



PAULA FURTADO DE PÁDUA

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS
ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA À *PSEUDOCERCOSPORA*
GRISEOLA NA LINHAGEM MAIII-16.159 DE FEIJOEIRO**

LAVRAS-MG

2022

PAULA FURTADO DE PÁDUA

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS A
RESISTÊNCIA À *PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA* NA LINHAGEM MAIII-16.159
DE FEIJOEIRO**

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 Doutora.

Prof (a). Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da
Biblioteca Universitária da UFLA**

Pádua, Paula Furtado de.

Identificação de regiões genômicas associadas a resistência
à *pseudocercosporangiseola* na linhagem MAIII-16.159 de feijoeiro / Paula
Furtado de Pádua. - 2022.

64 p.

Orientador(a): Elaine Aparecida Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Genética. 2. Mapeamento de genes. 3. Melhoramento de Plantas. I.
Souza, Elaine Aparecida. II. Título.

PAULA FURTADO DE PÁDUA

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS A
RESISTÊNCIA À *PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA* NA LINHAGEM MAIII-
16.159 DE FEIJOEIRO**

**IDENTIFICATION OF GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH
RESISTANCE TO *PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA* IN COMMON BEAN LINE
MAIII-16.159**

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 Doutora.

APROVADA em 29 de abril de 2022.

Dr. Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza

Dra. Rosana Pereira Vianello

Dra. Larissa Carvalho Costa

Dr. Vinícius Quintão Carneiro

Embrapa Arroz e Feijão

Embrapa Arroz e Feijão

United States Department of Agriculture

Universidade Federal de Lavras

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

Orientadora

LAVRAS-MG

2022

AGRADECIMENTOS

A realização dessa tese não poderia chegar aos seus resultados sem o precioso apoio de várias pessoas ao longo desses anos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus familiares, meus pais Márcia e Sebastião por todo o apoio, meu marido pela paciência e compreensão, minha filha Isis que sempre foi minha força, minha irmã e meus sobrinhos pelo suporte e minha prima Mariana e tia Natália por todo acolhimento e torcida por mim.

A todos os meus outros familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim! Obrigada por compreenderem minhas ausências e estudos constantes.

Meus sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA. Tenho extrema felicidade de ter feito parte desse programa durante 12 anos da minha vida, foi onde eu descobri grandes desafios a enfrentar, muitos momentos de ansiedade, mas também muitos momentos de alegria.

Não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Elaine, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante minha trajetória. Muito obrigada por me ter me ensinado muitas coisas e sempre ter me motivado!

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Doutorado e do Laboratório de Resistência de Plantas a doenças da UFLA, especialmente Mariana, Larissa, Fernanda, Ana, Alex, Ednilson, Júlio, Katia, Gleice, Rafael, Jussara, Karina, Juninho e Maria Clara. Vocês foram essenciais na minha jornada e alegraram muito os meus dias. Quero agradecer especialmente à Nathália que foi uma grande amiga que tive a oportunidade de coorientar em seus trabalhos de graduação. Quero também agradecer ao Reberth que sempre me socorreu e me ajudou nos problemas enfrentados no doutorado, foi um grande amigo nos momentos mais difíceis. Outra grande amiga durante esse período foi a Heloisa, amiga sempre presente para me ajudar, escutar e me ouvir desabafar. Muito obrigada amiga!

Tenho um agradecimento especial para fazer ao nosso laboratorista Miller Marani que foi essencial para me ajudar na condução desses experimentos sempre com muita boa vontade!

Aos demais professores do programa, Magno, César, João Bosco, José Airton, João Cândido, Vânia, Flávia, Vinícius, Evandro e Thiago por todos os ensinamentos e exemplo. Vocês foram essenciais na minha formação.

Aos amigos do feijão, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos de campo. Ao GEN pela oportunidade de fazer parte desse núcleo e pelo apoio e amizade.

À Embrapa Arroz e Feijão, à Universidade Federal de Goiás (UFG), aos pesquisadores Dr. Thiago Lívio e Dra. Rosana Vianello pela parceria na condução desses experimentos, por todo apoio ensinamentos e orientação. Sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Um agradecimento especial ao Lucas que me ajudou na realização das análises estatísticas sempre pronto e com boa vontade. Passamos boa parte do tempo em vídeo- conferências realizando análises juntos. Obrigada por todo seu empenho, dedicação e amizade que foram essenciais para a finalização desse trabalho. Agradeço também ao Prof. Alexandre da UFG por toda orientação durante a realização das análises de GWAS.

