



MARIANA ANDRADE DIAS

**VALIDAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À
RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO COMUM A RAÇA 65 DE
*Colletotrichum lindemuthianum***

**LAVRAS – MG
2023**

MARIANA ANDRADE DIAS

**VALIDAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO COMUM A RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Dias, Mariana Andrade.

Validação de marcador molecular associado à resistência do
feijoeiro comum a raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* /
Mariana Andrade Dias. - 2023.

55 p.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Resistência genética. 3. Marcador
SNPs. I. Souza, Elaine Aparecida de. II. Título.

MARIANA ANDRADE DIAS

**VALIDAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO COMUM A RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

**VALIDATION OF A MOLECULAR MARKER ASSOCIATED WITH THE
RESISTANCE OF COMMON BEANS TO RACE 65 OF *Colletotrichum
lindemuthianum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 15 de Dezembro de 2023.

Dra. Rosana Pereira Vianello	EMBRAPA
Dra. Fernanda Aparecida Castro Pereira	ESALQ
Profa. Dra. Lucimara Cruz de Souza	UFLA
Dra. Larissa Carvalho Costa	USDA

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por se fazer presente nela, iluminando sempre o meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade concedida. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, José e Andréa, pelo incentivo, apoio incondicional, paciência, amor, e por todos os sonhos dos quais abriram mão para que o meu se realizasse.

À minha irmã Juliana, pela paciência, carinho, atenção e dedicação, e por toda a ajuda nesse trabalho. Ela é a minha inspiração.

Ao meu Tio Tadeu e à minha avó Júnia (*in memoriam*), por todo o carinho e ensinamentos durante estes anos.

À professora Elaine, pela oportunidade, pela orientação na elaboração e execução deste projeto, pelos ensinamentos, pela paciência e confiança.

À Dra. Rosana, por todo suporte na EMBRAPA, agradeço por sua orientação, conselhos e pela oportunidade de trabalharmos juntas.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Aos amigos de Laboratório de Resistência, os que já se foram e os que permanecem ainda no laboratório, por toda a ajuda, amizade e a prazerosa convivência.

Ao Miller, pela disposição, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

Aos amigos dessa jornada, obrigada pela parceria, paciência e incentivo. Em especial os meus amigos Rafael, Reberth e Samanta, por sempre me apoiarem, incentivarem e não me deixarem desistir.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para que este sonho se tornasse realidade.

MUITO OBRIGADA!

Aos meus pais, José e Andréa, à minha irmã Juliana, minha sobrinha Júlia e ao meu tio Tadeu, que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta caminhada.

Dedico

RESUMO

O controle genético da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, tem sido um desafio devido à grande variabilidade patogênica, entre e dentro das raças. Contudo, marcadores SNPs ligados a locos de resistência a diferentes isolados de *C. lindemuthianum* têm sido identificados e com potencial para utilização em programas de melhoramento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi validar a associação do marcador SNP ss715649771 com a resistência ao isolado LV134 da raça 65. Para isto, foram realizadas avaliações fenotípicas e genotípicas em uma população F₂ de 192 plantas, derivadas do cruzamento entre as cultivares BRS Cometa (suscetível) e BRSMG Ouro Vermelho (resistente), e também em um painel de 55 genótipos constituído de cultivares e linhagens elite de diferentes programas de melhoramento. Além disso, foi realizada uma análise de regressão linear do efeito do marcador e a eficiência de seleção (ES) para marcadores codominantes foi estimada. A fenotipagem da geração F₂ resultou, como esperado, na proporção 3R:1S ($p = 0,093$), assim como a genotipagem também se ajustou a 1CC:2CT:1TT ($p = 0,095$). A frequência de recombinação da população F₂ foi estimada em 10,0%, onde foram observadas 11 plantas com fenótipos recombinantes (4 resistentes com o alelo T, e 7 suscetíveis com alelo C). A estimativa de ES foi de 96%, e o modelo de regressão linear estatisticamente significativo, explicando cerca de 42% da variação. As análises com o painel de 55 genótipos revelaram 41% de indivíduos recombinantes (9 resistentes com o alelo T, e 14 suscetíveis com o alelo C). Considerando o alto valor de ES, os resultados do presente trabalho evidenciam o alto potencial de utilização desse marcador nas rotinas de Seleção Assistida por Marcadores. Contudo, a distância de 10cM entre a marca e o gene, e o número de indivíduos recombinantes observado no painel de cultivares podem sugerir a existência de outros alelos que conferem resistência à raça 65 nas cultivares avaliadas. A utilização do marcador SNPss715649771 em programas de melhoramento, junto a outras marcas já conhecidas, contribuirá para a piramidação de genes de resistência a esta raça em linhagens de feijoeiro comum.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Resistência genética; Marcador SNPs.

ABSTRACT

The genetic control of anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum* fungus, has become a challenge due the great pathogenic variability among and within races. However, SNPs markers linked to resistance loci to different *C. lindemuthianum* isolates have been identified and have potential to be used in common bean breeding programs (*Phaseolus vulgaris* L.). In this context, the present study aimed to validate the SNP marker ss715649771 association with resistance to the isolate LV134 of race 65. For this, phenotypic and genotypic evaluations were carried out in an F₂ population of 192 plants, derived from the cultivars BRS Cometa (susceptible) and BRSMG Ouro Vermelho (resistant) cross, and also in a 55 genotypes panel of cultivars and elite lines from different breeding programs. In addition, a linear regression analysis of the marker effect was carried out, and the selection efficiency (SE) for codominant markers was estimated. The generation F₂ phenotyping resulted, as expected, in the 3R:1S ratio ($p = 0.093$), and the genotyping also adjusted to 1CC:2CT:1TT ($p = 0.095$). The recombination frequency of the F₂ population was estimated at 10.0%, with 11 plants presenting recombinant phenotypes (4 resistant with T allele, and 7 susceptible with C allele). The estimated SE was 96%, and the linear regression model was statistically significant, explaining about 42% of the variation. The panel analyses of 55 genotypes revealed 41% of recombinant individuals (9 resistant with T allele, and 14 susceptible with C allele). Considering the high SE value, results shows a high potential use of this marker in Marker-Assisted Selection routines. However, the 10cM distance between the marker and the gene, and the number of recombinant individuals observed on the cultivars panel can suggest the existence of other alleles that confer resistance to race 65 in the evaluated cultivars. The use of the SNPss715649771 marker in breeding programs, together with other already known markers, will contribute to the pyramiding of resistance genes to this race in common bean lines.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; Genetic resistance; SNPs marker.

INDICADORES DE IMPACTO

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais O feijão é uma fonte importante de proteína vegetal em muitos países no mundo. O controle da antracnose contribui para garantir a segurança alimentar das populações que dependem do feijão como uma fonte primária de alimento. A resistência genética pode reduzir a vulnerabilidade dos agricultores a perdas na cultura devido à ocorrência dessa doença. Principalmente em regiões com condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, a ocorrência da antracnose pode levar à insegurança alimentar e à perda na renda dos agricultores. Os marcadores moleculares obtidos neste trabalho poderão ser utilizados de forma rotineira na identificação de genótipos resistentes à antracnose nos programas de melhoramento do feijoeiro. As informações obtidas sobre a resistência das linhagens de feijoeiro poderão ser utilizadas em projetos futuros que permitirão o avanço do conhecimento na obtenção de resistência durável para a antracnose do feijoeiro, contribuindo para uma agricultura sustentável.

IMPACT INDICATORS

Common bean is an important source of vegetable protein in many countries around the world. Anthracnose control contributes to ensuring food security for populations that depend on common beans as a primary source of food. Genetic resistance can reduce farmers' vulnerability to crop losses due to the occurrence of this disease. Especially in regions with environmental conditions favorable to the development of the disease, the occurrence of anthracnose can lead to food insecurity and a reduction in farmers' income. The molecular markers obtained in this study could be routinely used to identify genotypes resistant to anthracnose in bean breeding programs. The information obtained about the resistance of common bean lines can be used in future projects that will allow the advancement of knowledge in obtaining durable resistance to common bean anthracnose, contributing to sustainable agriculture.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 A Cultura do feijoeiro no Brasil.....	9
2.2 Aspectos gerais da antracnose do feijoeiro	10
2.3 Controle genético da resistência do feijoeiro à antracnose.....	12
2.4 Marcadores moleculares	15
2.5 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).....	17
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Material genético	34
2.2 Validação do marcador SNP ss715649771 associado à região LV134.....	34
2.3 Fenotipagem da severidade da antracnose nos genótipos de feijoeiro	35
2.4 Genotipagem da população F ₂ e do painel de diversidade de feijoeiro.....	36
2.5 Análises Estatísticas.....	37
3 RESULTADOS	37
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior país produtor e consumidor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), uma importante fonte nutricional e cultural socioeconomicamente significativa (KOTUE et al., 2018; EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2021). A ocorrência de doenças é um dos principais problemas que acomete a cultura do feijoeiro, causando grande instabilidade na produção. O controle genético da antracnose, uma das principais doenças que afeta a cultura, é complexo, devido a ampla variabilidade patogênica entre e dentro das raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; SANTOS et al., 2008; COSTA et al., 2017; COSTA et al., 2021).

Para a resistência do feijoeiro a *C. lindemuthianum*, atualmente, 14 genes estão caracterizados e aceitos oficialmente pelo Comitê de Genética da Cooperativa de Melhoramento do Feijão – BIC das quais quatro têm séries alélicas: *Co-1* (*Co-1*, *Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴ e *Co-1*⁵); *Co-2*; *Co-3* (*Co-3*, *Co-3*², *Co-3*⁴ e *Co-3*⁵); *Co-4* (*Co-4*, *Co-4*² e *Co-4*³); *Co-5* (*Co-5* e *Co-5*²); *Co-6*; *Co-8*; *Co-11*; *Co-12*; *Co-13*; *Co-14*; *Co-15*; *Co-16*; e *Co-17* (CHEN et al., 2017; <http://www.bic.uprm.edu>).

O controle genético da resistência de cultivares de feijoeiro a seis isolados diferentes pertencentes a raça 65 de *C. lindemuthianum* foi estudado por Costa et al. (2017). A resistência a cada isolado é conferida por genes duplicados, sendo observada a segregação de 15 resistentes: 1 suscetível na geração F₂. Neste trabalho umas das populações F₂ avaliadas é oriunda do cruzamento das cultivares BRSMG Ouro Vermelho e BRSMG Estilo. De acordo com os resultados e nomenclatura adotada pelos autores a cultivar resistente BRSMG Ouro Vermelho apresenta a constituição genética *COECOECOFCOF* e a outra suscetível *COECOECOFCOF* para os genes que conferem resistência ao isolado LV134 da raça 65. Portanto, as cultivares diferem em apenas um dos genes que conferem resistência a este isolado.

Posteriormente, Costa et al. (2021) mapearam QTLs envolvidos na resistência a este isolado utilizando esta população F₂, e também realizaram um estudo de associação de todo o genoma (GWAS) com um painel de diversidade de linhagens de feijoeiro. Foi detectada uma região genômica no grupo de ligação Pv04 associada a dez marcadores SNPs associados a resistência ao isolado LV134 entre 1.1345 Mb e 1.1657 Mb. Dentre esses marcadores, o SNP *ss715649771* foi o principal marcador selecionado. A estratégia de identificação de marcadores ligados a locos de resistência a doenças no feijoeiro tem sido amplamente utilizada em diversos

programas de melhoramento, e uma vez validados, muitos dos marcadores mostram potencial de aplicação significativo na seleção assistida por marcadores - SAM (BURT et al. 2015; PERSEGUINI et al. 2016; ZUIDERVEEN et al. 2016; WU et al. 2022; LOBATON et al. 2018; GIL et al. 2019; NAY et al. 2019; FRITSCHÉ-NETO et al. 2019).

A Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é considerada um avanço da genética molecular para somar-se a outros procedimentos utilizados para facilitar o processo de melhoramento, principalmente em etapas iniciais do programa, a fim de eliminar genótipos indesejados. Porém, a validação de SNPs é um passo crucial para programas de melhoramento que usam ou visam utilizar a SAM (SHAFI et al., 2022). Atualmente, diversos trabalhos vêm obtendo sucesso no processo de validação (ÁLVAREZ et al., 2019; GOMES-MESSIAS et al., 2022). Gomes-Messias et al. (2022) utilizando a genotipagem com base no sistema TaqMan® para marcadores como spnPV 0070 (*Co-4²*), snpP 8282v3-817 (*Co-4²*) e snpPV 0025 (Phg-2), obtiveram uma amplificação altamente específica dos alelos desejados, com eficiência de seleção de marcadores de aproximadamente 99,7% e 99,8%, respectivamente. A identificação de marcadores associados à resistência em feijoeiro comum é uma prática bem estabelecida e necessária para utilização desses marcadores na SAM.

A eficiência de seleção de cada marcador SNP ss715649771, identificado como ligado ao gene *COE* de resistência à antracnose, foi determinada para a sua utilização na SAM em programas de melhoramento, visando resistência a raça 65 de *C. lindemuthianum*, quando a mesma fonte de resistência for utilizada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Cultura do feijoeiro no Brasil

O feijão comum pertence à família Fabaceae (ou Fabáceas), subfamília Faboideae, gênero *Phaseolus* L. e espécie *Phaseolus vulgaris* L. É uma espécie autógama, apresentando baixa taxa de alogamia, sendo esta inferior a 1,4% (VIEIRA et al., 2005; BORÉM; CARNEIRO, 2015). Cerca de 61% da produção mundial deste produto é proveniente de apenas seis países, sendo eles o Brasil, China, EUA, Índia, Myanmar e México. Essa leguminosa é cultivada em todo o território brasileiro, tendo como principais produtores os estados do Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Bahia e São Paulo (CONAB, 2023).

Entre 1985 e 2021 houve uma redução considerável na área cultivada (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2022). Contudo, a produção continuou a crescer, fato esse, devido

principalmente ao aumento da produtividade, que passou de 514 kg.ha⁻¹ em 1985 para 1.463 kg.ha⁻¹ em 2021 (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2022). Em termos de consumo nacional do produto por pessoa, em média, é de 19 quilos de feijão por ano. Porém, fatores como disponibilidade interna e dos preços no mercado afetam diretamente o consumo do produto. O feijão, por ser um alimento de baixo custo, desempenha um papel importante na dieta brasileira, pois os grãos contêm alto valor nutricional como fonte de proteína vegetal, vitaminas do complexo B e sais minerais. Além disso, pode ser cultivado em diferentes condições de clima e solo (CONAB, 2018).

No Brasil, o feijoeiro é cultivado em três safras: i) a primeira, conhecida como safra das águas, e é assim chamada porque o plantio e a colheita ocorrem com alto índice de chuvas, o que favorece a ocorrência de doenças fúngicas, como por exemplo, a antracnose. O plantio desta safra na região Centro-Sul vai de agosto a dezembro, e no Nordeste, de maio a junho; ii) a segunda safra, realizada no período com o menor índice de chuva no país, é chamada de safra da seca, e a semeadura é realizada de dezembro a março; iii) já a terceira, a safra irrigada, ou de outono-inverno, é assim conhecida por se referir à colheita do feijão irrigado, a qual tem a concentração do plantio na região Centro-Sul no período de abril a junho. O feijão pode ser colhido em média após 90 dias depois da semeadura (MAPA, 2016). Considerando a primeira safra 2018/2019, estima-se que a área semeada poderá variar de 51 e 55 mil hectares, podendo ter um acréscimo de 16,2% e 25,3% em relação à safra passada (CONAB, 2018).

Vários fatores limitam a produção do feijoeiro, dentre eles destacam-se as doenças, pois estas reduzem a produtividade da cultura e depreciam a qualidade do produto (SARTORATO et al., 2000). Dessa forma, a obtenção de cultivares resistentes é uma questão relevante tratada pelos melhoristas, uma vez que é a forma mais eficiente e econômica de controle de diversas doenças que acometem a cultura. No entanto, a obtenção de cultivares com resistência durável é dificultada pela variabilidade do patógeno que frequentemente conseguem quebrar essa resistência (BORÉM; MIRANDA, 2005).

2.2 Aspectos gerais da antracnose do feijoeiro

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é uma das principais doenças do feijoeiro (SHAFI et al., 2022), sobretudo por ser capaz de infectar a cultura nas três épocas de cultivo, se destacando nas regiões subtropicais e temperadas, especialmente em localidades com temperaturas moderadas a frias e com alta umidade relativa. No Brasil esta doença prevalece nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande

do Sul (KIMATI et al., 1997). Porém, embora seja uma doença de caráter cosmopolita, apresenta maiores índices de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, com temperaturas amenas, entre 13 a 27°C, associadas à alta umidade relativa do ar (PASTOR-CORRALES, 1989; KIMATI et al., 1997). Segundo Crispin et al. (1976), temperaturas superiores a 30°C ou inferiores a 13°C, limitam tanto a infecção como o desenvolvimento do fungo.

Os sintomas da doença aparecem em todos os estágios de crescimento da planta, podendo ser observado após o sexto dia da infecção, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes. As sementes infectadas são ligeiramente descoloridas, podendo apresentar cancos cuja coloração varia de amarela a café-escuro ou negra. Já nos pecíolos e caule as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura. Nas folhas as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escuro a negras. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por um bordo de coloração laranja-avermelhada (SARTORATO, 1988).

O patógeno sobrevive em restos culturais na forma de esporos, sendo as sementes infectadas a principal via de sobrevivência e disseminação (VECHIATO et al., 2001). Após a germinação destas sementes, observam-se lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo das plantas (BARCELOS, 2010). Além da disseminação via sementes infectadas, a água da chuva ou da irrigação torna-se um meio de disseminação a curta distância.

A ampla distribuição no Brasil é facilitada pelo livre comércio de grãos entre os estados e pela reutilização dos mesmos grãos, por se tratar de uma espécie autógama, para futuros plantios em uma mesma área, acarretando um aumento no potencial do inóculo do patógeno de uma safra para outra (THOMAZELLA et al., 2000).

As perdas causadas por este patógeno podem chegar a 100% quando são utilizadas sementes contaminadas para plantio e quando ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao seu desenvolvimento, como alta umidade e temperaturas amenas (VIDIGAL FILHO et al., 2020; SINGH et al., 1991; TRUTMANN; GRAF, 1993). Além de diminuir a produtividade, os sintomas desta doença depreciam a qualidade do produto, por ocasionarem manchas nos grãos que inviabilizam o consumo do produto (DALLA PRIA et al., 2003).

Entre os métodos de controle empregado, destaca-se o controle químico e o uso de cultivares resistentes. A resistência genética é um dos métodos mais eficientes no controle da doença, pois além de não onerar o custo de produção, evita o controle químico, que além de caro, causa danos ambientais já conhecidos (ALMEIDA et al., 2021). Portanto, cultivares com

diferentes genes de resistência específicos de raça ou de amplo espectro que conferem resistência contra múltiplas raças dos patógenos precisam ser identificados e investigados. Isto possibilita a utilização de tais cultivares em diferentes programas de melhoramento de feijoeiro comum. No entanto, a resistência genética é dificultada pelo fato do agente causal apresentar grande variabilidade patogênica (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006; PADDER et al., 2017; PINTO et al., 2012).

Segundo Nunes et al. (2021), atualmente foram descritas 298 raças de *C. lindemuthianum* ao redor do mundo. No Brasil foram identificadas 89 raças (NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2021), as raças 65, 73, 81 e 89 as mais frequentes (PINTO et al., 2012; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Outro fator que dificulta a obtenção de cultivares resistentes é a variabilidade patogênica dentro das raças (ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011; ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2008; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Devido a esta alta variabilidade, o monitoramento constante deste patógeno é essencial para auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes à antracnose do feijoeiro. O melhoramento genético assistido por marcadores moleculares parece ser uma alternativa promissora para sobrepor estas limitações da variabilidade e facilitar a obtenção de genótipos resistentes (NAY et al., 2019).

2.3 Controle genético da resistência do feijoeiro à antracnose

Em muitas situações, apenas por meio do melhoramento genético é que se consegue aumentos na produtividade e qualidade dos grãos, pois este tem como vantagem a capacidade de promover alterações hereditárias. Em outras palavras, por meio do melhoramento é possível transmitir as características desejáveis de um genótipo, por exemplo, pouco adaptado, para outro, adaptado às condições edafoclimáticas da região de interesse.

O conhecimento do tipo de ação gênica que predomina no controle genético de um caráter é um fator importante, principalmente para a condução eficiente de um programa de melhoramento. Quando o controle genético é complexo, envolvendo muitos locos, ou então quando a influência de fatores ambientais sobre a expressão do caráter for pronunciada, há uma maior dificuldade em se conhecer com detalhes a natureza da ação gênica presente (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

Quando se trabalha com resistência a patógenos, têm-se dois sistemas genéticos que interagem entre si, a patogenicidade (virulência e avirulência) e a reação (resistência e

susceptibilidade) e ambos dependem da constituição genética do patógeno e do hospedeiro. Ou seja, para que estes dois caracteres se expressem, eles devem ser considerados em conjunto porque são interdependentes. A teoria gene-a-gene proposta por Flor (1956) demonstra uma relação entre os sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno, em que, para cada gene que condiciona resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona avirulência. Em nível molecular, o alelo de resistência está relacionado à presença de uma substância receptora nas células do hospedeiro e o alelo de avirulência a uma substância elicitora no patógeno, que induz a expressão de defesa da planta por meio de reações de hipersensibilidade (DE WIT, 2002).

Aproximadamente 25 locos de resistência à antracnose com múltiplos alelos de resistência de origem mesoamericana e andina já foram identificados (MUNGALU et al., 2020; VIDIGAL FILHO et al., 2020). Alguns desses genes codificam para proteínas que reconhecem e respondem à presença do fungo causador da doença, ativando uma série de mecanismos de defesa na planta. Outros genes estão envolvidos na síntese de compostos que impedem o crescimento do fungo, ou na regulação da expressão de outros genes relacionados à resposta imune da planta.

Para *C. lindemuthianum*, vários alelos de resistência de diferentes genes já foram descritos, sendo estes *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-8*, *Co-9*, *Co-10*, *Co-11*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-16*, *Co-17*, *Co-u*, *Co-v*, *Co-w*, *Co-x*, *Co-y*, *Co-z*, *CoPv02c* e *CoPv09c* (GEFFROY et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; CAMPA et al., 2014). No caso do gene de resistência *Co-8*, a resistência é conferida pelo alelo recessivo. Há relatos também da ocorrência de alelismo múltiplo para alguns genes, sendo eles: *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*. Os genes *Co-7*, *Co-9* e *Co-10*, por sua vez, foram renomeados como os alelos *Co-3⁵*, *Co-3³* e *Co-3⁴*, respectivamente, do gene *Co-3* (COSTA et al., 2017; PÁDUA; RAMALHO; ABREU, 2015). Além disso, pesquisas recentes indicam a presença de mais 11 genes e um alelo de resistência ao *C. lindemuthianum*, sendo estes ainda não validados pelo Comitê de Genética para Melhoramento do Feijão (BIC; CHEN et al., 2017; NANAMI et al., 2017; LIMA CASTRO et al., 2017).

