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

MELHORAMENTO MOLECULAR DO FEIJÃO-COMUM PARA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A VIROSES

RODRIGO DE SOUZA SILVA

Orientador:
Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza

Goiânia - GO

Brasil

Junho – 2021

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 [x] Tese

2. Nome completo do autor

RODRIGO DE SOUZA SILVA

3. Título do trabalho

Melhoramento molecular do feijão-comum para resistência múltipla a viroses

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

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[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 **Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza**, **Usuário Externo**, em 15/06/2021, às 10:41, conforme horário oficial

de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO DE SOUZA SILVA**, **Discente**, em 15/06/2021, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

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, informando o código verificador **2093702** e o código CRC **918E2591**.

Referência: Processo nº 23070.026563/2021-32 SEI nº 2093702

RODRIGO DE SOUZA SILVA

MELHORAMENTO MOLECULAR DO FEIJÃO-COMUM PARA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A VIROSES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.
Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:
Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza

Coorientador:
Dr. Josias Correa de Faria

Goiânia, GO – Brasil
2021

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

Silva, Rodrigo de Souza
Melhoramento molecular do feijão-comum para resistência múltipla a viroses [manuscrito] / Rodrigo de Souza Silva. - 2021.
C, 100 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza ; co orientador Dr. Josias Correa de Faria.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2021.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui tabelas.

1. Phaseolus vulgaris L. 2. Embrapa 5.1. 3. severidade de viroses. 4. DArtseq. 5. Seleção assistida por marcadores. 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 96/2021 da sessão de Defesa de Tese de **RODRIGO DE SOUZA SILVA** que confere o título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos quatorze dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e um, a partir das treze horas e trinta minutos, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **"**Melhoramento molecular do feijoeiro-comum para resistência múltipla a viroses". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador e Presidente da Banca Examinadora, **Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza - Embrapa Arroz e Feijão,** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dra. Rosana Pereira Vianello - Embrapa Arroz e Feijão**, membro titular externo; **Profa. Patrícia Guimarães Santos Melo - EA/UFG**, membro titular interno; **Dra. Patrícia Valle Pinheiro - Embrapa Arroz e Feijão**, membro titular externo; **Profa. Bruna Mendes de Oliveira - EA/UFG**, membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. Após a arguição, 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 Presidente da Banca Examinadora, **Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos quatorze dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Melhoramento molecular do feijão-comum para resistência múltipla a viroses

---

Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Guimarães Santos Melo**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2021, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Bruna Mendes De Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2021, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza**, **Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Patricia Valle Pinheiro**, **Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com

fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Rosana Pereira Vianello**, **Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 19:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

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, informando o código verificador **2093701** e o código CRC **C39E9DC2**.

Referência: Processo nº 23070.026563/2021-32 SEI nº 2093701

Ao meu irmão, Bruno de Souza Silva (in memoriam), por ter sempre acreditado em mim.

DEDICO

"Aproveito para eternizar aqui, nesta página, todo o meu amor a você, meu irmão. Saudade que não cabe no peito!"

Aos meus pais, Meire e Agnaldo, pelos ensinamentos mais valiosos da vida.

OFEREÇO

"Há um futuro e um presente cheios de vida."

- Rodrigo Silva

AGRADECIMENTOS

A DEUS

Aos meus pais Meire Sueli de Souza Silva e Agnaldo da Silva Filho, e irmão Bruno de Souza Silva (*in memoriam*), pelo amor incondicional.

À Universidade Federal de Goiás, UFG e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todo o suporte e também pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa. Em especial a todos os brasileiros que contribuíram para a minha formação.

Ao Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza, pela paciência, conselhos e por toda a dedicação no desenvolvimento deste trabalho. E também por ter confiado em mim!

Ao Dr. Josias Correa de Faria por todo o conhecimento transmitido e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Em especial pela ajuda nas inoculações e, claro, pelos conselhos repassados.

À Dra. Rosana Pereira Vianello, pela paciência e disponibilidade em ensinar. As correções e sugestões foram valiosas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas por toda a dedicação ao programa; pelas inspirações e ensinamentos transmitidos.

À Professora Leila Garcês pela orientação nas atividades curriculares, e pelos conselhos profissionais e pessoais.

A todos os amigos de estágio, mestrado e doutorado, pelo companheirismo e apoio na realização deste trabalho. Com carinho aos amigos Ailton, Antônia, Danilo, Érica, Gabriela, Jordana, Letícia, Ludivina, Mário Henrique, Pedro, Roberta, Samara e Samela.

Aos meus amigos Ariela, Eliana, Kélcia, Renata, Ricardo, Ronny, Tamara, Thatyane e Thiago, pelos momentos de alegria juntos.

Aos profissionais da Embrapa Arroz e Feijão – campo e laboratório - por todo o auxílio na realização deste trabalho. Em especial aos amigos Antônio (Toninho) e Antônio Cosmi (Toinzinho), pela confiança, companheirismo e todo apoio na realização dos trabalhos de campo e casa de vegetação.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL 13

GENERAL ABSTRACT 17

1 INTRODUÇÃO GERAL 17

2 DESENVOLVIMENTO E SELEÇÃO DE PROGÊNIES TRANSGÊNICAS DE FEIJÃO CARIOCA PARA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A VIROSES 21

RESUMO 21
ABSTRACT 22
2.1 INTRODUÇÃO 23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS 26
2.2.1 Material Genético 26
2.2.2 Seleção assistida por marcadores (SAM) 27
2.2.3 Condução dos cruzamentos e avaliação das progênies 27
2.2.4 Avaliação de Desempenho Agronômico 29
2.2.4.1 Análises Genética e Estatística 30
2.2.5 Inoculação e avaliação de plantas em casa de vegetação 30
2.3 RESULTADOS 32
2.4 DISCUSSÃO 40
2.5 CONCLUSÕES 47
2.6 REFERÊNCIAS 48

APÊNDICE A. **56**

APÊNDICE B **56**

3 HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DO LOCO DE RESISTÊNCIA AO *COWPEA MILD MOTTLE VIRUS* (CPMMV) NA CULTIVAR DE FEIJÃO BRS SUBLIME 57

RESUMO 57
ABSTRACT 58
3.1 INTRODUÇÃO 59
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 63
3.2.1 Material Genético 63
3.2.2 Inoculação mecânica e avaliação fenotípica 63
3.2.2.1 Análise estatística - fenotípica 64
3.2.3 Análise Genômica 64
3.2.3.1 Genotipagem por *DArTseq* 64
3.2.3.2 Teste de segregação e mapa de ligação 64
3.2.3.3 Detecção de QTL e anotação gênica 65
3.3 RESULTADOS 67
3.3.1 Estudo da herança 67
3.3.2 Genotipagem de marcadores SNP e *Silico*DArT 67
3.3.3 Mapa de ligação 70
3.3.4 Análise de QTL e anotação gênica 71
3.4 DISCUSSÃO 74

3.5 CONCLUSÕES 81
3.6 REFERÊNCIAS 82
APÊNDICE A **93**

4 PERSPECTIVAS.....95

5 REFERÊNCIAS.....97

RESUMO GERAL

SILVA, R. S. **Melhoramento Molecular do feijão-comum para resistência múltipla a viroses**. 2021. 100f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.[1]

Dentre as doenças que acometem o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), as viroses merecem destaque, uma vez que são de difícil controle e causam perdas parcial ou total de produtividade e de qualidade dos grãos. No Brasil, as principais viroses do feijão são: o mosaico comum, causado pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV), o mosaico-dourado, cujo agente causal é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e o mosqueado-suave-do-caupi e necrose da haste da soja, causado pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). Os sintomas de CPMMV emergiram no feijão-comum mais recentemente, em ensaios de campo com a cultivar transgênica BRS FC401 RMD, que apresenta resistência efetiva ao BGMV (evento Embrapa 5.1). Os sintomas de CPMMV são confundidos ou suplantados pelos sintomas mais severos de BGMV, e ambas as viroses ocorrem simultaneamente em condição natural no campo e são transmitias pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), sobretudo na região Central do Brasil. Assim, dois estudos foram realizados com os seguintes objetivos: i) desenvolver, avaliar e selecionar progênies transgênicas de feijão-comum, de segunda geração, com grãos no padrão comercial carioca, boa performance agronômica e com resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV, e ii) investigar o controle genético da resistência ao CPMMV e mapear loco(s) de resistência ao CPMMV na cultivar de grãos carioca BRS Sublime. No primeiro estudo, progênies foram desenvolvidas do cruzamento das cultivares BRS Estilo e BRS Sublime (resistentes ao CPMMV e ao BCMV), com a linhagem transgênica CNFCT 16206 (evento Embrapa 5.1; resistente ao BGMV) e ao BCMV. A recuperação de progênies elite com maior proporção dos genitores foi realizada por meio da análise de retrocruzamento assistido por marcadores SSR e SNP. As 39 progênies e as testemunhas foram avaliadas em condição de campo, nas águas (2016) e seca (2017), e em casa de vegetação, livre de insetos. Foram avaliados os caracteres produtividade e massa de 100 grãos, arquitetura e acamamento de planta (ARQ), aspecto visual de grãos e severidade de viroses (SV). As progênies elite e as testemunhas foram mecanicamente inoculadas aos oito dias após plantio com o isolado (CPMMV:BR:GO:14 – *GenBank* MK202583) e foram avaliadas, aos 35 dias após inoculação, para severidade de CPMMV. Essas progênies e as testemunhas foram avaliadas, também, para a presença do evento Embrapa 5.1 (marcador *Ahas*) e gene *I* (marcador SCAR SW13). O resultado da análise conjunta mostrou variabilidade entre progênies para todos os caracteres avaliados, sobretudo SV, exceto para ARQ, considerando os dois ambientes, com interação P × E ($P \leq 0,01$). Todas as progênies elite apresentaram resistência ao BCMV e ao BGMV, com exceção da progênie 336-3.1 (BGMV), sendo as testemunhas convencionais suscetíveis ao BGMV, e a testemunha transgênica (cv. BRS FC401 RMD) e as progênies, suscetíveis ao CPMMV. Desse modo, a severidade de CPMMV foi avaliada nas progênies e testemunhas transgênicas. Doze progênies elite apresentaram notas ≤ 3,0 para SV. Dentre elas, as progênies 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 e 422-39.1 apresentaram resistência ao BCMV, ao BGMV e ao CPMMV. Assim, o uso de estratégias de melhoramento convencional e a seleção assistida

[1] Orientador: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Arroz e Feijão.
Coorientador: Dr. Josias Correa de Faria. Embrapa Arroz e Feijão.

por marcadores (SAM), possibilitou o desenvolvimento e a seleção de progênies transgênicas elite de feijão-comum, de segunda geração, com grãos no padrão comercial carioca, porte ereto e adaptadas à colheita mecanizada, com resistência múltipla às viroses e com potencial de uso em futuras avaliação agronômicas. No segundo estudo, a genotipagem de marcadores SNP e *Silico*DArT foi realizada por meio da tecnologia *DArTseq*, em uma população de mapeamento na geração F_2 obtida através do cruzamento entre a cultivar BRS Sublime (resistente) e a linhagem transgênica CNFCT 16207 (suscetível). A natureza hibrida de F_1 foi confirmada por meio de marcador molecular ligado ao evento Embrapa 5.1. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação. Assim, um total de 180 plantas individuais (F_2) e 180 progênies $F_{2:3}$ (2160 plantas; 12 plantas/progênie), e os genitores, foram mecanicamente inoculadas aos oito dias após plantio, com o mesmo isolado de CPMMV. Aos 35 dias após inoculação, as plantas foram avaliadas para severidade de CPMMV. Os dados fenotípicos foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), considerando a taxa de segregação mendeliana esperada para cada geração. O mapa genético completo foi obtido com 1.695 marcadores segregando conforme a frequência esperada e distribuídos nos 11 cromossomos do feijão, com comprimento total de 2.864 cM e distância média entre marcas de 1,8 cM. Os resultados indicaram que um único gene dominante controla a herança da resistência ao CPMMV na cultivar BRS Sublime. O QTL – Gene de efeito principal (CPMMV. Pv08) foi identificado na região final do cromossomo 8, associado à resistência ao CPMMV e explicando ~77% da variação fenotípica. Este é o primeiro trabalho de estudo da herança genética e de mapeamento do loco de resistência ao CPMMV em BRS Sublime. A construção do mapa genético e a abordagem da análise de QTL, gera novas perspectivas para os programas de melhoramento genético do feijoeiro, com o potencial de desenvolvimento e a validação de marcadores moleculares a serem utilizados por meio de SAM para reação ao CPMMV em genótipos de feijão-comum.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., Embrapa 5.1, severidade de viroses, *DArTseq*, marcadores SNP, Seleção assistida por marcadores.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, R. S. **Molecular breeding for the development of multiple resistance to viruses in common bean**. 2021. 100f. Thesis (Doctor of Science in Genetics and Plant Breeding) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.[2]

Among the diseases that affect the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), viruses deserve to be highlighted, since they are difficult to control and cause partial or total yield and grain quality losses. In Brazil, the main viruses of beans are: the common mosaic, caused by the Bean common mosaic virus (BCMV), the golden mosaic, whose causal agent is the Bean golden mosaic virus (BGMV) and the soybean stem necrosis disease, caused by Cowpea mild mottle virus (CPMMV). The symptoms of CPMMV emerged in common beans more recently in agronomic performance tests with the transgenic cultivar BRS FC 401 RMD, which presents effective resistance to BGMV (event Embrapa 5.1). The symptoms of CPMMV were confused or hidden by the more severe symptoms of BGMV, and both viruses occur simultaneously in the field and are transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*), mainly in Central region Brazil. Thus, two studies were carried out with the objectives of: i) develop, evaluate and select transgenic common bean progenies, second generation, with carioca market class, good agronomic performance and with multiple resistance to viruses BCMV, BGMV and CPMMV, and ii) to investigate genetic inheritance of the CPMMV and to genetically map loci of resistance to CPMMV in the carioca seeded cultivar BRS Sublime. In the first study, elite progenies were developed from crosses using the carioca seeded cultivars BRS Estilo and BRS Sublime (both showing resistance to CPMMV and BCMV), with the transgenic line CNFCT 16206 (event Embrapa 5.1; effective resistance to BGMV) and resistant to BCMV. The recovery of elite progenies with a greater proportion of parents was performed through the analysis of backcrosses assisted by SSR and SNP markers. Thus, 39 elite progenies were evaluated in field condition, in the rainy (2016) and dry (2017) growing seasons, and in an insect-proof screenhouse. The evaluated traits were the seed yield and mass of 100 seeds, plant architecture and tolerance to lodging, seed appearance, and virus disease severity (VS). The elite progenies in addition to the controls were mechanical inoculated at eight days after planting with the strain (CPMMV: BR:GO:14 – *GenBank* MK202583), and were evaluated, at 35 days after inoculation, for severity of CPMMV. These progenies and the controls were also evaluated for the presence of the event Embrapa 5.1 (marker *Ahas*) and gene *I* (marker SCAR SW13). The result of the joint analysis showed variability between the progenies for all characters evaluated, especially SV, except for ARQ, considering the two environments, with P × E interaction ($P \leq 0.01$). All elite progenies showed effective resistance to BCMV and BGMV, with the exception of progeny 336-3.1 (BGMV), whereas the conventional controls were susceptible to BGMV, and the transgenic control (cv. BRS FC401 RMD,) and the progenies were susceptible to CPMMV. Thus, the severity of CPMMV was assessed in progenies and transgenic controls. Twelve elite progenies showed mean scores ≤ 3.0 for VS. Of these, the progenies 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 and 422-39.1 showed resistance to BCMV, BGMV and CPMMV. Therefore, the use of conventional breeding strategies and marker-assisted selection (SAM) enabled the development and selection of elite transgenic carioca-seeded cultivars, second-

[2] Advisor: Dr. Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza. Embrapa Arroz e Feijão.
Co-Advisor: Dr. Josias Correa de Faria. Embrapa Arroz e Feijão.

generation, with carioca-seeded market class, better plant architecture and allowing direct mechanical harvest, with multiple resistance to viruses and presenting potential to be evaluated in agronomic performance tests. In the second study, the genotyping of SNP and SilicoDArT markers was performed using the DArTseq technology, in a mapping population in the F_2 generation obtained from the crossing between the cultivar BRS Sublime (resistant) e transgenic line CNFCT 16207 (susceptible). All F_1 plants were tested with molecular marker linked to the event Embrapa 5.1 to confirm the hybrid nature. The plants were conducted in an insect-proof screenhouse. Thus, a total of 180 F_2 individual plants and 180 $F_{2:3}$ progenies (2160 seedlings; 12 seedlings/progeny), in addition to the parents, were mechanically inoculated with the same CPMMV isolate, at eight days after planting. At 35 days after inoculation, the plants were evaluated for severity of CPMMV. The phenotypic data were subjected to the chi-square test (χ^2) ($P \leq 0.05$), considering the expected mendelian segregation ratio for each generation. The complete genetic map was obtained with 1.695 markers segregated according to the expected frequency and distributed in the 11 chromosomes of the bean, with total length of 2.864 cM and average distance between marks of 1.8 cM. The results indicated that a single dominant gene controls the inheritance of CPMMV resistance in the cultivar BRS Sublime. The QTL – single Gene (CPMMV. Pv08) was identified in the final region of chromosome 8, associated with resistance to CPMMV and explaining ~ 77% of the phenotypic variation. This is the first report to study genetic inheritance and genetically map locus to CPMMV resistance in BRS Sublime. The construction of the genetically map and the QTL analysis approach generates new perspectives for common bean breeding programs, with the potential for development and validation of molecular markers to be used through SAM for reaction to CPMMV in common bean genotypes.

Key words: Phaseolus vulgaris L., event Embrapa 5.1, virus disease severity, DArTseq, SNP markers, Marker-assisted selection.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família das leguminosas (*Fabaceae*), tribo *Phaseoleae*, subfamília *Papilionoideae* e gênero *Phaseolus* L., sendo uma espécie predominantemente autógama e domesticada em dois centros de origem: Mesoamericano, compreendendo a região da América do Norte (México) e América Central, e Andino (Norte da Argentina e sul do Peru). Dentro do gênero *Phaseolus* são aproximadamente 55 espécies, sendo o feijão-comum a espécie mais importante (Schmutz et al., 2014; Borém & Carneiro, 2015). Além disso, o feijão-comum é diploide (2n = 2x = 22 cromossomos), sendo o tamanho do genoma das variedades Mesoamericana de aproximadamente 549,6 Mpb e das variedades Andinas (~537 Mpb) (Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016; Lobaton et al., 2018).

A espécie apresenta relevância social e econômica no mundo, sendo amplamente cultivada, sobretudo em países pobres dos continentes Americano, Africano e Asiático (FAO, 2020). É alimento básico na dieta humana, sendo uma leguminosa reconhecida pelo seu valor nutricional, com grãos ricos em proteínas, carboidratos e minerais (Brigide et al., 2014; Martins et al., 2016). No Brasil, o feijão-comum representa uma importante fonte de proteína na dieta dos brasileiros, sendo cultivado praticamente em todos os estados e em diferentes níveis de tecnologia (Faria et al., 2013). Merece destaque, também, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp; gênero *Vigna*], cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (Borém & Carneiro, 2015).

O Brasil é o maior produtor e consumidor de feijão-comum no mundo. A produção brasileira, na safra 2019/20, foi de aproximadamente 2,51 milhões de toneladas de grãos, em uma área plantada por volta de 1,61 milhões de hectares e uma produtividade média de 1.530 kg ha^{-1} (CONAB, 2021), sendo o consumo per capita de aproximadamente 17 kg/habitante/ano (Embrapa Arroz e feijão, 2019). A preferência do consumidor brasileiro é por feijão de grãos do tipo carioca, por volta de 70%, sendo 20% para o feijão preto e os 10% restantes para feijão de outras classes comerciais. Sendo assim, apesar do progresso genético obtido pelo melhoramento de plantas nas últimas décadas, cerca de 17,4 kg ha^{-1}

anual para o feijão carioca, a produtividade de grãos ainda está abaixo do potencial produtivo para a espécie (Faria et al., 2013; Souza et al., 2018).

Neste cenário, vários são os fatores que contribuem para essa baixa produtividade de grãos na espécie, entre eles o grande número de doenças que acometem o feijão em praticamente todas as regiões produtoras, principalmente as viroses. Entre as doenças causadas por vírus no feijoeiro, merecem destaque o mosaico comum, cujo agente causal é o *Bean common mosaic virus* (BCMV; família *Potyviridae*; gênero *Potyvirus*), o mosaico-dourado, causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV; família *Geminiviridae*; gênero *Begomovirus*) e o mosqueado-suave-do-caupi, sendo o agente causal o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV; família *Betaflexiviridae*; gênero *Carlavirus*) (Faria et al., 2016; Meziadi et al., 2017; Souza et al., 2018).

É oportuno mencionar que BGMV e CPMMV são transmitidos com muita eficiência pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), além da ocorrência simultânea dessas viroses no campo, sendo os sintomas de CPMMV muitas vezes confundidos ou suplantados pelos sintomas mais severos de BGMV. Atualmente, o mosaico-dourado é a principal virose do feijoeiro no país, podendo ocasionar perdas total ou parcial de produtividade de grãos (~40 a 100%); dependendo da cultivar, incidência da doença e época de plantio. Adicionalmente, além do feijão, CPMMV também infecta naturalmente a soja, causando a doença necrose da haste em alguns genótipos da espécie. Vale pontuar que a soja é uma excelente hospedeira de *B*. *tabaci* e de CPMMV, o que tem gerado preocupação de produtores e pesquisadores, sobretudo na região Central do país (Paula et al., 2015; Faria et al., 2016; Cheruku et al., 2017; Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019).

Os sintomas de CPMMV foram detectados de maneira conclusiva no feijão-comum em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) da cultivar transgênica BRS FC401 RMD, a qual apresenta resistência efetiva ao BGMV por meio do evento Embrapa 5.1 (Tecnologia RMD; prefixo referente à resistência ao mosaico-dourado) (Bonfim et al., 2007; Dinon et al, 2012) e resistência natural ao BCMV (gene *I*) (Melotto et al., 1996; Pasev et al., 2013), contudo é suscetível ao CPMMV (Souza et at., 2018). Fontes de resistência natural ao CPMMV têm sido verificadas na cultivar de feijão carioca BRS Sublime; não havendo, até o momento, estudos publicados de herança genética da resistência ao CPMMV em genótipos de feijão (Souza, T. L. P. O, comunicação pessoal).

Vale frisar que os métodos de controle convencionais para vírus são de difícil adoção e muitas vezes pouco eficientes. O uso indiscriminado de inseticidas para o controle

de insetos vetores, a exemplo da mosca-branca, tem gerado o surgimento de genótipos resistentes às principais moléculas químicas, além de poluir o ambiente. Assim, a resistência genética demonstra ser a maneira mais eficiente, econômica e de menor impacto ambiental no controle de doenças (Gil et al., 2019), incluindo àquelas causadas por vírus (Paula et al., 2015; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

A tecnologia RMD (evento Embrapa 5.1) tem se mostrado promissora no avanço e desenvolvimento de linhagens transgênicas de feijão com grãos tipo carioca com padrão comercial, ótima performance agronômica e com resistência às viroses BCMV e BGMV (Souza et al., 2018). Além disso, o evento apresenta potencial de uso na seleção e avanço de linhagens-elite RMD de feijão carioca de segunda geração, com alto rendimento e sobretudo resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV; podendo ser uma ferramenta eficiente no desenvolvimento de cultivares resistentes a viroses transmitidas pela mosca-branca, integrando métodos convencionais de melhoramento e ferramentas biotecnológicas (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Nesse âmbito, os avanços na pesquisa genômica nas últimas décadas têm possibilitado o desenvolvimento e o uso de dezenas de milhares de marcadores moleculares informativos em diversas culturas agronomicamente importantes e com diferentes objetivos, como a construção de mapas genéticos mais saturados, estudos de evolução e diversidade genética, e a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (Mace et al., 2008; Heller-Uszynska et al., 2011; Cheruku et al., 2017; Patroti et al., 2019), incluindo o feijão (Oblessuc et al., 2013; Schmutz et al., 2014; Silva et al., 2018; Lobaton et al., 2018; Gil et al., 2019). Os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) são muito utilizados, uma vez que são abundantes no genoma das espécies, além de bastante informativos (codominantes) (Lobaton et al., 2018), assim como os microssatélites (SSR; *Simple Sequence Repeat*), e apresentam um custo relativamente mais acessível. Já os marcadores *Silico*DArT (*Diversity Arrays Technology*) (Kilian et al., 2012), apesar de menos informativos, uma vez que são dominantes, também têm sido utilizados em estudos de diversidade genética e na construção de mapas genéticos, inclusive em estudos de associação de QTL (*Quantitative trait locus*) para loco de resistência genética a doenças no feijão-comum (Oblessuc et al., 2013).

Os objetivos deste trabalho foram: i) desenvolver, avaliar e selecionar progênies transgênicas de feijão carioca com resistência múltiplas às viroses BCMV, BGMV e CPMMV, e ii) investigar o controle genético quanto à resistência ao CPMMV e mapear

loco(s) de resistência ao CPMMV, na cultivar BRS Sublime, por meio das populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ (BRS Sublime × CNFCT 16207).