A todos os demais funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, por todo o auxílio e prazerosa convivência. Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o curso de doutorado e o apoio financeiro na atividade de genotipagem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acima de tudo gostaria de agradecer a Deus que sempre esteve presente na minha vida e que me deu forças para continuar caminhando e por ter me dado a chance de ter chegado até aqui e concluído este trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente cultivado em países tropicais e subtropicais, sendo uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais. No entanto, a cultura do feijão-comum é acometida por diversas doenças, sendo a mancha-angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, uma das mais importantes, levando a perdas de produtividade de até 80%. A melhor forma de controle da doença inclui o uso de cultivares resistentes. Com os esforços do melhoramento genético, a linhagem MAIII-16.159 foi obtida a partir do programa de seleção recorrente para mancha angular realizado pela Universidade Federal de Lavras em parceria com a Embrapa, no Brasil, mostrou alta resistência a isolados de *P.griseola*. Apesar do alto nível de resistência apresentado por esta linhagem, não há informações sobre os genes de resistência que ela possui. Portanto, é importante identificar esses genes. A linhagem MAIII-16-159 (resistente) foi cruzada com a cultivar BRS Horizonte (suscetível) e avançada até a geração F₇ pelo método SSD (Single Seed Descent). Cento e oitenta e quatro linhagens recombinantes (RILs) foram obtidas. A fenotipagem destas linhagens foi realizada nos estágios V2 e V3, onde as plantas foram inoculadas com um isolado da raça 63-63 de *P. griseola*. Em seguida, a genotipagem foi realizada utilizando marcadores SNPs (Single Nucleotide Polimorfism) gerados por meio da tecnologia DArTseq (DArT Pty Ltd., Bruce, Austrália). Devido à ocorrência de seleção direcional e perda de RILs durante o avanço das gerações de autofecundação, não foi possível fazer o mapeamento. Contudo, um estudo de associação foi realizado nesta população que apresenta alto desequilíbrio de ligação. Duas associações estatisticamente significativas para a resistência à mancha angular foram identificadas no estágio V2 e uma no estágio V3 (dart3496, dart7825, dart7260). Esses marcadores apresentaram efeito negativo, ou seja, atuam na redução da severidade da mancha angular, sendo que dois estão localizados no cromossomo Pv08 e um no Pv04. O loco encontrado no cromossomo Pv08 em V2 validou uma região de estudo anterior do loco *Phg-2*, já descrito. Este marcador, dart7825, explicou cerca de 57% da variação fenotípica causada pela raça 63-63. Os marcadores dart3496 (Pv04) e dart7260 (Pv08) explicaram 53% e 44% da variação fenotípica em V2 e V3, respectivamente. Portanto, a linhagem MAIII-16.159 possui alelos de efeito maior localizados nos cromossomos Pv08 e Pv04, responsáveis pela resistência à *P. griseola* em ambos os estádios V2 e V3 de desenvolvimento do feijoeiro.

Palavras-chave: Mancha angular.*Phaseolus vulgaris*. Melhoramento de plantas. Resistência genética. Estudo de associação.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is widely grown in tropical and subtropical countries, and is an important source of proteins, carbohydrates, fiber, vitamins, and minerals. Angular leaf spot (ALS), caused by the fungus *Pseudocercospora griseola*, is of the most main diseases that affects the crop, leading to yield losses. The best strategy of disease control includes using resistant cultivars. The line MAIII-16.159 obtained from the recurrent selection program for ALS conducted by the Universidade Federal de Lavras in partnership with Embrapa, in Brazil has presented high resistance to *P.griseola* isolates. During the Common Bean Disease Workshop on Angular Leaf Spot and Root Rot, held in Skukuza, South Africa, in 2015, this line was indicated to compose the new international set of differential cultivars for the ALS. Despite the high level of resistance presented by this line, there is no information about its resistance genes. Therefore, it is important not only to identify these genes, but also to mapping the same. The MAIII-16.159 (resistant) line was crossed with the cultivar BRS Horizonte (susceptible) and advanced to the F₇ generation by the SSD method (Single Seed Descent). 184 recombinant lines (RIL's) were obtained. Phenotyping was carried out for ALS resistance in stage V2 and V3 using a isolate of race 63-63 of *P. griseola* and then genotyping using the DArTseq analysis facility (DArT Pty Ltd., Bruce, Australia). There was directional selection and loss of RILs, during advance of inbreeding generations, that is not be possible to carry out mapping. Therefore an association study was performed in this population that has presented high linkage disequilibrium. Two statistically significant associations for angular leaf spot resistance were identified at stage V2 and one at stage V3 (dart3496, dart7825, dart7260). These markers have presented a negative effect, that is, they act to reduce the severity of the ALS, two of which are located on chromosome Pv08 and one on Pv04. The locus found on chromosome Pv08 in V2 validated an earlier study region of the already described *Phg-2* locus. This marker (dart7825) explained about 57% of the phenotypic variation caused by race 63-63. Markers dart3496 (Pv04) and dart7260 (Pv08) explained 53% and 44% of the phenotypic variation in V2 and V3, respectively. Therefore, the MAIII-16.159 line has alleles of greater effect located on chromosomes Pv08 and Pv04, responsible for resistance to *P. griseola* in both V2 and V3 developmental stages of the common bean.

