.; RODRIGUES, L. A.; MELO, P. G. S.; FARIA, L. C.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; SOUZA, T. L. P. O. Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 234-239, 2016. Doi: 10.1590/1984-70332016v16n3n35.

MUKANKUSI, C.; RAATZ, B.; NKALUBO, S.; BERHANU, F.; BINAGWA, P.; KILANGO, M.; WILLIAMS, M.; ENID, K.; CHIRWA, R.; BEEBE, S. Genomics, genetics and breeding of common bean in Africa: A review of tropical legume project. **Plant Breeding**, n. 138, p. 401-414. 2019. Doi: 10.1111/pbr.12573.

NADEEM, M. A.; YEKEN, M. Z.; SHAHID, M. Q.; HABYARIMANA, E.; YILMAZ, H.; ALSALEH, A.; HATIPOĞLU, R.; ÇILESİZ, Y.; KHAWAR, K. M.; LUDIDI, N.; ERCİŞLİ, S.; AASIM, M.; KARAKÖY, T.; BALOCH, F. S. Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 758-786, 2021. Doi: 10.1080/13102818.2021.1920462.

NAY, M. M.; SOUZA, T. L. P. O.; RAATZ, B.; MUKANKUSI, C. M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; ABREU, A. F. B.; MELO, L. C.; PASTOR-CORRALES, M. A. A review of angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 59, p. 1376-1391, 2019. Doi: 10.2135/cropsci2018.09.0596.

NIETSCHÉ, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 331-335, 2002.

OBLESSUC, P. R.; FRANCISCO, C.; MELOTTO, M. The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 *COK-4* genes and is regulated by immune response in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 1193-1208, 2015. Doi: 10.1007/s00122-015-2500-6.

PADDER, B. A.; SHARMA, P. N.; AWALE, H. E.; KELLY, J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99 n. 2, p. 317-330, 2017. Doi: 10.4454/jpp.v99i2.3867.

PÁDUA, P. F. **Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para resistência à *Pseudocercospora griseola* na linhagem MAIII-16.159**. 2022. 60 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2022.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 103, p. 161-171, 1998.

PAULINO, J. F. C.; ALMEIDA, C. P.; BUENO, C. J.; SONG, Q.; FRITSCHÉ-NETO, R.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Genome-wide association study reveals genomic regions associated with *fusarium* wilt resistance in common bean. **Genes**, v. 12:765, 2021. Doi: 10.3390/genes12050765.

PAULINO, P. P. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VAZ BISNETA, M.; VIDIGAL FILHO, P. S.; NUNES, M. P. B. A.; XAVIER, L. F. S.; MARTINS, V. S. R.; LACANALHO, G. F. Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-21, 2022. Doi: 10.33158/ASB.r140.v8.2022.

PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A.; COSTA, J. G. C.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C. Genotype by environment interaction for disease resistance and other important agronomic traits supporting the indication of common bean cultivars. **Euphytica**, v. 214:12, 2018. Doi: 10.1007/s10681-017-2093-z.

PEREIRA, H. S.; SOUZA, T. L. P. O.; AGUIAR, M. S.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; MAGALDI, M. C. S.; SOUZA, N. P.; KNUPP, A. M.; GUIMARÃES, C. M.; CARVALHO, H. W. L.; ALMEIDA, V. M.; MELO, L. C. BRS FC415: Common bean cultivar with high yield, commercial quality, slow seed coat darkening, and resistance to soil pathogens. **Functional Plant Breeding Journal**, v. 4, n. 2, p. 33-39, 2022. Doi: 10.35418/2526-4117/v4n2a4.

PEREIRA, H. S.; SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, L. C.; AGUIAR, M. S.; WENDLAND, A.; COSTA, J. G. C.; DÍAZ, J. L. C.; MAGALDI, M. C. S.; SOUZA, N. P.; CARVALHO, H. W. L.; COSTA, A. F.; MELO, C. L. P.; ALMEIDA, V. M.; MELO, L. C. BRS FC406: Common bean cultivar with high yield in the rainy season in central Brazil. **Functional Plant Breeding Journal**, v. 3, n. 2, p. 115-120, 2021a. Doi: 10.35418/2526-4117/v3n2a10.