De acordo com pesquisas recentes, a coexistência de resistência qualitativa não exclui a presença de resistência quantitativa no contexto do controle genético da antracnose (RAHMANZADEH et al., 2022; SHAFI et al., 2022). Os cientistas conduziram uma análise abrangente dos Locos de Características Quantitativas (QTLs) previamente documentados em estudos anteriores, integrando esses dados em um mapa consensual, visando aprimorar sua

acessibilidade em futuras aplicações em programas de melhoramento genético. Os resultados evidenciaram que a variabilidade fenotípica explicada por esses QTLs abrangeu uma amplitude considerável, variando de 3,97% a 46,8%, com uma média de 16,54%. Adicionalmente, por meio de uma meta análise, foram identificados 11 meta-QTLs (MQTLs) distribuídos em seis cromossomos do feijão comum, juntamente com a identificação de 10 regiões de QTLs altamente influentes. Nove dos 11 MQTLs identificados foram confirmados por meio de validação utilizando associações de marcadores (MTAs) conforme relatado em Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS; SHAFI et al., 2022).

Além dos genes específicos envolvidos na resistência à antracnose, há também outros fatores genéticos que influenciam a expressão desses genes e a capacidade da planta de resistir à doença. Por exemplo, a herança da resistência pode ser influenciada por fatores como a presença de alelos dominantes ou recessivos, a interação entre diferentes genes e a presença de fatores ambientais que afetam a expressão dos genes.

De acordo com Ragagnin et al. (2003), a estratégia mais aconselhável para desenvolver cultivares de feijão resistentes à antracnose é a introgressão simultânea de diversos genes de resistência em uma cultivar-elite, uma técnica conhecida como piramidação. Essa abordagem é recomendada devido à ampla variabilidade do patógeno, o que torna viável o programa de melhoramento genético. Contudo, a principal dificuldade encontrada ao implementar um programa de piramidação reside na identificação dos genes de resistência correspondentes a cada genótipo, um desafio significativo nesse processo.

Um dos principais desafios ao realizar um programa de piramidação genética reside na tarefa de identificar os genes de resistência correspondentes a cada genótipo. Essa etapa é particularmente complexa devido à necessidade de realizar múltiplas inoculações, o que pode onerar o programa em termos de tempo e recursos financeiros. Além disso, existem as interações epistáticas que podem mascarar a expressão de genes específicos. Isso ocorre devido à existência de vários genes que influenciam a expressão do caráter (FERREIRA et al., 2013). Portanto, o uso de marcadores moleculares se mostra uma abordagem promissora para obter ganhos genéticos significativos durante o processo de introdução de genes de interesse. A integração desse método permite uma monitorização mais eficiente e custo-efetiva da piramidação, uma vez que reduz a necessidade de múltiplas inoculações de patógenos. É importante ressaltar que a maioria das categorias de marcadores moleculares é menos suscetível a influências ambientais e interações genéticas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Portanto, o uso de ferramentas moleculares tem se tornado cada vez mais valioso e difundido no melhoramento do feijoeiro-comum, especialmente no desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças.

2.4 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para identificar regiões específicas do DNA, permitindo a identificação de genes responsáveis por características de interesse. Essa ferramenta foi desenvolvida a partir dos anos 80 e desde então, tem sido amplamente utilizada para melhoramento de plantas (BOTSTEIN et al., 1980).

O desenvolvimento desses métodos baseados no DNA proporcionou uma oportunidade para analisar diretamente as diferenças a nível do genoma do organismo, sem se basear em análise de proteínas expressas ou fenótipos (ZHAO et al., 2010). São usados para caracterizar a variabilidade genética de uma população de plantas, identificando quais indivíduos apresentam características de interesse e quais genes estão relacionados com essas características. Isso permite selecionar plantas com características desejáveis e descartar aquelas que não possuem essas características.

A combinação de métodos clássicos de melhoramento genético com tecnologias de genética molecular em análises do DNA, têm contribuído significativamente para a ampliação do conhecimento genético e acelerar os programas de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Essa ferramenta permite aos melhoristas selecionar plantas com características desejáveis, como resistência a doenças, tolerância à seca, maior produtividade, melhor qualidade dos grãos, entre outras.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na cultura do feijoeiro para estudar a diversidade genética e a estrutura populacional (ALMEIDA et al., 2020; DELFINI et al., 2021), identificar genes associados a caracteres de interesse agrônômico (OBLESSUC et al., 2015), e auxiliar no melhoramento genético e na seleção de genótipos promissores (FERREIRA et al., 2010; PERSEGUINI et al., 2016). Além disso, com o auxílio dos marcadores, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para a identificação de QTLs associados às características de interesse (COSTA et al., 2021; ALMEIDA et al., 2021), e mapeamento associativo (COSTA et al., 2021; ALMEIDA et al., 2020; KATUURAMU et al., 2018). Eles também são usados para estudar a filogenia e a evolução da espécie (BITOCCHI et al., 2017).

Existem vários tipos de marcadores moleculares, na cultura do feijoeiro marcadores como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), utilizados para estudar a diversidade genética do feijoeiro, os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) também conhecidos como microssatélites, utilizados para estudar a variabilidade genética, a identificação de variedades, o mapeamento genético e a caracterização de populações, e os marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), usados para estudar a variabilidade genética e para construir mapas genéticos (TAUTZ, 1989; PARAN; MICHELMORE, 1993; YOUNG et al., 1998). Já marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), são marcadores baseados na variação de um único nucleotídeo na sequência de DNA, e esses aparecem em maior abundância no genoma (CHAGNÉ et al., 2007). São amplamente utilizados para estudar a variabilidade genética, a identificação de variedades, o mapeamento genético e a caracterização de populações. Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), o número de SNPs identificados tem aumentado substancialmente (BLAIR et al., 2013).

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração foi possível uma produção de dados genéticos em larga escala e com custos cada vez mais baixos (SORIANO, 2020). Isso propiciou um aumento do volume de pesquisas envolvendo a genômica estrutural e funcional em todo o mundo, possibilitando a busca de novos genes candidatos a efetores em diversas espécies (VARSHNEY et al., 2009). Além disso, essa tecnologia permite a leitura simultânea de milhões de fragmentos de DNA ou RNA em paralelo, o que permite a identificação de variantes genéticas, mutações e alterações em larga escala no genoma, transcriptoma ou epigenoma de uma amostra biológica. Algumas plataformas de sequenciamento de nova geração que vêm sendo utilizadas atualmente, dentre elas, as plataformas Illumina e Nanopore PromethION tem destaque.

A obtenção de muitos marcadores a partir de grandes conjuntos de genótipos vem sendo amplamente utilizado atualmente, permitindo a construção de mapas de alta resolução, análises de estruturação genética de populações, avaliação da filogenia, mapeamento de QTL e seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de plantas (AGRAWAL et al., 2020; AHMAR et al., 2020; BHATIA, 2020; CHAGNÉ et al., 2007; SORIANO, 2020). Além disso, a grande disponibilidade de SNPs, aliada à sequência do genoma de referência do feijoeiro, tem permitido o desenvolvimento de chips de genotipagem de alto rendimento, para a construção de mapas de ligação (SONG et al., 2015). A anotação do genoma do feijoeiro também tem permitido a busca por genes candidatos dos alelos mapeados.

Os marcadores moleculares que estão disponíveis para o feijoeiro, notadamente os microssatélites (SSRs), como referenciado em estudos anteriores (BLAIR et al., 2009, 2013), e os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), conforme mencionado por Galeano et al. (2009), têm sido extensivamente empregados na elaboração de mapas moleculares. Esses mapas desempenham um papel fundamental na identificação de genes que controlam diversas características, incluindo a resistência a doenças.

Vale destacar que os SNPs são as formas mais comuns de variação genética no DNA de organismos eucarióticos, conforme observado por Brookes (1999). Com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, a quantidade de SNPs identificados têm experimentado um notável aumento, como apontado por Blair et al. (2013). Essa evolução na identificação de SNPs abre portas para a saturação de regiões específicas do genoma e, conseqüentemente, para o aprimoramento da resolução no mapeamento de genes de interesse. Essa abordagem representa uma oportunidade significativa para avançar na compreensão genômica e no melhoramento do feijoeiro.

Em resumo, os marcadores moleculares têm sido uma importante ferramenta no melhoramento de plantas nos últimos anos, permitindo aos melhoristas selecionar plantas com características desejáveis e acelerando assim o processo de melhoramento genético.

2.5 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

A seleção de genótipos superiores com o auxílio dos marcadores moleculares representa a perfeita associação entre o melhoramento convencional e as modernas técnicas de biologia molecular disponíveis atualmente (FRONZA, 2003). A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma técnica revolucionária no campo do melhoramento genético de plantas. Ela se baseia na identificação e análise de marcadores genéticos específicos que estão ligados a características desejáveis em plantas, como resistência a doenças, produtividade ou qualidade de grãos. Esses marcadores moleculares funcionam como "etiquetas" genéticas, permitindo que os melhoristas identifiquem rapidamente quais plantas possuem os genes desejados, acelerando o processo de seleção. Ela é uma ferramenta com grande potencial de reduzir os custos e o tempo gasto no desenvolvimento de cultivares em programas de melhoramento.

A SAM envolve a presença ou ausência de um marcador ou alelo, como um substituto para auxiliar na seleção fenotípica de uma forma que pode torná-lo mais eficiente, eficaz, confiável e de baixo custo em comparação com a metodologia de melhoramento de plantas

mais convencional (COLLARD et al., 2005). Oferece vantagens únicas na escolha correta de genótipos elites, a fim de melhorar as características para as quais são de baixa herdabilidade ou existem limitações das tecnologias de fenotipagem (DI GASPERO; CATTONARO, 2010). A SAM é especialmente útil quando o gene alvo é verdadeiramente único e há poucas alternativas para obter fenótipos desejados, tais como no caso da resistência a doença monogênica (GILL-LANGARICA; MAYEK-PÉREZ, 2008).

As melhores oportunidades de sucesso da SAM estão no melhoramento para resistência às doenças, onde a piramidação de genes é desejável na mesma cultivar com menos ciclos de seleção (JOSHI; NAYAK, 2010; WU; WANG, 2011). O processo de piramidação de genes de resistência à antracnose no feijoeiro comum tem sido realizado com o auxílio de diversas classes de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores. Essa é uma estratégia que vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro. No entanto, na prática, é um processo extremamente difícil e trabalhoso, principalmente pela dificuldade em se identificar, de modo preciso, os sintomas de resistência após múltiplas inoculações. Marcadores moleculares ligados aos alelos a serem piramidados podem ser monitorados ao longo do processo de piramidação, constituindo-se em ferramenta de seleção indireta, evitando as dificuldades inerentes ao processo de seleção via análise de sintomas (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Para que a SAM seja eficaz, os marcadores moleculares devem estar localizados o mais próximo possível do gene de interesse que está sendo alvo do programa de melhoramento. A proximidade física entre o marcador e o gene é importante porque facilita a associação direta entre a presença da marca e a presença do gene de interesse (ARRUDA, 2009).

Diversos grupos de pesquisa envolvidos no melhoramento de feijoeiro-comum têm concentrado significativos esforços na validação de marcadores com o objetivo de sua aplicação efetiva na SAM. Esse esforço visa garantir a confiabilidade e a utilidade dos marcadores moleculares na identificação de características de resistência desejadas, contribuindo assim para o avanço e o sucesso dos programas de melhoramento genético do feijão-comum (MOTA, 2016).

O tipo de marcador mais utilizado na SAM atualmente, é o SNP. Os SNPs são amplamente adotados devido às suas várias vantagens, incluindo alta densidade, facilidade de detecção, custos relativamente baixos e distribuição ao longo do genoma. Os SNPs podem ser usados como marcadores de DNA bialélicos e codominantes para uma variedade de

funções no melhoramento das culturas, incluindo descoberta de genes e QTLs, avaliação de diversidade genética, análise de associação e seleção assistida por marcadores (SOUZA et al., 2012).

A associação entre marcadores moleculares e QTLs pode ser evidenciada, de modo mais preciso, por meio de mapas de ligação saturados (PATERSON, 1998). Compreender o controle genético e as regiões genômicas que promovem a resistência à antracnose por meio de estudos de associação, mapeamento biparental, RILs e MAGIC é crucial para o melhoramento do feijoeiro (PAULINO et al., 2021; NUNES et al., 2021).