Keywords: Angular leaf spot. *Phaseolus vulgaris*. Plant breeding. Genetic resistance. Association study.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 A cultura do feijão-comum	12
2.2 Mancha Angular	13
2.3 Variabilidade patogênica de <i>P. griseola</i>	14
2.4 Controle genético de resistência à Mancha Angular.....	17
2.5 Marcadores Moleculares.....	20
2.6 Utilização de populações RILs no melhoramento do feijão-comum.....	22
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	35
ABSTRACT	36
3.1 Introdução	37
3.2 Material e Métodos	39
3.2.1 Multiplicação das sementes das linhagens de feijão-comum utilizadas	39
3.2.2 Teste de patogenicidade	40
3.2.3.1 Inoculação e avaliação das RILs no estádio V2	40
3.2.3.2 Inoculação e avaliação das RILs no estádio V3	41
3.2.4 Extração de DNA	42
3.2.5 Genotipagem de marcadores SNP e DarT	42
3.2.6 Análise de associação em população sob alto desequilíbrio de ligação.....	42
3.2.7 Identificação de genes candidatos	42
3.2.8 Análise de variância e Correlação de Spearman	43
3.2.9 Índice de coincidência	43
3.3 RESULTADOS	43
3.3.1 Análise de variância e fenotipagem das linhagens RILs.....	43
3.3.2 Análise do desequilíbrio de ligação	45
3.3.3 Genotipagem de marcadores SNP e DarT	46
3.3.4 Análise de associação.....	47
3.3.5 Identificação de genes candidatos para resistência à Mancha angular.....	49
3.4 DISCUSSÃO	51
3.5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

PRIMEIRA PARTE

I INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa consumida em quase todo o mundo (BEEBE, et al., 2014), e é uma importante fonte primária de proteína, carboidratos e vitaminas nos países em desenvolvimento (BROUGHTON et al., 2003; MYERS; KMIETIK, 2017). Entretanto, a cultura do feijão-comum é acometida por diversos fatores bióticos e abióticos que ameaçam sua produção e a qualidade dos grãos.

Um dos principais problemas na cultura do feijão-comum e causa grande instabilidade de produção é a ocorrência de doenças (SCHWARTZ; PASTOR-CORRALES, 1989; SINGH; SCHWARTZ, 2010). A mancha angular do feijoeiro é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, e as perdas podem chegar até 80% sob condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo (NAY et al., 2019). Embora o uso de fungicidas seja frequente para o controle de doenças durante o ciclo da cultura, a estratégia de controle mais econômica e sustentável é o uso da resistência genética (OBLESSUC et al., 2015). Portanto, é importante a identificação de genes responsáveis pela resistência para o uso em programas de melhoramento genético.

Estudos sobre o controle genético da resistência à mancha angular têm sido realizados em algumas oportunidades, sendo identificada a presença de resistência monogênica e poligênica, esta última considerada o principal tipo de resistência no patossistema *P.griseola*-feijoeiro (PEREIRA et al., 2015; OBLESSUC et al., 2013; REZENDE et al., 2014; LIBRELON et al., 2020). Uma estratégia para a obtenção de linhagens com resistência durável é o uso da seleção recorrente, que visa aumentar a frequência de alelos favoráveis, ou seja, incrementar a resistência de forma gradual (NELSON et al., 2018). Desde 1998 a Universidade Federal de Lavras em parceria com a Embrapa tem conduzido um programa de seleção recorrente para a resistência à *P.griseola*. Várias linhagens têm sido obtidas ao longo dos ciclos, com destaque para a linhagem MAIII-16.159 que tem se apresentado altamente resistente (AMARO et al., 2007; ARANTES; ABREU; RAMALHO, 2010; REZENDE et al., 2014). Durante o Workshop “Angular Leaf Spot and Root Rot”, realizado em Skukuza na África do Sul em 2015, esta linhagem foi indicada para compor o novo conjunto internacional de cultivares diferenciadoras para a mancha angular. Apesar do alto nível de resistência apresentado por esta linhagem em vários trabalhos (PEREIRA; ABREU; SOUZA, 2011;

PEREIRA et al., 2015; PÁDUA, et al., 2021), ainda não há informações sobre os genes de resistência presentes nesta linhagem. Portanto, é importante identificar esses genes.