PEREIRA, H. S.; WENDLAND, A.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; NASCENTE, A. S.; DÍAZ, J. L. C.; CARVALHO, H. W. L.; ALMEIDA, V. M.; MELO, C. L. P.; COSTA, A. F.; POSSE, S. C. P.; SOUZA, J. F.; ABREU, A. F. B.; MAGALDI, M. C. S.; GUIMARÃES, C. M.; OLIVEIRA, J. P. BRS Notável: a medium-early-maturing, disease-resistant Carioca common bean cultivar with high yield potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 220-223, 2012. Doi: 10.1590/S1984-70332012000300010.

PEREIRA, R.; ABREU, A. F. B.; NAIN, R. S.; SOUZA, E. A. Phenotyping for angular leaf spot severity and its implication in breeding common bean for resistance. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 5, p. 415-423, 2019. Doi: 10.1590/1678-992X-2017-0394.

- PEREIRA, R.; SOUZA, E. A.; BARCELOS, Q. L.; ABREU, A. F. B.; LIBRELON, S. S. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetic Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 5044-5053, 2015. Doi: 10.4238/2015.May.12.7.
- PEREIRA, S. P.; MENDONÇA, F. R.; RODRIGUES, L. L.; MELO, L. C.; MELO, P. G. S.; FARIA, L. C.; COSTA, A. F.; CARVALHO, H. W. L.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALMEIDA, V. M. Selection of carioca common bean lines with slow darkening. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.56, e02471, 2021b. Doi: 10.1590/S1678-3921.pab2021.v56.02471.
- PORCH, T. G.; BEAVER, J. S.; DEBOUCK, D. G.; JACKSON, S. A.; KELLY, J. D.; EMPEWOLF, H. Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change. **agronomy**, v. 3, p. 433-461, 2013. doi:10.3390/agronomy3020433.
- RAGAGNIN, V. A.; DE SOUZA, T. L. P. O.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; COSTA, M. R.; ALZATE-MARIN, A. L.; CARNEIRO, J. E. DE S.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, v. 128, p. 156-163, 2009. Doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01549.x.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. 1 ed. Lavras: Editora UFLA. 2012, 566 p.
- RIBEIRO, R. L. D.; HAGEDORN, D. J. Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Genetics**, v. 69, n. 8, p. 859-861, 1979b.
- RIBEIRO, R. L. D.; HAGEDORN, D. J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, v. 69, p. 272-276, 1979a.
- RODRIGUES, L. L.; RODRIGUES, L. A.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S. Genetic control of seed coat darkening in common bean cultivars from three market classes. **Crop Science**, v. 59, p. 2046-2054, 2019a. Doi: 10.2135/cropsci2019.03.0161.
- RODRIGUES, L. L.; TORRES, M. H. R. M.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S. Associação entre o escurecimento dos grãos e reação à marcha de *fusarium* em feijão carioca. In: XIII Seminário Jovens Talentos, 13. **Resumos**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão: ISBN 978-65-86056-69-3, 2019b, p. 69.
- RODRIGUEZ, D.; BEAVER, J. JENSEN, C. E.; PORCH, T. Identification of resistance sources of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 72, n. 2, p. 8785-8791, 2019. Doi: 10.15446/rfnam.v72n2.70238.
- SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F. Physiological specialization end effects of inoculum concentration on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, v. 77, p. 492-496, 1993.
- SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F.; BRICK, M. A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, v. 79, p. 279-281, 1995.