2 DESENVOLVIMENTO E SELEÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE FEIJÃO CARIOCA COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A VIROSES

RESUMO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é acometido por algumas viroses de importância econômica, uma vez que comprometem a qualidade e a produtividade dos grãos. No Brasil, merecem destaque as viroses *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Bean Golden mosaic virus* (BGMV) e *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), sendo as duas últimas transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e de ocorrência simultânea em condição natural de campo. As viroses têm preocupado pesquisadores e produtores, sobretudo, na região do Cerrado brasileiro (Brasil Central), sendo constatadas maiores incidências na época de plantio da seca, em decorrência das condições ambientais favoráveis e com o aumento populacional da mosca-branca. O objetivo do trabalho foi desenvolver, avaliar e selecionar progênies transgênicas de feijão-comum, com grãos no padrão comercial carioca e com resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV, por meio de métodos convencionais de melhoramento e o uso de ferramentas moleculares. Progênies foram desenvolvidas a partir do cruzamento entre as cultivares BRS Estilo e BRS Sublime (resistentes ao CPMMV e ao BCMV) e a linhagem transgênica CNFCT 16206, portadora do evento Embrapa 5.1 (Tecnologia RMD) e resistente, também, ao BCMV. As progênies com maior proporção dos genitores foram recuperadas por meio da análise de retrocruzamento assistido por marcadores SSR e SNP. As 39 progênies e as testemunhas foram avaliadas em condições de campo, nas águas (2016) e seca (2017), e casa de vegetação, na Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás). Foram avaliados os caracteres produtividade e massa de 100 grãos, arquitetura e acamamento de planta, aspecto visual de grãos e severidade de viroses (SV). As progênies superiores e as testemunhas foram mecanicamente inoculadas aos oito dias após plantio com o isolado (CPMMV:BR:GO:14 – *GenBank* MK202583) e, aos 35 dias após inoculação, foram avaliadas para severidade de CPMMV. Essas progênies e as testemunhas foram avaliadas, também, com o marcador *Ahas* ligado ao evento Embrapa 5.1 e o marcador SCAR SW13 ligado ao gene *I*. Os resultados em condições de campo indicaram adequada precisão experimental, com valores de acurácia seletiva (AS) variando de 0,50 para ARQ a 0,86 (M100), o que possibilitou discriminar as progênies para os caracteres mensurados, sobretudo para SV (AS = ~0,80), e, assim, selecionar plantas mais resistentes. Todas as progênies portadoras do evento Embrapa 5.1, com exceção da progênie 336-3.1, apresentaram resistência efetiva ao BGMV, sendo todas resistentes ao BCMV. Apenas as testemunhas convencionais foram suscetíveis ao BGMV. As testemunhas transgênicas e as progênies apresentaram suscetibilidade ao CPMMV. Estas duas viroses ocorrem simultaneamente no campo e os sintomas de CPMMV são suplantados pelos sintomas de BGMV. Doze progênies elite apresentaram notas ≤ 3,0 para SV e foram selecionadas, e entre elas, as progênies 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 e 422-39.1 apresentaram resistência ao BCMV, BGMV e CPMMV, e porte ereto, com resistência ao acamamento e grãos no padrão comercial carioca, apresentando potencial para serem conduzidas em avaliações de campo. O uso de estratégias de melhoramento convencional e ferramentas moleculares, possibilitou o desenvolvimento e a seleção de progênies transgênicas elite de feijão-comum de segunda geração, com grãos no padrão comercial

carioca, porte ereto e adaptadas à colheita mecanizada, com resistência múltipla às viroses e com potencial de uso em futuras avaliação agronômicas.

Palavras-chaves: *Phaseolus* vulgaris L., severidade de viroses, Tecnologia RMD, *DArTseq*, marcadores SNP, Seleção assistida por marcadores.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND SELECTION OF CARIOCA-SEEDED TRANSGENIC LINES FOR MULTIPLE RESISTANCE TO VIRUSES

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is susceptible to some viruses of economic importance, since they compromise the yield performance and reduce the commercial quality of seeds. In Brazil, the viruses Bean common mosaic virus (BCMV), Bean Golden mosaic virus (BGMV) and Cowpea mild mottle virus CPMMV deserve mention, the last two being transmitted by the whitefly and occurring simultaneously in natural field conditions. The viruses have been of concern to researchers and producers, especially in the Brazilian Cerrado region (Central Brazil), with greater incidences at the dry growing season, due to favorable environmental conditions and the increase in whitefly population. The main goal of the present work was to develop, evaluate and select common bean progenies, genetically modified (GM), from the carioca market class and with multiple resistance to BCMV, BGMV and CPMMV, through conventional methods and the use of biotechnology tools. Progenies were developed from controlled crosses between the cultivars BRS Estilo and BRS Sublime as parents, both showing resistance to CPMMV, and the line CNFCT 16206, harboring the event Embrapa 5.1 (RMD technology) and resistant to BCMV. The progenies with the highest proportion of parents were recovered through the backcrosses analysis assisted by SSR and SNP markers. The 39 progenies and controls were evaluated in field conditions, in the rainy (2016) and dry (2017) growing seasons, and in the insect-proof screennet, carried out at Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás). The evaluated traits were the seed yield and mass of 100 seeds, plant architecture and tolerance to lodging, seed appearance, and virus disease severity (VS). The elite progenies in addition to the controls were mechanical inoculated at eight days after planting with the strain (CPMMV: BR:GO:14 – *GenBank* MK202583), and were evaluated, at 35 days after inoculation, for severity of CPMMV. These progenies and the controls were also evaluated for the presence of the event Embrapa 5.1 (marker *Ahas*) and gene *I* (marker SCAR SW13). The results in field conditions indicated adequate experimental precision, which selective accuracy (SA) values ranging from 0.50 for plant architecture to 0.86 for mass of 100 seeds, which made it possible to discriminate the progenies for the characters measured, especially for VS (SA = 0.80), and to select more resistant plants. All progenies harboring the event Embrapa 5.1, with the exception of progeny 336-3.1, showed effective resistance to BGMV, and all resistant to BCMV. Only the conventional controls were susceptible to BGMV. The transgenic controls and progenies were susceptible to CPMMV. These two viruses occur simultaneously in the field and the symptoms of CPMMV are confused or hidden by the more severe symptoms of BGMV. Twelve elite progenies showed mean score ≤ 3.0 for VS and were selected, and of these, progenies 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 and 422-39.1 showed resistance to BCMV, BGMV and CPMMV, besides better plant architecture to allow for direct mechanical harvest and carioca market class, presenting potential to be tested in future agronomic performance field trials. The use of conventional breeding strategies and

molecular tools enabled the development and selection of carioca-seeded transgenic elite progenies.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L, virus disease severity, RMD technology, DArTseq, markers SNP, Marker-assisted selection.

2.1 INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais consumida diretamente na dieta alimentar humana em todo o mundo. A espécie apresenta relevante impacto social e econômico, sendo o seu grão uma excelente fonte de proteínas, minerais, fibras e vitaminas. Além disso, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo cultivada, principalmente, em países da América Latina, África e Ásia (Brigide et al., 2014; Martins et al., 2016; Yi et al., 2016).

No Brasil, o feijão-comum é cultivado em praticamente todos os estados, por pequenos, médios e grandes produtores, que utilizam diferentes níveis tecnológicos (Faria et al., 2013; Martins et al., 2016; Melo et al., 2017). O país é o maior produtor e o maior consumidor mundial de feijão-comum (FAO, 2017). Na safra de 2019/20, a produção brasileira foi de aproximadamente de 2,51 milhões de toneladas em área plantada por volta de 1,61 milhões de hectares e uma produtividade média de 1.530 kg ha^{-1} (CONAB, 2021). O consumo per capita é de aproximadamente 17 kg/habitante/ano (Embrapa Arroz e Feijão, 2019), sendo a preferência nacional por feijão de grãos carioca (cerca de 70% do consumo), seguindo por feijão preto (20%), outras classes comercias (10%) e tipos de grãos especiais (Anderson et al., 2016; Barili et al., 2016; Barros & Prudencio, 2016; Faria et al., 2013; Faria et al., 2014a).

Apesar do progresso genético obtido nos últimos anos, por volta de 17,4 kg ha^{-1} anual para feijão de grãos carioca (Faria et al., 2013), o feijão-comum ainda apresenta produtividade de grãos abaixo do seu potencial produtivo (Faria et al., 2013, 2014a). Um dos fatores que compromete a qualidade e, sobretudo, a produtividade dos grãos, é o grande número de doenças que acometem a cultura (Miklas et al., 2006; Meziadi et al., 2016; Assefa et al., 2019), com destaque para as viroses (Faria et al., 2016; Meziadi et al., 2017; Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019). Entre as viroses mais importantes, no Brasil, encontram-se o *Bean common mosaic virus* (BCMV; família *Potyviridae*; gênero *Potyvirus*)

(Melotto et al., 1996; Meziadi et al., 2017), o *Bean golden mosaic virus* (BGMV; família *Geminiviridae*; gênero *Begomovirus*) (Bonfim et al., 2007; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018) e o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV; família *Betaflexiviridae*; gênero *Carlavirus*). Estas duas últimas viroses são transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*; Hemiptera: *Aleyrodidae*) (Costa et al., 1983; Marubayashi et al., 2010; Faria et al., 2016) e podem ocorrer simultaneamente em uma mesma planta de feijão (Faria et al., 2016; Alves-Freitas et al., 2019), sendo o CPMMV transmitido, também, por meio de sementes (Faria et al., 2016). Entre os vírus transmitidos por *B. tabaci*, os *Begomovirus* se destacam, sendo os mais amplamente disseminados e prejudiciais à agricultura, em virtude dos danos causados (Chen et al., 2016).

O BGMV é, atualmente, a principal virose que acomete o feijão no país, podendo causar perdas de produção de grãos de até 100% (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). Uma estimativa tímida é de que, aproximadamente, 200.000 ha são anualmente inviabilizados para o cultivo de feijão-comum no Brasil em virtude da ocorrência de BGMV (Souza et al., 2018). Adicionalmente, o CPMMV tem apresentado ampla incidência em soja e feijão (Marubayashi et al., 2010; Faria et al., 2016). Apesar do vírus ter sido descrito no país acometendo feijão-comum (cv. Jalo) já em 1979 (Costa et al., 1983), a doença foi negligenciada por muitos anos, sendo seus sintomas detectados de forma conclusiva durante os ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) que permitiram a avaliação agronômica e a seleção da cultivar BRS FC401 RMD. Esta cultivar apresenta resistência efetiva ao BGMV por meio de transgenia (evento Embrapa 5.1; Tecnologia RMD; prefixo referente à resistência ao mosaico-dourado) (Bonfim et al., 2007, Dinon et al., 2012) e resistência natural ao BCMV (gene *I*), contudo é suscetível ao CPMMV, assim como os seus genitores (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Os sintomas de CPMMV em feijão correspondem a um mosaico menos acentuado, acompanhado ou não de deformação foliar, que podem evoluir para um encarquilhamento mais proeminente nas folhas (Faria et al., 2016; Alves-Freitas et al., 2019). Tais sintomas são, quando da infecção simultânea, suplantados pelos sintomas mais severos de BGMV (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). Vale mencionar que o CPMMV é o agente causal da necrose da haste da soja (Marubayashi et al., 2010), sendo esta espécie, portanto, a principal hospedeira, devido à sua ampla dispersão no país (Faria et al., 2016; Cheruku et al., 2017). Assim, a alta incidência e distribuição de CPMMV tem sido verificada em importantes regiões produtoras de feijão no Brasil (Faria et al., 2016), sobretudo no Brasil

Central, o que tornou o CPMMV um patógeno de importância econômica para a cultura. Fontes de resistência natural ou nativa ao CPMMV foram identificadas em cultivares de feijão carioca em avaliações realizadas na Embrapa Arroz e Feijão (dados não publicados).

Os avanços na pesquisa genômica têm permitido o desenvolvimento de marcadores moleculares informativos, agregando maior eficiência e celeridade aos programas de melhoramento genético e tornando-os mais competitivos. Um dos recursos mais amplamente utilizados para o desenvolvimento de variedades tem sido o retrocruzamento assistido por marcadores, auxiliando na incorporação de alelos de interesse em linhagens elite, reduzindo o número de gerações e de genótipos ao longo dos ciclos (Patroti et al., 2019). Para o feijão, o sequenciamento dos genomas Andino e Mesoamericano (Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016), a identificação de milhares de marcadores SNP (Lobaton et al., 2018; Valdisser et al., 2016) e o desenvolvimento de estudos de mapeamento genético fino (Gil et al., 2019) têm contribuído para que inúmeros recursos moleculares sejam disponibilizados para a comunidade científica. Nesse cenário, a seleção assistida por marcadores, de modo crescente, se torna viável e acessível, sendo integrada à rotina dos programas de melhoramento do feijão-comum (Souza et al., 2018; Assefa et al., 2019). O objetivo deste trabalho foi desenvolver, avaliar e selecionar progênies transgênicas de feijão-comum, com grãos carioca e resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Genético

Para o desenvolvimento de progênies elite de feijão-comum com resistência múltipla a viroses, as cultivares BRS Estilo e BRS Sublime foram utilizadas como genitores (Apêndices A e B). Essas cultivares pertencem à classe comercial carioca, com alto potencial produtivo e grãos no padrão e com alta qualidade comercial, bem como plantas de arquitetura ereta e adaptadas à colheita mecânica direta, sendo BRS Estilo uma das cultivares mais plantadas no Brasil em áreas não irrigadas, segundo levantamentos periódicos realizados pela Embrapa junto ao setor produtivo (dados não publicados). Além disso, apresentam resistência ao BCMV, porém são suscetíveis ao BGMV (Melo et al., 2010; Wendland et al., 2018). BRS Sublime apresenta resistência horizontal à mancha angular, que é uma doença importante para a cultura, sobretudo na época de plantio da seca (segunda safra) (Wendland et al., 2018). Ambas cultivares apresentam resistência moderada natural ou nativa ao CPMMV (dados não publicados).

As linhagens de grãos tipo carioca CNFCT 16206 e CNFCT 16207 são portadoras do evento Embrapa 5.1 que confere imunidade ao BGMV (Tecnologia RMD; prefixo referente à resistência ao mosaico-dourado), sendo também resistentes ao BCMV, mas suscetíveis ao CPMMV (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). CNFCT 16206 foi utilizada como genitor doador do evento Embrapa 5.1 em todos os cruzamentos (Apêndices A e B) e CNFCT 16207 para a multiplicação do isolado de CPMMV utilizado neste trabalho nas inoculações artificiais (*strain* CPMMV: BR:GO:14 – GenBank MK202583) (Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019). CNFCT 16207 também foi sempre utilizada como testemunha suscetível nos ensaios de avaliação para reação ao CPMMV, em casa de vegetação. Foram utilizadas também como testemunhas as cultivares BRS FC402, com alta produtividade, resistência à murcha-de-fusário e à antracnose (Melo et al., 2017) e BRS FC401 RMD, com resistência efetiva ao BGMV por ser portadora do evento Embrapa 5.1 (Souza et al., 2018). Ambas cultivares apresentam grãos do tipo carioca no padrão comercial e resistência ao BCMV, porém são suscetíveis ao CPMMV, sendo utilizadas em ensaios de campo e casa de vegetação.

2.2.2 Seleção assistida por marcadores (SAM)

O DNA genômico das plantas (parentais e progênies) foi extraído a partir de amostras de tecido foliar utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), com modificações. Para a identificação da presença do transgene, evento Embrapa 5.1, foi utilizando o marcador molecular associado ao gene *Ahas* (Dinon et al., 2012). A presença do gene *I*, que confere resistência ao BCMV (Meziadi et al., 2017), foi identificada por meio do marcador SCAR SW13 (Melotto et al., 1996). A amplificação desses locos foi realizada por meio de PCR loco-específico utilizando sondas de hidrólise do tipo *TaqMan* (*ThermoFisher*). As sondas foram desenhadas utilizando o software *Primer Express* (*Life Technologies Corporation*, 2011)

A análise de retrocruzamento assistido por marcadores, nas gerações RC_3F_1, $RC_4F_{4(n)}$ e $RC_3F_{5(n)}$ (Apêndice A), foi realizada utilizando um conjunto de 24 marcadores microssatélites (SSR), conforme descrito por Morais et al. (2016). Nas gerações $RC_4F_{4:7}$ e $RC_3F_{5:8}$ (Apêndice A), além das gerações $F_{3:7}$ e $F_{4:7}$ (Apêndice B), a análise de similaridade genética seguida pela seleção de plantas mais próximas do genitor recorrente foi realizada utilizando 275 marcadores SNP genotipados na plataforma *Sequenom Technology Core* (*RAPiD Genomics*, *USA*, 2021). A análise de similaridade genética, por meio da distância euclidiana média, foi conduzida utilizando o programa GENES (Cruz, 2013), a partir do qual foram recuperadas as progênies com maior porção do genoma do parental recorrente.

2.2.3 Condução dos cruzamentos e avaliação das progênies

Cruzamentos artificiais foram realizados em casa de vegetação, na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás (Apêndices A e B). A linhagem CNFCT 16206 transgênica, RMD, foi utilizada como genitor masculino no cruzamento inicial. Assim, BRS Estilo foi cruzada com CNFCT 16206 (Apêndice A). A natureza híbrida das plantas F_1 foi 'checada' por meio do marcador *Ahas* ligado ao evento Embrapa 5.1 (Bonfim et al., 2007; Dinon et al., 2012). Por vez, os híbridos F_1 foram retrocruzados com BRS Estilo (genitor recorrente), em quatro ciclos de retrocruzamentos (RC) consecutivos. Em todos os ciclos de RC, a presença do transgene foi verificada por PCR evento-específico (marcador *Ahas*). A similaridade genética das plantas RC_3F_1 com o genitor recorrente foi determinada por meio da análise de retrocruzamento assistido por marcador utilizando um conjunto de 24 marcadores SSR, conforme descrito por Morais et al. (2016). A partir das gerações RC_4F_2

e RC_3F_2, as gerações seguintes foram avançadas utilizando o método Descendente de Uma Única Semente (SSD) até as gerações RC_4F_4 e RC_3F_5. Nessas gerações, as plantas foram colhidas individualmente e selecionadas via marcador *Ahas* ligado ao evento Embrapa 5.1 (Bonfim et al., 2007; Dinon et al., 2012) e, também, pela maior similaridade genética com o genitor recorrente (24 SSRs; Morais et al., 2016), até formarem as gerações $RC_4F_{4:5}$ e $RC_3F_{5:6}$ (Apêndice A).

Os cruzamentos também foram realizados entre plantas da cultivar BRS Sublime e plantas RC_3F_1 (BRS Estilo × CNFCT 16206) (Apêndice B). A natureza híbrida das plantas F_1 foram avaliadas por meio do marcador *Ahas* ligado ao evento Embrapa 5.1 (Bonfim et al., 2007; Dinon et al., 2012). A partir da geração F_2, as gerações seguintes foram avançadas por meio do método SSD até a geração F_3 e, em seguida, geração F_4. As plantas individuais foram selecionadas (marcador *Ahas*; evento Embrapa 5.1), colhidas e conduzidas para formarem as gerações $F_{4:5}$ e $F_{3:5}$ (Apêndice B).

Assim, as progênies pertencentes as gerações $RC_4F_{4:5}$ e $RC_3F_{5:6}$; e, também, as gerações $F_{4:5}$ e $F_{3:5}$ (Apêndices A e B, respectivamente) foram avaliadas em ensaio no campo, na época de plantio de inverno/2016, na Embrapa Arroz e Feijão. Foram avaliados a reação ao CPMMV e outras doenças, além da qualidade das sementes e o padrão comercial dos grãos tipo carioca. As duas populações foram desenvolvidas em decorrência da necessidade de se obter um maior número de sementes (Apêndices A e B). Assim, no inverno (2016), foram avaliadas 477 progênies e as testemunhas convencionais BRS FC402 e BRS Estilo, além da cultivar transgênica BRS FC401 RMD, em linhas de 2,0 m, densidade de 10 sementes/m e espaçamento de 0,45 m. Avaliou-se uma linha de testemunha intercalada para cada 10 linhas de progênies, sem repetições, totalizando 525 parcelas, em que 48 foram testemunhas. Na ocasião, ocorreu uma condição atípica no campo, com uma maior intensidade de viroses para a época de plantio, o que possibilitou uma maior intensidade de seleção.

Na avaliação da reação a doenças foi utilizada uma escala de notas de 1 a 9, em que 1 é a nota atribuída às parcelas resistentes e 9 às parcelas com plantas mortas ou totalmente comprometidas pela doença (Melo, 2009). A severidade de reação ao CPMMV foi avaliada nas 477 progênies RMD e na testemunha transgênica. Logo, a severidade de BGMV foi avaliada nas testemunhas convencionais, uma vez que os sintomas de CPMMV são confundidos ou até mesmo suplantados pelos sintomas mais severos de BGMV. Desse modo, a(s) progênie(s) de feijão-comum com melhor desempenho quanto à reação de

doenças, sobretudo severidade de CPMMV, e com grãos no padrão comercial carioca, foram selecionadas para avaliações de desempenho agronômico em condições de campo, gerações $RC_4F_{4:6}$ e $RC_3F_{5:7}$ (Apêndice A) e, também, gerações $F_{4:6}$ e $F_{3:6}$ (Apêndice B), além de ensaios em casa de vegetação: gerações $RC_4F_{4:7}$ e $RC_3F_{5:8}$; $F_{4:7}$ e $F_{3:7}$ (Apêndices A e B, respectivamente).

2.2.4 Avaliação de Desempenho Agronômico

Dois experimentos foram realizados na Embrapa Arroz e feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás), nas épocas de plantio das águas/2016 e seca/2017, para a avaliação de desempenho agronômico. Participaram das avaliações 39 progênies de feijão-comum selecionadas na época de plantio de inverno/2016, e pertencentes as gerações $RC_4F_{4:6}$ e $RC_3F_{5:7}$ (Apêndice A), e gerações $F_{4:6}$ e $F_{3:6}$ (Apêndice B), além de três testemunhas (BRS Estilo, BRS FC402 e BRS FC401 RMD). Os experimentos foram realizados utilizando o delineamento de blocos ao acaso com três repetições, sendo cada parcela de $6m^2$ e densidade de 10-12 plantas/m. As parcelas foram conduzidas utilizando-se o manejo recomendado para o cultivo do feijão (Arf et al., 2015), contudo, sem o controle de doenças e insetos-praga.

Os caracteres avaliados foram: produtividade de grãos (PROD), massa de 100 grãos (M100), aspecto visual dos grãos (AG), acamamento de planta (AP), arquitetura de planta (ARQ) e severidade de viroses (SV). Para a avaliação de PROD, todas as plantas das linhas da parcela experimental foram colhidas e trilhadas, e obteve-se o peso dos grãos em gramas (g) por $parcela^{-1}$ e, em seguida, os valores foram convertidos para kg ha^{-1} (corrigidos para 13% de umidade). Por sua vez, M100 foi determinada pela pesagem de uma amostra aleatória de 100 grãos em cada parcela, em g. Já AG foi mensurado por meio de uma amostra aleatória de 100 sementes em cada parcela e avaliado por meio de uma escala de notas de 1 a 5, em que 1 = grãos com todos os atributos desejáveis para a classe de grãos carioca (cor bege, com rajas marrom-claro e brilho opaco) e 5 = grãos totalmente fora do padrão carioca (Ramalho et al., 1998; Barili et al., 2016).

As avaliações dos caracteres AP e ARQ foram realizadas no final do ciclo da cultura e em todas as linhas da parcela experimental, sendo estimados por meio de uma escala de notas de 1 a 9 (Melo, 2009), em que, para AP, nota 1 = parcelas com ausência de plantas acamadas e 9 = parcelas com 91 a 100% de plantas acamadas. Já para ARQ, considera-se o comprimento da guia, a altura da extremidade da vagem em relação ao solo

e o ângulo de inserção das ramificações primárias, sendo, portanto, a nota 1 = parcelas com plantas com guias curtas, vagens altas e ramificações muito fechadas e 9 = parcelas com tipo de planta trepador. Por fim, SV foi avaliada em condição natural de infestação no campo (final de ciclo), e em todas as linhas da parcela, sendo a reação ao BGMV avaliada nas testemunhas convencionais (BRS Estilo e BRS FC402) e a reação ao CPMMV nas progênies RMD, bem como na cultivar transgênica (BRS FC401 RMD). As avaliações de severidade de viroses (SV) foram baseadas em uma escala de notas, em que 1 = ausência de sintomas e 9 = parcela com 80% a 100% de plantas doenças, ou 60% a 100% de tecidos infectados (Melo, 2009).

2.2.4.1 Análises Genética e Estatística

Análises de variâncias individuais e conjuntas foram estimadas para todos os caracteres. Os efeitos de progênies e ambientes foram considerados fixos. As médias foram comparadas por meio do teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade (Scott & Knott, 1974). A precisão experimental foi estimada, também, por meio da acurácia de seleção (AS), proposta por Resende & Duarte (2007). As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico GENES (Cruz, 2013).

2.2.5 Inoculação e avaliação de plantas em casa de vegetação

Entre as 39 progênies avaliadas nos dois experimentos de campo, águas/2016 e seca/2017, nas gerações $RC_4F_{4:6}$ e $RC_3F_{5:7}$; $F_{3:6}$ e $F_{4:6}$ (Apêndices A e B, respectivamente), progênie(s) elite foram selecionadas com notas ≤ 3,0 para severidade de viroses, e foram avaliadas em casa de vegetação para a caracterização fenotípica à reação ao CPMMV e para a caracterização molecular por meio da seleção assistida por marcadores (SAM). Os seguintes marcadores foram utilizados: SCAR SW13, ligado ao gene *I* (BCMV; Melotto et al., 1996) e *Ahas*, ligado ao evento Embrapa 5.1 (BGMV; Dinon et al., 2012). Além disso, realizou-se a análise de similaridade genética por meio de 275 locos SNP (Ver subitem 2.2.2).