Ao identificar genes e alelos principais, bem como QTLs menores, é possível validar marcadores moleculares a eles relacionados, tornando-os úteis em programas de melhoramento assistido por marcadores e em estudos básicos de mapeamento fino e clonagem de regiões genômicas associadas à resistência à antracnose em feijão comum (PAULINO et al., 2021; NUNES et al., 2021; SHAFI et al., 2022). Genes mesoamericanos *Co-5*, *Co-4*², *Co-6*, *Co-16* e *Co-17* e os genes andinos *Co-1*², *Co-1*⁴, *Co-Bf*, *Co-15*, *Co-AC* e *CoPv01^{CDRK}* são estabelecidas para conferir resistência à maioria das raças de *C. lindemuthianum* relatadas no Brasil e no mundo. Assim, a piramidização desses genes por meio de marcadores moleculares pode ajudar a reduzir o tempo e o custo de introdução de cultivares comerciais de feijão e pode garantir resistência duradoura a *C. lindemuthianum* em feijão comum (PAULINO et al., 2021; NUNES et al., 2021).

Entender como os genomas das plantas funcionam é um desafio importante deste século. A seleção assistida por marcadores moleculares representa uma abordagem promissora e inovadora para o melhoramento genético de plantas. Ela oferece uma maneira mais rápida, precisa e eficiente de desenvolver variedades com características desejáveis, contribuindo para a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola em todo o mundo (RUPRECHT et al., 2017).

2.6 Validação de SNPs

De maneira geral, estudos de validação são utilizados para testar a associação entre marcadores moleculares e QTLs (JUN et al., 2007) e, uma vez constatada a associação, a seleção assistida por marcadores piramida alelos favoráveis de forma mais rápida. Ela garante a precisão na identificação de locos associados a características de interesse. Isso significa que a seleção de indivíduos ou linhagens com base em informações genéticas é confiável, aumentando a eficácia do programa de melhoramento genético. Sem validação adequada, existe

o risco de selecionarmos marcadores que não estão realmente associados à característica desejada, o que pode resultar em decisões de seleção errôneas. Isto pode ser feito por meio de populações obtidas de genitores contrastantes para esses caracteres ou de linhagens elites com a participação do genitor no qual o marcador foi identificado (SHAFI et al., 2022).

A técnica TaqMan, por exemplo, é uma das abordagens mais amplamente utilizadas na validação de marcadores SNPs. Ela se baseia na tecnologia de PCR em tempo real e é altamente precisa e sensível na detecção de variações de nucleotídeo único em amostras de DNA. Com os ensaios TaqMan, é possível analisar uma grande quantidade de SNPs de forma rápida e confiável. O ensaio do sistema de genotipagem TaqMAN SNP é conduzido usando ensaios personalizados que correspondem a muitos SNPs com poucas amostras ou poucos SNPs com muitas amostras (*Applied Biosystems*™). Fluidigm A tecnologia TM também se baseia na detecção de SNPs através de sondas TaqMAN e permite a genotipagem simultânea de 48 a 96 SNPs com o mesmo número de amostras.

A identificação de marcadores associados à resistência a doenças no feijoeiro é uma prática que vem sendo empregada e validada por pesquisadores (GIL et al., 2019; FRITSCHENETO et al., 2019; GOMES-MESSIAS et al., 2022). Gomes-Messias et al. (2022), utilizando a genotipagem baseada no sistema TaqMan® para marcadores como spnPv 0070 (*Co-4*²), snpP 8282v3-817 (*Co-4*²) e snpPV 0025 (*Phg-2*), foi possível alcançar uma amplificação altamente específica dos alelos desejados, com eficiência de seleção de marcadores de aproximadamente 99,7% e 99,8%, respectivamente.

No entanto, é importante observar que, conforme indicado por Gomes-Messias et al. (2022), quando um SNP está localizado em uma região genômica repetitiva, a amplificação do fragmento torna-se problemática, levando a uma redução na eficiência de genotipagem e a uma alta taxa de perda de dados, inviabilizando a SAM.

A abordagem de SAM para características quantitativas geralmente não abrange todos os QTLs, mas concentra-se naqueles de efeitos principais, que explicam a maior parte das características de interesse, conforme destacado por Oliveira et al. (2013). Portanto, é comum realizar a análise de um conjunto restrito de três a, no máximo, cinco QTLs que exercem controle sobre uma característica específica, o que tem sido reconhecido como uma abordagem adequada e viável para SAM, conforme mencionado por Vieira et al. (2012).

É importante ressaltar que a priorização deve ser dada especialmente quando se identifica a presença de um ou dois QTLs que explicam a maior parcela da variação fenotípica, como apontado por Lima et al. (2010). Nesses casos, a concentração de esforços na seleção e

uso desses QTLs principais pode resultar em melhorias significativas na característica de interesse durante o processo de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- AHMAR, S. et al. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2590-2614, 2020.
- ALMEIDA, Caleo Panhoca de et al. Genetic diversity, population structure, and andean introgression in Brazilian common bean cultivars after half a century of genetic breeding. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1298, 2020.
- ALMEIDA, C. P. et al. Marker-assisted backcrossing for disease resistance and agronomic traits in carioca beans. **Agronomy**, v. 61, n. 4, p. 2510-2521, 2021.
- ALVARES, R. C.; STONEHOUSE, R.; SOUZA, T. L. P. O.; MELO, P. G. S.; MIKLAS, P. N.; BETT, K. E.; MELO, L. C.; RODRIGUES, L. A.; SOUZA, L. L.; PEREIRA, H. S. Generation and validation of genetic markers for the selection of carioca dry bean genotypes with the slow-darkening seed coat trait. *Euphytica*, v. 215:141, 2019. Doi: 10.1007/s10681-019-2461-y.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. *Fitopatologia Brasileira* 30: 333- 342, 2005.
- ARRUDA, Klever Márcio Antunes. **Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular e estudos de alelismos em feijão comum**. 2009. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- BARCELOS, Q. L. **Análise dos eventos de pré e pós penetração de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro**. 2010. Tese (Doutorado em Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- BHATIA, D. Advanced Quantitative Genetics Technologies for Accelerating Plant Breeding. **Accelerated Plant Breeding**, v. 1, p. 121–138, 2020.
- BITOCCHI, E. Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- BLAIR, M. W. et al. A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 2, p. 535–548, 2013.
- BLAIR, M. W. et al. Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 23, n. 2, p. 197-207, 2009.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: CARNEIRO, J. E. S.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: Ed UFV, 2015, p.9-15.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–331, 1980.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, 1999.

BURT, A. J. et al. Candidate Gene Identification with SNP Marker-Based Fine Mapping of Anthracnose Resistance Gene *Co-4* in Common Bean. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139450, 2015.

CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v.14, n. 115, 2014.

CHAGNÉ, D. et al. Single nucleotide polymorphism genotyping in plants. *In*: ORAGUZIE, N. C., RIKKERINK, E. H. A., GARDINER, S. E., SILVA, H. N. **Association Mapping in Plants**. New York: Springer, 2007, p. 77–94.

CHEN, M. et al. Mapping and genetic structure analysis of the anthracnose resistance locus *Co-1^{HY}* in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169954, 2017.

COLLARD, C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169–196, 2005.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *In*: OLIVEIRA NETO, A. A. de; SANTOS, C.M. R. **A cultura do feijão**. Brasília: Conab, 2018.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *In*: OLIVEIRA NETO, A. A. de; SANTOS, C.M. R. **A cultura do feijão**. Brasília: Conab, 2023.

COSTA, L. C. **Controle genético da resistência do feijoeiro a diferentes isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

COSTA, L. C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173789, 2017.

COSTA, L. C. et al. Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 543–556, 2021.

CRISPÍN, M. A.; SIFUENTES, J. A.; AVILA, J. C. *Enfermedades y plagas del frijolen México*. México: INIA, 1976.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monicíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 401- 407, 2003.

DE WIT, P. J. G. M. On guard. **Nature**, v. 416, p. 801-803, 2002.

DELFINI, J. et al. Population structure, genetic diversity and genomic selection signatures among a Brazilian common bean germplasm. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-12, 2021.

DI GASPERO, G.; CATTONARO, F. Application of genomics to grapevine improvement. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. 1, p. 122-130, 2010.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2018): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2022. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 08/10/2023.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2019): área, produção e rendimento. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, 2021. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 27 jun. 2023.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. *In*: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. **Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2013, p. 151- 181.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. *In*: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. **Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2013, p. 151- 181.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998.

FERREIRA, T.G.T. et al. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**, v. 129, p. 727-730, 2010.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.

FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 321-327, 2019.

FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 321-327, 2019.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f.sp.glycines**. 2003. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GALEANO, C. H. et al. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 10, n. 629, 2009.

GEFFROY, V. et al. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 181, p. 405–419, 2009.

- GIL, J. et al. 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, p. 2003-2016, 2019.
- GILL-LANGARICA, H. R.; MAYEK-PEREZ, N. Molecular markers for breeding for genetic resistance against diseases in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Applications and perspectives. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 26, n. 2, p. 164-176, 2008.
- GOMES-MESSIAS, L. M. et al. Genetic mapping of the Andean anthracnose resistance gene present in the common bean cultivar BRSMG Realce. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1033687, 2022.
- ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 2, p. 461–464, 2011.
- ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, v. 63, p. 156-161, 2008.
- JOSHI, K. R.; NAYAK, S. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 5, n. 3, p. 51-60, 2010.
- JUN, T. et al. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. **Euphytica**, v.162, n.2, p.179-191, 2007.
- KATUURAMU, D. N. et al. Genome-wide association analysis of nutritional composition-related traits and iron bioavailability in cooked dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 38, n. 44, 2018.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.
- KOTUE, T. C.; MARLYNE, J. M.; WIRBA, L. Y. Nutritional properties and nutrients chemical analysis of common beans seed. **MOJ Biology and Medicine**, v. 3, p. 41–47, 2018.
- LIMA-CASTRO, S. A. et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean paloma. **BMC Genomics**, v. 18, n. 306, 2017.
- LOBATON, J. D. et al. Resequencing of common bean identifies regions of inter-gene pool introgression and provides comprehensive resources for molecular breeding. **Plant Genome**, v. 11, p. 170068, 2018.
- MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.
- MUNGALU, H. et al. Identification of race-specific quantitative trait loci for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in an Andean population of common bean. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2843-2856, 2020.

NANAMI, D. S. Y. et al. Characterization of genetic resistance in Andean common bean cultivar Amendoim Cavalo to *Colletotrichum lindemuthianum*. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 43-52, 2017.

NAY, M. M. et al. A review of angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 59, n. 4, 2019.

NUNES, M. P. B. A. et al. Relationship of *Colletotrichum lindemuthianum* races and resistance loci in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. **Crop Science**, v. 61, n. 6, p. 3877-3893, 2021.

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

OLIVEIRA, et al. Análise de QTLs com efeito principal. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 25-30, 2013.

PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317-330, 2017.

PÁDUA, J. M. V.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Implications of early selection for resistance to anthracnose in genetic breeding of common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p. 169–174, 2015.

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

PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean Production Problems in the Tropics**. CIAT, Cali, Colombia, 1989.

PATERSON, A. H. Of blending, beans, and bristles: the foundations of QTL mapping. In: PATERSON, A.H. **Molecular Dissection of Complex Traits**. New York. CRC Press. 1998. pp.1-10.

PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIN L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, R.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Ed UFV, 2006.

PAULINO, J. F. C. et al. Genome-wide association study reveals genomic regions associated with fusarium wilt resistance in common bean. **Genes**, v. 12, n. 5, p. 765, 2021.

PAULINO, P. P. S. et al. Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-21, 2022.

PERSEGUINI, J. M. K. C. et al. Genome-wide association studies of anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150506, 2016.

- PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490-497, 2012.
- RAGAGNIN et al. Avaliação da Resistência de Isolinhas de Feijoeiro a Diferentes Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola**. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 6, 2003.
- RAHMANZADEH, A. et al. Genome-wide meta-QTL analyses provide novel insight into disease resistance repertoires in common bean. **BMC Genomics**, v. 23, n. 680, 2022.
- RUPRECHT, C. et al. Beyond Genomics: Studying Evolution with Gene Coexpression Networks. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 4, p. 298–307, 2017.
- SANTOS, J. et al. Virulência das raças 65, 73 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris* L. **Agrociência**, v. 14, p. 115-124, 2008.
- SARTORATO, A. et al. Principais doenças transmitidas pela semente. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 147-199.
- SHAFI, S. et al. Delineating meta-quantitative trait loci for anthracnose resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 966339, 2022.
- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 241-247, 2007.
- SINGH, S. P. et al. Independent, alternate, and simultaneous selection for resistance to anthracnose and angular leaf spot and effects on seed yield in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, v. 106, p. 312-318, 1991.
- SONG, Q. et al. SNP assay development for linkage map construction, anchoring whole-genome sequence, and other genetic and genomic applications in common bean. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 11, p. 2285-2290, 2015.
- SORIANO, J. M. Molecular marker technology for crop improvement. **Agronomy**, v. 10, n. 10, 2020.
- SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, 2007.
- SOUZA, T. L. P. et al. Single nucleotide polymorphism discovery in common bean. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 1, p. 419-428, 2012.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

THOMAZELLA, C. et al. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 82- 83, 2000.

TRUTMANN, P.; GRAF, W. The impact of pathogens and arthropod pests on common bean production in Rwanda. **International Journal of Pest Management**, v. 39, p. 328-333, 1993.

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: Epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963.

VARSHNEY, R. K. et al. A comprehensive resource of drought-and salinity responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **BMC Genomics**, v. 10, n. 523, 2009.

VECHIATO, M. H. et al. Antracnose do feijoeiro: tratamento de sementes e correlação entre incidência em plantas e infecção de sementes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 83-87, 2001.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992.

VIDIGAL FILHO, P. S. et al. Genome-wide association study of resistance to anthracnose and angular leaf spot in Brazilian Mesoamerican and Andean common bean cultivars. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2931-2950, 2020.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2. ed. Viçosa: Ed UFV, 2005. p. 301-391.

VIEIRA, M. L. A. et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 54-66, 2012.

WU, X. et al. Unravelling the genetic architecture of rust resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by combining QTL-seq and GWAS analysis. **Plants**, v. 11, n. 7, 2022.

YOUNG, R. A. et al. Marker - assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G 2333". **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87-94, 1998.

ZHAO, K. et al. Advance in molecular markers for plant genetics and breeding. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6384-6396, 2010.

ZUIDERVEEN, G. H. et al. Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0156391, 2016.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**VALIDAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO COMUM A RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum***

**Normas da Revista The Plant Genome Magazine Standards
(VERSÃO PRELIMINAR)**

ABSTRACT

The genetic control of anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum* fungus, has become a challenge due the great pathogenic variability among and within races. However, SNPs markers linked to resistance loci to different *C. lindemuthianum* isolates have been identified to be used in common bean breeding programs. The present study aimed to validate the SNP marker *ss715649771* association with resistance to the isolate LV134 of race 65. Phenotypic and genotypic evaluations were carried out in an F₂ population of 192 plants from BRS Cometa and BRSMG Ouro Vermelho cross, and in a 55 genotypes panel of cultivars and elite lines. A linear regression analysis of the marker effect was carried out, and the selection efficiency (SE) for codominant markers was estimated. The generation F₂ phenotyping resulted, in the expected 3R:1S ratio ($p = 0.093$), and genotyping also adjusted to 1CC:2CT:1TT ($p = 0.095$). The F₂ population recombination frequency was estimated at 10.0%, with 11 plants presenting recombinant phenotypes. The estimated SE was 96%, and the linear regression explained about 42% of variation. The panel analyses revealed 41% of recombinant individuals. Considering the high SE value, our results shows a high potential use of *ss715649771* in Marker-Assisted Selection. However, the 10cM distance between mark and gene, and the number of recombinant individuals may suggest the other alleles existence that confer resistance to race 65. The use of *ss715649771* marker in breeding programs, together with other already known markers, will contribute to the resistance genes pyramiding to this race in common bean lines.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Anthracnose. Genetic resistance. SNPs marker.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento de baixo custo, que desempenha papel essencial na dieta da população brasileira devido aos seus importantes valores nutricionais, como fonte de proteína vegetal, vitaminas do complexo B e sais minerais (CONAB, 2018). Cultivado em todo o território brasileiro (CONAB, 2023), alguns desafios são enfrentados pelos produtores desta cultura, destacando-se principalmente a ocorrência de doenças, o que limita a produção de grãos (SARTORATO et al., 2000).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é relatada como uma das principais doenças do feijoeiro devido a sua alta capacidade de infecção e severidade de danos causados (SHAFI et al., 2022). Esta doença é cosmopolita, prevalecendo em regiões tropicais e subtropicais, com condições climáticas que favorecem o desenvolvimento do patógeno, como temperaturas amenas e alta umidade relativa do ar (PASTOR-CORRALES, 1989; KIMATI et al., 1997). Além disso, a infecção por *C. lindemuthianum* pode resultar em perdas de até 100% na produção de grãos (PADDER et al. 2017; VIDIGAL FILHO et al. 2020), pois os sintomas da doença ocorrem em todos os estágios de crescimento da planta, e as lesões acometem tanto folhas, caules, ramos, vagens como sementes (SARTORATO et al., 2000).

O controle genético da antracnose tem sido o método empregado mais eficiente, considerando que reduz os custos de produção ao evitar o uso de métodos químicos ou tratamento de sementes ou cuidados extras no manejo de equipamentos (MARKELL; WUNSCH; RIO, 2012; PAULA JÚNIOR et al., 2015; ALMEIDA et al., 2021). Contudo, a variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011; NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2021) dificulta o controle da antracnose por meio da resistência genética uma metodologia complexa. Sendo assim, o monitoramento do patógeno é essencial para a obtenção de novas cultivares

resistentes à antracnose, e nesse sentido, a identificação e a utilização de marcadores moleculares no melhoramento genético pode facilitar este processo (NAY et al., 2019).

Cerca de 298 raças de *C. lindemuthianum* já foram descritas ao redor do mundo (NUNES et al., 2021), sendo 89 identificadas no Brasil, e as raças 65, 73, 81 e 89 caracterizadas como as mais frequentes (PINTO et al., 2012; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Além disso, diversos alelos de resistência de genes diferentes já foram descritos para este patógeno (GEFFROY et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; CAMPA et al., 2014): *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-8*, *Co-9*, *Co-10*, *Co-11*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-16*, *Co-17*, *Co-u*, *Co-v*, *Co-w*, *Co-x*, *Co-y*, *Co-z*, *CoPv02c* e *CoPv09c*. Já em relação ao feijoeiro, cerca de 25 locos de resistência à antracnose, de origem mesoamericana e andina, são conhecidos (MUNGALU et al., 2020; VIDIGAL FILHO et al., 2020). Há ocorrência de raças de *C. lindemuthianum* com preferência a estes centros de origem (PASTOR-CORRALES, 1996; NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2022), podendo ocorrer também virulência de raças para genótipos de ambos os pools gênicos (BALARDIN; KELLY, 1998). Essas informações, associadas aos avanços das técnicas genômicas, integram cenários de buscas por novas regiões de resistência (QTLs - Locos de Características Quantitativas), novas marcas e genes, além de possibilitar estudos de Análise de Associação de Genoma Ampla (GWAS; SHAFI et al., 2022).

O controle genético da resistência de cultivares de feijoeiro a seis isolados diferentes pertencentes a raça 65 de *C. lindemuthianum* foi estudado por Costa et al., (2017). A resistência a cada isolado é conferida por genes duplicados, sendo observada a segregação de 15 resistentes:1 suscetível na geração F₂. Neste trabalho umas das populações F₂ avaliadas é oriunda do cruzamento das cultivares BRSMG Ouro Vermelho e BRS Estilo. De acordo com os resultados e nomenclatura adotada pelos autores a cultivar resistente BRSMG Ouro Vermelho apresenta a constituição genética $CO_{E}CO_{E}CO_{F}CO_{F}$ e a outra suscetível $CO_{E}CO_{E}CO_{F}CO_{F}$

para os genes que conferem resistência ao isolado LV134 da raça 65. Portanto, as cultivares diferem em apenas um dos genes que conferem resistência a este isolado. Costa et al. (2021), ao realizarem o mapeamento de QTLs nesta população F_2 e uma análise GWAS em painel de diversidade, identificaram região genômica no grupo de ligação Pv04, associada a 10 marcadores SNPs que estão relacionados à resistência ao isolado LV134 da raça 65 de antracnose. Dentre estes marcadores, destacou-se o ss715649771, explicando 64% da variação.

A extensão da região é significativa em termos de pares de bases, devido à grande extensão dos blocos de ligação na população F_2 , e devido ao elevado desequilíbrio de ligação no painel GWAS, resultante do alto grau de parentesco entre algumas linhagens (Costa et al. 2021). Porém, a posição exata não pôde ser identificada devido à baixa resolução e à ausência de marcadores mais próximos ligados a este gene (Costa et al. 2021).

Nesse contexto, identificar genes e alelos principais, e realizar a associação entre marcadores moleculares e QTLs, são importantes para o melhoramento do feijoeiro utilizando SAM (Seleção Assistida por Marcadores), assim como auxiliar na compreensão do controle genético e as regiões genômicas que promovem a resistência à antracnose (PAULINO et al., 2021; NUNES et al., 2021). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e validar a associação do marcador SNP ss715649771, previamente identificado por Costa et al. (2017; 2021), com a resistência do isolado LV134 da raça 65 à antracnose, por meio de avaliações fenotípicas e genotípicas em uma população F_2 , e também em um painel de cultivares e linhagens elites.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

No total, foram utilizados 247 genótipos de feijão-comum, dos quais 192 plantas foram da geração F₂ do cruzamento das cultivares BRS Cometa x BRSMG Ouro Vermelho. Além disso, empregou-se um painel diverso contendo 55 genótipos, com diversas origens do Brasil e de programas internacionais de melhoramento. As informações fenotípicas e genotípicas foram obtidas a partir desses genótipos, que foram submetidos à avaliação quanto à resistência ao isolado LV134 da raça 65 de *C. lindemuthianum* em condições de casa de vegetação no Departamento de Biologia da UFLA.

2.2 Validação do marcador SNP ss715649771 associado à região LV134

O SNP ss715649771, selecionado para o presente estudo, foi a marca que apresentou o maior nível de associação com a resistência à antracnose no trabalho de Costa et al. (2021). Este marcador foi, portanto, submetido a um processo de validação adicional. O SNP específico foi convertido em uma sonda TaqMan® (ThermoFisher; SHEN et al., 2009). O projeto da sonda foi baseado no alinhamento de sequências que continham o SNP alvo ao genoma de referência do feijão comum (SCHMUTZ et al., 2014), usando o comando BLAST. Uma busca por elementos repetitivos foi realizada usando o RepeatMasker, com ambas as análises disponíveis na plataforma Phytozome (Phytozome v12.1: Home: <https://phytozome.jgi.doe.gov/>). As sondas foram projetadas usando a ferramenta online Custom TaqMan Assay Design Tool (ThermoFisher) disponível em: [<https://www.thermofisher.com/order/customgenomicproducts/tools/genotyping/>].

2.3 Fenotipagem da severidade da antracnose nos genótipos de feijoeiro

O isolado LV134, crescido em placas de Petri em meio BDA, foi repicado para tubos contendo vagens de feijoeiro previamente estéreis e armazenado por 15 dias a 22°C. Para obtenção da suspensão de esporos, foi realizada a raspagem dos tubos com água destilada estéril com auxílio de uma alça de platina e a solução filtrada, a concentração foi ajustada para $1,2 \times 10^6$ conídios/ml com auxílio da câmara de Neubauer.