SANGLARD, D. A. **Melhoramento do feijoeiro para resistência à mancha-angular: validação de marcadores moleculares SCAR, piramidação alélica de genes, testes de alelismo e caracterização de linhagens elites**. 2010. 109f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

SANGLARD, D. A.; DAMASCENO, J. D.; BALBI, B. P.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Introgression of angular leaf spot resistance genes in common bean isolines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 50, p. 101–102, 2007.

SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M. A.; SINGH, S. P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 31, p. 741–754, 1982.

SHEN, G. Q.; ABDULLAH, K. G.; WANG, Q. K. (2009). The TaqMan method for SNP genotyping. In: Komar, A. (eds) **Single Nucleotide Polymorphisms. Methods in Molecular Biology™**, Totowa: Humana Press, 2009, v. 578. p. 293-306. Doi: 10.1007/978-1-60327-411-1\_19.

SILVA, F. C.; PEREIRA, H. S.; MELO, P. G. S.; MELO, L. C. Selection of parents and segregating populations of common bean with high agronomic potential and slow seed-coat darkening. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 1, p. 75-82, 2018. Doi:10.1590/1983-40632018v48a49519.

SILVA, G. S.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SILVA, F. B. Genetic control of early grain darkening of carioca common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 299-304, 2008. Doi: 10.12702/1984-7033.v08n04a07.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, p. 2199-2223, 2010. Doi: 10.2135/cropsci2009.03.0163.

SIQUEIRA, B. S.; PEREIRA, W. J.; BATISTA, K. A.; OOMAH, B. D.; FERNANDES, K. F.; BASSINELLO, P. Z. Influence of storage on darkening and hardening of slow- and regular-darkening carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Journal of Agricultural Studies*, v. 2, n. 2, p. 87-104, 2014. Doi: 10.5296/jas.v2i2.5859.

SOUSA, L. L. et al. Genetic Characterization and Mapping of Anthracnose Resistance of Common Bean Landrace Cultivar Corinthiano. **Crop Science**, v. 55, p. 1900–1910, 2015.

SOUZA, T. L. P. O.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; RAATZ, B.; MUKANKUSI, C. M.; ABREU, A. F. B.; MELO, L. C.; PASTOR-CORRALES, M. A. Major loci controlling resistance to the angular leaf spot of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 58, p. xv – xviii, 2016.

SOUZA, T. L. P. O.; WENDLAND, A.; RODRIGUES, M. S.; ALMEIDA, L. C. S.; CORREIA, F. R.; RODRIGUES, L. A.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; MELO, L. C. Anthracnose resistance sources to be explored by the common bean breeding programs in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, n. 57, p. 217-218, 2014.

STAM, R.; MCDONALD, B. A. When resistance gene pyramids are not durable – the role of pathogen diversity. *Molecular Plant Pathology*, n. 19, v. 3, p. 521-524. 2018. Doi: 10.1111/mpp.12636.

TERÁN, H.; JARA, C.; MAHUKU, G.; BEEBE, S.; SINGH, S. P. Simultaneous selection for resistance to five bacterial, fungal, and viral diseases in three Andean x Middle American

inter-gene pool common bean populations. **Euphytica**, v. 189, p. 283-292, 2013. Doi: 10.1007/s10681-012-0803-0.

TORRES, M. H. R. M. **Melhoramento de feijão preto para resistência à murcha de fusário: identificação de marcadores moleculares e seleção de populações segregantes e linhagens**. 2020. 103 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.

TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Identification of a New Chromosomal Region Involved in the Genetic Control of Resistance to Anthracnose in Common Bean. **The Plant Genome**, v. 8, 2015.

VALDISSER, P. A. M. R. MOTA, A. P. S.; BUENO, L. G.; MENEZES, I. P. P.; COELHO, G. R. C.; MAGALHÃES, F. O. C.; VIANELLO, R. P. Protocolo de extração de DNA e genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Comunicado Técnico**, n. 208, 2013. ISSN1678-961X.