Dessa maneira, a(s) progênie(s) elite foram colhidas individualmente, e dois ensaios em casa de vegetação foram conduzidos na Embrapa Arroz e feijão. Considerou-se 20 plantas por família nas gerações $RC_4F_{4:7}$ e $RC_3F_{5:8}$; $F_{3:7}$ e $F_{4:7}$ (Apêndices A e B, respectivamente). Para a caracterização molecular e análise de similaridade genética, amostras de tecido foliar individuais foram coletadas aos 20 dias após plantio para a extração

de DNA e genotipagem (Ver subitem 2.2.2). As cultivares convencionais BRS Estilo e BRS Sublime (Apêndices A e B), e a cultivar transgênica BRS FC401 RMD e a linhagem transgênica CNFCT 16207, foram utilizadas como testemunhas.

No primeiro ensaio, plantas individuais na(s) progênie(s) elite foram avaliadas para severidade de CPMMV e àquelas geneticamente similares foram selecionadas para o segundo ensaio, sendo realizadas, novamente, a analise molecular (SAM) e a reinoculação para reação ao CPMMV.

As inoculações mecânicas ao CPMMV foram realizadas nas plântulas aos oito dias após semeadura, com um substrato extraído de folhas de plantas sintomáticas da linhagem CNFCT 16207 (Souza et al., 2018), previamente inoculadas com o isolado de CPMMV (*strain* CPMMV: BR:GO:14 – *GenBank* MK202583), em 0.1M de tampão fosfato contendo sulfito de sódio, adicionado de uma pitada de *carborundum* (Cheruku et al., 2017; Alves-Freitas, 2019). Aos 35 dias após inoculação, todas as plantas foram avaliadas individualmente para a severidade de sintomas de CPMMV, por meio de uma escala de notas de 1 a 9, sendo 1 = ausência de sintomas e 9 = plantas com sintomas severos de mosaico e, ou, encarquilhamento das folhas. As plantas com ausência de sintomas ou apresentando mosaico leve ou, ainda, mosaico com deformações foliares leves foram consideradas resistentes (notas 1, 2 e 3, respectivamente). Já as plantas com mosaico severo, com ou sem deformações foliares ou com mosaico e deformações foliares severos e, ainda, apresentando encarquilhamento proeminente em praticamente todas as folhas, foram consideradas suscetíveis (4 ou superior) (dados não publicados). Mais atualmente, *primers* específicos para CPMMV foram ‘desenhados’ para uso por meio de *RT-PCR*, sendo o primeiro isolado de CPMMV encontrado no Estado de Goiás, com o genoma sequenciado, e que infecta naturalmente feijão-comum (Faria et al., 2016; Alves-Freitas et al., 2019), e utilizado no presente estudo.

2.3 RESULTADOS

Entre as 39 progênies, 10 foram derivadas do cruzamento BRS Estilo × CNFCT 16206, gerações $RC_4F_{4:6}$ e $RC_3F_{5:7}$ (Apêndice A), e 29 do cruzamento BRS Sublime × RC_3F_1 (BRS Estilo × CNFCT 16206 RMD), gerações $F_{4:6}$ e $F_{3:6}$ (Apêndice B). Adicionalmente, as 39 progênies e a testemunha transgênica apresentaram resistência efetiva ao BCMV e ao BGMV. Como esperado, as testemunhas convencionais foram suscetíveis ao BGMV, com médias de severidade de viroses (SV) de 5,8. As médias das progênies e testemunhas para SV referente ao BGMV foram de 3,48 e 5,70, respectivamente (Tabela 2.1). Não foi possível avaliar a severidade dos sintomas de CPMMV nas testemunhas convencionais, uma vez que os sintomas são totalmente confundidos ou suplantados pelos sintomas de BGMV (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019). A severidade de CPMMV foi avaliada somente nas progênies e na testemunha transgênica, sendo que esta apresentou média de 5,5 para SV. Assim, 69% das progênies avaliadas foram suscetíveis ao CPMMV, com médias de SV variando de 3,6 a 4,3. Por sua vez, 31%, ou seja, 12 progênies elite apresentaram as menores médias de notas para SV ≤ 3,0 (Tabelas 2.1 e 2.4). No geral, as notas médias de SV variaram de 2,3 a 5,8, confirmando a variabilidade genética para reação às viroses em condições de campo (Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3).

Considerando os dois experimentos em condições de campo, os coeficientes de variação (CV%) variaram de 3,6 para massa de 100 grãos (M100) a 28,1 para produtividade de grãos (PROD) (Tabela 2.2). As estimativas de acurácia seletiva (AS) de progênies foram consideradas altas (0,71 ≤ AS < 0,90) para PROD, M100, aspecto visual de grãos (AG) e SV; e moderadas (0,50 ≤ AS < 0,70) para arquitetura de planta (ARQ) e acamamento de planta (AP) (Tabela 2.2). Houve diferenças significativas para todos os caracteres considerando os dois experimentos, indicando que há variabilidade genética entre os tratamentos. Neste contexto, também houve diferenças significativas entre as testemunhas para PROD e AP. Já entre as progênies houve diferenças significativas para todos os caracteres, exceto ARQ (águas/2016 e seca/2017) e AP (seca/2017), indicando maior variabilidade genética para os demais caracteres (Tabela 2.2).

Em relação à análise conjunta, houve diferenças significativas entre tratamentos, entre progênies e entre testemunhas, exceto para progênies ao considerar ARQ e testemunhas (SV). Diferenças significativas também foram verificadas para a interação progênies (P) *vs* ambientes (E), exceto para os caracteres ARQ, AP e AG. Adicionalmente, a interação

testemunhas (Test) *vs* ambientes (E) apresentou efeito significativo apenas para AP (Tabela 2.3).

Tabela 2.1. Médias de severidade de viroses, caracteres agronômicos e de qualidade de grãos, avaliados em 39 progênies e três cultivares testemunhas, em Santo Antônio de Goiás, Goiás, nas épocas de plantio das águas/2016 e seca/2017.

Identificação de progênie	PROD[b]	M100	ARQ[d]	AP[e]	AG[f]	SV[g]
356-27.1	1664a[a]	23,9a	4,3a	3,6a	2,1b	2,8a
477-4.1	1459a	23,1b	4,3a	3,6a	2,5b	3,8b
BRS FC401RMD	1387a	23,2b	6,6c	7,1c	2,3b	5,5c
356-5.1	1359a	21,8c	4,3a	3,3a	1,6a	2,5a
398-3.1	1357a	22,0c	4,8a	4,8b	2,6c	3,0a
184-16.1	1348a	23,1b	4,3a	4,0a	1,6a	3,0a
389-8.1	1335a	22,9b	4,1a	3,8a	2,0a	4,0b
356-3.1	1292a	23,2b	4,3a	3,6a	1,8a	3,0a
211-1.1	1288a	23,8a	4,5a	4,0a	1,1a	3,6b
195-10.1	1275a	22,3c	5,3b	5,1b	1,8a	3,8b
398-14.1	1275a	24,3a	4,0a	4,0a	1,6a	3,0a
422-39.1	1220a	22,9b	4,8a	4,3a	1,5a	2,8a
185-10.1	1217a	23,7a	4,5a	3,1a	2,0a	3,6b
336-3.1	1211a	21,5c	4,5a	4,0a	2,3b	2,8a
183-33.1	1183a	23,5b	4,6a	4,1a	1,8a	3,8b
336-14.1	1179a	21,2c	4,0a	4,1a	2,8c	4,0b
477-10.1	1165a	22,5c	5,0a	3,8a	2,1b	4,1b
198-29.1	1138b	23,9a	4,0a	3,3a	1,5a	4,3b
295-10.1	1122b	22,0c	4,0a	3,8a	1,6a	3,6b
477-9.1	1093b	22,8b	4,0a	3,5a	1,5a	4,3b
201-16.1	1092b	23,9a	4,1a	4,1a	1,5a	3,8b
367-8.1	1079b	22,8b	4,8a	4,3a	1,5a	3,6b
184-12.1	1074b	22,7b	5,0a	4,6b	2,0a	2,8a
417-22.1	1072b	24,5a	4,1a	3,5a	1,5a	2,5a
520-17.1	1069b	24,5a	4,6a	4,0a	2,6c	3,6b
450-29.1	1058b	22,4c	4,5a	3,8a	2,3b	3,6b
224-24.1	1046b	23,6a	4,5a	4,1a	2,5b	4,1b
389-14.1	1023b	23,4b	4,1a	3,3a	1,6a	3,6b
BRS Estilo	1022b	21,6c	5,3b	4,6b	1,6a	5,8c
554-27.1	1005b	22,8b	4,5a	3,5a	3,0c	3,6b
362-15.1	984b	22,9b	4,6a	4,3a	2,6c	3,6b

Tabela 2.1. Continuação.

398-15.1	984b	23,0b	4,1a	3,5a	1,5a	4,0b
554-19.1	956b	21,7c	4,8a	3,6a	3,0c	3,6b
184-7.1	943b	22,1c	4,5a	3,8a	1,8a	4,1b
477-3.1	916b	23,4b	4,5a	3,6a	2,8c	4,1b
520-10.1	916b	22,6b	5,1b	4,0a	1,8a	3,6b
544-26.1	898b	21,9c	4,5a	3,5a	3,1c	3,8b
367-19.1	898b	23,9a	4,5a	4,0a	1,8a	3,6b
520-20.1	890b	23,1b	4,5a	3,8a	2,3b	3,6b
554-15.1	880b	22,7b	4,8a	3,5a	2,3b	2,8a
554-23.1	857b	21,5c	4,5a	3,0a	2,1b	2,3a
BRS FC402	736b	22,0c	6,3c	5,3b	2,6c	5,8c
Média geral	1118	22,90	4,58	3,96	2,04	3,64
Média de progênie	1123	22,95	4,46	3,83	2,03	3,48
Média de testemunha	1048	22,30	6,06	5,66	2,16	5,70

[a]Médias seguidas da mesma letra não diferem significamente pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade; [b] PROD, produtividade de grãos, em kg/ha^{-1}; [c] M100, massa de 100 grãos, em gramas; [d] ARQ, arquitetura de planta; [e] AP, acamamento de planta. Notas de 1 a 9: 1, plantas adaptadas à colheita mecânica e 9, plantas não adaptadas à colheita mecanizadas; [f] AG, aspecto visual de grãos. Notas de 1 a 5: 1, grãos no padrão comercial do tipo carioca e 5, grãos fora do padrão comercial para a classe carioca; [g] SV, severidade as viroses (notas de 1 a 9): 1, plantas resistentes; 2-3, moderadamente resistentes; 4-9, suscetíveis. BGMV – *Bean Golden mosaic virus*, avaliado nas testemunhas convencionais (BRS Estilo e BRS FC402), e CPMMV – *Cowpea mild motle virus*, avaliado nas progênies elite e na testemunha transgênica (cv. BRS FC401 RMD).

As médias obtidas por meio dos experimentos em condições de campo foram alocadas em dois e três grupos (Tabela 2.1). A produtividade de grãos (PROD, Kg ha^{1}) variou de 736 a 1664 kg ha^{-1} e 41% das progênies avaliadas apresentaram médias de produtividade de grãos estatisticamente iguais à testemunha transgênica BRS FC401 RMD. Para M100, os valores médios variaram de 21,2 a 24,5 g entre as progênies e 26% das progênies apresentaram médias estatisticamente maiores do que a melhor testemunha (RMD) (Tabela 2.1). Já para ARQ e AP, as médias de notas variaram de 4,0 a 6,6 e 3,0 a 7,1, respectivamente. Adicionalmente, para ARQ, 95% das progênies ficaram alocadas no grupo das melhores médias, superiores estatisticamente à melhor testemunha (BRS Estilo), e AP, 92% das progênies apresentaram médias estatisticamente superiores, também, em relação às melhores testemunhas (BRS Estilo e BRS FC402). As médias de notas para AG variaram de 1,1 a 3,1 e 56% das progênies apresentaram notas estatisticamente iguais à testemunha BRS Estilo (Tabela 2.1).

Tabela 2.2. Resumo da análise de variância individual para os caracteres produtividade de grãos (PROD, kg ha^{-1}), massa de 100 grãos (M100, g), arquitetura de planta (ARQ), acamamento de planta (AP), aspecto visual de grãos (AG) e severidade de viroses (SV), avaliados em 39 progênies e três testemunhas, em Santo Antônio de Goiás, Goiás, nas épocas de plantio das águas/2016 e seca/2017.

Fonte de variação	GL[a]	Águas/2016											
		PROD.		M100		ARQ[c].		AP[d]		AG[e]		SV[f]	
		QM[b]	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor
Tratamentos (T)	41	313346	0,001	2,42	0,001	1,79	0,001	2,04	0,001	1,14	0,001	2,51	0,001
Progênies (P)	38	301774	0,001	2,49	0,001	0,58	0,170	0,86	0,040	1,13	0,001	0,90	0,006
Testemunhas (Test.)	2	410146	0,032	1,13	0,170	3,00	0,002	8,11	0,001	1,33	0,007	1,00	0,124
P *vs* Test.	1	559489	0,029	2,40	0,053	45,16	0,001	34,87	0,001	1,12	0,039	66,48	0,001
Resíduos	82	114605	-	0,62	-	0,45	-	0,54	-	0,25	-	0,46	-
Média geral	-	-	1287	-	21,93	-	3,84	-	3,21	-	1,99	-	3,38
Média progênies	-	-	1306	-	21,97	-	3,67	-	3,06	-	1,96	-	3,17
Média testemunhas	-	-	1047	-	21,43	-	6,00	-	5,11	-	2,33	-	6,00
CV(%)[g]	-	-	26,28	-	3,60	-	17,58	-	22,91	-	25,48	-	20,22
AS[h]	-	-	0,78	-	0,86	-	0,50	-	0,61	-	0,87	-	0,70
		Seca/2017											
Fonte de variação	GL	PROD.		M100		ARQ.		AP		AG		SV	
		QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor
Tratamentos (T)	41	148084	0,002	3,82	0,001	0,71	0,007	1,88	0,007	0,67	0,008	2,38	0,001
Progênies (P)	38	142904	0,004	3,78	0,001	0,55	0,082	1,19	0,081	0,69	0,006	2,02	0,002
Testemunhas (Test.)	2	270676	0,026	4,00	0,020	0,77	0,135	4,33	0,007	0,44	0,294	0,11	1,000
P *vs* Test.	1	99718	0,240	4,95	0,026	6,98	0,001	23,21	0,001	0,02	1,000	20,44	0,001
Resíduos	82	71401	-	0,97	-	0,38	-	0,82	-	0,35	-	0,68	-

Tabela 2.2. Continuação.

Média geral	-	-	948,7	-	23,87	-	5,37	-	4,78	-	2,16	-	3,99
Média progênies	-	-	940,9	-	23,93	-	5,30	-	4,66	-	2,17	-	3,88
Média testemunhas	-	-	1051	-	23,16	-	6,20	-	6,33	-	2,11	-	5,44
CV(%)	-	-	28,16	-	4,13	-	11,47	-	18,94	-	27,62	-	20,80
AS	-	-	0,70	-	0,86	-	0,54	-	0,60	-	0,70	-	0,81

[a] GL, grau de liberdade; [b] QM, quadadros médios; [c] ARQ, arquitetura de planta e [d] AP, acamamento de planta. Notas de 1 a 9: 1, plantas adaptadas à colheita mecânica e 9, plantas não adaptadas à colheita mecanizadas; [e] AG, aspecto visual de grãos. Notas de 1 a 5: 1, grãos no padrão comercial do tipo carioca e 5, grãos fora do padrão comercial para a classe carioca; [f] SV, severidade as viroses (notas de 1 a 9): 1, plantas resistentes; 2-3, moderadamente resistentes; 4-9, suscetíveis. BGMV – *Bean Golden mosaic virus*, avaliado nas testemunhas convencionais (BRS Estilo e BRS FC402), e CPMMV – *Cowpea mild motle virus*, avaliado nas progênies elite e na testemunha transgênica (cv. BRS FC401 RMD); [g] CV (%), coeficiente de variação e [h] AS, acurácia seletiva de progênies

Tabela 2.3. Resumo da análise de variância conjunta para os caracteres produtividade de grãos (PROD, kg ha^{-1}), Massa de 100 grãos (M100, g), arquitetura (ARQ), acamamento de planta (AP), aspecto visual de grãos (AG) e severidade de viroses (SV), avaliados em 39 progênies e três testemunhas em Santo Antônio de Goiás, Goiás, nas épocas de plantio das águas/2016 e seca/2017.

Fonte de variação	GL[a]	PROD.		M100		ARQ.[c]	
		QM[b]	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor
Tratamentos (T)	41	218862	0,001	4,42	0,001	1,82	0,001
Progênies (P)	38	200082	0,001	4,37	0,001	0,66	0,060
Testemunhas (Test.)	2	638407	0,002	3,95	0,001	2,88	0,002
T *vs* Ambientes (E)	41	242568	0,001	1,82	0,013	0,68	0,043
P *v*s E	38	244596	0,001	1,89	0,010	0,47	0,439
Test. *vs* E	2	42415	1,000	1,18	0,233	0,88	0,148
Resíduo	168	95341	-	0,80	-	0,46	-
Média geral	-	-	1118	-	22,90	-	4,60
Média progênies	-	-	1123	-	22,95	-	4,49
Média testemunhas	-	-	1048	-	22,30	-	6,11

Fonte de variação	GL	AP[d]		AG[e]		SV[f]	
		QM	P-valor	QM	P-valor	QM	P-valor
Tratamentos (T)	41	2,99	0,001	1,56	0,001	3,63	0,001
Progênies (P)	38	1,18	0,014	1,59	0,001	1,79	0,001
Testemunhas (Test.)	2	10,05	0,001	1,55	0,009	0,22	1,000
T *vs* Ambientes (E)	41	0,93	0,114	0,25	1,000	1,25	0,001
P *v*s E	38	0,86	0,193	0,24	1,000	1,13	0,002
Test. *vs* E	2	2,38	0,003	0,22	1,000	0,88	0,220
Resíduo	168	0,71	-	0,32	-	0,58	-
Média geral	-	-	4,00	-	2,07	-	3,68
Média progênies	-	-	3,86	-	2,06	-	3,52
Média testemunhas	-	-	5,72	-	2,22	-	5,72

[a] GL, grau de liberdade; [b] QM, quadadros médios; [c] ARQ., arquitetura de planta e [d] AP, acamamento de planta. Notas de 1 a 9: 1, plantas adaptadas à colheita mecânica e 9, plantas não adaptadas à colheita mecanizadas; [e] AG, aspecto visual de grãos. Notas de 1 a 5: 1, grãos no padrão comercial do tipo carioca e 5, grãos fora do padrão comercial para a classe carioca; [f] SV, severidade as viroses (notas de 1 a 9): 1, plantas resistentes; 2-3, moderadamente resistentes; 4-9, suscetíveis. BGMV – *Bean Golden mosaic virus*, avaliado nas testemunhas convencionais (BRS Estilo e BRS FC402), e CPMMV – *Cowpea mild motle virus*, avaliado nas progênies elite e na testemunha transgênica (cv. BRS FC401 RMD).

Oito, entre as 12 progênies elite selecionadas como mais tolerantes ao CPMMV (SV ≤ 3,0), apresentaram valores alocados no grupo das maiores médias para PROD (Tabelas 2.1 e 2.4). Para M100, três das 12 progênies elite selecionadas foram, em média, superiores estatisticamente à testemunha transgênica (RMD) (Tabelas 2.1 e 2.4). Vale destacar, também, que as 12 progênies elite apresentaram médias de ARQ estatisticamente maiores do que a testemunha convencional BRS Estilo (Apêndice A), e, sobretudo, em relação à testemunha transgênica, a qual apresenta limitação quanto à colheita mecanizada (Tabelas 2.1 e 2.4). Resultado similar foi evidenciado para AP, sendo que 10 entre as 12 progênies elite, apresentaram médias estatisticamente maiores em relação às testemunhas convencionais e transgênica (Tabelas 2.1 e 2.4). Para AG, sete das 12 progênies elite selecionadas alocaram no grupo das maiores médias, sendo, estatisticamente, o mesmo grupo da testemunha BRS Estilo. As demais progênies não diferiram a partir da média da testemunha transgênica, que, também, pertence ao grupo de grãos do tipo carioca (Tabelas 2.1 e 2.4).

As 12 progênies elite que apresentaram as menores médias de nota para SV (≤ 3,0) (Tabelas 2.1 e 2.4) foram inoculadas mecanicamente com o isolado de CPMMV, descrito por Alves-Freitas et al. (2019), e avaliadas em casa de vegetação (Tabela 2.4). Além disso, todas as progênies elite selecionadas foram avaliadas, também, quanto à presença do gene *I* (marcador SCAR SW13; Melotto et al., 1996) e a presença do evento Embrapa 5.1 (marcador *Ahas*; Dinon et al., 2012) (Tabela 2.4). Foi evidenciado a presença do Gene *I*, que confere resistência ao BCMV, em 12 progênies elite e nas testemunhas. Quanto ao transgene (evento Embrapa 5.1), 11 das 12 progênies elite apresentaram o evento Embrapa 5.1, que confere resistência efetiva ao BGMV, com exceção, portanto, da progênie 336-3.1 (Tabela 2.4).

Ademais, a resistência ao CPMMV, por meio da inoculação artificial, foi evidenciada nas testemunhas convencionais, assim como a suscetibilidade nas testemunhas transgênicas (Tabela 2.4). Adicionalmente, 41% das progênies elite selecionadas (cinco entre as 12) foram consideradas resistentes e, ou, tolerantes ao CPMMV, sendo todas as cinco resistentes, também, ao BGMV e ao BCMV (Tabela 2.4). Desse modo, as progênies 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 e 422-39.1 apresentaram resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV, além de outras características agronômicas desejáveis, como porte ereto, resistência ao acamamento e grãos no padrão comercial carioca (Tabelas 2.1 e 2.4). Das cinco progênies resistentes ao CPMMV, apenas a progênie 184-12.1 é derivada

do cruzamento entre a cultivar BRS Estilo e a linhagem CNFCT 16206. As demais são oriundas do cruzamento (BRS Sublime × BRS Estilo GM) (Apêndices A e B; Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Caracterização fenotípica e molecular de progênies elite e testemunhas, avaliadas em casa de vegetação em Santo Antônio de Goiás, Goiás[a].

Sequência	Geração de progênie	Identificação de progêniea	CPMMV[b] (Fenotipagem)	BGMV[c] (Gene *Ahas*)	BCMV[d] (Gene *I*)
1	GII[e]	184-12.1	RR	RR	RR
2	GII	184-16.1	Het	RR	RR
3	GIII	336-3.1	Het	Het	RR
4	GIII	356-3.1	Het	RR	RR
5	GIII	356-5.1	RR	RR	RR
6	GIII	356-27.1	Het	RR	RR
7	GIII	398-3.1	RR	RR	RR
8	GIII	398-14.1	Het	RR	RR
9	GIII	417-22.1	RR	RR	RR
10	GIII	422-39.1	RR	RR	RR
11	GIII	554-15.1	Het	RR	RR
12	GIII	554-23.1	Het	RR	RR
1	-	CNFCT 16207[f]	SS	RR	RR
2	-	BRS FC401RMD	SS	RR	RR
3	-	BRS Sublime[g]	RR	SS	RR
4	-	BRS Estilo	RR	SS	RR

[a] Casa de vegetação, '*screning*': RR, homozigoto resistente; Het, Heterozigoto; SS, homozigoto suscetível; [b] Inoculação mecânica utilizando isolados de CPMMV (Alves-Freitas et al., 2019); [c] Seleção assistida por meio do marcador *Ahas* (Bonfim et al., 2007; Dinon et al., 2012); [d] Seleção assistida por meio do marcador SCAR SW13 ligado ao gene *I* (Melotto et al., 1996); [e] GII e GIII, gerações $RC_4F_{4:7}$ e $RC_3F_{5:8}$ a partir do cruzamento entre BRS Estilo × CNFCT 16206; gerações $F_{4:7}$ e $F_{3:7}$ a partir do cruzamento entre (BRS Sublime × BRS Estilo GM), respectivamente; [f] CNFCT 16207, linhagem geneticamente modificada GM de feijão comum, resistente ao mosaico-dourado (Evento Embrapa 5.1; Tecnologia RMD) (Souza et al., 2018); [g] BRS, cultivares convencionais de feijão-comum desenvolvidas pela Embrapa.