A semeadura dos 247 genótipos de feijão comum (população F₂ e painel) foi realizada em bandejas de poliestireno de 162 células, com substrato comercial Topstrato®, utilizando uma semente por genótipo. Plântulas com folhas primárias totalmente expandidas (estádio V2) foram pulverizadas com uma suspensão de conídios até o ponto de escorrimento do caule em ambas as superfícies das folhas unifoliadas, com o auxílio de um pulverizador manual. Após a inoculação, as plântulas foram incubadas em câmara de nebulização por 48 horas com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 20 °C. Posteriormente, as bandejas foram transferidas para casa de vegetação com controle de umidade (95%) e temperatura (24°C). A avaliação de severidade da antracnose foi realizada 12 dias após a inoculação utilizando a escala de notas de 1 a 9 descrita por Van Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987; Tabela 1). As plantas foram avaliadas individualmente e as plantas com notas entre 1 e 3 foram consideradas resistentes e as demais suscetíveis.

TABELA 1. Escala descritiva de notas para avaliação da severidade da antracnose em plântulas de feijoeiro (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987).

Nota	Descrição
1	Ausência de sintomas
2	Até 1% das nervuras principais apresentando manchas necróticas, perceptivas somente na face inferior das folhas
3	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.

-
- | | |
|---|--|
| 5 | Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas. |
| 6 | Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos. |
| 7 | Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos. |
| 8 | Manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas. |
| 9 | Plantas mortas |
-

2.4 Genotipagem da população F₂ e do painel de diversidade de feijoeiro

Antes da inoculação, uma folha primária de cada um dos 247 genótipos foi coletada. Cada folha foi coletada individualmente, embrulhada em papel alumínio sob nitrogênio líquido e mantida em um ultracongelador a -80°C até a extração do DNA. O DNA genômico foi extraído usando o método CTAB, de acordo com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) e modificado pelo IAC (1998). A concentração de DNA foi estimada usando um fluorímetro Qubit® (Thermo Scientific®, Waltham, EUA), e a integridade foi visualizada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio.

Os ensaios de genotipagem de SNP Taqman® foram amplificados com o reagente Taqman® GTXpress™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. A amplificação foi realizada usando o sistema QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 60°C por 30 s, 95°C por 20 s, seguido por 50 ciclos de 95°C por 3 s e 60°C por 30 s, e uma extensão final de 60 °C por 30 s. Este protocolo foi seguido para a análise de alelos, usando o Módulo de Análise de Genotipagem, V.3.7. Os SNP foram avaliados através de experimento com sonda de hidrólise TaqMan® (ThermoFisher) (Shen et al. 2009; APPLIED BIOSYSTEMS, 2021), realizado no “Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Arroz e Feijão”.

2.5 Análises Estatísticas

Com base nas frequências observadas das plantas para as classes fenotípicas, resistente e suscetível na geração F_2 , foi testada a hipótese de segregação fenotípica 3Resistentes:1suscetível. A partir dos dados moleculares foi testada a segregação genotípica 1CC:2CT:1TT. O alelo C está associado à resistência e o alelo T à suscetibilidade. O teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizado, adotando-se o nível de significância de 5%.

Uma análise de regressão linear simples foi realizada com nível de significância de $p < 0.05$ com base nos genótipos dos marcadores SNP associados em relação aos valores fenotípicos.

A análise de ligação entre o marcador SNP e a região foi realizada utilizando o pacote OneMap (Margarido et al., 2007), e a frequência de recombinação estimada convertida em distância genética (cM).

Todas as análises foram realizadas no software R, versão 4.1.2 (R Core Team, 2021).

A eficiência de seleção (ES) para marcadores codominantes foi estimada de acordo com a metodologia descrita por Liu (1998), utilizando-se o seguinte estimador:

$$ES (\%) = (1 - 4fr^2) \times 100, \text{ onde "fr" é a frequência de recombinação.}$$

3 RESULTADOS

O SNP ss715649771 foi o principal marcador selecionado pela análise de GWAS e pelo mapeamento biparental realizado por Costa et al. (2021) associado com a resistência ao isolado LV 134 de *C. lindemuthianum*, explicando 64% da variação fenotípica. Este marcador está inserido na região subtelomérica do cromossomo Pv04, onde também se encontra o gene *COE*

responsável pela resistência ao isolado LV 134 (Costa et al., 2017; Costa et al., 2021). Este gene está situado no intervalo entre 11.110pb e 227.000pb da referida região.

Na posição 96.165 pb, o marcador apresentou polimorfismo C:T, sendo que o alelo T está associado à suscetibilidade e o alelo C à resistência (Costa et al., 2021). A análise realizada no Phytozome não identificou a presença do marcador em uma região repetitiva, isto confirma a adequação dos marcadores para aplicações de genotipagem.

Para validar a eficácia desse marcador, utilizamos uma população diferente daquela usada para a identificação do mesmo por Costa et al. (2017). Para isso, foi realizado o cruzamento entre as cultivares BRS Ouro Vermelho (resistente - *COECO_ECO_FCO_F*) e BRS Cometa (suscetível - *COECO_ECO_FCO_F*) e obtidas as gerações F₁ e F₂. A reação das cultivares genitoras quando inoculadas com o isolado LV134 foi confirmada e foi semelhante à relatada na literatura (Tabela 2). As cultivares BRS Cometa e BRSMG Ouro Vermelho apresentaram amplificação para o marcador ss715649771 do tipo T e C, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2. Padrão de amplificação para o marcador ss715649771 para os genótipos BRS Ouro Vermelho e BRs Cometa e seu respectivo *pool* gênico, fenótipo e cromossomo onde foi identificado o marcador para a resistência ao Lv134 da raça 65 de *C. lindemunthianum*.

Identificação	ss715649771/alelo	Fenótipo
BRS Cometa	TT (alelo T)	Suscetível
BRSMG Ouro Vermelho	CC (alelo C)	Resistente
Geração F ₁	CT (alelos CT)	Resistente

A fenotipagem para a severidade da antracnose e genotipagem com a sonda das 192 plantas da geração F₂ do cruzamento BRS Ouro Vermelho x BRS Cometa foi realizada. A partir dos resultados de fenotipagem, 154 plantas F₂ apresentaram reação de resistência (R) e 38 de suscetibilidade (S) e esses dados, como esperado, se ajustaram à proporção 3R:1S ($\chi^2 = 2,7$; $p = 0,093$). Os dados observados na genotipagem das plantas F₂ com o marcador SNP se

ajustaram à segregação esperada de 1CC:2CT:1TT ($\chi^2 = 4,7; p = 0,095$), como apresentado na Tabela 3.

TABELA 3. Segregação fenotípica e genotípica das plantas da geração F₂ do cruzamento entre BRS Ouro Vermelho x BRS Cometa, avaliadas quanto a reação para resistência ao isolado LV134, da raça 65 de *C. lindemuthianum*. Frequência de recombinação (FR%) e eficiência de seleção (ES%).

Genótipo	¹ FO	² FE	Hipótese	³ χ^2_c	p-valor	⁴ FR (%)	⁵ ES(%)
CC	51	48	1CC:2CT:1TT	4,7	0,093	10,0	96,0%
CT	106	96					
TT	35	48					
Fenótipo							
Resistente	154	144	3R:1S	2,7	0,095		
Susceptível	38	48					

Legenda: ¹FO: Frequência observada; ²FE: Frequência esperada; ³ χ^2_c : Qui-quadrado calculado; ⁴RF: frequência de recombinação; ⁵SE: eficiência de seleção.

A frequência de recombinação, isto é, a distância entre o gene *Co_F* e o marcador SNP foi estimada utilizando a população F₂. Das 192 plantas avaliadas, 181 apresentaram fenótipos parentais, sendo que 150 foram resistentes e apresentaram o alelo C e 31 foram suscetíveis e apresentaram o alelo T. Foram observadas 11 plantas com fenótipos recombinantes, sendo 4 resistentes e com o alelo T e 7 suscetíveis e com o alelo C. A estimativa da frequência de recombinação foi de 10,0%, portanto a distância genética entre o gene *Co_F* e o marcador ss715649771 foi de 10cM e a estimativa de eficiência de seleção foi de 96% (Tabela 3).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da análise de regressão linear simples para o efeito do marcador SNP ss715649771. O modelo de regressão linear foi estatisticamente significativo para esse marcador, explicando aproximadamente 42% da variação fenotípica observada (Tabela 4). A estimativa do coeficiente angular, ou seja, a inclinação da reta do modelo de regressão foi negativa, indicando que a presença do alelo C contribui para a redução da nota de severidade da antracnose (Tabela 4).

TABELA 4. Resumo da análise de regressão entre o marcador SNP e a reação para resistência ao isolado LV134 da raça 65 de *C. lindemuthianum*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F-value	p-value	R ²	Inclinação
C versus T	1	210,0	210,0	76,92	6,29E-16	0,4151	-0,548
Resíduo	209	570,6	2,73				

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio.

Como uma estratégia adicional para validar este marcador, foi utilizado um painel de diversidade composto por um total de 55 genótipos (APÊNDICE A), que incluem cultivares e linhagens elites de diferentes programas de melhoramento de feijoeiro do Brasil. Dentre esses genótipos, 16 exibiram o alelo C e foram resistentes fenotipicamente, enquanto 16 apresentaram o alelo T e foram suscetíveis, representando indivíduos parentais.

Em relação ao número de recombinantes, um total de 23 indivíduos foram observados, correspondendo a 41% do painel. Destes, 9 apresentaram resistência com a presença do alelo T, e 14 foram suscetíveis, portando o alelo C, conforme ilustrado na Figura 1. Apenas a linhagem UFV 5, apresentou o genótipo C:T e foi suscetível (Tabela S1).

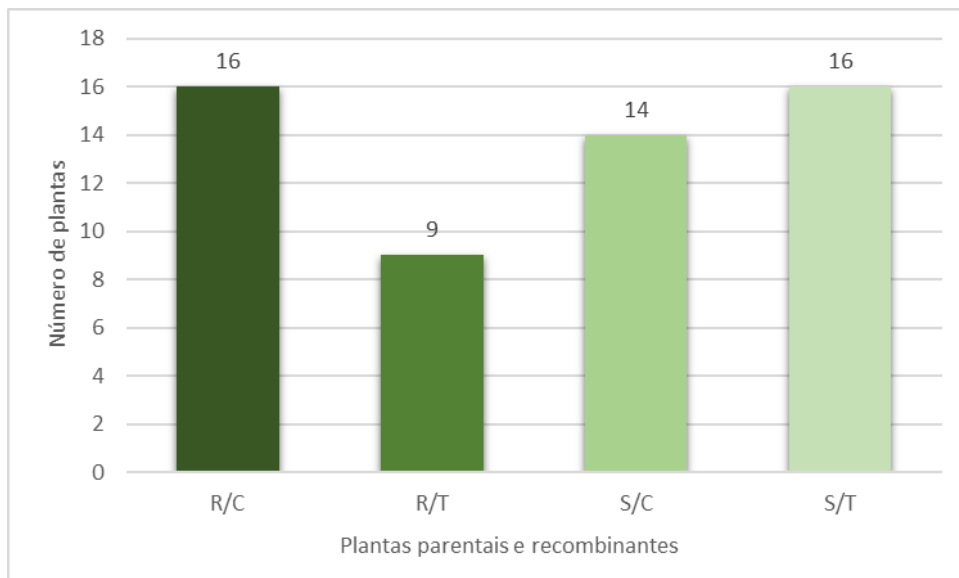


FIGURA 1. Número de indivíduos parentais e recombinantes no painel de validação com cultivares e linhagens elites. R/CC- Indivíduos parentais, resistentes e que amplificaram para o alelo C; R/TT- indivíduos recombinantes, resistentes e que amplificaram para o alelo T; S/CC- indivíduos recombinantes, suscetíveis e que amplificaram para o alelo C; S/TT- indivíduos parentais, suscetíveis e que amplificaram para o alelo T.