VALENTINI, G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; HURTADO-GONZALES, O. P.; CASTRO, S. A. L.; CREGAN, P. B.; SONG, Q.; PASTOR-CORRALES, M. A. High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, p. 1705-1722, 2017. Doi: 10.1007/s00122-017-2920-6.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. New Insights into the Anthracnose Resistance of Common Bean Landrace G 2333. **The Open Horticulture Journal**, 2:29-33, 2009.

VIEIRA, A. F.; ALMEIDA, L. C. S.; RODRIGUES, L. A.; COSTA, J. G. C.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; SANGLARD, D. A.; SOUZA, T. L. P. O. Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, gmr18066, 2018. Doi: 10.4238/gmr18066.

WENDLAND, A.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C.; DÍAZ, J. L. C.; MAGALDI, M. C. S.; ALMEIDA, V. M.; CARVALHO, H. W. L.; MELO, C. L. P.; COSTA, A. F.; ABREU, A. F. B.; MELO, L. C. BRS Sublime: Common bean cultivar with carioca grain, resistance to angular leaf spot and high nutritional quality. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, p. 440-445, 2018. Doi: 10.1590/1984-70332018v18n4c65.

WOO, S. L.; ZOINA, A.; DEL SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B.; SCALA, F.; NOVIELLO, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. **Phytopathology**, v. 86, p. 966-973, 1996. Doi: 10.1094/Phyto-86-966.

XAVIER, L. F. S., PASTOR-CORRALES, M. A., VALENTINI, G., HURTADO-GONZALES, O. P., POLETINE, J. P., GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. Mapping an anthracnose resistance locus in Andean common bean landrace beija flor. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 65, p. 51–52, 2022.

YOUNG, R.; MELOTTO, M.; NODARI, R.; KELLY, J. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87–94, 1998.

## 12 APÊNDICES

**Apêndice 3.A.** Marcadores microssatélites usados nas etapas de checagem da natureza híbridas das plantas oriundas de cruzamentos biparentais e suas respectivas fluorescências, tamanho do fragmento em pares de bases (pb), sequência dos iniciadores e o cromossomo em cada marcador foi mapeado.

Painel	Marcador	Fluorescência	Fragmento (pb)	Primer F	Primer R	Cromossomo
1	BM143	HEX	100-170	GGGAAATGAACAGAGGAAA	ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	Pv02
	PVBR25	6-FAM	140-180	GAGCTTCTCCGTCCTGTGT	CGAACTGAATCAGAAAGGAA	Pv09
	BM164	NED	130-190	CCACCACAAGGAGAAGCAAC	ACCATTCAGGCCGATACTCC	Pv02
	BM114	6-FAM	230-260	AGCCTGGTCAAATGCTCATAG	CATGCTTGTTCCTAACTCTCT	Pv09
	BM138	NED	190-210	TGTCCCTAAGAACGAATATGGAATC	GAATCAAGCAACCTTGGATCATAAC	Pv05
	PVBR169	HEX	195-220	TGGAAAGTCCGAGGAGAAGA	AAAAGGGTCCCAACCAAAAC	Pv03
2	PVBR5	HEX	160-220	ATTAGACGCTGATGACAGAG	AGCAGAATCCTTTGAGTGTG	Pv06
	PVBR35	6-FAM	190-260	TCTACGCGTTCCTCTGTCT	AGTGGATGTGTGGGAAAAGC	Pv04
	BM202	6-FAM	100-173	ATGCGAAAGAGGAACAATCG	CCTTTACCCACACGCCTTC	Pv11
	BM189	NED	80-120	CTCCCACTCTCACCTCACT	GCGCCAAGTGAAACTAAGTAGA	Pv03
	BM210	NED	160-220	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG	CCCTCATCCTCCATTCTTATCG	Pv07
3	PVBR113	NED	60-110	TGCATTCTCCTCCCATCTT	TTGATTTGATTTGATCAGTGGTG	Pv06
	PVBR87	NED	150-201	CTCATTGCGTCTACCAGTGC	CCTAGGTTCCGCAGCATGT	Pv05
	PVBR272	6-FAM	70-135	CAGAACAGAAGAAGAAACAGAAAATG	GCGTGTTCTCTGTGTGTGT	Pv02
	BM154	6-FAM	205-317	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC	CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	Pv09
	PVBR13	6-FAM	159-200	TGAGAAAGTTGATGGGATTG	ACGCTGTTGAAGGCTCTAC	Pv06
4	PVBR11	HEX	175-192	AAACTCAAAGTCGTTGTTCC	CCACTGACTCTAGCTCCTCC	Pv02
	BM181	NED	170-250	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT	CCACTCTTAGCATCAACTGGA	Pv05
	BM183	6-FAM	130-170	CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC	TCTTACAGCCTTGACAGACATC	Pv07
	PVBR163	6-FAM	180-350	TGAGAGTGGAGAAGGAGAGAGA	TGACAACACTGCAAACACCA	Pv06
	BM201	NED	90-120	TGGTGCTACAGACTTGATGG	TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	Pv01
	PVBR251	HEX	193-220	TGAAGTTGCAGCTAGGTTGG	GGTTGTGCTTGTGTTGTTGG	Pv01