Para o mapeamento de genes maiores e de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de resistência no feijão-comum tem sido utilizado com sucesso o emprego de populações RILs (*Recombinant Inbred Lines*) (OBLESSUC et al., 2013; BASSI et al., 2017). As populações RILs são constituídas de linhagens endogâmicas obtidas a partir do cruzamento de dois genitores puros e contrastantes para o caráter em questão, sendo realizadas posteriormente, sucessivas gerações de autofecundação pelo método SSD (*Single Seed Descent*) até a geração F₈ ou superior, portanto, obtém-se um elevado grau de homozigose (BROMAN, 2005). As linhagens obtidas no final do processo representam a variabilidade presente na F₂ e também, aquela que está encoberta no heterozigoto e que será disponibilizada nas sucessivas gerações de autofecundação até que a homozigose seja atingida. Dessa forma, o uso dessas linhagens recombinantes possibilita a identificação de marcadores polimórficos e a realização do mapeamento de genes de interesse (POLLARD, 2012). Como as RILs são linhas puras a sua multiplicação é fácil, permitindo a realização de experimentos com maior número de repetições e conseqüentemente maior precisão (BROMAN, 2005; SCHUSTER; CRUZ, 2008).

Blocos gênicos (clusters), dentro dos quais, possuem vários genes individuais que conferem resistência a patógenos diferentes têm sido identificados em vários grupos de ligação do feijão-comum. (MEZIADI et al., 2016; MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019). Estudos de associação também têm sido realizados na cultura do feijão-comum para a identificação de regiões genômicas associadas a várias características de interesse, incluindo resistência a doenças (KAMFWA; CICHY; KELLY, 2015; MOGHADDAM et al., 2016; PERSEGUINI et al., 2016; TOCK et al., 2017; ZUIDERVEEN et al., 2016; ALMEIDA et al., 2021). O mapeamento por associação, também conhecido como mapeamento por desequilíbrio de ligação, detecta e localiza QTLs baseado na intensidade da correlação entre os marcadores moleculares mapeados e as características fenotípicas (MACKAY E POWELL, 2007). A vantagem da utilização de mapeamento por associação é que não há necessidade de sintetizar uma população, esta pode ser, por exemplo, um conjunto diverso de indivíduos, populações, germoplasmas e coleções nucleares (SCHMUTZ et al., 2014). No presente trabalho, devido à problemas na condução da população RILs, e a impossibilidade de ser realizar o mapeamento, foi realizado um estudo de associação para identificar regiões genômicas responsáveis pela resistência à mancha angular na linhagem MAIII-16.159. O uso

de uma população estruturada com alto desequilíbrio de ligação é mais poderosa na identificação de QTLs, em vez de sua localização. Neste caso, a falta de recombinação entre um QTL e um marcador ligado aumenta o poder de detecção (MACKAY E POWELL, 2007).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar regiões genômicas associadas a resistência a mancha angular na linhagem MAIII-16.159 em uma população com alto desequilíbrio de ligação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão-comum

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma leguminosa cultivada em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, constituindo a principal fonte de proteínas e minerais na dieta da população (MEZIADI et al., 2016). Sua origem se deu basicamente a partir de dois centros principais de domesticação, a região Mesoamericana e a região Andina (BELLUCCI et al., 2014). A primeira região é localizada no centro das Américas, em torno do México e originou cultivares de grãos pequenos. Já na região Andina, que compreende o sul dos Andes e norte da Argentina, originaram-se os grãos graúdos (VELOSO et al., 2015).

No Brasil, o feijão está presente diariamente na dieta da população. Sendo o país, o maior produtor e consumidor dessa leguminosa (LEMOS et al., 2020). A cultura assume grande importância social para o país, já que seu cultivo envolve desde os pequenos agricultores (agricultura familiar) aos grandes produtores de grãos (CARNEIRO; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2015). A produção de feijão no Brasil, é realizada em três safras. A primeira denominada “safra das águas” e semeada entre outubro e novembro. A segunda, “safra da seca”, é semeada entre janeiro e abril e a terceira, “safra de inverno” ou “safra de outono/inverno” é semeada a partir de abril e colhida entre agosto e outubro (BARBOSA; GONZAGA, 2012) Estima-se que para o ano de 2022 a produção total de feijão-comum fique em torno de 3.059 toneladas, sendo que os principais estados brasileiros produtores de feijão são Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás, Mato Grosso e Bahia (CONAB, 2022).