2.4 DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas fitossanitários da cultura do feijão é a alta incidência de doenças virais, entre elas o mosaico-dourado do feijoeiro, causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um *Begomovirus* da família *Geminiviridae*; o mosqueado-suave-do-caupi, causado pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), um *Carlavirus* da família *Betaflexiviridae* e o *Bean golden common virus* (BCMV), um *Potyvirus* da família *Potyviridae*. O mosaico-dourado do feijoeiro é atualmente a principal virose da cultura no Brasil, responsável por perdas de rendimento entre 40 e 100%, dependendo da incidência, da época de semeadura e da cultivar utilizada. A época de maior ocorrência do BGMV é no plantio da seca (de janeiro a março), que coincide com as altas populações do inseto vetor, a mosca-branca (*Bemisia tabaci)*, neste período do ano. Os sintomas do mosaico-dourado são amarelecimento das folhas, nanismo das plantas, deformação das vagens e grãos, além do abortamento das flores (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

O mosqueado-suave-do-caupi apresenta sintomas semelhantes aos do mosaico-dourado, porém menos severos, incluindo o encarquilhamento ou enrugamento das folhas associado à necrose das nervuras, clorose ou mosaico leve (mosqueado), principalmente em folhas jovens, menor desenvolvimento das plantas e potencial redução da produtividade, dependendo do nível de resistência da cultivar adotada (Marubayashi et al., 2010; Faria et al., 2016). Embora já descrito no Brasil como patogênico ao feijão desde 1980, os sintomas do CPMMV vinham sendo confundidos, ou até mesmo suprimidos, em campo, pelos sintomas do mosaico-dourado, os quais são muito mais agressivos. Já o mosaico comum, responsável por perdas de até 98% da produção de feijão no passado, é uma doença que tem sido erradicada no Brasil, uma vez que todas as linhagens de feijão desenvolvidas pela Embrapa possuem o gene *I* de resistência a este complexo de vírus (Singh & Schwartz, 2010).

Assim, o manejo do mosaico comum tem sido realizado de forma efetiva pela obtenção de cultivares comerciais resistentes ao vírus. No entanto, o manejo do mosaico-dourado e do mosqueado-suave-do-caupi ainda é realizado majoritariamente pela aplicação de inseticidas para o controle das populações do inseto vetor, a mosca-branca. Em algumas regiões são realizadas até 15 pulverizações de inseticidas por safra, o que pode ocasionar sérios danos ambientais, como contaminação de mananciais e do solo, efeitos

letais na fauna, incluindo polinizadores, bem como efeitos nocivos à saúde humana (Paula et al., 2015).

Por essa razão, em um esforço de mais de 20 anos de pesquisa, a Embrapa desenvolveu a primeira cultivar de feijão-comum geneticamente modificada (GM) do mundo, resistente ao mosaico-dourado (RMD), originada do evento Embrapa 5.1. Essa cultivar, registrada como BRS FC401 RMD, é imune ao BGMV e apresenta diversas outras características agronômicas desejáveis, como grãos tipo carioca com padrão comercial, alta produtividade e resistência ao mosaico comum do feijoeiro, além de resistência moderada à antracnose, à ferrugem e ao crestamento bacteriano comum (Souza et al., 2018). No entanto, nas avaliações finais de campo para a liberação comercial dessa cultivar, foram observados sintomas severos de outra doença viral, o mosqueado-suave-do-caupi, cujos sintomas vinham sendo confundidos ou suplantados pelos sintomas de BGMV. Atualmente, potenciais surtos de CPMMV são uma ameaça à produtividade do feijoeiro (Faria et al., 2016).

Como as duas viroses ocorrem simultaneamente no campo, os produtores têm buscado compensar as reduções de rendimento de grãos na época de plantio da seca, por meio de maiores produções e produtividade na época de plantio de inverno. Contudo, lança-se mão de maiores quantidades de insumos, além depender de sistemas de irrigação (Faria et al., 2016). Dessa forma, o desenvolvimento de linhagens que apresentem resistência ao BGMV e ao CPMMV simultaneamente, representa significativo ganho para a produção de feijão-comum no Brasil.

No presente trabalho, foram desenvolvidas e selecionadas 12 linhagens transgênicas elite de grão do tipo carioca com padrão comercial e com resistência às três viroses BCMV, BGMV e CPMMV por meio do uso de métodos convencionais de melhoramento e ferramentas moleculares (Tabela 2.4). Assim, a incorporação de alelos de resistência por meio da técnica de hibridização, juntamente com a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (Miklas et al., 2006; Assefa et al., 2019; Souza et al., 2018; Patroti et al., 2019), tem se mostrado um método viável e sustentável quando se busca o desenvolvimento de cultivares com resistência genética, sobretudo para doenças de herança monogênica (Souza et al., 2013, 2018; Meziadi et al., 2017). Vale mencionar que vários estudos têm identificado, também, marcadores moleculares ligados a locos de resistência a doenças de herança quantitativa (QTL) (Baumgartner et al., 2015; Pilet-Nayel et al., 2017; Assefa et al., 2019), inclusive QTLs ligados à resistência a viroses (Maule et al., 2007).

É oportuno mencionar que a resistência quantitativa tende a ser mais douradora que a resistência qualitativa (Wendland et al., 2018), porém os estudos de genes de efeito maior para resistência a patógenos em programas de melhoramento são mais frequentes (Meziadi et al., 2017). Além disso, a resistência quantitativa é mais difícil de ser explorada e tem um custo fisiológico maior para a planta (Pilet-Nayel et al., 2017). Nesse contexto, Faria et al. (2014b) observaram segregação Mendeliana de 3:1 (plantas transgênicas e não transgênicas) em plantas de feijão transgênicas e encontraram herança monogênica, com relação intra-alélica de dominância completa para o transgene (Evento Embrapa 5.1) e para a reação ao BGMV. Resultado semelhante tem sido confirmado quanto à resistência ao CPMMV na cultivar BRS Sublime (dados não publicados).

Vale mencionar que locos de resistência ao CPMMV estão em fase de caracterização (Souza, T. L. P. O., comunicação pessoal; dados não publicados). Adicionalmente, Arias et al. (2015) identificaram dois genes de efeitos maiores determinando a tolerância ao CPMMV em soja, com predominância de efeitos aditivos e herdabilidade "adequada" para a seleção. Adicionalmente, Cheruku et al. (2017) estudaram o controle da herança de reação ao CPMMV, também em soja, e evidenciaram herança monogênica com efeito intra-alélico de dominância completa. Nos últimos anos, portanto, tem aumentando a compreensão da natureza molecular e dos mecanismos associados a genes de resistência a vírus (Meziadi et al., 2016; 2017). Genes de efeitos dominante e recessivo têm sido caracterizados em nível molecular, em várias culturas como arroz, tomate, soja, tabaco, batata e inclusive em feijão, o que tem propiciado entender melhor os princípios relacionados à imunidade a vírus e a busca por estratégias para o desenvolvimento de cultivares com resistência genética, lançando mão de métodos convencionais de melhoramento e ferramentas biotecnológicas (Bonfim et al., 2007; Maule et al., 2007; Singh & Schwartz, 2010; Faria et al., 2016; Meziadi et al., 2017; Souza et al., 2018).

A técnica de piramidação de alelos tem sido uma dessas estratégias, sobretudo, visando conferir maior durabilidade de resistência. A principal abordagem dessa técnica é introgredir alelos de resistência funcionalmente diferentes contra o mesmo patógeno (Patroti et al.,2019) e, assim, aumentar a durabilidade da resistência, já que possibilita a expressão de genes (*R*) de resistência que atuam contra vários componentes do ciclo de infecção. Para viroses, por exemplo, com a incorporação de alelos diferentes contra mais de uma estirpe do mesmo vírus, várias mutações simultâneas tendem a ser necessárias em inúmeros genes de avirulência (*avr*) antes que a resistência seja quebrada (Maule et al., 2007).

Outra abordagem importante visando resistência genética é a resistência múltipla a doenças. Dessa maneira, a introgressão de alelos de resistência contra mais patógenos visando este tipo de resistência, pode ser uma maneira, também, de aumentar a durabilidade da resistência no campo, além de ser um método sustentável para o controle de doenças que ocorrem simultaneamente em condições de campo (Baumgartner et al., 2015; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). Para as viroses, a durabilidade da resistência em relação à plasticidade genética do vírus é um fator importante para o melhoramento de espécies de importância agrícola (Maule et al., 2007; Baumgartner et al., 2015).

Assim, para a avaliação de severidade de viroses (SV), sobretudo BGMV e CPMMV, dois experimentos de campo foram conduzidos na Embrapa Arroz e feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás. Os valores de coeficiente de variação (CV) estimados para as 39 progênies e as testemunhas, indicaram boa precisão experimental, considerando que os experimentos foram conduzidos em campo (Tabela 2.2). Resultados similares de CV foram encontrados por Pereira et al. (2019) para reação à murcha de fusário, em campo. Adicionalmente, as estimativas de acurácia seletiva (AS) foram consideradas de moderada a alta, indicando boa qualidade experimental (Tabela 2.2). De acordo com Resende & Duarte (2007), AS representa o melhor parâmetro para estimar a precisão experimental quando se avalia linhagens e, ou, cultivares, e reflete, também, as variações ambientais e genéticas (Ramalho et al., 2012). Souza et al. (2018) encontraram valores de AS de 0,97 e 0,89 para severidade de BGMV e severidade de CPMMV, respectivamente, quando avaliaram linhagens GM elite de feijão-comum, também em condições de campo. A adequada precisão experimental possibilitou discriminar as 39 progênies avaliadas para produtividade de grãos (PROD, em kg ha^{-1}), massa de 100 grãos (M100, em g), arquitetura de planta (ARQ), acamamento de planta (AP), aspecto visual de grãos (AG) e, sobretudo, SV, em condições de campo (Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3), o que permitiu selecionar plantas mais resistentes às viroses (Tabelas 2.1 e 2.4).

A resposta diferencial das progênies sob condições de campo já era esperada, e pode ser explicada pelas diferenças climáticas entre as épocas de plantio (Pereira et al., 2019) e, consequentemente, da pressão diferenciada de viroses, com maior intensidade de viroses na época de plantio da seca (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). A superioridade das progênies, juntamente com a testemunha transgênica, em relação às testemunhas convencionais (Tabela 2.1), corrobora os resultados encontrados por Souza et al. (2018), indicando que a presença do transgene (evento Embrapa 5.1) aumentou a estabilidade de

produtividade de grãos em linhagens GM elite de feijão-comum. Entre as linhagens GM avaliadas pelos autores acima, com maiores estabilidades de produtividade, estão as linhas: CNFCT 16205 (cv. BRS FC401 RMD; prefixo referente à resistência ao mosaico-dourado), CNFCT 16206 (RMD; alto padrão comercial de grão tipo carioca, sendo utilizada como genitor masculino; Apêndices A e B), além da linhagem CNFCT 16207 (RMD; utilizada como fonte de propagação de inóculo de CPMMV) (Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019). A variação evidenciada para PROD por meio da interação significativa entre progênie (P) *vs* ambientes (E), representa um potencial de seleção continuada para as progênies elite 184-12.1, 356-5.1, 398-3.1, 417-22.1 e 422-39.1 (Tabelas 2.1, 2.3 e 2.4) em ensaios agronômicos futuros, visando a estimação de estabilidade e adaptabilidade.

Futuros experimentos de performance agronômica das progênies elite de segunda geração, portadoras do evento transgênico Embrapa 5.1 (Tabela 2.4), tem o potencial de continuar os estudos sobre a severidade dos sintomas de CPMMV em condições de campo, bem como a estimativa das perdas de produtividade e de qualidade de grãos com a doença. Estudos iniciais, após avaliações de campo com a cultivar transgênica BRS FC401 RMD, têm evidenciado, em linhagens GM de feijão, perdas de produtividade estimadas em 17 a 69%, devido à incidência de CPMMV (Faria et al., 2016). Assim, a identificação dos sintomas de CPMMV é importante para entender o patossistema da doença (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). Adicionalmente, o evento Embrapa 5.1 aportado em feijão-comum de grãos carioca, se apresenta, atualmente, como a maneira mais sustentável de controle ao BGMV e ao BCMV. Portanto, o uso integrado da tecnologia RMD com produtos químicos direcionados ao controle da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), tende a possibilitar um uso mais racional e em menor escala de inseticidas. É importante destacar os efeitos do uso indiscriminado de inseticidas para o manejo de *B. tabaci* e das viroses transmitidas por este inseto vetor, em várias culturas de importância agrícola. Tal situação tem contribuído para o surgimento de populações de mosca-branca resistentes aos principais inseticidas, além de apresentar eficiência parcial e efeitos negativos ao ambiente (Bonfim et al., 2007; Paula et al., 2015; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

A efetiva resistência ao BGMV pode ser refletida por meio dos resultados encontrados para PROD, sendo confirmado por meio do valor médio da testemunha transgênica (Tabela 2.1), semelhante aos resultados encontrados por Souza et al. (2018). O sucesso da transferência do evento Embrapa 5.1 para as 11 progênies elite selecionadas, consideradas resistentes ao BGMV (Tabela 2.4), corrobora os estudos realizados quanto à

caracterização agronômica e molecular do transgene (Aragão et al., 2013; Faria et al., 2014b). De acordo com Souza et al. (2018), o evento 5.1 foi alocado no cromossomo 8 do genoma do feijão-comum (Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016). Outros genes importantes como *Co-4*, *Phg-2* e *Ur-13*, que conferem resistência à antracnose, à mancha-angular e à ferrugem, respectivamente, também estão alocados no cromossomo 8 do genoma da espécie (Meziadi et al., 2016; Souza et al., 2018).

Adicionalmente, as avaliações fenotípicas, por meio da inoculação artificial de CPMMV, em ambiente controlado, e molecular, possibilitaram discriminar as progênies elite selecionadas (Tabela 2.4). Todas as 12 progênies elite foram resistentes efetivamente ao BCMV, uma vez que a linhagem CNFCT 16206 apresentou reação de hipersensibilidade ao *bean comom mosaic necrosis virus* (BCMNV), indicando a presença do gene *I* para a resistência ao BCMV, de acordo com Souza et al. (2018). Além disso, o sucesso da transferência da resistência e, ou, tolerância ao CPMMV também foi confirmada com cinco das 12 progênies elite (Tabela 2.4). Vale frisar que ambas as cultivares BRS Estilo (Melo et al., 2010) e BRS Sublime (Wendland et al., 2018), utilizadas como genitoras (Apêndices A e B), apresentaram fontes de resistência e, ou, tolerância ao CPMMV (dados não publicados). Apesar da pressão de CPMMV nas plantas por meio da inoculação mecânica realizada em ambiente controlado, as demais progênies que apresentaram segregação ao CPMMV (Tabela 2.4) podem ser reinoculadas com o mesmo inóculo viral (Alves-Freitas et al., 2019).

Os caracteres ARQ, AP, M100 e AG são importantes agronomicamente e estão associados à qualidade de grão, indicando valor comercial (Melo et al., 2017). A transferência dos caracteres ARQ e AP ocorreu com sucesso entre as 12 progênies elite (Tabelas 2.1 e 2.4). Estes caracteres estão presentes em ambos os genitores (Melo et al., 2010; Wendland et al., 2018) utilizados nos cruzamentos (Apêndices A e B), e evidenciam importantes demandas pelos programas de melhoramento do feijoeiro. O progresso genético para ARQ e AP é confirmado por meio do desenvolvimento de cultivares modernas pelos programas de melhoramento do feijoeiro da Embrapa (Faria et al., 2013). Plantas eretas são preferidas pelos produtores, uma vez que possibilitam a colheita mecanizada no campo. Além disso, o porte ereto representa redução de perdas de grãos no campo, bem como diminui a incidência de doenças e melhora a qualidade dos grãos (Faria et al., 2013; Barili et al., 2016). Vale ressaltar que apesar de o feijoeiro ser cultivado no Brasil principalmente

por pequenos produtores, uma parte da produção nacional é realizada de maneira mais tecnificada, por médios e grandes produtores (Faria et al., 2013; Melo et al., 2017).

Os caracteres envolvendo qualidade de grão são importantes e demandados não somente por agricultores e melhoristas, mas sobretudo pelo consumidor (Souza et al., 2018). O feijão de grão carioca é o mais consumido no Brasil, representando cerca de 70% do mercado interno (Faria et al., 2013; Barili et al., 2016; Souza et al., 2018). A resistência efetiva ao BGMV tem propiciado estabilidade de produtividade e qualidade de grão, o que pode ser evidenciado pelos resultados médios de M100 da testemunha transgênica em relação as convencionais (Tabela 2.1). O caráter M100 é um indicador importante quanto ao valor de padrão comercial para grãos do tipo carioca, sendo que há preferência dos consumidores por grãos maiores no mercado brasileiro (Faria et al., 2013; Melo et al., 2017). No presente estudo, os valores médios de M100 variaram de 21,5 a 24,5 g entre as progênies elite (Tabelas 2.1 e 2.4), estando dentro da faixa normalmente obtida em outros estudos, como, por exemplo, para as cultivares BRS FC401 RMD, BRS FC402, BRS Estilo e BRS Sulime, em condições de campo e sem o controle de doenças ou insetos-praga (Melo et al., 2017; Souza et. al., 2018; Wendland et al., 2018).

As progênies transgênicas elite selecionadas (evento Embrapa 5.1) (Tabela 2.4), apresentam potencial de seleção em futuras avaliações de campo, com ampla performance agronômica. Assim sendo, a introgressão de combinações de genes de resistência para três importantes viroses do feijoeiro, sendo BCMV, BGMV e CPMMV, potencializa o desenvolvimento de cultivares de feijão-comum com resistência múltipla a viroses e grãos do tipo carioca no padrão comercial, bem como potencialmente produtivas e adaptadas à colheita mecanizada. A tecnologia RMD passa a ser uma ferramenta de transferência de tecnologia nos programas de melhoramento do feijoeiro, lançando mão da biotecnologia e dos métodos convencionais (Meziadi et al., 2016; 2017; Souza et al., 2018). Nesse cenário, a tecnologia RMD gera novas possibilidade práticas para o fortalecimento de um sistema mais sustentável da cadeia produtiva do feijão no Brasil, além de garantir a segurança alimentar, por meio do desenvolvimento de novas cultivares transgênicas de feijão carioca com resistência múltipla a viroses, sobretudo àquelas transmitidas pela mosca-branca (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

2.5 CONCLUSÕES

1. Há variabilidade genética para todos os caracteres avaliados entre as progênies em condição natural de campo e casa de vegetação;

2. Foi possível a introgressão de combinações de genes para as viroses BCMV, BGMV e CPMMV por meio de métodos convencionais de melhoramento e o uso de ferramentas biotecnológicas;

3. Progênies transgênicas elite de segunda geração foram desenvolvidas e selecionadas, e apresentaram resistência múltipla a viroses, grãos do tipo carioca no padrão comercial, porte ereto e resistência ao acamamento, e boa performance agronômica; com potencial para serem avaliadas em futuros ensaios agronômicos.

2.6 REFERÊNCIAS

ALVES-FREITAS, D. M. T.; PINHEIRO-LIMA, B.; FARIA, J. C.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; MELO, F. L. Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New *Cytorhadovirus* in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. **Viruses**, v. 11, p. 1-11, 2019.

ANDERSON, J.A.; GIPMANS, M.; HURST, S.; LAYTON, R.; NEHRA, N.; PICKETT, J.; SHAH, D. M.; SOUZA, T. L. P. O.; TRIPOTHI, L. Emerging agricultural biotechnologies for sustainable agriculture and food security. **Journal Agricutural Food and Chemistray**, v. 64, n.2, p. 383–393. 2016. Doi:10.1021/acs.jafc.5b04543

ARF, O.; LEANDRO, B. L.; ROGÉRIO, P. S.; SAMUEL, F. **Aspectos gerais da cultura do feijão *Phaseolus vulgaris* L**. Botucatu: FEPAF, 2015. 433p.

ARAGÃO, F. J. L.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; TINOCO, M. L. P.; FARIA, J. C. Molecular characterization og the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. **Journal Biotechnology**, v.166, p.42-50. 2013. Doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.009

ARIAS, C. A. A.; ALMEIDA, A. M.; MILUTI, T.; KITAJIMA, E. W. Inheritance of tolerance to *Cowpea mild motlle virus* in soybean. **Crop Breedind Applied Biotechnology**, v. 15, p.132-138, 2015. Doi: 10.1590/1984-70332015v15n3a24

ASSEFA, T.; MAHAMA, A. 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, n. 2, 2019. Doi: /10.1007/s11032-018-0920-0

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 Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016. Doi: 10.4238/gmr.15038523

BARROS, M. & PRUDENCIO, S. H. Physical and chemical characteristics of common bean varieties. **Semina**: Ciências Agrárias, v. 37, n. 2, p.751-761, 2016. Doi:10.5433/1679-0359.2016v37n2p751

BAUMGARTNER, I. O.; PATOCCHI, A.; FREY, J. E.; PEIL, A.; KELLERHALS, M. Breeding elite lines of apple carrying pyramided homozygous resistance genes against apple scab and resistance against powdery mildew and fire blight. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, p. 1573-1583, 2015. Doi: 10.1007/s11105-015-0858-x

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007. Doi: 10.1094/MPMI-20-6-0717

BRIGIDE, P.; ATAIDE, T. R.; GANNIATTI-BRAZANCA, S. G.; BAPTISTA, A. S.; ABDALLA, A. L.; FILHO, V. F. N.; PIEDADE, S. M. S.; BUENO, N. B.; SANT' ANA, A. E. G. Iron bioavailability of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) intrinsically labeled with ^{59}Fe. **Journal Trace of Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 3, p.260-265, 2014. Doi: 10.1016/j.jtemb.2014.03.001

CHEN, W.; HASEGAWA, D. K.; KAUR, N.; KLIOT, A.; PINHEIRO, P. V.; LUAN, J.; STENSMYR, M. C.; ZHENG, Y.; LIU, W.; SUN, H.; XU, Y.; LUO, Y.; KRUSE, A.; YANG, X.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; FISHER, T. W.; NELSON, D. R.; HUNTER, W. B.; BROWN, J. K.; JANDER, G.; CILIA, M.; DOUGLAS, A. E.; GHANIM, M.; SIMMONS, A. M.; WINTERMANTEL, W. M.; LING KAI-SHU.; FEI, Z. The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. **BMC Biology**. v. 14, n. 110, 2016. Doi: 10.1186/s12915-016-0321-y

CHERUKU, D.; LAL, S. K.; TALUKDAR, A.; MANDAL, B. Inheritance and mapping of resistance against cowpea mild mottle virus strain D1 in soybean. **Plant Breeding**, v. 136, p. 155-160, 2017. Doi: 10.1111/PBR.12455

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em < http://www.conab.gov.br>. Acesso em 20 abril. 2021.

COSTA, A. S.; GASPAR, J. O.; VEJA, J. Mosaico angular do feijoeiro jalo causado por um "carlavirus" transmitido pela mosca-branca (*Bemisa tabaci*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 325-337, 1983.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013. Doi:10.4025/actasciagron.v35i3.21251

DINON, A. Z.; BROD, F. C. A.; MELLO, C. S.; OLIVEIRA.; E. M. M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p. 4672−4677, 2012. Doi: 10.1021/jf3011257

Embrapa Arroz e Feijão. Home Page, 2019. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em 23 jun. 2019.

FAOSTAT. Home Page, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Acesso em 14 Jun. 2018.

FARIA, L. C.; PEREIRA, H. S.; DEL PELOSO, M. J.; BRÁS, A. J. B. P.; MOREIRA, J. A. A. DE 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: 10.1016/j.fcr.2012.11.016

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

FARIA, J.C., P.A.M.R. VALDISSER, P. A. M. R.; E.O.P.L. NOGUEIRA, E. O. P. L.; F.J.L. ARAGÃO, F. J. L. RNAi-based *Bean golden mosaic virus*-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. **Plant Breeding**. 133, n. 5, p. 649-653, 2014b. Doi: 10.1111/pbr.12189

FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; SOUZA, T. P. O.; QUINTELA, E. D.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, S. G. Golden mosaic of common beans in brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, Saint Paul, 2016. Disponível em: <http://www.apsnet.org//publications/apsnetfeatures/Pages/GoldenMosaic.aspx>. Acesso em 02 de abr. 2019.

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**, v. 132, n.11, p. 2003 – 2016, 2019.

Life Technologies Corporation. 2011. Home page, 2021. Disponível em: <https://downloads.thermofisher.com/Primer_Express/Primer_Express_v.3.0.1_README.pdf> . Acesso em 04 de jul. 2021

LOBATON, J. D.; MILLER, T.; GIL, J.; ARIZA, D.; FERNANDO DE LA HOZ, J.; SOLER, A.; BEBEE, 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, n.2, 2018. Doi: 10.3835/plantgenome2017.08.0068

MAULE, A. J.; CARANTA, C.; BOULTON, M. I. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. **Molecular Plant Pathology**, n. 8, p. 223-231, 2007. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00386.x

MARTINS, S.M.; MELO, P. G. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S. Genetic parameters and breeding strategies for high of iron and zinc in *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016. Doi:10.4238/gmr.15028011

MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; WUTKE, E. B. Transmission of Cowpea mild mottle virus by Bemisia tabaci biotype B from plants of beans and soybean. **Summa Phytopathology**, v. 36, p. 158–160, 2010.

MELO, L. C. Procedimentos para Condução de Experimentos de Valor de Cultivo e Uso em Feijoeiro-comum. Embrapa Documentos 239. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, GO, 2009.

MELO, L.C., DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; COSTA, J. G. C.; DIAZ, J. L. C.; RAVA, C. A.; WENDLAND, A.; ABREU, A. F. B. BRS Estilo - Common bean cultivar with Carioca grain, upright and high yield potential. **Crop Breeding Applied Biotechonology**, v. 10, n. 4, p.377-379, 2010. Doi: 10.1590/S1984-70332010000400015

MELO, L.C.; 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, n. 1, p. 67-71, 2017. Doi: 10.1590/1984-70332017v17n1c11

MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J. D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, v. 39, p. 1216–1219, 1996. Doi: 10.1139/g96-155

MEZIADI, C., M.M.S. RICHARD, A. DERQUENNES, V. THAREAU, S. BLANCHET, A. 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

MEZIADI, C.; BLANCHET, S.; GEFFROY, V.; PFLIEGER, S. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. **Plant Science**, v. 265 p. 39-50, 2017.