Adaptado de Morais et al. (2016).

**Apêndice 3.B.** Condições de amplificação de cada marcador que será utilizado no estudo.

<b>Marcador</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Etapas</b>	<b>Condições de amplificação</b>	<b>Tempo</b>
g796	1	Desnaturação inicial	95°C	15'
	40	Desnaturação	94 °C	30''
		Anelamento	62°C	1' e 30''
		Extensão	72°C	1' e 30''
1	Extensão final	60°C	30'	
SE04	1	Desnaturação inicial	95°C	15'
	35	Desnaturação	94 °C	30''
		Anelamento	65°C	1' e 30''
		Extensão	72°C	1' e 30''
1	Extensão final	60°C	30'	
Ensaio TaqMan™	1	Desnaturação inicial	95°C	30''
	50	Desnaturação	95 °C	3''
		Anelamento	60°C	30''
		Extensão	60°C	30''
1	Extensão final	72°C	5'	

\*Marcadores SNP em ensaios tipo TaqMan™ (ThermoFisher) foram submetidos às mesmas condições de desnaturação, anelamento e extensão.

**Apêndice 3.C. Perfil molecular de 35 plantas oriundas do cruzamento simples F<sub>1(CD)</sub> [BRS ELO FC423 x DM103].**

Genótipo	ID_PlantaF <sub>1</sub>	PV5_alelo1	PV5_alelo2	PV35_alelo1	PV35_alelo2
BRS ELO FC423	P5545_19	177 <sup>a</sup>	177	208	208
	DM103	P5543_19	175	175	214
F <sub>1(CD)</sub> [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂]	P5507_19	175	177	208	214
	P5508_19	175	177	208	214
	P5509_19	175	177	208	214
	P5510_19	-	-	208	214
	P5511_19	175	177	208	214
	P5512_19	-	-	208	214
	P5513_19	-	-	208	214
	P5514_19	175	177	208	214
	P5515_19	175	177	208	214
	P5516_19	175	177	208	214
	P5517_19	175	177	208	214
	P5518_19	175	177	208	214
	P5519_19	-	-	-	-
	P5520_19	175	177	208	214
	P5521_19	-	-	-	-
	P5522_19	-	-	-	-
	P5523_19	175	177	208	214
	P5524_19	175	177	208	214
	P5525_19	175	177	208	214
	P5526_19	175	177	208	214
	P5527_19	-	-	208	214
	P5528_19	-	-	-	-
	P5529_19	175	177	208	214
	P5530_19	-	-	-	-
	P5531_19	175	177	208	214
	P5532_19	-	-	208	214
	P5533_19	175	177	208	214
	P5534_19	175	177	208	214
	P5535_19	175	177	208	214
	P5536_19	175	177	208	214
	P5537_19	175	177	208	214
	P5538_19	175	177	208	214
	P5539_19	175	177	208	214
	P5540_19	-	-	-	-
	P5541_19	175	177	208	214

<sup>a</sup>Tamanho da banda (pares de base); - Plantas em que os marcadores não amplificaram.