Dentre os diversos fatores que reduzem a produtividade, estão os patógenos, especialmente os fungos, são capazes de afetar o desenvolvimento da planta e reduzir drasticamente a qualidade dos grãos (SINGH; SCHWARTZ, 2010). Bruno et al. (2017)

observaram que a severidade das doenças causadas por patógenos como *Pseudocercospora griseola* (mancha angular), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (crestamento bacteriano comum), e *Colletotrichum linemuthianum* (antracnose), foi negativamente correlacionado com a produtividade de grãos de feijão-comum. Embora o uso de fungicidas seja frequente, a alternativa de controle mais viável economicamente é o emprego de cultivares resistentes. O aumento na produtividade de grãos e a melhoria de características agronômicas, em cultivares de feijão, se deve, em grande parte, ao seu melhoramento genético (BARILI et al.,2016; LEMOS et al., 2020)

2.2 Mancha Angular

A mancha angular é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. A nomenclatura de *P.griseola* já passou por diversas mudanças, inicialmente foi nomeado como *Isariopsis griseola* por Saccardo em 1878 (NIETSCHKE, 1997). Em 1909 Ferraris identificou o gênero *Isariopsis* como sinonímia do gênero *Phaeoisariopsis*, propondo a denominação de *Phaeoisariopsis griseola* para o patógeno (STENGLEIN et al., 2003). Após esse período um trabalho realizado com análises moleculares sugeriu uma nova nomenclatura. Desta maneira a nova denominação do fungo ficou sendo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun (CROUS et al., 2006).

A mancha angular é uma doença que se encontra em todos os países onde o feijão-comum é cultivado, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são moderadas e ocorrem períodos de alta umidade relativa (CHILAGANE et al., 2016). Considerada de grande importância para a cultura do feijão-comum, pode causar perdas de até 80%, se as condições climáticas forem favoráveis, além do uso de cultivares suscetíveis e presença de inóculo durante o cultivo (SINGH; SCHWARTZ, 2010; PAULA-JUNIOR et al.,2015).

O processo de infecção começa a partir da germinação dos conídios, que ocorre entre 3 a 6 horas após a inoculação em temperaturas ótimas de 20-28°C. O fungo penetra pelos estômatos e coloniza o hospedeiro. O desenvolvimento da doença ocorre em temperaturas entre 16 e 28°C, preferencialmente a 24°C. O patógeno produz sinêmios na face abaxial da folha, nas condições de campo, com cerca de 250 µm de comprimento e 20 a 40 µm de largura, compostos por conidióforos paralelos e escuros e forma tufos visíveis a olho nu. Os sintomas aparecem cerca de oito a 12 dias após a inoculação. A esporulação ocorre durante períodos de alta umidade (BIANCHINI et al.,2005).

O patógeno *P. griseola* pode afetar toda a parte aérea da planta, causa lesões no caule, ramos, folhas e vagens, além de promover a queda prematura das folhas, sob alta severidade. Nos ramos e pecíolos as lesões são alongadas e escuras. As lesões nas vagens apresentam manchas arredondadas superficiais de coloração castanho-escuro. Entretanto, os sintomas mais visíveis são nas folhas. Nas folhas cotiledonares, as lesões são circulares amarronzadas e nas folhas trifolioladas, as lesões são angulares, pardo acinzentadas, delimitadas pelas nervuras (MODA-CIRINO et al., 2012). Com a ocorrência de um grande número de lesões, estas coalescem, causando desfolha, e conseqüentemente perdas na produtividade de grãos (RAMALHO; ABREU; SANTOS, 2005).

O patógeno pode sobreviver em sementes e restos de cultura. Os esporos produzidos são disseminados, pela ação do vento e da chuva (SINGH; SCHWARTZ, 2010; BIANCHINI et al., 2005). O controle da mancha angular pode ser realizado utilizando diferentes manejos como rotação de culturas, uso de sementes sadias, eliminação dos restos culturais e utilização de uma densidade de semeadura adequada. O controle químico também tem sido utilizado. Entretanto, a resistência genética tem se mostrado o método mais eficiente e econômico para o controle da doença (REZENDE et al., 2014, LIBRELON et al., 2020).

2.3 Variabilidade patogênica de *P. griseola*

Apesar da resistência genética ser o método mais eficiente para o controle da mancha angular, a obtenção de cultivares resistentes é dificultado devido à alta variabilidade patogênica do fungo *P. griseola* (SANGLARD et al., 2009; CHILAGANE et al., 2016; LEITICH et al., 2016). Essa variabilidade é proporcionada por diversos mecanismos, desde mutações, atividade de elementos transponíveis, recombinação intragênica e ciclo parasexual. O ciclo parasexual é um mecanismo potencial de recombinação genética em fungos. Esse mecanismo já foi identificado em isolados de *P. griseola*, e podem explicar grande parte da variabilidade desse fungo (DAMASCENO-SILVA et al., 2015). Este também já foi identificado em outros fungos patogênicos como, por exemplo, em *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose do feijão-comum (ISHIKAWA et al., 2010, 2012).