4 DISCUSSÃO

A ocorrência de doenças é um dos principais problemas que acomete a cultura do feijoeiro, causando grande instabilidade na produção. A raça 65 de *C. lindemuthianum* é uma das principais raças que afetam a cultura, e seu controle tem sido dificultado devido a ampla variabilidade patogênica dentro desta raça (DAVIDE; SOUZA, 2009; ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2008; COSTA et al., 2017).

O controle genético da resistência de cultivares de feijoeiro a seis isolados pertencentes à raça 65 de *C. lindemuthianum* foi estudado por Costa et al. (2017), e as segregações de 15R:1S observadas indicaram que genes duplicados com alelos dominantes conferem resistência específica a cada um dos isolados utilizados. No entanto, no cruzamento entre BRSMG Ouro Vermelho e BRS Estilo a segregação de 3R:1S foi observada, indicando que as cultivares diferem em apenas um gene, sendo o alelo dominante responsável pela resistência. Costa et al. (2021) mapearam QTLs da população F₂ (BRSMG Ouro Vermelho X BRS Estilo) e estudo de GWAS em painel de diversidade, onde detectaram uma região genômica no grupo de ligação Pv04, associada a 10 marcadores SNPs relacionados a resistência ao isolado LV134 de antracnose. Contudo, não ocorreu a identificação de um gene específico, porque não houve um mapeamento fino para marcadores ligados mais próximo ao gene de interesse, e o estudo em questão foi realizado com base na região identificada.

Dentre os marcadores detectados, o SNP ss715649771 foi o principal marcador, explicando 64% da variação. Este marcador está localizado na região subtelomérica do cromossomo Pv04, e as regiões subteloméricas são apontadas como regiões com grande potencial para facilitar a adaptação rápida, devido à sua natureza altamente dinâmica (BROWN

et al., 2010). Os subtelômeros são locais ideais para genes que podem se beneficiar dessa plasticidade e muitas vezes carregam genes maiores e de evolução mais rápida do que aqueles encontrados em localizações cromossômicas mais internas (CHEN et al., 2018). Além da marca em estudo, diferentes genes de resistência à antracnose já foram observados e descritos na região subtelomérica do Pv04, como o gene *Co-3* e sua série alélica (*Co-3²*, *Co-3³*, *Co-3⁴* e *Co-3⁵*), *Co-15* e *Co-16* (COIMBRA-GONÇALVES et al., 2016; GEFROY et al., 1999; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2013; YOUNG et al., 1998). Isto demonstra a importância dessa região para estudos de resistência à antracnose.

Como já foi descrito para o cluster B4 no cromossomo Pv04, onde o *Co_F* está localizado, ele é derivado de um processo de recombinação ectópica com o cromossomo Pv11 e, portanto, vem do cluster Co-2 (Chen et al. 2017; Meziadi et al. 2016; Richard et al. 2017). Além disso, verifica-se que o cromossomo Pv04 possui em sua extremidade, Knobs terminais (blocos heterocromáticos) e também um conjunto de regiões repetitivas formando DNA satélite, denominadas Khipu (Chen et al. 2018; Richard et al. 2017; Meziadi et al. 2016). Além disso, para aumentar a variabilidade e diferença entre as sequências dessas regiões, elementos transponíveis e miRNAs podem estar presentes, atuando como fatores para o processo de regulação da expressão gênica (Chen et al. 2018; Meziadi et al. 2016; Parker et al. 2016) . Todos esses fatores podem interferir na obtenção de marcadores intimamente associados, devido ao grande número de regiões repetitivas e por serem hotspots para recombinação (Chen et al. 2018; Meziadi et al. 2016; Murube et al. 2019).

Além disso, mecanismos epigenéticos já bem conhecidos, resultam no desligamento de genes próximos a regiões heterocromáticas, como a região telomérica e repetições de sequências, por meio de modificações epigenéticas, como a metilação. Essas modificações podem induzir a ocorrência de novas recombinações, originando assim genes de resistência

inéditos. Dessa maneira, o ambiente genômico nessa região cria condições propícias para a formação de agrupamentos extensos de genes R (YI; RICHARDS, 2007). As regiões subteloômicas são reconhecidas como locais que abrigam famílias gênicas em constante evolução, influenciadas por processos adaptativos. Essa flexibilidade tem sido documentada em diversos organismos, especialmente em fungos e leveduras (MEZIADI et al., 2016).

Estudos anteriores apoiam a hipótese de que a resistência ao isolado LV134 da raça 65 na cultivar BRS Ouro Vermelho ($CO_{ECO}E_{CO}F_{CO}F$) é controlada por um gene principal, com dominância completa (COSTA et al., 2017). A cultivar também se mostrou uma boa fonte de resistência a isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum* em outros trabalhos, sendo indicada para compor um painel de cultivares diferenciadoras de isolados dessa raça (ISHIKAWA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2016). Já a cultivar utilizada neste estudo como suscetível ao isolado LV134 para obtenção da população F_2 (BRS Cometa) apresenta o genótipo $CO_{ECO}E_{ECO}F_{CO}F$, sendo genotipicamente igual ao genitor BRS Estilo, utilizado no trabalho de Costa et al. (2021). Ambos os genitores possuem os pais, EMP 250 /4/ A 769 / A 429 / XAN 252, em sua genealogia.

Costa et al. (2017) observaram uma distância de aproximadamente 1cM entre o SNP avaliado e o gene de resistência ao isolado LV134. Contudo, no presente trabalho uma distância de aproximadamente 10cM foi observada. Apesar da presença de parentais comuns em sua genealogia, o tamanho do genoma e a posição dos genes podem afetar essa distância. Outro fator que pode explicar essa diferença, pode ser o fato de que o SNP deve estar em uma região próxima ao gene de interesse, mas não dentro do gene. Os blocos de ligação, ou grupos de genes ligados, são mais extensos em populações F_2 , e a permuta entre o SNP e o gene de interesse pode ocorrer proporcionando essa diferença. Além disso, a presença de indivíduos recombinantes, ou seja, indivíduos com a marca, mas suscetíveis, ou indivíduos sem a marcar,

mas resistentes, também evidenciam essa hipótese da quebra dos blocos de ligação. Esses eventos de recombinação e a diferença no tamanho do genoma entre as cultivares podem alterar a distância em centiMorgans (cM) entre os marcadores e os genes *Co_F*, influenciando a eficiência do marcador.

Marcadores moleculares vêm sendo identificados para monitorar a piramidação de genes de resistência à doenças, reduzindo mão de obra e tempo necessários para a condução de programas de melhoramento (BERNADO, 2010). Quando fortemente ligados aos genes de resistência, esses marcadores apresentam alta eficiência de seleção (ES) e, assim, reduzem sobremaneira a quantidade de ações para a seleção de genótipos portadores das combinações alélicas mais promissoras. Sendo assim, quanto maior a ES de um marcador, maior será a sua contribuição na tomada de decisão pelos programas de melhoramento (SILVA et al., 2007). No presente trabalho, a ES estimada do marcador avaliado apresentou um valor de 96%, evidenciando uma forte associação da marca com o gene de interesse, e um alto potencial desse marcador para ser utilizado na rotina da SAM. Gomes-Messias et al. (2022) validando marcadores moleculares associados ao gene *Co-4²* de resistência a antracnose observaram valores semelhantes de ES.

O modelo de regressão linear simples foi significativo (Tabela 4) para o marcador avaliado, com um valor de 41,5% de R². Esse valor indica o quanto o modelo explicou a variabilidade da população avaliada ou o ajuste dos dados ao modelo testado. Além disso, os valores observados do declive da reta foram negativos (Tabela 4), revelando uma associação entre o marcador SNP e o alelo de resistência, excedendo a maioria dos valores relatados na literatura (Gomes-Messias et al. 2022).

Observamos um número relativamente elevado de indivíduos recombinantes no painel, cerca de 41%. Em termos de indivíduos que apresentaram reação de resistência ao patógeno e

não apresentaram a marca (C), uma provável explicação é que essas linhagens/cultivares possuem outros alelos que conferem resistência à raça 65 de *C. lindemuthianum*. Diferentes genes de resistência à antracnose foram relatados no Pv04, tais como, *Co-3*, *Co-9*, *Co-y*, *Co-z* e *Co-10*, cada um associado a diferentes raças do patógeno, sendo que o gene *Co-3* está associado a resistência à raça 65 (NUNES et al., 2021).

Considerando a ancestralidade, as cultivares parentais utilizadas no presente trabalho são de origem andina (BRSMG Ouro Vermelho) e mesoamericana (BRS Cometa). Na literatura, os genes de resistência à antracnose de origem andina são: *Co-1*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-x*, *Co-w*, *Co-y*, *Co-z*, *Co-Pa*, *Co-AC* e *Co-Pv01^{CDRK}* nos cromossomos Pv01, Pv03 e Pv04 (LÓPEZ et al., 2003; GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2013; RICHARD et al., 2014; COIMBRA-GONÇALVES et al., 2016; CHEN et al., 2017; CASTRO et al., 2017; GILIO et al., 2020). Além disso, é relatada a preferência de raças de *C. lindemuthianum* a centros de origem específicos, Andino e Mesoamericanos (PASTOR-CORRALES, 1996; NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2022), mas podem ocorrer raças com alta virulência para genótipos de ambos pools gênicos (BALARDIN; KELLY, 1998).

A ocorrência de raças andinas de *C. lindemuthianum* são derivadas, normalmente, de feijões de sementes grandes, enquanto raças mesoamericanas são isoladas de sementes médias e pequenas, cada qual pertencente ao seu respectivo pool gênico (KELLY; VALLEJO, 2004; PAULINO et al., 2022). Contudo, quando é considerada a virulência, as raças mesoamericanas apresentam maior diversidade genética e são compatíveis com feijão andino (KELLY; VALLEJO, 2004). Isto sugere atenção considerável aos novos genes de resistência quando identificados, pois estes podem ser utilizados no manejo da antracnose nas diferentes possibilidades de pool gênico: genes andinos usados em áreas com raças mesoamericanas, e

genes de origem mesoamericana em raças andinas (PAULINO et al., 2022). Além disso, a piramidação combinada poderia contribuir para a obtenção de resistência durável NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2022).

A introgressão alelos de resistência em germoplasmas elite de feijão auxiliados por marcadores moleculares é uma estratégia promissora em programas de melhoramento, visto que reduz tempo e custo nas etapas iniciais de seleção (SAKIYAMA et al., 2014). De acordo com Ragagnin et al. (2003), uma estratégia altamente recomendada para o desenvolvimento de cultivares de plantas resistentes à antracnose envolve a introgressão simultânea de múltiplos genes de resistência em uma cultivar-elite, conhecida como a piramidação. Essa abordagem leva em consideração a ampla variabilidade do fungo, tornando viável o processo de melhoramento genético. Portanto, a identificação e validação precisa de genes de resistência e o gerenciamento das interações genéticas são aspectos críticos a serem considerados na SAM visando resistência à antracnose.

A sonda TaqMan® desenvolvida para o SNP ss715649771 foi avaliada também em um painel composto de cultivares e linhagens elite de diferentes programas de melhoramento contrastantes para resistência ao isolado LV134. É na utilização de um painel que conseguimos ter uma maior compressão da funcionalidade das sondas em uma rotina de SAM. Além disso, nesse painel, a evidência de que o gene avaliado em questão se trata de um novo gene ainda não relatado, como proposto por Costa et al., (2019) ficou ainda mais evidente. O alelo *Co-3*⁴, associado a resistência à raça 65 de *C. lindemuthianum*, está localizado também no PV04, é encontrado na cultivar Ouro Negro, que em trabalhos anteriores (NUNES et al., 2021; COSTA et al., 2017) foi considerada resistente a essa raça. No presente trabalho, a cultivar foi suscetível ao isolado LV134 e não apresentou o alelo C, evidenciando que um novo gene estaria associado à resistência a esse isolado da raça 65 e estaria presente no PV04, não apenas o *Co-3*. Além

disso, a cultivar Ouro Vermelho Resistente (OVR), originada da BRSMG Ouro Vermelho, obtida por meio da piramidação de alelos de resistência a isolados de *C. lindemuthianum*, foi piramidada para o alelo *Co-3*⁴, indicando que anteriormente, a linhagem não apresentava o gene *Co-3*, aumentando ainda mais a probabilidade de se tratar de um novo gene.