**Apêndice 3.D.** Genealogia do híbrido múltiplo  $F_{1(ABCDEF)}$ . Número de sementes  $F_2$  dos três cruzamentos múltiplos e os alelos-alvo piramidados no híbrido múltiplo  $F_{1(ABCDEF)}$ .

Cruzamento múltiplo: $F_{1(ABCDEF)}$					
Híbrido Simples		Híbrido Duplo	Nº sementes $F_{1(ABCDEF)}$	Código	Alelos-alvo*
$F_{1(EF)}$ : ( <i>SdsdFOP2.3<sup>403H</sup>fop2.3<sup>403H</sup></i> ) [BRS Sublime♀ x BRS FC415♂]_planta7	VS	$F_{1(AB)(CD)}$ _D6plt2: ( <i>SdsdCo4<sup>2</sup>co4<sup>2</sup></i> ) $F_{1(AB)}$ [Prog. 218311376♀ X K10♂]_plt4:1_P5477_19_A4 <b>X</b> $F_{1(CD)}$ [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂]_plt2:1_P5511_19_B2♂]	1	LM01 (97)	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>Co-4<sup>2</sup></i>
$F_{1(EF)}$ : ( <i>Sdsd FOP2.3<sup>403H</sup>fop2.3<sup>403H</sup></i> ) [BRS Sublime♀ x BRS FC415♂]_planta6	VS	$F_{1(AB)(CD)}$ _D6plt2: ( <i>SdsdCo4<sup>2</sup>co4<sup>2</sup></i> ) $F_{1(AB)}$ [Prog. 218311376♀ X K10♂]_plt4:1_P5477_19_A4 <b>X</b> $F_{1(CD)}$ [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂]_plt2:1_P5511_19_B2♂]	2	LM02 (36) LM03 (68)	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>sd</i> <i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>Co-4<sup>2</sup></i>
$F_{1(EF)}$ : ( <i>SdsdFOP2.3<sup>403H</sup>fop2.3<sup>403H</sup></i> ) [BRS Sublime♀ x BRS FC415♂]_planta1	VS	$F_{1(CD)(AB)}$ _D78plt1: ( <i>SdsdCo4<sup>2</sup>co4<sup>2</sup></i> ) $F_{1(CD)}$ [BRS ELO FC423♀ X DM 103♂]_plt14_P5541_B14 <b>X</b> $F_{1(AB)}$ [Prog. 218311376♀ X K10♂]_plt6:1_P5481_19_A6♂]	4	LM04 (71) LM05 (36) LM06 (72) LM07 (14)	<i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>sd</i> <i>Sd</i> <i>Co-4<sup>2</sup></i> + <i>sd</i> <i>FOP2.3<sup>403H</sup></i> + <i>sd</i>

<sup>0</sup> Número de sementes  $F_2$  de cada planta  $F_1$  do cruzamento múltiplo; Código - Cada semente do cruzamento múltiplo foi codificada, gerando sete códigos (LM01 ao LM07);