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

MORAIS, S.R.P.; VIEIRA, 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 Applied Biotechonology**, v. 16, n. 3, p. 234-239, 2016. Doi:10.1590/1984-70332016v16n3n35

PATROTI, P.; VISHALAKSHI, B.; UMAKANTH, B.; SURESH, J.; SENGUTTUVEL, P.; MADHAV, M. S. Marker-assisted pyramiding of major blast resistance genes in Swarna-Sub1, an elite rice variety (Oryza sativa L.). **Euphytica**, v. 215, n. 179, 2019. Doi:10.1007/s10681-019-2487-1

PAULA, N.T., FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. Reduction of viral load in whitefly (Bemisia tabaci Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plants. **Virus Research**, v. 210, p. 245-247, 2015. Doi:10.1016/j.virusres.2015.08.012

PEREIRA, D.G.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S. Selection of parents and segregating populations of black bean resistant to fusarium wilt with high yield and seed weight. **Genetics Molecular Research**, v.18, 2019. Doi: 10.4238/gmr18276

PILET-NAYEL, MARIE-LAURE.; MOURY, B.; CAFFIER, V.; MONTARRY, J.; MARIE-CLAIRE KERLAN, MARIE-CLAIRE.; FOURNET, S.; DUREL, CHARLES-ERIC.; DELOURME, R. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1838, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01838

RAMALHO, M.A.P.; PIROLA, L. H.; ABREU, A. F. B. Alternativas na seleção de plantas de feijoeiro com porte ereto e grão tipo carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1989-1994, 1998.

RAMALHO, M.A.P., FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas**. 3ª ed. Lavras: UFLA, 2012. 305p.

RAPID GENOMICS, USA. Home Page, 2021. Disponível em: <https://rapid-genomics.com>. Acesso em 11 de maio. 2021.

RESENDE, M. D. V. & DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p.182-194, 2007.

SCHMUTZ, J.; MC CLEAN, P.; MAMIDI, S.; WU, G. A.; CANNON S. B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p.707-713, 2014.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974. Doi:10.2307/2529204

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

SOUZA, T.L.P.O., FALEIRO, F. G.; DESSAUNE, S. N.; PAULA-JUNIOR, T. J.; MOREIRA, T. J.; BARROS, E. G. Breeding for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rust resistance in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 361-374. 2013. Doi: 10.1590/S1982-56762013005000027

SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L; DEL-PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A.; AGUIAR, M. S.; QUINTELA, E. D.; MELO, C. L. P.; HUNDRIA, M.; VIANELO, R. P.; PEREIRA, H, S.; MELO, L. C. Agronomic performance and yield stability of the RNA interference-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean. **Crop Sci**, v. 57, p. 579-591. 2018. Doi:10.2135/cropsci2017.06.0355

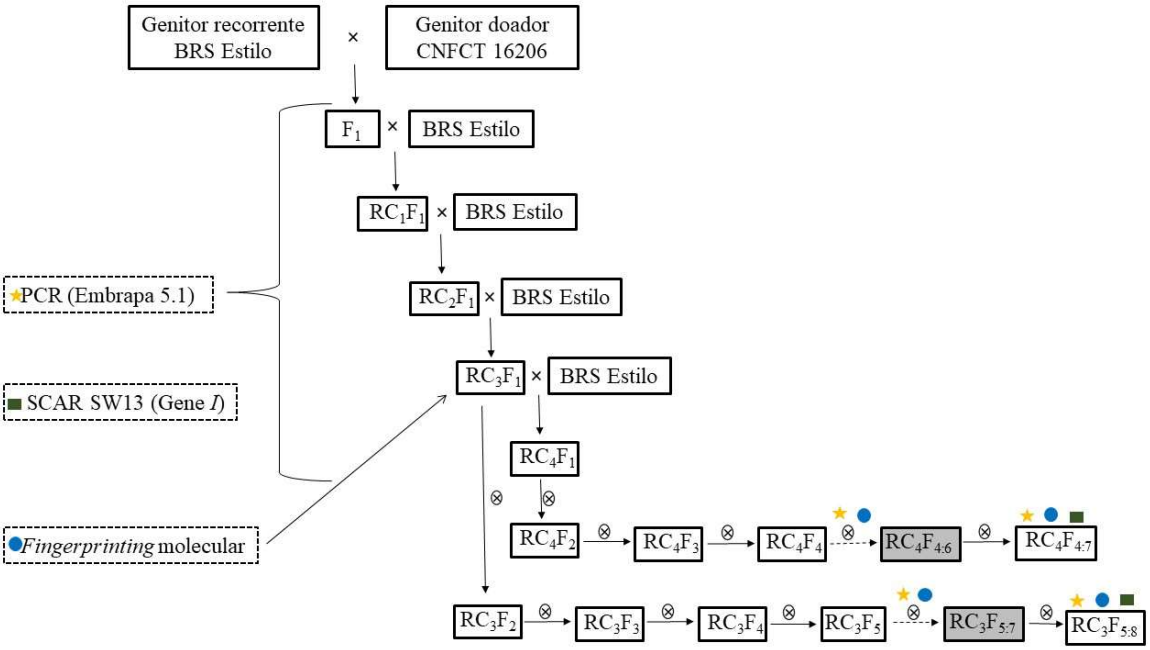
VALDISSER, P. A. M. R.; JUNIOR-PAPPAS, G. L.; MENEZES, I. P. P.; MÜLLER, B. S. F.; PEREIRA, W. J.; NARCISO, M. G.; BRONDANI, G.; SOUZA, T. L. O. P.; BORBA, T. C. O.; VIANELLO, R. P. SNP discovery in common bean by restriction-associated DNA (RAD) sequencing for genetic diversity and population structure analysis. **Molecular Genetic Genomics**, v. 291, p. 1277-1291, 2016. Doi: 10.1007/s00438-016-1182-3

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; RENDÓN-ANAYA, M.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E.; ERB, I.; CÂMARA, F.; PRIETO-BARJA, P.; CORVELO, A.; SANSEVERINO, W.; WESTERGAARD, G.; DOHM, J. C.; JUNIOR - RAPPAS, G. J.; SABURIDO-ALVAREZ, S.; KEDRA, D.; GONZALEZ, I.; COZZUTO, L.; GÓMEZ-GARRIDO, J.; AGUILAR-MORÓN, M. A.; ANDREU, N. AGUILAR, M.; GARCIA-MAS, J.; ZEHNSDORF, M.; VÁZQUES, M. P.; DELGADO, SALINAS, A.; DELAYE, L.; LOWY, E.; MENTABERRY, A.; VIANELLO-BRONDANI, R. P.; GARCÍA, J. L.; ALIOTO, T.; SÁNCHEZ, F.; HIMMELBAUER, H.; SANTALLA, M.; NOTREDAME, C.; GABALDÓN, T.; HERRERA, ESTRELLA, A.; GUIGÓ, R. 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, n. 32, 2016. Doi:10.1186/s13059-016-0883-6

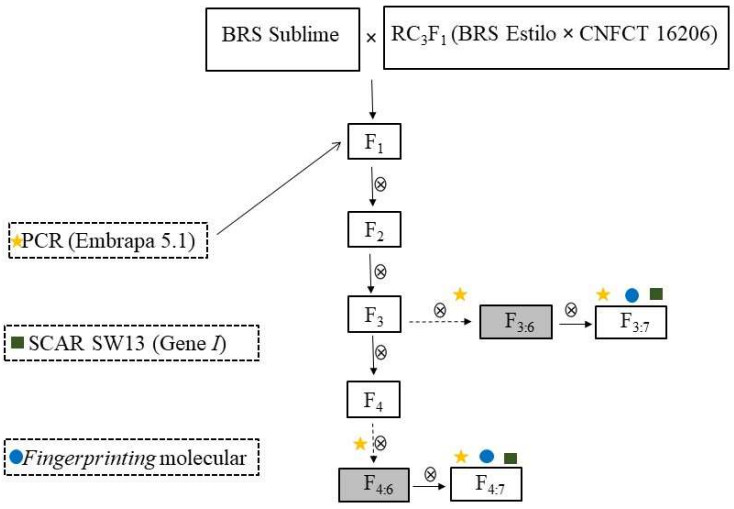
WENDLAND, A.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T . L. P. O.; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C.; DÍAZ, J. L. C.; MAGALDI, M. C. S.; ALMEIDA, V. M. CARVALHO, H. W. L.; MELO, C.L. P.; COSTA, A. F.; ABREU, Â, F. B.; MELO, L. C. BRS Sublime - Common bean cultivar with carioca grain, resistance to angular leaf spot and high nutritional quality. **Crop Breeding Applied Biotechonology**, v. 18, n. 4, p. 440-445, 2018. Doi:10.1590/1984-70332018v18n4c65

YI, J.; NJOROGE, D. M.; SILA, D. N.; KINYANJUI, P. K.; CHRISTIAENS, S.; BI, J.; HENDRICKX, M. E. Detailed analysis of seed coat and colyledon reveals molecular

understanding of the hard-to-cook defect of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 210, p. 481-490, 2016. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.018



Apêndice A. Diagrama representativo da estratégia de melhoramento utilizada para desenvolver progênies de feijão-comum geneticamente modificado resistentes a viroses, por meio do cruzamento entre a cultivar BRS Estilo e a linhagem transgênica CNFCT 16206 (evento Embrapa 5.1).



Apêndice B. Diagrama representativo da estratégia de melhoramento utilizada no desenvolvimento de progênies de feijão-comum geneticamente modificado resistentes a viroses, por meio do cruzamento entre a cultivar BRS Sublime com plantas RC_3F_1 do cruzamento BRS Estilo × CNFCT 16206 (evento Embrapa 5.1).

3 HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DO LOCO DE RESISTÊNCIA AO *COWPEA MILD MOTTLE VIRUS* (CPMMV) NA CULTIVAR DE FEIJÃO BRS SUBLIME

RESUMO

No Brasil, *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) foi relatado infectando feijão-comum em 1980, em Campinas, São Paulo. Contudo, os seus sintomas emergiram no feijão-comum em ensaios de performance agronômica com a cultivar BRS FC401 RMD, que apresenta resistência efetiva ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV; evento Embrapa 5.1; Tecnologia RMD), porém é suscetível ao CPMMV. Ambas as viroses ocorrem simultaneamente em condição natural de campo e são transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Fontes de resistência ao CPMMV têm sido identificadas em ensaios em condições de casa de vegetação e de campo na Embrapa Arroz e Feijão. Os objetivos desse trabalho foram: investigar o controle genético quanto à resistência ao CPMMV e mapear o(s) loco(s) de resistência ao CPMMV, na cultivar de feijão carioca BRS Sublime. Foram utilizadas 180 progênies obtidas através da população BRS Sublime (genitora resistente) × linhagem transgênica CNFCT 16207 (genitor suscetível). CNFCT 16207 também foi sempre utilizada como testemunha suscetível. Todas as plantas F_1 foram avaliadas com marcador molecular ligado ao evento Embrapa 5.1 para confirmar a natureza híbrida, e os híbridos utilizados para a obtenção das gerações F_2 e $F_{2:3}$. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, livres de insetos. Um total de 180 plantas individuais (F_2) e 180 progênies $F_{2:3}$ (12 plantas/progênie), além dos genitores, foram mecanicamente inoculadas com o isolado (CPMMV: BR:GO:14 – *GenBank* MK202583), aos oito dias após plantio. Aos 35 dias após inoculação, as plantas foram avaliadas para reação ao CPMMV por meio de uma escala de notas, em que 1 (ausência de sintomas e sinais do patógeno) e 9 (80% a 100% de severidade da doença ou plantas mortas). As plantas com notas 1 a 3 foram consideradas resistentes e notas ≥ 4, suscetíveis. Os dados de fenotipagem foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), considerando a taxa de segregação mendeliana esperada para cada geração. A genotipagem de marcadores SNP e *Silico*DArT foi realizada na geração F_2 por meio da tecnologia *DArTseq*. O mapa foi gerado inicialmente com alto suporte estatístico (‘*safe’*), seguido pela incorporação de marcas com menor rigor estatístico para ampliar a cobertura genômica. Assim, foi obtido um mapa genético com 1.695 marcadores segregando conforme a frequência esperada e distribuídos nos 11 cromossomos do feijão, com comprimento total de 2.864 cM e distância média entre marcas de 1,8 cM. A fenotipagem dos sintomas indicou que um único gene dominante controla a herança da resistência ao CPMMV na cultivar BRS Sublime. O QTL – Gene de efeito principal (CPMMV. Pv08) foi identificado na região final do cromossomo 8, associado à resistência ao CPMMV e explicando ~77% da variação, reverberando que a herança da resistência ao CPMMV é monogênica. Este é o primeiro trabalho de estudo da herança e de mapeamento genético do loco de resistência ao CPMMV na cultivar de feijão carioca BRS Sublime, com potencial de desenvolvimento de linhagens transgênicas elite de feijão carioca, com alto rendimento e resistência múltipla as viroses BCMV e BGMV, agregando também resistência ao CPMMV; sendo uma importante ferramenta para o manejo integrado de viroses, sobretudo àquelas transmitidas pela mosca-branca no Brasil.

Palavras-chaves: *Phaseolus vulgaris* L., viroses, mosca-branca, *DArTSeq*, herança monogênica, marcadores SNP.

ABSTRACT

INHERITANCE AND GENETIC MAPPING OF THE LOCUS OF RESISTANCE TO COWPEA MILD MOTTLE VIRUS (CPMMV) IN THE BEAN CULTIVAR BRS SUBLIME

In Brazil, the Cowpea mild mottle virus (CPMMV) was reported infecting common beans in the 1980's, in Campinas, São Paulo. However, its symptoms emerged in common beans in agronomic performance tests with the cultivar BRS FC 401 RMD, that presents effective resistance to Bean golden mosaic virus (BGMV; event Embrapa 5.1; RMD technology), but it is susceptible to CPMMV. Both viruses occur simultaneously in the natural condition of the field and are transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*). Sources of resistance to CPMMV have been identified through greenhouse and field screenings carried out at Embrapa Arroz e Feijão. The main goal of the present work was to elucidate the genetic inheritance of the CPMMV and to genetically map loci of resistance to CPMMV in the carioca seeded cultivar BRS Sublime. Thus, 180 progenies obtained from the population BRS Sublime (resistant) × transgenic line CNFCT 16207 (susceptible) were analyzed. CNFCT 16207 was also always used as a susceptible control. All F_1 plants were tested with a molecular marker linked to the event Embrapa 5.1 to confirm the hybrid nature, and the hybrids were advanced up to generations F_2 and $F_{2:3}$. Plants were maintained in the insect-proof screenhouse. A total of 180 F_2 individual plants and 180 $F_{2:3}$ progenies (12 seedlings/progeny), in addition to the parents, were mechanically inoculated with the virus isolate (CPMMV: BR:GO:14 – *GenBank* MK202583), at eight days after planting. At 35 days after inoculation, the plants were scored for CPMMV severity, using a scoring scale from 1 (absence of disease symptoms and signs of pathogens) to 9 (80-100% disease severity or plants death). Plants showing score 1-to-3 were considered resistant and those scoring ≥ 4 were considered as susceptible. The phenotypic data were subjected to the chi-square ($\chi 2$) test ($P \leq 0.05$), considering the theoretically expected Mendelian segregation ratio for each generation. The genotyping of SNP and SilicoDArT markers was performed in the F_2 generation through DArTseq technology. The map was initially generated with high statistical support ('safe'), followed by the incorporation of marks with less statistical rigor to expand genomic coverage. Thus, a genetic map was obtained with 1.695 markers segregating according to the expected frequency and distributed in the 11 chromosomes of the bean, with a total length of 2.864 cM and average distance between marks of 1.8 cM. The phenotyping of the symptoms indicated that a single dominant gene controls the inheritance of CPMMV resistance in the cultivar BRS Sublime. The QTL - single Gene (CPMMV. Pv08) was identified in the final region of chromosome 8, associated with the resistance to CPMMV and explaining ~77% of the variation, revealing that the inheritance of CPMMV resistance is monogenic. This is the first report of a genetic inheritance study and genetic map resistance to CPMMV locus in the carioca seeded cultivar BRS Sublime, with the potential to develop RMD carioca-seeded elite line, with high yield and multiple resistance to viruses BCMV

and BGMV, also adding resistance to CPMMV; being an important tool for the integrated management of viruses, especially those transmitted by the whitefly in Brazil.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., viruses, whitefly, DArTSeq, monogenic inheritance, SNP markers.

3.1 INTRODUÇÃO

Um amplo número de vírus acomete o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causando reduções significativas de rendimento e qualidade dos grãos, nas principais regiões produtoras no mundo (Meziadi et al., 2017; Zanardo & Carvalho, 2017; Zhao et al., 2017). Entre as mais importantes viroses que causam sérios danos ao feijoeiro, no Brasil, destacam-se o mosaico comum, sendo o agente causal, o *Bean common mosaic virus* (BCMV) (Melotto et al., 1996; Elsharkawy & El-Sawy, 2015; Meziadi et al., 2017) e o mosaico-dourado, cujo agente causal é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), sendo o BGMV a principal virose da cultura no país. As perdas de grãos com o mosaico-dourado podem variar de 40% a 100% e dependem da incidência da doença no campo, época de plantio e cultivar utilizada (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Nos últimos anos, uma virose emergiu na cultura do feijão-comum, conhecida como mosqueado-suave-do-caupi, sendo seu agente causal o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) (família *Betaflexiviridae*; gênero *Carlavirus*) (Marubayashi et al., 2010; King et al., 2012; Faria et al., 2016; Zarnado & Carvalho, 2017; Alves-Freitas et al., 2019), que foi originalmente descrito causando sintomas em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Este vírus é o mesmo agente causal da necrose da haste em alguns genótipos de soja. No Brasil, foi descrito em 1983 acometendo feijão-comum, cv. Jalo (Costa et al., 1983; Zarnado & Carvalho, 2017). Os seus sintomas emergiram no feijão recentemente em ensaios de avaliação agronômica da cultivar BRS FC401 RMD, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país. A cultivar transgênica apresenta resistência efetiva ao BGMV por meio do evento Embrapa 5.1 (Tecnologia RMD, prefixo referente à resistência ao mosaico-dourado), contudo é suscetível ao CPMMV. Normalmente os sintomas de CPMMV são confundidos ou suplantados pelos sintomas mais severos de BGMV, o que não ocorreu no caso da cv. BRS FC401 RMD. Ambas as doenças ocorrem simultaneamente no campo, bem como são transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Os sintomas de CPMMV observados no feijão-comum variam de um mosaico leve, com nenhum ou pequeno efeito no desenvolvimento da planta, evoluindo para um mosaico e deformação foliar mais severos, até a um encarquilhamento muito proeminente nas folhas. A vagem também tende a apresentar deformação e manchas verdes escuras, e as plantas podem apresentar redução no desenvolvimento (Marubayashi et al., 2010; Faria et al., 2016). Em estudos preliminares, a infecção natural de CPMMV, no campo, pode causar perdas de produção de grãos na ordem de 17% a 69% (Faria et al., 2016).

O vírus CPMMV apresenta partícula filamentosa de 610 a 700 nm de comprimento e 13 nm de diâmetro, sendo flexível e frágil. O genoma é constituído de cadeia simples de RNA, com 8200 nucleotídeos e uma sequência polipeptídica (32 – 36 KDa) (King et al., 2012; Zanardo et al., 2014; CABI, 2020), sendo transmitido naturalmente por meio do inseto vetor *B. tabaci* de maneira não-persistente, bem como por meio de sementes e, também, inoculação mecânica. Além do feijão, o vírus acomete outras espécies de *Fabaceae*, como a soja, além de *Solanaceae* e *Lamiaceae*, em diversas regiões no mundo. Há, portanto, uma ampla gama de hospedeiros e sintomas variados, incluindo infecções assintomáticas em soja (Marubayashi et al., 2010; King et al., 2012; Faria et al., 2016; Zanardo & Carvalho, 2017; Alves-Freitas et al., 2019; Thekke-Veetil et al., 2021).

A transmissão de CPMMV por meio de sementes tem sido verificada em soja, feijão-caupi e feijão-comum. Neste caso, contudo, em menor frequência e sem relatos de isolados transmitidos no Brasil. No entanto, uma única mosca-branca pode transmitir o vírus em soja ou feijão com uma eficiência de aproximadamente 11,7%, sendo de aproximadamente 88%, com 20 insetos por planta (Marubayashi et al., 2010; Faria et al., 2016; Zanardo & Carvalho, 2017). A soja é uma excelente hospedeira de *B. tabaci*, o que tem contribuído para a alta incidência e ampla distribuição de BGMV e CPMMV no feijão, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, em importantes áreas produtoras de soja. Desse modo, o mosqueado-suave-do-caupi tem despertado a atenção dos pesquisadores nos últimos anos (Faria et al., 2016; Zanardo & Carvalho, 2017; Souza et al., 2018; Alves-Freitas et al., 2019; Thekke-Veetil et al., 2021). Fontes de resistência têm sido identificadas no feijão-comum em avaliações realizadas na Embrapa Arroz e Feijão, incluindo a cultivar de feijão carioca desenvolvida pela Embrapa BRS Sublime, sendo esta uma das fontes de resistência ao CPMMV mais promissoras identificadas até o momento (Dr. J. C. Faria, comunicação pessoal).

Vale mencionar que a resistência genética representa a estratégia mais efetiva, confiável e sustentável para reduzir os danos causados pelas doenças em culturas economicamente importantes, sobretudo as viroses (Agrios, 2004; Faria et al., 2016; Gil et al., 2019). Os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil, cujos objetivos incluem a resistência a viroses, também têm lançado mão da seleção fenotípica e da seleção assistida por meio de marcadores moleculares (SAM) para o desenvolvimento de cultivares resistentes (Singh & Schwartz, 2010; Pasev et al., 2013; Bello et al., 2014; Souza et al., 2018). Adicionalmente, o evento Embrapa 5.1 vem se concretizando como uma importante ferramenta para o controle integrado de viroses na cultura do feijão, o qual está sendo utilizado pela Embrapa no desenvolvimento de cultivares RMD de segunda geração, com grãos tipo carioca no padrão comercial e resistência múltipla a viroses, principalmente viroses transmitidas pela mosca-branca; integrando, assim, métodos convencionais de melhoramento e ferramentas biotecnológicas (Dinon et al., 2012; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Inúmeros marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de resistência genética para doenças importantes no feijão (Souza et al., 2013, 2014; Oblessuc et al.,2013, 2015; Keller et al., 2015; Gil et al., 2019), inclusive para viroses (Miklas et al., 2009; Pasev et al., 2013; Bello et al., 2014; Souza et a., 2018). Os marcadores SNP (*Single nucleotide polymorphism*) são bastante utilizados, uma vez que são abundantes no genoma e bastante informativos, além de possibilitarem a genotipagem de um grande número de genótipos de maneira relativamente rápida e a um custo razoável e justificável (Cortés et al., 2011; Souza et al., 2012; Borém & Caixeta, 2016; Valdisser et al., 2016; Lobaton et al., 2018). Adicionalmente, os marcadores *Silico*DArT (*Diversity Array Technology*), apesar de serem menos informativos quando comparados a outros marcadores codominantes, a exemplo dos SNPs e microssatélites (Briñez et al., 2017), têm se mostrado potencialmente úteis para estudos de diversidade genética e construção de mapas de ligação em inúmeras espécies, incluindo estudos de associação de QTLs (*Quantitative trait locus*) com locos de resistência em feijão-comum (Oblessuc et al., 2013). A plataforma *DArTseq* (Kilian et al., 2012) tem fornecido milhares de *Silico*DArTs para essas finalidades (Wenzl et al., 2004; Mace et al., 2008; Sansaloni et al., 2010; Heller-Uszynska et al., 2011; Briñez et al., 2012; Oblessuc et al., 2013), inclusive na análise direcionada de SNPs, por meio de ensaios específicos de genotipagem (Valdisser et al., 2016), *DArTseq*, dentre outros, para uso rotineiro na seleção assistida de alelos de interesse.

Assim, os principais objetivos do presente trabalho foram: i) investigar o controle genético da resistência ao CPMMV e ii) mapear o(s) loco(s) de resistência ao CPMMV, na cultivar de feijão carioca BRS Sublime, utilizando as populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ (BRS Sublime × linhagem suscetível CNFCT 16207).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Genético

A população de mapeamento foi desenvolvida por meio do cruzamento entre a cultivar BRS Sublime (Wendland et al., 2018), utilizada como fonte de resistência, e a linhagem transgênica CNFCT 16207, portadora do evento Embrapa 5.1 (Tecnologia RMD; resistência ao mosaico-dourado; BGMV - *Bean Golden mosaic virus*), porém suscetível ao CPMMV (*Cowpea mild mottle virus*) (Souza et al., 2018). Ambos os genitores pertencem ao *pool* gênico Mesoamericano e são do grupo de grãos carioca. A natureza híbrida das sementes F_1 foi verificada por meio do marcador dominante *Ahas* ligado ao evento Embrapa 5.1 (Dinon et al., 2012) e presente no genitor masculino (CNFCT 16207). Os híbridos foram utilizados para a obtenção das gerações de mapeamento F_2 e $F_{2:3}$.