Para garantir a eficiência da seleção destes marcadores, estratégias devem ser adotadas, uma delas seria a realização do mapeamento fino para desenvolver marcadores intimamente ligados a cada gene de resistência (*Co_F*). Indivíduos recombinantes de populações segregantes (BRS Estilo x BRSMG Ouro Vermelho) podem ser usados para mapeamento fino. Além disso, a validação de marcadores adicionais para estes isolados específicos de antracnose e outras raças é essencial. A utilização de vários marcadores validados melhora significativamente a eficiência da seleção assistida por marcadores (MAS). O mapeamento fino é particularmente importante porque ajuda a identificar a localização específica dos genes de resistência. Atualmente, apenas um gene candidato está associado ao marcador: Phavu-004G001500g (que codifica um fator de alongamento com envolvimento relatado na resistência ao oídio do feijão) para *Co_F* (Campa e Ferreira 2017).

Levando-se em consideração também a existência da co-evolução planta-patógeno (NUNES et al., 2021; PAULINO et al., 2022), estratégias alternativas de controle da antracnose podem ser elaboradas, conforme a identificação de novos genes de resistência e do uso de genótipos de pools gênicos diferentes, andinos e mesoamericanos. Assim, a adoção rotineira do marcador ss715649771, associado com outras marcas já conhecidas em programas de melhoramento pode contribuir efetivamente no desenvolvimento de linhagens de feijoeiro comum resistentes à antracnose. A seleção via marcadores não exclui a fenotipagem em casa de vegetação com mistura de raças e em condições naturais.

5 CONCLUSÃO

- Os sistemas de genotipagem baseados em sondas de hidrólise desenvolvidos neste estudo (TaqMan® SNP) para o marcador ss715649771 permitiu a amplificação específica do alelo alvo, sendo adequado para uso na SAM;

- O marcador ss715649771 apresentou alta eficiência de seleção, 96% e sua utilização em programas de melhoramento, junto a outras marcas já conhecidas, contribuirá para a piramidação de genes de resistência à raça 65 de *C. lindemuthianum* em linhagens de feijoeiro comum.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às seguintes agências de fomento brasileiras: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela EMBRAPA – Corporação Brasileira de Pesquisa Agrícola.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não apresentam conflito de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. P. et al. Marker-assisted backcrossing for disease resistance and agronomic traits in carioca beans. **Agronomy**, v. 61, n. 4, p. 2510-2521, 2021.

BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, p. 1038-1047, 1998.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma, 2010.

BROWN KK, et al. Deletion of an enhancer near DLX5 and DLX6 in a family with hearing loss, craniofacial defects, and an inv(7)(q21.3q35). *Hum Genet.* 127:19-31, 2010.

CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v.14, n. 115, 2014.

CASTRO, S. A. L. et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, v. 18, n. 306, 2017.

CHEN, M. et al. Mapping and genetic structure analysis of the anthracnose resistance locus Co-1^{HY} in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169954, 2017.

COIMBRA-GONÇALVES, G. K. et al. Characterization and mapping of anthracnose resistance gene in Mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Crop Science**, v. 56, n. 6, p. 2904-2915, 2016.

COSTA, L. C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173789, 2017.

COSTA, L. C. et al. Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 543–556, 2021.

COSTA, L. C. et al. **Mapeamento de genes de resistência a diferentes isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e seleção recorrente visando à resistência a antracnose do feijoeiro**. 2019. 109 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

DAVIDE, L. M. C.; SOUZA, E. A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 23–30, 2009.

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

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. *In*: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. **Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2013, p. 151-181.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 774-784, 1999.

GEFFROY, V. et al. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 181, p. 405–419, 2009.

GILIO, T. A. S. et al. Fine mapping of an anthracnose-resistance locus in Andean common bean cultivar Amendoim Cavalão. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0239763, 2020.

GOMES-MESSIAS, L. M. et al. Genetic mapping of the Andean anthracnose resistance gene present in the common bean cultivar BRSMG Realce. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1033687, 2022.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose Co-10 and angular leaf spot Phg-ON disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 2245-2255, 2013.

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

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31175, 2012.

ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 2, p. 461-464, 2011.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, v. 63, p. 156-161, 2008.

KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, v. 39, p. 1196-1207, 2004.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

LIU, X. et al. Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. **PLoS genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005767, 2016.

LÓPEZ, C. E. et al. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 1, p. 88-95, 2003.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: Software for Genetic Mapping in Outcrossing Species. **Hereditas**, v. 144, p. 78-79, 2007.

MARKELL, S.; WUNSCH, M.; RIO, L. DEL. Anthracnose of Dry Beans. *Plant Disease Management*, p. 1-4, 2012.

MEZIADI, C. et al. 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.

MIGUEL, L. A. **Meta-QTLs para resistência a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e expressão diferencial de genes durante interação com a raça 65 no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

MUNGALU, H. et al. Identification of race-specific quantitative trait loci for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in an Andean population of common bean. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2843-2856, 2020.

NAY, M. M. et al. A review of angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 59, n. 4, 2019.

- NUNES, M. P. B. A. et al. Relationship of *Colletotrichum lindemuthianum* races and resistance loci in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. **Crop Science**, v. 61, n. 6, p. 3877-3893, 2021.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; PAULA-JR, T. J. Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Proceedings of the Reuniao Nacional de Pesquisa de Feijão**, v. 5, p. 23-41, 1996.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. *In*: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean Production Problems in the Tropics**. CIAT, Cali, Colombia, 1989.
- PAULA JÚNIOR, T. J. P. et al. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. *In*: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. cap. 11, p. 270–299.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIN L. Doenças. *In*: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, R.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Ed UFV, 2006.
- PAULINO, J. F. C. et al. Genome-wide association study reveals genomic regions associated with fusarium wilt resistance in common bean. **Genes**, v. 12, n. 5, p. 765, 2021.
- PAULINO, P. P. S. et al. Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-21, 2022.
- PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490-497, 2012.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Versão 4.1.2 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- RAGAGNIN, V.A. et al. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 591-596, 2003.
- RIBEIRO et al. Classification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in differential cultivars of common bean. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 179-184, 2016.
- RICHARD M. M. et al. Fine mapping of Co-x, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, p. 1653–1666, 2014.
- RICHARD, Manon MS et al. What is present at common bean subtelomeres? Large resistance gene clusters, knobs and Khipu satellite DNA. **The Common Bean Genome**, p. 187-199, 2017.

- SAKIYAMA, N. S.; RAMOS, H. C. C.; CAIXETA, E. T.; PEREIRA, M. G. . Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 54–60, 2014.
- SARTORATO, A. et al. Principais doenças transmitidas pela semente. *In*: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 147-199.
- SCHMUTZ, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature genetics**, v. 46, n. 7, p. 707-713, 2014.
- SHAFI, S. et al. Delineating meta-quantitative trait loci for anthracnose resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 966339, 2022.
- SHEN, G. Q.; ABDULLAH, K. G.; WANG, Q. K. O Método TaqMan para Genotipagem SNP. *In*: KOMAR, A. **Polimorfismos de nucleotídeo único. Métodos em biologia molecular™ (métodos e protocolos)**. Totowa: Humana Press, 2009.
- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 241-247, 2007.
- SILVA, L. C. et al. Simulation of population size and genome saturation level for genetic mapping of recombinant inbred lines (RILs). **Genetics and Molecular Biology**, v. 1108, p. 1101–1108, 2007.
- SINGH, S. P. et al. Independent, alternate, and simultaneous selection for resistance to anthracnose and angular leaf spot and effects on seed yield in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, v. 106, p. 312-318, 1991.
- TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 793-803, 2006.
- TRUTMANN, P.; GRAF, W. The impact of pathogens and arthropod pests on common bean production in Rwanda. **International Journal of Pest Management**, v. 39, p. 328-333, 1993.
- VAN SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 1987.
- VIDIGAL FILHO, P. S. et al. Genome-wide association study of resistance to anthracnose and angular leaf spot in Brazilian Mesoamerican and Andean common bean cultivars. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2931-2950, 2020.
- VITTE, C. et al. The bright side of transposons in crop evolution. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 4, p. 276-295, 2014.
- YI, H.; RICHARDS, E.J. A cluster of disease resistance genes in *Arabidopsis* is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. **Plant Cell**, v. 19, p. 2929–2939, 2007.

YOUNG, R. A. et al. Marker - assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G 2333". **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87-94, 1998.

ZUIDERVEEN, G. H. et al. Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS one**, v. 11, n. 6, p. e0156391, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A Meio fenotípico para isolar Lv134 de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 65, amplificação para o alelo ss715649771 e origem de linhagens de feijoeiro do banco de germoplasma ativo da Universidade Federal de Lavras-UFLA (Continuação).

Número	Identificação	Origem	Alelo	Nota
1	UFV-6	UFV	TT	4
2	UFV-7	UFV	TT	9
3	UFV-10	UFV	TT	6
4	UFV-11	UFV	TT	6
5	UFV-13	UFV	TT	9
6	CIAT-12	CIAT	TT	6
7	CIAT-13	CIAT	TT	9
8	CIAT-14	CIAT	TT	6
9	CIAT-18	CIAT	TT	6
10	CIAT-19	CIAT	TT	7
11	CIAT-21	CIAT	TT	6
12	CIAT-22	CIAT	TT	7
13	OURO NEGRO	-	TT	9
14	Corinthians	Diferencial	TT	6
15	Jalo EEP 558	-	TT	1
16	G2333	Diferencial	TT	1
17	XANA	Serida	TT	1
18	MDRK1	Diferencial	TT	2
19	kaboon	Diferencial	TT	2
20	Widusa	Diferencial	TT	2
21	PARA	Diferencial	TT	2
22	México 222	Diferencial	TT	9
23	Jalo Listras Vermelhas	-	TT	1
24	PUAD	-	TT	1
25	VR-20	UFV	TT	6
26	UFV-1	UFV	CC	9

APÊNDICE A Meio fenotípico para isolar Lv134 de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 65, amplificação para o alelo ss715649771 e origem de linhagens de feijoeiro do banco de germoplasma ativo da Universidade Federal de Lavras-UFLA.

27	UFV-2	UFV	CC	9
28	UFV-3	UFV	CC	9
29	UFV-4	UFV	CC	9
30	UFV-8	UFV	CC	5
31	UFV-9	UFV	CC	4
32	UFV-12	UFV	CC	9
33	UFV-14	UFV	CC	3
34	UFV-15	UFV	CC	9
35	Vermelhinho	UFV	CC	3
36	CIAT-1	CIAT	CC	3
37	CIAT-3	CIAT	CC	9
38	CIAT-11	CIAT	CC	9
39	CIAT-20	CIAT	CC	3
40	CIAT-23	CIAT	CC	9
41	Safira	EMBRAPA	CC	9
42	BRS Pitanga	Diferencial	CC	3
43	BASTÃO 93	Diferencial	CC	1
44	A252		CC	2
45	Medula Perry	Diferencial	CC	1
46	TU	Diferencial	CC	1
47	PI207262	Diferencial	CC	1
48	AB136	Diferencial	CC	1
49	RV 25	UFV	CC	8
50	RV 26	UFV	CC	1
51	CARIOCA Pyatã	IAC	CC	1
52	BRSMG REALCE	Convênio	CC	1
53	CNFRS 15.558	EMBRAPA	CC	1
54	MADREPEROLA	UFLA	CC	1
55	UFV-5	UFV	TC	9