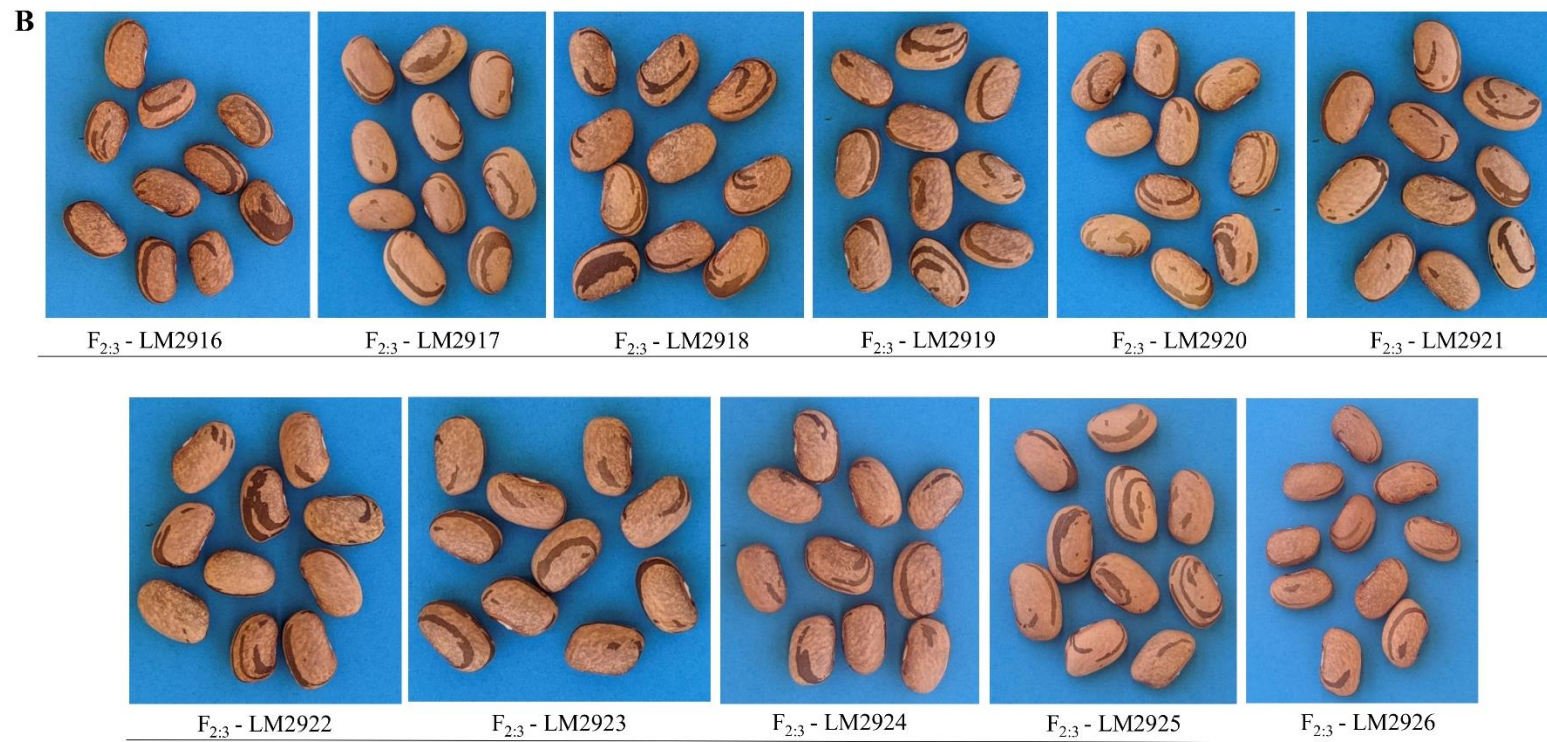
\*Alelos-alvo piramidados no híbrido múltiplo  $F_{1(ABCDEF)}$ .



**Apêndice 3.E.** Fenótipo das sementes oriundas das onze plantas  $F_2$  selecionadas contendo os alelos  $FOP2.3^{403H}$  e  $sd$  em homozigose, todas com escurecimento lento dos grãos.



**Apêndice 3.F. (A)** - Fenótipo das sementes oriundas de dez progênes F<sub>2:3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homocigose. G01 - LM2906 ao LM2914 e G02 - LM2915.



**Apêndice 3.F. (B)** - Fenótipo das sementes oriundas de onze progêneses F<sub>2,3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose. G03 - LM2916 ao LM2926.