3.2.2 Inoculação mecânica e avaliação fenotípica

As plantas das gerações F_2 e $F_{2:3}$ foram conduzidas em ambiente controlado livres de mosca-branca (*Bemisia Tabaci*) e mecanicamente inoculadas com CPMMV (Cheruku et al., 2017; Alves-Freiras et al., 2019) na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás. As plantas foram semeadas em vasos de 7.0 kg preenchidos com substrato apropriado e adubados com N-P_2O_5-K_2O na formulação 5-30-15, na proporção de 15 gramas por vaso. A irrigação foi realizada via sistema por aspersão. Na geração $F_{2:3}$ foram avaliadas e inoculadas 12 plantas por progênies.

O vírus foi mantido em plantas da linhagem CNFCT 16207 (Souza et al., 2018), também em ambiente controlado e livres de insetos. As folhas infectadas com o vírus foram coletadas e mantidas a -20 ºC no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão. Aos oito dias após semeadura, 180 plântulas F_2 e 2160 plântulas $F_{2:3}$ (180 progênies; 12 plantas por progênies), além dos genitores (BRS Sublime e linhagem CNFCT 16207), foram mecanicamente inoculados com o isolado de CPMMV (BR: GO: 14; *GenBank* MK202583) (Alves-Freitas et al., 2019). Assim, para a inoculação, folhas de plantas suscetíveis de feijão com sintomas típicos da virose foram maceradas em tampão fosfato, na proporção de 1,0 g de tecido/ml, contendo bissulfito de sódio e uma pequena porção de *Carborundum* 500 *mesh*. O inoculo foi friccionado nas folhas unifolioladas das plântulas, com o auxílio de gazes (Cheruku et al., 2017).

Aos 35 dias após inoculação, todas as plantas foram avaliadas individualmente quanto à severidade de sintomas de CPMMV, por meio de uma escala de notas de 1 a 9, sendo 1 - ausência de sintomas e 9 - plantas com sintomas severos de mosaico e, ou, encarquilhamento das folhas. As plantas com notas 1, 2 e 3 foram consideradas resistentes e as plantas com notas ≥ 4 foram caracterizadas como suscetíveis (Melo, 2009; Dr. J. C. de Faria, comunicação pessoal).

3.2.2.1 Análise estatística – fenotípica

As plantas das gerações F_2 e $F_{2:3}$ foram avaliadas quanto à resistência e à suscetibilidade ao CPMMV e os dados foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) para aferir, a 5% de probabilidade, os desvios das frequências observadas e esperadas; utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). Considerou-se as hipóteses de segregação mendeliana esperada para cada geração, sendo para F_2 (3R: 1S) e para $F_{2:3}$ (1R: 2Segregando: 1S). Assim, a resistência e a suscetibilidade avaliadas em $F_{2:3}$ foram testadas por meio das médias das progênies (Cheruku et al., 2017).

3.2.3 Análise Genômica

3.2.3.1 Genotipagem por *DArTseq*

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de tecido foliar da população de mapeamento, geração F_2, por meio do método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), com adaptações. Assim, as amostras de DNA de 180 plantas F_2 e genitores foram avaliadas quanto à qualidade e à quantidade, e enviadas para a empresa *Diversity Arrays Technology Pty*. *Ltd Yarralumia ACT*. Canberra, Australia; sendo genotipadas por meio da tecnologia *DArTseq*, conforme descrito por Kilian et al. (2012).

3.2.3.2 Teste de segregação e mapa de ligação

O teste de qui-quadrado (χ^2) para os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e *Silico*DArT (*Diversity Arrays Technology*), além do loco de resistência ao CPMMV, foi realizado referente às populações F_2 e $F_{2:3}$, respectivamente. Testou-se, a 5% de probabilidade, a proporção de segregação para cada loco, sendo 1R: 1Segregando: 1S para os SNPs e o loco de resistência, e 3R:1S para os *silico*DArTs. O método 'FDR' (*false discovery rate*) foi aplicado (Benjamin & Hocheberg, 1995). O teste de segregação e a construção do mapa de ligação foram realizados por meio do software R versão 3.6.1 (R

Core Team, 2019). A função '*converte*' foi utilizada para a codificação dos marcadores. Assim, o arquivo de saída, com os locos e as médias fenotípicas para severidade de CPMMV, foi organizado por meio do formato '*MapMarker*'.

A distância entre os pares de marcadores foi calculada por meio do método da máxima verossimilhança (Lynch & Walsh, 1998) e o mapa genético foi gerado utilizando *LOD-score* de 5.0 e máxima frequência de recombinação de 30%. A função de *Komsabi* foi utilizada para converter a frequência de recombinação para a distância genética em (cM) (Kosambi, 1943). Utilizou-se a função '*make.seq*' para organizar os marcadores dentro de cada grupo. Ademais, por meio do método '*rcd*' (*rapid chain delineation*) e o comando '*safe*', as marcas foram ordenadas com maior precisão utilizando suporte estatístico de alta verossimilhança. Nesta etapa adotou-se um *LOD – score* de 2.0, e os marcadores completamente ligados (co-segregação) foram considerados para cada loco (Silva et al., 2018). Além disso, marcadores segregantes adicionais foram incorporados ao mapa de ligação, com menor rigor estatístico, para gerar um mapa contendo um maior número de marcadores. Utilizaram-se os comandos '*Try.seq*' e '*make.seq*'. Desse modo, o mapa foi construído utilizando o pacote '*R - onemap*' (Margarido et al., 2007; R Core Team, 2019).

3.2.3.3 Detecção de QTL e anotação gênica

As médias fenotípicas de severidade de CPMMV na população $F_{2:3}$ foram utilizadas para a detecção de QTL (*Quantitative trait locus*) por meio do software WinQTLCart 2.5. Assim, a análise de QTL foi realizada através do Método de Intervalo Composto (*CIM*), modelo 6 - *JZmapqtl* (Wang et al., 2012). Considerou-se o intervalo de distância de 1 cM, sendo a posição do QTL estimada por meio do *LOD-score* de 17,91, definido através do método de permutação, considerando 1000 permutações para o nível de significância de 5% (Doerge & Churchill, 1996). A janela considerada foi de 10,0 cM (*window size*). Além disso, a estimativa da proporção da variabilidade do QTL foi determinada por meio do valor do coeficiente de determinação (R^2), baseado em modelo de regressão múltipla. O intervalo de localização do QTL foi determinado por meio da metodologia de intervalo de suporte de *LOD*, usando como critério o *LOD* máximo menos uma unidade (Broman & Sen, 2009).

Os dados fenotípicos quanto à resistência e à suscetibilidade ao CPMMV, obtidos aos 35 dias após inoculação na população segregante $F_{2:3}$, foram correlacionados com os resultados do(s) marcador(es) molecular(es) mais próximo(s). Para isso, foram

utilizados o índice de coincidência (IC) calculado de acordo com a razão do número de genótipos que apresentaram o mesmo fenótipo e genótipo esperado (NG) pelo número total de genótipos avaliados (Total), sendo IC = [(NG)/Total] (Souza et al., 2009) e, também, o gráfico *Boxplot*. Neste caso, a um nível de significância de 5%, e com o auxílio do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

Por sua vez, a anotação gênica foi realizada no(s) intervalo(s) do(s) QTL(s) utilizando a plataforma '*Phytozome'* (http://www.phytozome.net/) e o genoma de *Phaseolus vulgaris*, variedade Andina (Schmutz et al. 2014). Considerou-se os genes envolvidos em mecanismos de resistência a doenças, ricos em repetições de Leucina (*LRR*) e codificadores de proteínas Kinases (*Pkinases*), como genes candidatos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Estudo da herança

Das 180 plantas inoculadas na geração F_2 (BRS Sublime × CNFCT 16207), 128 apresentaram resistência e 52 foram suscetíveis (Tabela 3.1). Desse modo, a segregação para a reação de resistência ao CPMMV apresentou proporção mendeliana de três plantas resistentes para uma suscetível (3R:1S; $p > 0,05$; $\chi^2 = 1,45$). A interação intra-alélica de dominância completa foi confirmada por meio da geração F_3 derivada de plantas individuais da geração F_2, ou seja, na população $F_{2:3}$. A partir das médias das 180 famílias/progênies ($F_{2:3}$), 45 progênies foram consideras resistentes, 88 apresentaram segregação e 47 suscetíveis. As progênies $F_{2:3}$ apresentaram segregação mendeliana na proporção de 1:2:1 (1R: 2Segregando: 1S; $p > 0,05$; $\chi^2 = 0,13$) (Tabelas 3.1).

Tabela 3.1. Herança da resistência à severidade de CPMMV nas populações F_2 e $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre BRS Sublime e a linhagem transgênica CNFCT 16207, e avaliadas aos 35 dias após a inoculação.

	Número de Planta/progênies					
Geração	Total	Resistente	Segregando	Suscetível	χ^2(3R:1S) e (1R: 2segregando:1S)	*P*-valor
BRS Sublime	12	12	0	0	-	-
CNFCT 16207	12	0	0	12	-	-
F_2	180	128	0	52	1,45	22,82%
$F_{2:3}$	180	45	88	47	0,13	93,55%

3.3.2 Genotipagem de marcadores SNP e *Silico*DArT

Um total de 26.462 marcadores SNP e 26.692 *Silico*DArT foram identificados por meio da genotipagem de 180 plantas F_2, oriundas do cruzamento BRS Sublime × CNFCT 16207. Um conjunto de 6.096 SNPs (~23,03%) foram polimórficos (Tabela 3.2), com *callrate* variando de 0,20 a 1,00, com média de 0,70 (dados não apresentados). Para os *Silico*DArTs, 4.788 foram polimórficos (~17,93%), conforme apresentado na Tabela 3.2, com valores de *callrate* variando de 0,76 a 1,00 e média de 0,92 (dados não apresentados).

Tabela 3.2. Número de marcadores SNP e *Silico*DArT genotipados na população F_2 do cruzamento BRS Sublime × CNFCT 16207.

	Número total		Monomórfico		Polimórfico		Distorção SNPs		Distorção DArTs	
Cr.[a]	SNPs	DArTs[b]	SNPs	DArTs	SNPs	DArTs	S[c]	C207	S	C207
Pv01	1938	1730	1653	1507	285	223	74	88	30	59
Pv02	2425	2213	2028	1900	397	313	99	113	48	67
Pv03	2261	2127	1817	1746	444	381	123	136	67	66
Pv04	1801	1590	1288	1285	513	305	169	177	48	40
Pv05	1491	1304	1213	1132	278	172	82	97	27	38
Pv06	1768	1502	1376	1243	392	259	114	135	16	33
Pv07	1941	1767	1448	1374	493	393	148	141	39	51
Pv08	2568	2312	1774	1741	794	571	267	258	122	76
Pv09	1851	1702	1625	1544	226	158	75	75	43	41
Pv10	1693	1439	1301	1165	392	274	140	145	31	38
Pv11	2588	1911	1906	1485	682	426	315	231	64	96
Scaff	742	371	590	322	152	49	60	76	10	08
Contig	3395	6724	2347	5460	1048	1264	360	328	140	291
Total	26462	26692	20366	21904	6096	4788	2026	2000	685	904
Média	2035	2053	1566	1684	468	368	155	153	52	69

[a]Cromossomo referente à espécie *Phaseolus vulgaris* L.; [b] *Silico*DArTs; [c] Genitores BRS Sublime (S) e CNFCT 16207 (C207).

Os números de marcadores SNP e *Silico*DArT polimórficos variaram de 226 (Pv09) a 682 (Pv11) e 158 (Pv09) a 571 (Pv08), com médias de 468 e 368 marcadores por cromossomo (Pv), respectivamente. Os grupos (Pvs) são representativos dos cromossomos da espécie (Liu, 1997; Balding et al., 2007; Vlasova et al., 2016) (Tabela 3.2). De acordo com o teste de segregação, entre os 6.096 SNPs polimórficos, (~72,8%; 4.440) não segregaram na proporção mendeliana esperada: 1R: 2Segregando: 1S. Destes, 2.026 marcadores SNP distorceram para o genitor BRS Sublime e 2.000 para o genitor (CNFCT 16207) (Tabela 3.2), sendo que para 414 SNPs não foi possível identificar a direção da distorção (dados não apresentados).

Os cromossomos Pv07, Pv08 e Pv11 apresentaram predominância de distorção dos alelos para o genitor BRS Sublime; já Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv05, Pv06 e Pv10 apresentaram predominância de distorção alélica para CNFCT 16207 (Tabela 3.2). Entre os 4.788 *Silico*DArTs polimórficos, 1.832 (~38,1%) não segregaram na proporção mendeliana esperada (3R: 1S). Destes, 685 marcadores apresentaram distorção alélica na direção do

genitor BRS Sublime e 904 para o genitor CNFCT 16207 (Tabela 3.2), com 234 marcadores sem apresentar predominância de distorção para os genitores (dados não apresentados). Os cromossomos Pv03, Pv04, Pv08 e Pv09 apresentaram predominância de distorção dos alelos para BRS Sublime e Pv1, Pv2, Pv5, Pv6, Pv7, Pv10 e Pv11, predominância de distorção alélica para CNFCT 16207 (Tabela 3.2).

Um total de 4.621 marcadores, sendo 1.656 SNPs e 2.965 *Silico*DArTs, passaram pelo teste de segregação e foram então utilizados na análise de ligação (*LOD – score* = 5.0 e r = 0.3). Os marcadores foram alocados em cromossomos individuais, totalizando, portanto, 11 cromossomos (Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016). O cromossomo Pv01 foi formado por três grupos de ligação, com 1.276 marcadores (~28,0% do total de marcadores), sendo 524 SNPs e 752 *Silico*DArTs (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Distribuição de 4.621 marcadores SNP e *Silico*DArT utilizados para o mapeamento da população F_2 do cruzamento BRS Sublime × CNFCT 16207.

Cr.[a]	Número de marcadores *Segregation ratio*			Número de grupo de ligação	Número de marcadores ligados por grupo		Número de marcadores não ligados
-	SNPs	DArTs[b]	SNPs & DArTs	-	SNPs	DArTs	DArTs
Pv01	524	752	1276	03	89;190;245	124;279;349	01
Pv02	150	179	329	01	150	179	01
Pv03	141	236	377	01	141	236	04
Pv04	214	353	543	02	87;127	97;256	-
Pv05	116	203	319	01	116	203	-
Pv06	09	06	15	01	09	06	01
Pv07	134	147	281	01	134	147	01
Pv08	55	70	125	01	55	70	-
Pv09	104	194	298	01	104	194	02
Pv10	-	02	02	02	-	01;01	03
Pv11	-	02	02	01	-	02	01
Scaff	14	27	-	-	-	-	-
Contig	195	776	-	-	-	-	04
Total	1656	2947		15	-	-	18
Média	127,3	226,6		-	-	-	-

[a] Cromossomo referente à espécie *Phaseolus vulgaris* L.; [b] *Silico*DArTs.

Adicionalmente, Pv04 e Pv10 foram formados por dois grupos de ligação. Os outros cromossomos foram formados por apenas um grupo de ligação cada, conforme esperado. Dezoito marcadores *Silico*DArT não se ligaram a nenhum dos grupos formados. Além disso, quatro *Silico*DArTs (não ligados) não apresentaram posição física (*contig*) (Tabela 3.3). Logo, os marcadores ligados (4.603; SNPs e SilicoDArTs) foram reorganizados por meio da posição física de acordo com o genoma de referência para *Phaseolus vulgaris* (Schmutz et al., 2014) e utilizados para as análises na construção do mapa de ligação (comando '*safe*'; *LOD – score* = 2.0) (Tabela 3.4).

3.3.3 Mapa de ligação

O mapa de ligação foi construído utilizando 1.695 marcadores não distorcidos e segregando conforme a frequência esperada para cada tipo de marca, sendo 967 SNPs e 728 *Silico*DArTs, ordenados em 11 grupos de ligação, ou seja, 11 cromossomos (Pvs) (Tabela 3.4). Utilizou-se o comando de mapeamento '*safe*' do pacote '*R - onemap*' (Margarido et al., 2007; R Core Team, 2019), além da adição de marcadores segregantes (Tabela 3.3) adicionais, com a geração do mapa mais completo (111 SNPs e 421 SilicoDArTs). O mapa completo apresentou tamanho de 2.864 cM e média final de 260,4 cM (Tabela 3.4).

O número de marcadores em cada cromossomo variou de 56 (~3,30%; Pv09) a 249 (~14,6%; Pv03). A média foi de 87,9 marcadores SNPs e 66,2 *Silico*DArTs, com a média de marcadores total por cromossomo de 154,1 (Tabela 3.4). Cinco cromossomos (Pv01, Pv05, Pv09, Pv10 e Pv11) apresentaram número de marcadores menor do que a média para todos os cromossomos (154,1; 9,08% dos 1695) (Tabela 3.4).

A variação do tamanho dos cromossomos foi de 137,4 cM (Pv05) a 353,8 cM (Pv07). Seis cromossomos (Pv02, Pv04, Pv05, Pv09, Pv10 e Pv11) foram mais curtos do que o comprimento médio para todos os cromossomos (260,4 cM; ~9,07% de 2.864 cM) (Tabela 3.4). A maior distância entre dois marcadores adjacentes variou de 10,2 cM (Pv05) a 31,1 cM (Pv08), e a distância média entre dois marcadores variou de 1,0 cM (Pv03; Pv04 e Pv05) a 2,9 cM (Pv09), com média de todos os cromossomos de 1,8 cM. A porcentagem de distâncias menores ou iguais a 5,0 cM variou de ~81,1% (Pv01) a ~96,0% (Pv03 e Pv04). Para todos os cromossomos a média das distâncias adjacentes menor ou igual a 5,0 cM foi de ~90,1% (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Distribuição de 1.695 marcadores SNP e *Silico*DArT por meio do mapa genético de ligação construído utilizando a população F_2 do cruzamento BRS Sublime × CNFCT 16207.

Cromossomo[a]	Número de marcadores			Tamanho (cM)	Maior distância (cM)	Média distância (cM)	D ≤ 5[c] (cM)
	SNPs	DArTs[b]	Total				
Pv01	65	57	122	312,0	18,7	2,5	81,1
Pv02	98	107	205	252,8	13,4	1,3	95,6
Pv03	126	123	249	267,7	14,0	1,0	96,0
Pv04	90	132	222	239,3	31,0	1,0	96,0
Pv05	77	53	130	137,4	10,2	1,0	95,0
Pv06	106	61	167	326,2	10,5	1,9	90,0
Pv07	113	44	157	353,8	17,0	2,2	86,0
Pv08	119	49	168	327,0	31,1	1,9	93,0
Pv09	30	26	56	160,8	27,2	2,9	82,1
Pv10	70	36	106	237,4	14,7	2,2	87,7
Pv11	73	40	113	250,1	13,7	2,2	88,4
Total	967	728	1695	2864	-	-	-
Média	87,9	66,2	154,1	260,4	18,3	1,82	90,1

[a] Cromossomo referente à espécie *Phaseolus vulgaris* L.; [b] *Silico*DArTs; [c] Porcentagem de distâncias menores ou iguais a 5,0 cM

3.3.4 Análise de QTL e anotação gênica

Um total de 1.695 marcadores SNP e *Silico*DArT polimórficos para os genitores da população de mapeamento F_2 (BRS Sublime × CNFCT 16207) foram mapeados e utilizados para a análise de QTL. A análise por meio do mapa de ligação indicou que a região de resistência ao CPMMV está no cromossomo Pv08 (Tabela 3.5 e Figura 3.1B). A localização do QTL foi determinada por meio da análise de Intervalo Composto (*CIM*), com um *LOD* limite de 3.9 (Figura 3.1B). Assim, um QTL - Gene de efeito principal (CPMMV.Pv08) foi detectado para o caráter severidade de CPMMV, que foi avaliado nas populações F_2 e $F_{2:3}$ (BRS Sublime × CNFCT 16207, genitores resistente e suscetível, respectivamente) (Tabela 3.1). O loco de resistência foi detectado na extremidade final do cromossomo 8, explicando a cerca de 77% da variação fenotípica, e com a marca SNP_Ch_8_62396711 contida no início da região de resistência, na posição de 62.39 Mpb e a uma distância por volta de 30 cM do loco (Tabela 3.5 e Figura 3.1B).

Por meio do gráfico *boxplot*, observou-se variações das médias de nota nos genótipos para o marcador mais próximo, SNP_Ch_8_6239671, que flanqueia o QTL (CPMMV.Pv08) (Figura 3.1AB). O alelo A é proveniente do genitor resistente BRS Sublime, sendo as médias de reação ao CPMMV, portanto, com valores inferiores e representativas dos indivíduos com os genótipos homozigotos para a resistência a doença (RR), e o alelo B é oriundo do genitor suscetível, sendo a linhagem CNFCT 16207, com notas de reação superiores, ou seja, genótipos homozigotos suscetíveis à doença (rr). Por fim, o alelo H, sendo representativo dos indivíduos com genótipos heterozigotos para o loco de resistência (Rr) (Figura 3.1A).

Tabela 3.5. Resumo da análise de QTL estimada por meio do Método de Intervalo Composto (*CIM*) para severidade de CPMMV, avaliada em 180 progênies ($F_{2:3}$; BRS Sublime × CNFCT 16207) aos 35 dias após inoculação, e o marcador mais próximo.

Loco	Cromossomo[a]	Marcador	*LOD*	R^2(%)[b]
CPMMV.Pv08	Pv08	SNP_Ch_8_62396711[c]	66,8	77,0

[a] *Phaseolus vulgaris* L.; [b] R^2 - Taxa de variação fenotípica explicada pelo loco; [c] Sequência do marcador: 5' - TGCAGTTTTCCTTCTATTTTCTTGAAGAAAATAAATATTGAAATGTCACTGTTGCAACCTAGGTCAACC - 3'

No total foram identificados 21 transcritos dentro do intervalo de confiança de 0,94 Mpb (61.30 - 62.24 Mpb) no cromossomo Pv08 flanqueando o gene de efeito principal CPMMV.Pv08 (Apêndice A), os quais estão envolvidos em mecanismos de defesa a doenças em planta (Agrios, 2004; Keller et al., 2015; Andersen et al., 2018; Gil et al., 2019). Do total de transcritos, 16 genes apresentam domínio de sequências ricas em repetição de Leucina, classe *LRR* (*Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*), sendo os demais genes codificadores de proteínas ricas em receptores quinases (*Pkinases*). Merecem destaques três genes: Phvul.008G281000, Phvul.008G281100 (ambos, *LRR*) e Phvul.008G281500 (*Pkinase*), identificados dentro do intervalo de confiança de 0,04 Mpb (62.20 - 62.24 Mpb; Pv08) (Apêndice A). Desse modo, o marcador SNP_Ch_8_62396711 (R^2 = ~77%; 62.39 Mpb) associado ao loco CPMMV.Pv08 no final de Pv08 (Tabela 3.5 e Figura 3.1B), está a uma distância de ~186 kpb dos genes *LRR* (Phvul.008G281000: 62,210,835 pb e Phvul.008G281100: 62,211,626 pb). Adicionalmente, o SNP acima está a uma distância de ~153 kpb do gene *Pkinase* (Phvul.008G281500; 62.24 Mpb).

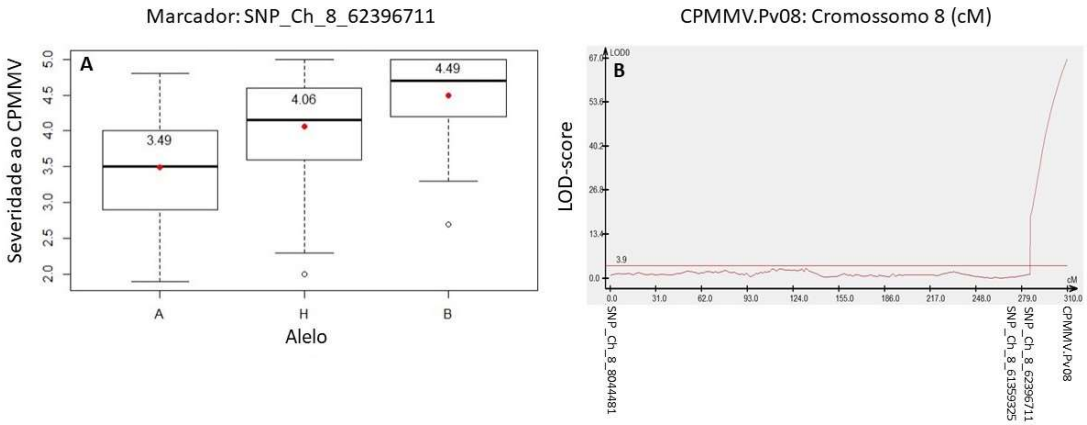


Figura 3.1. Resistência ao CPMMV na população composta por 180 famílias $F_{2:3}$ (BRS Sublime × CNFCT 16207) inoculada com CPMMV; isolado BR: GO:14 (Código *GenBank* MK202583) (Alves-Freitas et al., 2019). **A**) *Box plot* das médias de nota de severidade das progênies para o marcador identificado na análise de QTL. Pontos em vermelho referem-se às médias de notas de severidade (sobrescrito). A e B são alelos em homozigose provenientes dos parentais BRS Sublime (resistente) e CNFCT 16207 (suscetível), respectivamente. H: indivíduos heterozigotos. **B**) Análise de QTL realizada usando o software QTL *Cartographer*, pelo método de mapeamento por intervalo composto (*CIM*). O maior pico observado no gráfico indica o loco de resistência (CPMMV.Pv08) ao CPMMV. Ademais, o marcador SNP_Ch_8_62396711 flanqueando a região de resistência a uma distância de cerca de 30 cM do loco de resistência.