A primeira evidência da variabilidade patogênica entre isolados de *P. griseola* foi relatada por Brok (1951), verificou-se que a reação de alguns isolados australianos apresentava diferentes padrões de virulência quando inoculados em cinco cultivares de feijão. Até então não existia uma metodologia padrão para a identificação das raças do patógeno. Na década de 90 foi proposto a utilização de um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras para a

identificação das raças, sendo seis cultivares de origem Andina e seis de origem Mesoamericana (PASTOR-CORRALES; JARA, 1995). Devido à coevolução entre o patógeno e o hospedeiro também é possível classificar os isolados de *P. griseola* em dois grupos principais: andino e mesoamericano (CHILAGANE et al., 2016). Dessa forma, isolados de origem mesoamericana e andina infectam predominantemente cultivares de mesma origem (PASTOR-CORRALES; JARA; SINGH, 1998).

Para a denominação da raça, foi proposta a utilização do método binário de Habgood (1970). Um valor é atribuído a cada uma dessas cultivares e a raça é determinada numericamente de acordo com a soma dos valores de todas as cultivares suscetíveis, dentro de cada grupo. Dessa forma que o nome da raça é um número. As cultivares de cada grupo seis andinas “ d_i ” e seis mesoamericanas “ d_j ” são identificadas ordenadamente pelos números de 1 a 6. Por exemplo a raça 63-23, o primeiro número significa a soma dos valores binários para as cultivares andinas (2^{d_i-1}) e o segundo relaciona-se à soma das cultivares mesoamericanas (2^{d_j-1}), para as quais o isolado apresentou reação de compatibilidade (TABELA 1). Desta forma o número 63 significa que todas as cultivares andinas apresentaram reação de compatibilidade ao isolado ($1+2+4+8+16+32$). Já o número 23 é o somatório dos valores das cultivares mesoamericanas que apresentaram reação de compatibilidade ao patógeno ($1+2+4+16$) (TABELA 1).

Tabela 1- Cultivares diferenciadoras de feijão utilizadas para a classificação das raças de *P. griseola* pelo sistema binário.

Cultivares	Conjunto	Série binomial (2^{d_i-1})	Valor binário	Reação ⁽¹⁾
1. Don Timóteo	Andino	2^0	1	C
2. G 11796	Andino	2^1	2	C
3. Bolón Bayo	Andino	2^2	4	C
4. Montcalm	Andino	2^3	8	C
5. Amendoim	Andino	2^4	16	C
6. G 5686	Andino	2^5	32	C
1. Pan 72	Mesoamericano	2^0	1	C
2. G 2858	Mesoamericano	2^1	2	C
3. Flor de Mayo	Mesoamericano	2^2	4	C
4. México 54	Mesoamericano	2^3	8	I
5. Bat 332	Mesoamericano	2^4	16	C
6. Cornell 49-242	Mesoamericano	2^5	32	I
Raça			63-23 ⁽²⁾	

¹ C: reação compatível; I: Reação Incompatível

² Exemplo hipotético

Esta nova metodologia possibilitou uma padronização em todo o mundo para a classificação de isolados de *P. griseola*. Desde então vários trabalhos de identificação de raças já foram realizados (GARCIA et al., 2006; NIETSCHKE et al., 2002; SARTORADO, 2002; BALBI et al., 2006; LEITICH et al., 2016).

A identificação de raças do patógeno é um dos passos fundamentais para o desenvolvimento de cultivares resistentes e estão embasados no conhecimento prévio da diversidade populacional do patógeno e do controle genético.

Da mesma forma que os patógenos de feijão-comum evoluíram sob dois *pools* gênicos distintos, os alelos que conferem resistência contra isolados oriundos do *pool* gênico Andino vem preferencialmente de feijões andinos sendo a recíproca verdadeira para regiões onde às raças de *P. griseola* predominantes são mesoamericanas (GUZMÁN et al., 1995). No Brasil são encontradas cultivares e raças de *P. griseola* dos dois *pools* gênicos, portanto, esforços devem ser feitos pelos programas de melhoramento de feijão-comum para obtenção de linhagens que combinem alelos resistência de cultivares Andinas e Mesoamericanas. Sendo essa uma importante estratégia para obtenção de cultivares de feijão com resistência ampla e duradora que combinem de alelos de resistência oriundos de *pools* gênicos distintos (Andino e Mesoamericano) em um mesmo genótipo por meio da seleção assistida por marcadores moleculares (MILLER et al., 2018; VIEIRA et al., 2018)

No Brasil já foram identificadas cerca de 54 raças de *P. griseola* em regiões produtoras de feijão-comum. Silva et al. (2008) avaliaram 48 isolados coletados nos municípios de Lavras e Ijaci em Minas Gerais, e verificaram a ocorrência de 10 raças diferentes, sendo que 47,92% dos isolados foram classificados como raça 63-63. A raça 63-63 quebra a resistência de todas as cultivares diferenciadoras, sendo assim, assim, a raça mais prevalente em todo o identificado em vários levantamentos de raças que têm sido realizados no Brasil (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2016; NIETSCHKE et al., 2002; SARTORATO, 2002; SARTORATO; ALZATE-MARÍN, 2004). No mundo já foram relatadas mais de 134 raças diferentes e cerca de 80 delas somente nas Américas (JARA et al., 2015). Embora o uso de cultivares diferenciadoras tem padronizado e facilitado o intercâmbio de informações entre pesquisadores sobre fontes de resistência, e sobre a população do patógeno, esta apresenta falhas.