**Apêndice 3.F. (C)** - Fenótipo das sementes oriundas de oito progênies F<sub>2:3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4*<sup>2</sup> e *FOP2.3*<sup>403H</sup> em homozigose. G04 - LM2927 ao LM2935.



**Apêndice 3.F. (D)** - Fenótipo das sementes oriundas de oito progênies F<sub>2:3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4*<sup>2</sup> e *FOP2.3*<sup>403H</sup> em homozigose. G05 - LM2936 ao LM2943.



**Apêndice 3.F. (E)** - Fenótipo das sementes oriundas de seis progênies F<sub>2:3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4*<sup>2</sup> e *FOP2.3*<sup>403H</sup> em homozigose. G06 - LM2944 ao LM2950.



**Apêndice 3.F. (F)** - Fenótipo das sementes oriundas de onze progênies F<sub>2.3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4<sup>2</sup>* e *FOP2.3<sup>403H</sup>* em homozigose. G07 - LM2951 ao LM2961.



**Apêndice 3.F. (G)** - Fenótipo das sementes oriundas de quatro progênies F<sub>2:3</sub> selecionadas contendo os alelos *Co-4*<sup>2</sup> e *FOP2.3*<sup>403H</sup> em homozigose. G08 - LM2962 ao LM2966.

### 13 CONCLUSÕES GERAIS

A resistência à antracnose presente na cultivar andina BRSMG Realce é controlada por um único gene de efeito maior ( $R^2=54,6\%$ ) no cromossomo 4, que foi previamente nomeado como *CoPv04<sup>R</sup>*. A região do *CoPv04<sup>R</sup>* inclui genes de resistência previamente descritos como associados a interação patógeno-hospedeiro. O *CoPv04<sup>R</sup>* é diferente dos genes R já mapeados no Pv04 (*Co-3*, *Co-15* e *Co-16*). Os snp12782 (1,182,123 pb), snp3308 (505,696 pb) e snp1327 (477,285 pb) são indicados para monitorar a introgressão do alelo *CoPv04<sup>R</sup>*, com 99,0% de eficiência de seleção. Propõe-se que o *CoPv04<sup>R</sup>* seja nomeado oficialmente de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Genética da BIC (Bean Improvement Cooperative).

Sete marcadores oriundos do projeto HTPG (High Throughput Genotyping) apresentaram potencial para serem incorporados à seleção assistida: snpPV0025-*Phg-2*, snpPV0027-*Phg-5*, snpPV0046-*Co-u*, snpPV0068-*Co-4<sup>2</sup>*, snpPV0070-*Co-4<sup>2</sup>*, snpP8282v3-817-*Co-4<sup>2</sup>* e snpPV0079-*Phg-5*. Os marcadores snpPV0025 e snpPV0079 são indicados para monitorar a presença dos alelos-alvo *Phg-2* e *Phg-5*, respectivamente. O sistema de genotipagem baseado em ensaios de hidrólise do tipo TaqMan™ para os marcadores snpPV0070, snpP8282v3-817 e snpPV0025 são específicos para os alelos-alvo e, portanto, adequados para o uso na seleção assistida. Os marcadores snpPV0070 e snpP8282v3-817 possuem elevada eficiência de seleção (99,7 e 99,8%, respectivamente) para o alelo *Co-4<sup>2</sup>* que confere resistência à antracnose e, portanto, são úteis para seleção precoce de genótipos superiores nos programas de melhoramento de feijão comum. A validação de marcadores previamente identificados como ligados aos alelos-alvo é essencial para aumentar a eficiência da seleção de genótipos com combinações alélicas superiores às já existentes.

A seleção assistida com marcadores codominantes permite a identificação de progênies combinando os alelos-alvo em homozigose. Os marcadores P8282v3-817, ANAAJK6 e PvbHLHp12804 possuem segregação mendeliana 1:2:1. Além da seleção precoce dos alelos-alvo, foi possível identificar progênies com grão carioca dentro dos padrões comerciais.