Por meio dos resultados fenotípicos para resistência e suscetibilidade ao CPMMV, os 180 indivíduos genotipados (populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$, respectivamente; Tabela 3.1), foram avaliados com o marcador SNP_Ch_8_62396711 identificado por volta de 30 cM do QTL – Gene de efeito principal (Tabela 3.5; Figura 1B). Assim, foi estimado o índice de coincidência (IC), para verificar a eficiência da seleção utilizando o marcador molecular acima. O cálculo foi feito considerando todos os genótipos. Logo, a coincidência entre a marca SNP_Ch_8_6239671 e os 180 genótipos avaliados foi de 62,2% (dado não apresentado).

3.4 DISCUSSÃO

Baseado na fenotipagem dos sintomas para severidade ao CPMMV nas gerações F_2 e $F_{2:3}$ (BRS Sublime × CNFCT 16207), observou-se segregação mendeliana para cada geração. Assim, os resultados de ambas as gerações indicaram que um gene dominante controla a herança da resistência ao CPMMV na cultivar de feijão carioca BRS Sublime (Tabela 3.1 e Figura 3.1B). Esse é o primeiro relato da herança da resistência ao CPMMV na cultivar de feijão-comum BRS sublime. Resultado semelhante foi evidenciado por Cheruku et al. (2017), ao estudarem a herança genética para severidade de CPMMV em soja. Adicionalmente, Arias et al. (2015) evidenciaram dois genes de efeito principal, com predominância de efeitos aditivos, controlando tolerância ao CPMMV, também em soja. CPMMV causa a doença necrose da haste da soja (Marubayashi et al., 2010; Cheruku et al., 2017; Thekke-Veetil et al., 2021). Vale mencionar que a resistência a vírus é governada, sobretudo, por genes *R* de efeitos maiores com interação intra-alélica de dominância, inclusive em feijão (Larsen & Miklas, 2004; Singh & Schwartz, 2010; Hart & Griffiths, 2015; Meziadi et al., 2016; 2017) (Tabela 3.1).

Neste estudo, ~23,0% (6.096) dos SNPs e ~17,9% (4.788) dos *Silico*DArTs observados entre os parentais BRS Sublime e CNFCT 16207, utilizados para gerar a população de mapeamento F_2, foram polimórficos (Tabela 3.2) e com médias de *call rate* 'adequadas' para a utilização dos marcadores (Wenzl et al., 2004; Briñez et al., 2012; Platten et al., 2019). As porcentagens mais reduzidas de marcadores polimórficos (Tabela 3.2) refletem os genótipos dos parentais acima, ambos pertencentes ao mesmo *pool* gênico Mesoamericano e grãos no padrão comercial carioca (Souza et al., 2018; Wendland et al., 2018). Yuste-Lisbona et al. (2012) encontraram taxa de 92,8% de SNPs monomórficos ao mapearem uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) de feijão-comum, sendo derivada do cruzamento entre parentais pertencentes ao mesmo *pool* gênico Andino. Entretanto, valores de porcentagens maiores de SNPs polimórficos, por exemplo, têm sido verificados para populações de mapeamento derivadas de genitores pertencentes a *poolgene* diferentes (Silva et al., 2018).

É oportuno mencionar que os marcadores *Silico*DArT mesmo sendo menos informativos (herança dominante) em relação aos marcadores codominantes como os SNPs (Briñez et al., 2017; Lobaton et al., 2018), são potencialmente eficientes em estudos de diversidade genética e na construção de mapas de ligação, em várias espécies de plantas,

sobretudo se for possível identificar uma quantidade grande desses marcadores (Kilian et al., 2012). São vários os trabalhos de diversidade genética e de mapa de ligação utilizando marcadores *Silico*DArT em espécies agronomicamente importantes, entre elas arroz (Jaccound et al., 2001), mandioca (Xia et al., 2005), cevada (Wenzl et al., 2004), sorgo (Mace et al., 2008), eucalipto (Sansaloni et al., 2010), cana-de-açúcar (Heller Uszynska et al., 2011), *Lolium-Festuca* (Tomaszewski et al., 2011) e feijão-comum (Briñez et al., 2012; Oblessuc et al., 2013).

Briñez et al. (2012) avaliaram 89 acessos pertencentes ao *pool* gênico Mesoamericano e Andino de países do continente Americano e identificaram 2.501 marcadores *Silico*DArT polimórficos (31%) e as marcas foram potencialmente úteis em discriminar os acessos para os dois *pool* gênicos da espécie. Adicionalmente, marcadores *Silico*DArT também têm sido utilizados para detectar QTLs associados a locos de resistência a doenças (Tomaszewski et al., 2011), inclusive em feijão (Oblessuc et al., 2013), além da abordagem da seleção genômica ampla para identificar genótipos resistentes (Santos et al., 2016).

O número de marcadores considerados polimórficos e que apresentaram distorção alélica foi alto neste estudo, sobretudo para os SNPs (Tabela 3.2). Silva et al. (2018) encontraram percentual de distorção alélica para os SNPs de ~33,3%. Resultado similar ao dos autores acima foi evidenciado por Passos (2016), ao selecionar SNPs com elevada eficiência para o mapeamento e a seleção de marcadores associados à reação ao crestamento bacteriano comum (CBC) no feijoeiro. A distorção alélica pode ser reflexo do tamanho da população, com um número menor de indivíduos amostrados, de problemas amostrais na população F_1, ou, ainda, resultante de fatores genéticos que afetam a herança dos marcadores (Nodari et al., 1993).

Ademais, o padrão de agrupamento foi representativo dos 11 cromossomos; condição haploide da espécie *P. vulgaris* (Schumrtz et al., 2014; Vlasova et al., 2016), com um número baixo de marcadores segregantes não ligados a nenhum dos grupos, evidenciando a qualidade dos marcadores polimórficos entre os parentais, gerados pela tecnologia de genotipagem (Tabela 3.3) (Kilian et al., 2012; Schuster & Cruz, 2013). Dos marcadores polimórficos segregantes (Tabela 3.3), 1.695 (967 SNPs e 728 *Silico*DArTs) foram utilizados para a construção do mapa de ligação (Tabela 3.4). Isso representa uma redução por volta de 84% e 85% dos SNPs e *Silico*DArTs considerados polimórficos, respectivamente (Tabelas 3.2 e 3.4). É oportuno destacar que no presente trabalho, os

marcadores foram posicionados no mapa por meio do comando '*safe*', pacote '*R – onemap*' (Margarido et al., 2007; R Core Team, 2019). O comando '*safe*' gera um mapa com elevado suporte estatístico, porém tende a remover muitas marcas informativas (Passos, 2016). Logo, marcadores segregantes (Tabela 3.3) adicionais foram incorporados ao mapa de ligação com menor rigor para proporcionar um maior número de marcadores no mapa (sendo 111 SNPs e 421 *Silico*DArTs, adicionais). A tentativa em gerar um mapa completo pode possibilitar uma maior cobertura de marcadores, sendo uma abordagem adequada para a análise de QTL (Oblessuc et al., 2013; Borém & Caixeta, 2016; Gil et al., 2019), sobretudo neste estudo, em que os genitores apresentam similaridade genética, com maior proporção de locos monomórficos (Borém & Caixeta, 2016) (Tabela 3.2).

Passos (2016) evidenciou redução de ~60% de SNPs ao mapear uma população RILs de feijão-comum a partir do cruzamento entre Rudá × AND 277 (Mesoamericano e Andino, respectivamente), para a análise de locos de resistência ao CBC; considerando as marcas com segregação esperada, sem distorção alélica e distribuídas nos 11 grupos representativos da espécie (2.041 SNPs). Adicionalmente, Wenzl et al. (2004) evidenciaram uma redução também de ~60% dos *Silico*DArTs considerados polimórficos, na construção do mapa genético através da população de mapeamento de Duplo-Haplóides (DH; cvs. *Steptoe* × *Morex*; cevada), para verificar a segregação dos marcadores. Reduções menores foram evidenciadas por Briñez et al. (2017), ~25% de marcadores SNPs e SSRs polimórficos, ao mapearem QTLs associadas à tolerância à seca, em uma população de RILs de feijão-comum (SEA-5 × AND 277; Mesoamericano e Andino, respectivamente). Por outro lado, Langat et al. (2019) evidenciaram uma redução de ~80% de SNPs polimórficos, ao mapearem QTLs associadas à tolerância à seca, por meio de uma população F_2 de feijão-comum a partir do cruzamento entre genitores contrastantes para vários caracteres. As populações de mapeamento RILs e DH tendem a possibilitar o mapeamento de um maior número de marcas quando comparadas com a utilização de geração F_2 (Borém & Caixeta, 2016).

Os 1.695 marcadores foram distribuídos nos 11 grupos (cromossomos) e com o tamanho do mapa completo de 2.864 cM (Tabela 3.4). Os tamanhos dos mapas genéticos em feijão têm variado com média de 754 cM a 3.702 cM (Galeno et al., 2012; Passos, 2016; Briñez et al., 2017; Silva et al., 2018; Langat et al., 2019). Vale ressaltar que as distâncias entre os marcadores variaram de 10,2 cM (Pv05) a 31,1 cM (Pv08), sendo considerada alta, contudo a variação da distância média entre os marcadores foi menor, sendo de 1,0 cM

(Pv03, Pv04 e Pv05) a 2,5 cM (Pv 01), com destaque para Pv03 que apresentou a melhor saturação de marcadores entre os cromossomos (Tabela 3.4). Adicionalmente, a média de distância entre as marcas com valores iguais ou menores que 5,0 cM foi de 90,1, indicando uma boa saturação do mapa construído (Tabela 3.4), mesmo amostrado um número menor do que 200 indivíduos através da população de mapeamento F_2 e da similaridade genética dos genitores (Tabela 3.1) (Borém & Caixeta, 2016). Resultados semelhantes foram evidenciados por Briñez et al. (2017) e Langat et al. (2019).

Neste contexto, o tamanho final do mapa pode ter sido em decorrência do tamanho da população amostrada neste estudo, além da similaridade genética entre os genitores (Wendland et al., 2018; Souza et al., 2018), sendo os dois genitores considerados genótipos elite (Tabela 3.4). O desenvolvimento de populações de mapeamento por meio de materiais-elite tende a contribuir para o aumento no tamanho final do mapa genético. Assim, as maiores distancias adjacentes entre os marcadores dentro do grupo, pode ser devido a um maior ajustamento no pareamento dos cromossomos durante a meiose entre genitores elite, promovendo um maior número de recombinações (Tabela 3.4; Figura 3.1B) (Borém & Caixeta, 2016; Passos, 2016). Logo, a dissimilaridade genética entre os genitores influência na cobertura genômica e eficiência no mapeamento e análise de gene, sobretudo devido a maior proporção de marcadores polimórficos.

Por meio da análise de QTL por intervalo composto (*CIM*), identificou-se no cromossomo Pv8, cujo tamanho do cromossomo é de ~62.36 Mpb, o marcador SNP_62396711 flanqueando o QTL - Gene de efeito principal (CPMMV.Pv08; R^2 = ~77%) a uma distância por volta de 30 cM (Tabela 3.5 e Figura 3.1B). Esta distância observada é um indicativo de fraca associação entre a marca e o QTL, uma vez que há maior chance de ocorrência de eventos de recombinação nessa região de Pv08 (Figura 3.1B) (Balding et al., 2007; Gil et al., 2019; Platten et al., 2019).

Assim, mesmo por meio da abordagem da geração do mapa completo (Tabela 3.4), não foi possível saturar a região através de marcadores segregantes (Tabela 3.3; Figura 3.1B). A amostragem menor na população pode ter corroborado com este resultado (Tabela 3.1), sendo justificável uma população de mapeamento maior para uma adequada amostragem de gametas recombinantes e, com isso, a geração de um mapa mais saturado (Liu, 1997; Borém & Caixeta, 2016). Vale lembrar que houve correlação de magnitude moderada da marca SNP_62396711 com os genótipos avaliados (62,2%; dado não apresentado), sendo possível, ainda assim, discriminar os genótipos resistentes e os

suscetíveis, com inconclusão para alguns genótipos, sobretudo heterozigoto (Figura 3.1A). A correlação, mesmo que moderada, evidencia a atividade do QTL – Gene de efeito principal na região (Figura 3.1AB) (Liu, 1997; Balding et al., 2007; Platten et al., 2019).

Os autores Cheruku et al. (2017) mapearam o loco de resistência ao CPMMV na soja, localizado no cromossomo 12 da espécie. Dois marcadores SSR (Satt635 e Uo8405) foram identificados altamente ligados ao loco de resistência (< 5 cM de distância) e a marca Satt293 a uma distância de 43,5 cM. O cromossomo 12 em soja é caracterizado por dois '*clusters*' de genes *R*, localizados nas extremidades do cromossomo (Schmutz et al., 2010; Nepal & Benson, 2015), o qual parece ser sintênico ao cromossomo 8 em feijão-comum. Há, assim, relevantes '*clusters*' identificados nas extremidades dos cromossomos referentes ao genoma de *P. vulgaris* (Schumtz et al., 2014), com destaque para os cromossomos Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv08, Pv10 e Pv11 (Meziadi et al., 2016, 2017), com genes governando resistência e, ou, tolerância a importantes doenças no feijoeiro, como: Antracnose (Oblessuc et al., 2015), ferrugem (Mienie et al., 2005; Souza et al., 2013; 2014) e mancha angular (Oblessuc et al., 2013; Keller et al., 2015; Gil et al., 2019).

Adicionalmente, existe um importante cluster de genes de resistência na extremidade final do cromossomo 8 da espécie de feijão-comum (Mienie et al., 2005; Meziadi et al., 2016; Gil et al., 2019). Os autores Gil et al. (2019) anotaram 18 genes possivelmente associados ao loco *Phg-2* que confere resistência à mancha angular na região final do cromossomo 8 do feijão (Apêndice A), sendo esses genes pertencentes a classe *NBS LRR* (*Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*) e a proteínas ricas em repetições quinases (*Pkinases*), envolvidos na defesa da planta contra patógenos (Agrios, 2004; Keller et al., 2015; Andersen et al., 2018).

Três genes anotados neste estudo, compreendendo a região 62.20 a 62.24 Mpb (Pv8), sendo Phvul.008G281000, Phvul.008G281100 (ambos, *LRR*) e Phvul.008G281500 (*Pkinase*) (Apêndice A), podem estar associados ao loco CPMMV.Pv08, que confere resistência ao *Carlavirus*. Adicionalmente, o loco *Phg-2* para mancha angular está inserido numa região de 259 kpb de Pv08, no intervalo entre 61.87 a 62.14 Mpb (Lobaton et al., 2018; Gil et al., 2019), o que pode ser um indicativo de ligação com o loco de resistência ao CPMMV, como já evidenciado para outros locos de resistência (Blair et al., 2007). A etapa posterior de mapeamento genético fino (Gil et al., 2019) e a integração de mapas pode ser uma tentativa para confirmar essas associações. Cruzamentos entre o genitor resistente BRS Sublime pode ser realizado com outros genótipos para confirmar uma possível associação

do marcador SNP_Ch_8_62396711, ou de outros marcadores, com o loco de resistência, com o aumento da população de mapeamento (Liu, 1997; Balding et al., 2007). Além disso, pode-se tentar, também, validar a marca encontrada e testar o seu potencial para ser incorporada à seleção assistida por marcadores (SAM), nos programas de melhoramento genético do feijão para viroses.

Nessa realidade, a abordagem da introgressão de alelos contra mais de um patógeno (resistência múltipla), assistida por meio de SAM (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018), pode vir a ser uma realidade promissora no desenvolvimento e no avanço de linhagens-elite transgênicas de feijão-comum de segunda geração, com grãos no padrão comercial carioca, resistência múltipla às viroses BCMV, BGMV e CPMMV e ótima performance agronômica, lançando mão do uso integrado da tecnologia RMD (evento Embrapa 5.1) (Dinon et al., 2012; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018). Vale destacar que os genitores utilizados no presente estudo apresentam tolerância à mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e resistência ao CPMMV (BRS Sublime), além de resistência efetiva ao BGMV (evento Embrapa 5.1) e suscetibilidade ao CPMMV (CNFCT 16207), sendo que ambos apresentam resistência ao BCMV (Souza et al., 2018; Wendland et al., 2018). BGMV e CPMMV ocorrem simultaneamente no campo e são transmitidos de maneira muito eficiente pela mosca-branca, o que tem aumentado a preocupação de pesquisadores e produtores de feijão, principalmente na região Central do Brasil. Essa é uma importante região produtora de soja, sendo a espécie uma excelente hospedeira de mosca-branca e, também, de CPMMV (Paula et al., 2015; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

Adicionalmente, o isolado CPMMV:BR:GO:14, utilizado neste estudo, é o primeiro isolado de CPMMV com o genoma sequenciado, que infecta naturalmente feijão-comum, sendo encontrado no estado de Goiás. Outros cincos isolados de CPMMV foram identificados e sequenciados acometendo soja, também em importantes regiões produtoras de grãos no Brasil (Alves-Freitas et al., 2019), com um novo membro do gênero *Carlavirus* sendo descoberto recentemente infectando naturalmente soja nos Estados Unidos (Thekke-Veetil et al., 2021). Além disso, um novo rabdovírus (gênero *Cytorhabdovirus*; família *Rhabdoviridae*) foi identificado na cultivar transgênica BRS FC401 RMD (Souza et al., 2018), sendo o primeiro rabdovírus infectando feijão (Alves-Freitas et al., 2019).

Assim, é oportuno reverberar que a piramidação de alelos visando resistência a mais de uma raça patogênica (Souza et al., 2014; Patroti et al., 2019) ou a alelos de resistência contra mais de um patógeno por meio da resistência múltipla (Faria et al., 2016;

Souza et al., 2018), se mostram estratégias viáveis para ampliar o espectro de resistência e a durabilidade da resistência na condição de ambiente natural, uma vez que a evolução do patógeno é um processo rápido e contínuo, sobretudo para resistência qualitativa, já que este tipo de resistência tende a ser menos douradora do que a resistência quantitativa (Agrios, 2004; Souza et al., 2014; Corwin & Kliebenstein, 2017; Wendland et al., 2018; Gil et al., 2019). Por outro lado, genes de efeito maior governando resistência a doenças têm sido mais amplamente estudados, a exemplo de genes *R* mapeados no feijão-comum e relacionados a doenças importantes causadas por vírus (Blair et al., 2007; Pasev et al., 2013; Hart & Griffiths, 2015; Meziadi et al., 2016; 2017).

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma cultivar de feijão RMD de segunda geração, com grãos carioca atendendo ao padrão de qualidade comercial exigido pelo mercado consumidor brasileiro, alto potencial produtivo e estabilidade de produção, além de adaptação à colheita mecânica direta e resistência múltipla às viroses BCMV e BGMV, agregando, também, a resistência ao CPMMV, representará uma importante ferramenta para o manejo integrado das viroses transmitidas pela mosca-branca na cultura do feijão. O uso indiscriminado de inseticidas para o controle da mosca-branca tem propiciado o surgimento de genótipos resistentes as principais moléculas no mercado, além da poluição ao ambiente; o que reverbera a importância da resistência genética como método de controle mais sustentável (Paula et al., 2015; Faria et al., 2016; Souza et al., 2018).

3.5 CONCLUSÕES

1. A genotipagem usando a tecnologia *DArTseq* gerou marcadores SNP e *Silico*DArTs polimórficos entre os parentais com qualidade para serem utilizados na construção do mapa genético nas populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$;

2. O mapa genético gerado apresentou uma boa saturação de marcas, mesmo com a similaridade genética identificada entre os genitores (~80%);

3. Um único gene dominante controla a herança genética para resistência ao CPMMV na cultivar de feijão carioca BRS Sublime;

4. A abordagem da Análise de QTL por meio da construção do mapa genético utilizando marcadores SNP e *Silico*DArT, possibilitou o mapeamento do loco de resistência ao CPMMV localizado na região final do cromossomo 8 de BRS Sublime.

3.6 REFERÊNCIAS

ALVES-FREITAS, D. M. T.; PINHEIRO-LIMA, B.; FARIA, J. C.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; MELO, F. L. Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New *Cytorhadovirus* in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. **Viruses**, v. 11, p. 1-11, 2019.

ANDERSEN, E. J.; ALI, S.; BYAMUKAMA, E.; YANG, Y.; NEPAL, M. P. Disease Resistance Mechanisms in Plants. **Genes**, v.9, p.339, 2018. Doi: 10.3390/genes9070339

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. – 5ª ed. – Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2004. 901p.

ARIAS, C. A. A.; ALVARO, M. R.; ALMEIDA, A. M. R.; TATIANA-MITUTI, T.; KITAJIMA, E. W. Inheritance of tolerance to Cowpea Mild Mottle Virus in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 132-138, 2015.

BALDING, D. J.; BISHOP, M.; CANNINGS, C. **Handbook of Statistical Genetics**. – 3rd. ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 1392

BELLO, M. H.; MOGHADDAM, S. M.; MASSOUDI, M.; MCCLEAN, P. E.; CREGAN, P. B.; MIKLAS, P. N. Application of in silico bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common bean. **BMC Genomics**, v. 15, p. 903-915, 2014.

BENJAMINI, Y & HOCHEBERG, Y. Controling the false Discovery rate: a practical and powerfull approach to multiple testing. **Journal Royal Statstical Society**, v. 57, p. 289-300, 1995.

BLAIR, M. W.; RODRIGUEZ, L. M.; PEDRAZA, F.; MORALES, F.; BEEBE, S. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm*-1 and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 114, p. 261–271, 2007. Doi: 10.1007/s00122-006-0428-6

BORÉM, A. & CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016, 385 p.

BROMAN, K. W & SEN, S. A. Guide to QTL Mapping with R/qtl. New York: **Springer**, 2009.

BRIÑEZ, B.; BLAIR, M. W.; KILIAN, A.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F.; RUBIANO, L. B. A whole genome DArT assay to assess germplasm collection diversity in common beans. **Molecular Breending**, v. 30, p. 181 – 193, 2012. Doi: 10,1007/s11032-011-9609-3

BRIÑEZ, B., PERSEGUINI, J. M. K. C., ROSA, J. S., BASSI, D., GONÇALVES, J. G. R., ALMEIDA, C.; PAULINO, J. F. C; BLAIR, M. W; CHIORATTO, A. L; CARBONELL, S. A. M; VALDISSER, P. A. M. R; VIANELLO, R. P; BENCHIMOL-REIS, L. L. Mapping QTLs for drought tolerance in a SEA 5 × AND 277 common bean cross with SSRs and SNP markers. **Genetics and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 813-823, 2017.

BRUNT, A. A & KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. **Annals of Applied Biology**, v. 74, n. 1, p.67-74, 1973.

CABI, current year. Home page, 2020. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/15735> Acesso em 22 de dez. 2020.

CORTÉS, A. J.; CHAVARRO, M. C.; BLAIR, M. W. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulga*ris L.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 123, p. 827-845, 2011.

CORWIN, J. A & KLIEBENSTEIN, D. J. Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. **The Plant Cell**, v. 29, p. 655-665, 2017.

COSTA, A. S.; GASPAR, J. O.; VEJA, J. Mosaico angular do feijoeiro jalo causado por um “carlavirus” transmitido pela mosca-branca (*Bemisa tabaci*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 325-337, 1983.

CHERUKU, D.; LAL, S. K.; TALUKDAR, A.; MANDAL, B. Inheritance and mapping of resistance against *cowpea mild mottle virus* strain D1 in soybean. **Plant Breeding**, v. 136, p. 155-160, 2017. Doi: 10.1111/PBR.12455

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271–276, 2013. Doi:10.4025/actasciagronv35i3.21251

DINON, A. Z.; BROD, F. C. A.; MELLO, C. S.; OLIVEIRA.; E. M. M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p. 4672−4677, 2012. Doi: 10.1021/jf3011257

DOERGE, R. W. & CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v. 142, n. 1, p. 285-294, 1996.

DOYLE, J. J & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

ELSHARKAWY, M. M & EL-SAWY. Control of bean common mosaic virus by plant extracts in bean plants. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 1, p. 54-59, jan. 2015.

FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; SOUZA, T. P. O.; QUINTELA, E. D.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, S. G. Golden mosaic of common beans in brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, Saint Paul, 2016. Disponível em: <http://www.apsnet.org//publications/apsnetfeatures/Pages/GoldenMosaic.aspx>.Acesso em 02 de abril. 2019.

GALEANO, C. H.; CORTÉS, A. J.; FERNÁNDES A. C.; SOLER, A.; FRANCO-HERRERA, N.; MAKUNDE G.; VANDERLEYDEN, J.; BLAIR, M. W. Gene-based single nucleotide polymorphism markers for genetic and association mapping in common bean. **BMC Genetic**, v. 13, p. 48, 2012.

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**, v. 132, n.11, p. 2003 – 2016, 2019.

HART, J. P & GRIFFITHS, P. D. Genotyping-by-Sequencing Enabled Mapping and Marker Development for the *By-2* Potyvirus Resistance Allele in Common Bean. **The Plant Genome**, v.8, n. 1, 2015. Doi: 10.3835/plantgenome2014.09.0058

HELLER-USZYNSKA, K.; USZYNSKI, G.; HUTTNER, E.; EVERS, M.; CARLIG, J.; CAIG, V, AITKEN, K.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G.; COX, M.; GILMOUR, R.; D' HONT, A.; BUTTERFIELD, M.; GLASZMANN J-C.; KILIAN, A. Diversity arrays technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. **Molecular Breeding**, v. 28, p. 37 – 55, 2011. Doi:10.1007/s11032-010-9460-y

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4 e 25, 2001.