Em um estudo realizado por Pereira et al. (2015) foi observado que as cultivares diferenciadoras não foram eficientes para detectar a grande variabilidade existente entre isolados da raça 63-63. Durante o Workshop “Angular Leaf Spot and Root Rot”, realizado na África do Sul em 2015, os pesquisadores propuseram um novo conjunto de linhagens diferenciadoras. Entre as linhagens escolhidas está a linhagem MA-III 16.159. Esta linhagem é proveniente do terceiro ciclo do programa de seleção recorrente para mancha angular, conduzido pela Universidade Federal de Lavras em parceria com a Embrapa, e apresenta bom nível de resistência à *P. griseola* (ARANTES; ABREU; RAMALHO, 2010; PEREIRA; ABREU; SOUZA, 2011; REZENDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; PÁDUA, 2021).

2.4 Controle genético de resistência à Mancha Angular

A resistência genética do feijão-comum à mancha angular é considerada complexa e envolve genes de efeito maior bem como genes de pequeno efeito (OBLESSUC et al., 2012; PEREIRA et al., 2015). Muitos trabalhos tem mostrado que a resistência específica a uma determinada raça de *P. griseola* é controlada por um ou poucos genes (NIETSCHE et al., 1999; SARTORATO et al., 2000; MAHUKU; IGLESIAS; JARA, 2009; SINGH; SCHWARTZ, 2010). Outros trabalhos indicam que vários genes estão envolvidos no controle do caráter (ARANTES; ABREU; RAMALHO, 2010; OBLESSUC et al., 2013, 2015; TRYPHONE et al., 2015; BASSI et al., 2017).

Pereira et al. (2015) avaliaram a agressividade de raças do patógeno em diferentes linhagens de feijão-comum, em um esquema dialélico, assim foi possível identificar tanto a presença de resistência vertical quanto a horizontal no controle do caráter, entretanto, houve uma predominância da resistência horizontal. A resistência vertical é específica à determinadas raças do patógeno, sendo essa especificidade determinada em função dos alelos de resistência presentes na linhagem, ao passo que a resistência horizontal refere-se a resistência da mesma linhagem a quaisquer raça do patógeno. Em um estudo conduzido por Amaro et al. (2007), os autores avaliaram progênies provenientes de seleção recorrente quanto à reação à *P. griseola* e observaram uma graduação nos sintomas das plantas consideradas resistentes, os autores atribuíram essa graduação ao efeito ambiental. Este é um comportamento típico de um caráter poligênico, ou seja, a resistência a *P. griseola* é predominantemente quantitativa. Outros trabalhos realizados obtiveram a mesma conclusão (ARANTES; ABREU; RAMALHO, 2010; REZENDE et al., 2014; PEREIRA et al., 2019; LIBRELON et al., 2020).

Durante o Workshop “Angular Leaf Spot and Root Rot”, realizado na África do Sul em julho de 2015, foi discutido a caracterização genômica de locos de resistência à mancha-angular. Os pesquisadores reconheceram formalmente os locos já nomeados anteriormente de *Phg-1* na cultivar AND 277, no cromossomo Pv01 (CARVALHO et al., 1998; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2011), *Phg-2* na cultivar México 54 em Pv08 (SARTORATO et al., 2000; NAMAYANJA et al., 2006) e *Phg-3* na cultivar Ouro Negro em Pv04 (CORRÊA et al., 2001; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2013). Os QTL's: *ALS4.1*^{GS, UD} no Pv04, presente na cultivar G5686 e o *ALS10.1*^{DG, UC} no cromossomo Pv10, presente nas cultivares CAL 143 e G5686, que foram oficialmente designados como *Phg-4*, *Phg-5*, *Phg-5*⁵ respectivamente (SOUZA et al., 2016). Informações sobre esses genes são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Locos identificados em linhagens de feijão comum responsáveis pela resistência à diferentes raças de *P. griseola*.