KELLER, B.; MANZANARES, C.; JARA, C.; LOBATON, J. D.; STUDER, B.; RAATZ B. Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in commn bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, p. 813-826, 2015. Doi: 10.007/s00122-015-2472-6

KILIAN, A.; WENZL, P.; HUTTER, E.; CARLING, J.; XIA, L.; BLOIS, H.; CAIG, V.; HELLER-USZYNSKA, K.; JACCOUD, D.; HOPPER, C.; ASCHENBRENNER-KILIAN, M.; EVERS, M.; PENG, K.; CAYLA, C.; HOK, P.; USZYNSKI, G. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In: POMPANON, F.; BONIN, A. **Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols**. 1ª ed. Totowa: Humana Press. 2012. cap 5. p. 67-89.

KING, A. M. Q, LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENSAND, E. B. **Virus taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9th ed. Elsevier, San Diego, CA. 2012.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v. 12, p. 172-175, 1943.

LANGAT, C. K.; OMBORI, O.; CHERUIYOT, R.; GATHAARA, M., KARANJA, D.; LELEY, P. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTL) Related to Drought Tolerance in 94

Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Using F_2 Population from (KATB1 × GLP2). **International Annals of Science**, v. 8, n. 1, p. 75-86, 2019.

LARSEN, R. C & MIKLAS, P. N. Generation and molecular mapping of a sequence characterized amplifi ed region marker linked with the Bct gene for resistance to Beet curly top virus in common bean. **Phytopathology**, v. 94, p. 320–325, 2004.

LYNCH, M & WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc. Ed., 1998.

LIU, B. H. **Statistical Genomics**: linkage, Mapping, and QTL analysis. CRC Press, Washington, D.C, 1997. p. 611

LOBATON, J. D.; MILLER, T.; GIL, J.; ARIZA, D.; FERNANDO DE LA HOZ, J.; SOLER, A.; BEBEE, 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, n. 2, 2018. Doi: 10.3835/plantgenome2017.08.0068

MACE, E.; XIA, L.; JORDAN, D. R.; HALLORAN, K.; PARH, D. K.; HUTTNER, E.; WENZL, P.; KILIAN, A. DArT markers: diversity analyses and mapping in Sorghum bicolor. **BMC Genomics**, v. 9, n. 26, 2008.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic map in outcrossing species. **Hereditas**, v. 144, p. 78-79, 2007.

MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; WUTKE, E. B. Transmission of Cowpea mild mottle virus by Bemisia tabaci biotype B from plants of beans and soybean. **Summa Phytopathology**, v**.** 36, p. 158–160, 2010.

MELO, L. C. 2009. Procedimentos para Condução de Experimentos de Valor de Cultivo e Uso em Feijoeiro-comum. Embrapa Documentos 239. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, GO.

MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J. D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, v. 39, p. 1216–1219, 1996. Doi: 10.1139/g96-155

MEZIADI, C., M.M.S. RICHARD, A. DERQUENNES, V. THAREAU, S. BLANCHET, A. 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

MEZIADI, C.; BLANCHET, S.; GEFFROY, V.; PFLIEGER, S. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. **Plant Science**, v. 265 p. 39-50, 2017.

MIENIE, C. M. S.; LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A.; MIKLAS, P. N. SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene *Ur-13*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 972 – 979, 2005. Doi: 10.1007/s00122-005-0037-9

MIKLAS, P. N.; SEO, Y. S.; GILBERTSON, R. L. Quantitative resistance to Bean dwarf mosaic virus in common bean is associated with the *Bct* gene for resistance to Beet curly top virus. **Plant Disease**, v. 93, p. 645–648, 2009.

NEPAL, M. P & BENSON, B. V. CNL disease resistance genes in soybean and their evolutionary divergence. **Evolutionary Bioinformatics,** v. 11, p. 49 – 63, 2015.

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

OBLESSUC, P. R.; CARDOSO-PERSEGUINI, J. M. K.; BARONI, R. M.; CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CAMARGO, L. E. A.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, 126, p. 2451-2465, 2013. Doi:10.1007/s00122-013-2146-1.

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 immuneresponse in common bean, **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, p. 1193–1208, 2015.

PAULA, N.T., FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. Reduction of viral load in whitefly (*Bemisia tabaci* Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic

bean plants. **Virus Research**, v. 210, p. 245-247, 2015. Doi:10.1016/j.virusres.2015.08.012

PASEV, G.; KOSTOVA, D.; SOFKOVA, S. Identification of genes for resistance to bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding lines using conventional and molecular methods. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 1, p.19-25, 2013.

PASSOS, A. L. P. Mapeamento de locos de resistência ao Crestamento Bacteriano Comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 2016. 78 f. (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

PATROTI, P.; VISHALAKSHI, B.; UMAKANTH, B.; SURESH, J.; SENGUTTUVEL, P.; MADHAV, M. S. Marker-assisted pyramiding of major blast resistance genes in Swarna-Sub1, an elite rice variety (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 215, n. 179, 2019. Doi:10.1007/s10681-019-2487-1

PLATTEN, J. D.; COBB, J. N.; ZANTUA, R. E. Criteria for evaluating molecular markers: comprehensive quality metrics to improve marker-assisted selection. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210529, 2019.

R CORE TEAM. **R**: **a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2019.

SANSALONI, C.; PETROLI, C.; JARSON, C.; HUDSON, C. J. A high-density Diversity Arrays Technology (DART) microarray for genome-wide genotyping in Eucalyptus. **Plant Methods**, v. 6, n.16, p. 2-11, 2010. Doi: 10.1186/1746-4811-6-16

SANTOS, J. P. R.; PIRES, L. P. M.; VASCONCELLOS, G. S. P.; PINHO, R. G. V.; BALESTRE, M. Genomic selection to resistance to Stenocarpella maydis in maize lines using DArTseq markers. **BMC Genetics**, v. 17, n. 86. 2016.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; JACSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, p. 178-183, 2010.

SCHMUTZ, J.; MC CLEAN, P.; MAMIDI, S.; WU, G. A.; CANNON S. B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p.707-713, 2014.

SCHUSTER, I & CRUZ, C. D. **Estatística genômica**: aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. – 2ª ed. rev. - Viçosa, MG: UFV, 2013. 568p.

SILVA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; e SILVA, F. F.; de BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P.; da FONSECA, C. E. L.; SONG, Q.; CREGAN, P. B.; CARNEIRO, J. E. S. Linkage fine-mapping and QTLs affecting morphoagronomic traits of Mesoamerican x Andean RIL common bean population. **Euphytica,** v. 14, n. 12**,** p**.** 214-221, 2018.

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

SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; SANGLARD, D. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, BARROS, E. G. Teste de resistência ao *Uromyces appendiculatus* por meio da inoculação do patógeno em folhas destacadas do feijoeiro. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 197-201, 2009.

SOUZA, T. L. P. O.; DE BARROS, E. G.; BELLATO, C. M.; HWANG, E. Y.; CREGAN, P. B.; PASTOR-CORRALES, M. A. Single nucleotide polymorphism Discovery in common bean. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 419-428, 2012. Doi: 10.0007/s11032-011-9632-4

SOUZA, T. L. P. O.; FALEIRO, F. G.; DESSAUNE, S. N.; PAULA-JUNIOR, T. J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Breeding for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rust resistance in Brazil. Trop. **Plant Pathology**. v. 38, p. 361-374, 2013. Doi:10.1590/S1982-56762013005000027

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**, v. 199, p. 303–316, 2014.

SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L; DEL-PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A.; AGUIAR, M. S.; QUINTELA, E. D.; MELO, C. L. P.; HUNDRIA, M.; VIANELO, R. P.; PEREIRA, H, S.; MELO, L. C. Agronomic performance and yield stability of the RNA interference-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean. **Crop Sci**, v. 57, p. 579-591. 2018. Doi:10.2135/cropsci2017.06.0355

THEKKE-VEETIL, T.; MCCOPPIN, N. K.; HOBBS, H. A.; HARTMAN, G. L.; LAMBERT, K. N.; LIM, H. S.; AND LESLIE. DOMIER, L. L. Discovery of a Novel Member of the Carlavirus Genus from Soybean (*Glycine max L*. Merr.). **Phatogens**, v.10, n. 2, p. 223-229. 2021.

TOMASZEWSKI, C.; BYRNE, S.L.; FOITO, A.; KILDEA, S.; KOPECKY, D.; DOLEZˇ EL, J.; HESLOP-HARRISON, J. S (PAT), STEWART, D.; BARTH, S. Genetic linkage mapping in an F_2 perennial ryegrass population using DArT markers. **Plant Breeding**, v. 131, n. 2, 2011. Doi:10.1111/j.1439-0523.2011.01944.x

VALDISSER, P. A. M. R.; JUNIOR-PAPPAS, G. L.; MENEZES, I. P. P.; MÜLLER, B. S. F.; PEREIRA, W. J.; NARCISO, M. G.; BRONDANI, G.; SOUZA, T. L. O. P.; 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 Genetic Genomics**, v. 291, p. 1277-1291, 2016. Doi: 10.1007/s00438-016-1182-3

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; RENDÓN-ANAYA, M.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E.; ERB, I.; CÂMARA, F.; PRIETO-BARJA, P.; CORVELO, A.; SANSEVERINO, W.; WESTERGAARD, G.; DOHM, J. C.; JUNIOR - RAPPAS, G. J.; SABURIDO-ALVAREZ, S.; KEDRA, D.; GONZALEZ, I.; COZZUTO, L.; GÓMEZ-GARRIDO, J.; AGUILAR-MORÓN, M. A.; ANDREU, N. AGUILAR, M.; GARCIA-MAS, J.; ZEHNSDORF, M.; VÁZQUES, M. P.; DELGADO, SALINAS, A.; DELAYE, L.; LOWY, E.; MENTABERRY, A.; VIANELLO-BRONDANI, R. P.; GARCÍA, J. L.; ALIOTO, T.; SÁNCHEZ, F.; HIMMELBAUER, H.; SANTALLA, M.; NOTREDAME, C.; GABALDÓN, T.; HERRERA, ESTRELLA, A.; GUIGÓ, R. 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, n. 32, 2016. Doi:10.1186/s13059-016-0883-6

WANG, S. BASTEN, C.J.; ZENG, B. 2012. Windows QTL Cartographer 2.5. Dep. Stat., North Carolina State University. Home Page, 2020. Disponível em: < http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm >. Acesso em 17 de ago. 2020.

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, Â, F. B.; MELO, L. C. BRS Sublime - Common bean cultivar with carioca grain, resistance to angular leaf spot and high nutritional quality. **Crop Breeding Applied Biotechonology**, v. 18, n. 4, p. 440-445, 2018. Doi:10.1590/1984-70332018v18n4c65

WENZL, P.; CARLING, J.; KUDRNA, D.; JACCOUD, D.; HUTTNER, E.; KLEINHOFS, A.; KILIAN, A. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings National Academy Sciences (USA),** v. 101, n. 26, p. 9915–9920, 2004.

XIA, L.; PENG, K.; YANG, S.; WENZL, P.; CARMEN DE VICENTE, M.; FREGENE, M.; KILIAN, A. DArT for high-throughput genotyping of cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. **Theoretical Applied Genetics,** v. 110, p. 1092–1098, 2005.

YUSTER-LISBONA, F.J.; SANTALLA, M.; CAPEL, C.; GARCÍA-ALCÁZAR, M.; DE LA FUENTE, M.; CAPEL, J.; DE RON, A. M,; LOZAN, R. Marker-based linkage map of Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and mapping of QTLs underlying popping ability traits. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 136, 2012. Doi.org/10.1186/1471-2229-12-136

ZANARDO, L. G.; SILVA, F. N.; LIMA, A. T. M. MILANESI, D. F.; CASTILHO-URQUIZA, ALMEIDA, A. M. R.; ZERBINI, F. M.; CARVALHO, C. M. Molecular variability of cowpea mild mottle virus infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v. 159, n. 4, p. 727-737, 2014.

ZANARDO, L.G. & CARVALHO, C. M. Cowpea mild mottle virus (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): a review. **Tropical plant pathology**, v. 42, p. 417-430, 2017. Doi:10.1007/s40858-017-0168-y

ZHAO L.; FENG, C.; WU, K.; CHEN, W.; CHEN, Y.; HAO, X.; WU, Y. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: a review. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v.135, p. 15–26, 2017.

Apêndice A. Genes candidatos para o loco CPMMV.Pv08[a]

ID / Gene	Início (pb)	Fim	Descrição
Phvul.008G273600	61,735,20[b]	61,737,956	*Leucine-rich repeat* (*LRR*_1)//*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT_2*)//*Leucine*
Phvul.008G273700	61,741,746	61,747,280	*Leucine-rich Repeat* (*LRR*_1)//*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G273801	61,749,035	61,750,088	*Leucine-rich repeat* (*LRR*) *protein associated with apoptosis in muscle tissue*
Phvul.008G273900	61,755,148	61,758,150	*Leucine-rich repeat* (*LRR*_1)//*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2) //*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G274000	61,776,591	61,779,650	*Leucine-rich repeat* (*LRR*_1)//*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2) //*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G274100	61,783,591	61,786,602	*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT_2*)//*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G275000	61,853,078	61,855,595	*Protein kinase domain* (*Pkinase*)//*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G275100	61,858,296	61,860,853	*SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE WNK11-RELATED*
Phvul.008G276100	61,925,250	61,926,777	*Ras-suppressor protein* (*contains leucine-rich repeats*)
Phvul.008G276300	61,935,298	61,935,870	*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2)
Phvul.008G276400	61,938,810	61,940,687	*Non-specific serine/threonine protein kinase/threonine-specific protein kinase*
Phvul.008G276600	61,943,471	61,943,797	*Non-specific serine/threonine protein kinase/Threonine-specific protein kinase*
Phvul.008G277000	61,955,233	61,956,464	*Leucine-rich repeat* (*LRR*_1) // *Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2) //*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G277184	61,961,555	61,962,863	*Leucine-rich repeat* (*LRR*_8)
Phvul.008G277226	61,962,868	61,964,475	*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2)
Phvul.008G277268	61,968,905	61,969,916	*Leucine-rich repeat N-terminal domain* (*LRRNT*_2)
Phvul.008G277310	61,969,927	61,971,992	*Ras-suppressor protein* (*contains leucine-rich repeats*)
Phvul.008G277352	61,987,965	61,990,190	*Ras-suppressor protein* (*contains leucine-rich repeats*)
Phvul.008G281000	62,209,834	62,210,835	*Leucine Rich Repeat* (*LRR*_1)

Apêndice A. Continuação.

Phvul.008G281100	62,210,955	62,211,626	*Leucine rich repeat* (*LRR*-8)
Phvul.008G281500	62,239,170	62,243,094	*Protein kinase domain* (*Pkinase*)// *Leucine Rich Repeat* (*LRR*_1)//*Leucin*e *rich repeat* (*LRR*_8)

[a] Região do cromossomo - Pv8 (espécie *Phaseolus vulgaris*); [b] Gil et al. (2019).

4 PERSPECTIVAS

A resistência efetiva ao mosaico-dourado conferida por meio da Tecnologia RMD, evento Embrapa 5.1 (cv. BRS FC401 RMD), representa um avanço importante para o melhoramento genético do feijoeiro, bem como para o sistema produtivo da cultura no Brasil, com a disponibilidade de uma tecnologia que confere resistência genética a duas importantes viroses que acometem o feijão, o mosaico comum (*Bean common mosaic virus* - BCMV) e o mosaico-dourado (*Bean Golden mosaic virus* - BGMV), além de resistência moderada a outras doenças.

Não obstante a isso, este trabalho gera novas perspectivas para o desenvolvimento de cultivares transgênicas de feijão de segunda geração, com grãos tipo carioca e com padrão comercial, plantas com porte ereto e adaptadas à colheita mecanizada e resistentes às viroses BCMV e BGMV, além de integrar, também, resistência a outra importante virose para o feijão, o mosqueado-suave-do-caupi, causado pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). Potenciais surtos de CPMMV representam uma ameaça à produtividade de feijão-comum, sobretudo na região Central do Brasil, e tem preocupando os pesquisadores nos últimos anos. CPMMV causa, também, a doença necrose da haste da soja, sendo a soja uma excelente hospedeira de mosca-branca (*Bemisia tabaci*), o que tem contribuído para a alta incidência e distribuição de BGMV e CPMMV. Ambas viroses são transmitidas com muita eficiência pela mosca-branca e ocorrem simultaneamente em uma mesma planta de feijão.

Adicionalmente, a validação de marcadores moleculares ligados ao loco de resistência ao CPMMV se mostra viável por meio dos resultados evidenciados, sendo este o primeiro relato de estudo da herança da resistência ao CPMMV na cultivar de feijão carioca BRS Sublime (fonte de resistência mais promissora, até o momento). Além disso, as abordagens de mapeamento genético fino e a integração de mapas genéticos podem conferir marca(s) molecular(es) mais próxima(s) ao loco de resistência ao CPMMV, aumentando a eficiência da seleção.

Logo, a estratégia de resistência múltipla, com a incorporação de alelos de interesse por meio do uso de métodos convencionais de melhoramento e de ferramentas biotecnológicas, potencializa um cenário promissor para o desenvolvimento de novas cultivares de feijão carioca com resistência genética a importantes viroses, além de proporcionar novos estudos visando compreender melhor a natureza molecular e os

mecanismos associados a genes de resistência a vírus no feijão, sobretudo para as viroses transmitidas pela mosca-branca e de ocorrência simultânea no campo, além de estudos de manejo de *B*. *tabaci.* Nesse contexto, há a possibilidade de desenvolver um sistema de produção mais sustentável para o feijão no Brasil, além de garantir a segurança alimentar, uma vez que o grão de feijão representa uma importante fonte de proteína, principalmente para a população mais pobre.

5 REFERÊNCIAS

ALVES-FREITAS, D. M. T.; PINHEIRO-LIMA, B.; FARIA, J. C.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; MELO, F. L. Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New Cytorhadovirus in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. **Viruses**, v. 11, p. 1-11, 2019.

BRIGIDE, P.; ATAIDE, T. R.; GANNIATTI-BRAZANCA, S. G.; BAPTISTA, A. S.; ABDALLA, A. L.; FILHO, V. F. N.; PIEDADE, S. M. S.; BUENO, N. B.; SANT´ANA, A. E. G. Iron bioavailability of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) intrinsically labeled with ^{59}Fe. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 3, p. 260-265. Doi: 10.1016/j.jtemb.2014.03.001

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA-JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**: do plantio à colheita. Viçosa: Ed. UFV, 2015. 384p.

CHERUKU, D.; LAL, S. K.; TALUKDAR, A.; MANDAL, B. Inheritance and mapping of resistance against *cowpea mild mottle virus* strain D1 in soybean. **Plant Breeding**, v. 136, p. 155-160, 2017. Doi: 10.1111/PBR.12455

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em < http://www.conab.gov.br>. Acesso em 20 de abril. 2021.

DINON, A. Z.; BROD, F. C. A.; MELLO, C. S.; OLIVEIRA.; E. M. M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p. 4672−4677. Doi: 10.1021/jf3011257

Embrapa Arroz e feijão. Home Page, 2019. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em 23 jun. 2018

FAOESTAT. Home Page, 2020. Disponível em: < http://faostat3.fao.org>. Acesso em 22 de out. 2020.

FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; SOUZA, T. P. O.; QUINTELA, E. D.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, S. G. Golden mosaic of common beans in brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, Saint Paul, 2016. Disponível em:

<http://www.apsnet.org//publications/apsnetfeatures/Pages/GoldenMosaic.aspx>.Acessado em 02 de abril. 2019.

FARIA, L. C.; PEREIRA, H. S.; DEL PELOSO, M. J.; BRÁS, A. J. B. P.; MOREIRA, J. A. A. DE 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: 10.1016/j.fcr.2012.11.016

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**, v. 132, n.11, p. 2003 – 2016, 2019.

HELLER-USZYNSKA, K.; USZYNSKI, G.; HUTTNER, E.; EVERS, M.; CARLIG, J.; CAIG, V, AITKEN, K.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G.; COX, M.; GILMOUR, R.; D' HONT, A.; BUTTERFIELD, M.; GLASZMANN J-C.; KILIAN, A. Diversity arrays technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. **Molecular Breeding**, v. 28, p. 37 – 55, 2011. Doi:10.1007/s11032-010-9460-y

KILIAN, A.; WENZL, P.; HUTTER, E.; CARLING, J.; XIA, L.; BLOIS, H.; CAIG, V.; HELLER-USZYNSKA, K.; JACCOUD, D.; HOPPER, C.; ASCHENBRENNER-KILIAN, M.; EVERS, M.; PENG, K.; CAYLA, C.; HOK, P.; USZYNSKI, G. Diversity arrays technology: a genetic genome profiling technology on open platforms. In: POMPANON, F.; BONIN, A. **Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols**. 1ª ed. Totowa: Humana Press. 2012. cap 5. p. 67-89.

LOBATON, J. D.; MILLER, T.; GIL, J.; ARIZA, D.; FERNANDO DE LA HOZ, J.; SOLER, A.; BEBEE, 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, n.2, 2018. Doi: 10.3835/plantgenome2017.08.0068

MACE, E.; XIA, L.; JORDAN, D. R.; HALLORAN, K.; PARH, D. K.; HUTTNER, E.; WENZL, P.; KILIAN, A. DArT markers: diversity analyses and mapping in Sorghum bicolor. **BMC Genomics**, v. 9, n. 26, 2008.

MARTINS, S. M.; P. G. S. MELO, P. G. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, L.C.; PEREIRA, H.S. Genetic parameters and breeding strategies for high of iron and zinc in *Phaseolus vulgaris* L. **Genetic Molecular Reseach**, v. 15, n. 2, p. gmr15028011, 2016. Doi:10.4238/gmr.15028011

MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J. D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, v. 39, p. 1216–1219, 1996. Doi: 10.1139/g96-155

MEZIADI, C.; BLANCHET, S.; GEFFROY, V.; PFLIEGER, S. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. **Plant Science**, v. 265 p. 39-50, 2017.

OBLESSUC, P. R.; CARDOSO-PERSEGUINI, J. M. K.; BARONI, R. M.; CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CAMARGO, L. E. A.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, 126, p. 2451-2465, 2013. Doi:10.1007/s00122-013-2146-1.

PATROTI, P.; VISHALAKSHI, B.; UMAKANTH, B.; SURESH, J.; SENGUTTUVEL, P.; MADHAV, M. S. Marker-assisted pyramiding of major blast resistance genes in Swarna-Sub1, an elite rice variety (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 215, n. 179, 2019. Doi:10.1007/s10681-019-2487-1

PAULA, N.T., FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. Reduction of viral load in whitefly (*Bemisia tabaci* Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plants. **Virus Reseach**, v. 210, p. 245-247, 2015; Doi:10.1016/j.virusres.2015.08.012

PASEV, G.; KOSTOVA, D.; SOFKOVA, S. Identification of genes for resistance to bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding lines using conventional and molecular methods. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 1, p.19-25, 2013.

SCHMUTZ, J.; MC CLEAN, P.; MAMIDI, S.; WU, G. A.; CANNON S. B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p.707-713, 2014.

SILVA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; e SILVA, F. F.; de BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P.; da FONSECA, C. E. L.; SONG, Q.; CREGAN, P. B.; CARNEIRO, J. E. S. Linkage fine-mapping and QTLs affecting morphoagronomic traits of Mesoamerican x Andean RIL common bean population. **Euphytica,** v. 14, n. 12**,** p**.** 214-221, 2018.

SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L; DEL-PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A.; AGUIAR, M. S.; QUINTELA, E. D.; MELO, C. L. P.; HUNDRIA, M.; VIANELO, R. P.; PEREIRA, H, S.; MELO, L. C. Agronomic performance and yield stability of the RNA interference-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean. **Crop Sci**, v. 57, p. 579-591. 2018. Doi:10.2135/cropsci2017.06.0355

VALDISSER, P. A. M. R.; JUNIOR-PAPPAS, G. L.; MENEZES, I. P. P.; MÜLLER, B. S. F.; PEREIRA, W. J.; NARCISO, M. G.; BRONDANI, G.; SOUZA, T. L. O. P.; 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 Genetic Genomics**, v. 291, p. 1277-1291, 2016. Doi: 10.1007/s00438-016-1182-3

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; RENDÓN-ANAYA, M.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E.; ERB, I.; CÂMARA, F.; PRIETO-BARJA, P.; CORVELO, A.; SANSEVERINO, W.; WESTERGAARD, G.; DOHM, J. C.; JUNIOR - RAPPAS, G. J.; SABURIDO-ALVAREZ, S.; KEDRA, D.; GONZALEZ, I.; COZZUTO, L.; GÓMEZ-GARRIDO, J.; AGUILAR-MORÓN, M. A.; ANDREU, N. AGUILAR, M.; GARCIA-MAS, J.; ZEHNSDORF, M.; VÁZQUES, M. P.; DELGADO, SALINAS, A.; DELAYE, L.; LOWY, E.; MENTABERRY, A.; VIANELLO-BRONDANI, R. P.; GARCÍA, J. L.; ALIOTO, T.; SÁNCHEZ, F.; HIMMELBAUER, H.; SANTALLA, M.; NOTREDAME, C.; GABALDÓN, T.; HERRERA, ESTRELLA, A.; GUIGÓ, R. 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, n. 32, 2016. Doi:10.1186/s13059-016-0883-6