Locos	Fonte de resistência	Grupo de ligação	Raça de <i>P. griseola</i>	População utilizada	Referência
<i>Phg-1</i>	AND 277	Pv01	63-23	F ₂	Carvalho et al. (1998) Gonçalves-Vidigal et al. (2011)
<i>Phg-2</i>	México 54	Pv08	63-19 63-39	F ₂ /retrocruzamento	Sartorato et al. (2000)
<i>Phg-2</i> ²	BAT 332	Pv08	63-39	F ₂ retrocruzamento	Namayanja et al. (2006)
<i>Phg-3</i>	Ouro Negro	Pv04	63-39	F ₂	Corrêa et al. (2001) Gonçalves-Vidigal et al. (2013)
<i>Phg-4</i>	G5686	Pv04	31-0 *Campo	F ₃	Mahuku et al. (2009) Keller et al. (2015)
<i>Phg-5</i>	CAL 143	Pv10	0-39 *Campo	346 RILs	Oblessuc et al. (2012, 2013)
<i>Phg-5</i> ²	G5686	Pv10	31-0 *Campo	F ₃	Keller et al. (2015)

Fonte: Souza et al. (2016)

Legenda: * Linhagens avaliadas em condição de campo

Oblessuc et al. (2012) avaliaram uma população de 346 linhagens endogâmicas recombinantes provenientes do cruzamento das cultivares IAC-UMA x CAL 143, avaliadas em campo e em casa de vegetação para a resistência a *P. griseola*. Os autores identificaram

sete QTLs em cinco grupos de ligação, sendo, o QTL *ALS10.1^{DG, UC}* foi o mais expressivo, localizado no final do cromossomo 10 do feijão-comum. Um trabalho posterior para identificar os genes contidos nesse QTL, encontrou aproximadamente 323 genes na região central. Uma análise ontológica desses genes, revelou a presença de genes envolvidos na percepção e transdução de sinal, morte celular programada e respostas de defesa (OBLESSUC et al., 2015).

Keller et al. (2015) realizaram um mapeamento de uma população F₃ oriunda do cruzamento das linhagens G5686 e Sprite, observaram a presença de um grande QTL de resistência no cromossomo Pv04 e três QTL's menores. O principal QTL identificado (*ALS4.1^{GS, UC}*) explica cerca de 75,3% da variação fenotípica para resistência à mancha angular. Mais recentemente, Bassi et al. (2017) realizaram um estudo para construção de um mapa de ligação genético usando marcadores de repetições de sequência única (SSRs) e polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), em uma população segregante de 105 linhas endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento AND 277 x SEA 5. A fenotipagem foi realizada em casa de vegetação para identificar QTLs associados à resistência à mancha angular. Os autores identificaram quatro QTLs responsáveis pelo caráter. O QTL *ALS11^{AS}*, mapeado no cromossomo Pv11, explicou cerca de 26,5 % da variação, sendo o de maior efeito.

No trabalho realizado por Mahuku et al. (2011) foram identificados alguns marcadores próximos à loci responsáveis pela resistência na linhagem G10909. Um desses marcadores, o PF9260 (SCAR), está na região 61.86 Mpb do cromossomo Pv08. Essa linhagem foi extremamente resistente ao isolado da raça 63-63 de *P. griseola*, apresentando nota de severidade igual a 2. Além disso, essa linhagem, apresentou outro marcador de microssatélite, *Pv-gaat001* ligado ao loco *phg-3* que está localizado no cromossomo Pv04 (MAHUKU et al., 2011). Esse loco é responsável por conferir resistência a pelo menos 21 raças de *C. lindemuthianum* e sete raças de *P. griseola*, incluindo a raça altamente virulenta 63-63 (NAY et al., 2019). Esses genes também estão intimamente ligados a um terceiro gene, o gene de resistência à ferrugem Ur-14 (VALENTINI et al., 2017). Uma análise de ligação usando uma população F₂, derivada da Estilo x Ouro Vermelho, revelou dois genes principais em Pv04 associados a resistência a duas cepas diferentes da raça 65 de Antracnose e o mapeamento associativo usando um painel diversificado de 189 acessos de feijão-comum do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras e cinco isolados diferentes da raça 65, também revelou QTL maior em diferentes posições de Pv04 (COSTA et al., 2021). Esses

resultados demonstram a existência de um cluster de genes de resistência no cromossomo Pv04 de feijão-comum (MURUBE et al.,2019).

Fritsche-Neto et al. (2019) avaliaram 60 linhagens, em condições de campo, que representam o germoplasma elite, desenvolvido pelo programa de melhoramento de feijão-comum da Embrapa ao longo de 22 anos, para a severidade da Mancha angular e Antracnose. Os autores encontraram um marcador significativo, que está localizada no cromossomo Pv10 e explicou 19% da variação fenotípica para a resistência a mancha angular. Vidigal Filho et al. (2020) identificaram dois SNPs associado à resistência à raça 31-23 de ALS, um no cromossomo Pv02 e outro no Pv04, e outros seis para a raça 63-39, sendo um no Pv03 e no Pv06, e os outros quatro no Pv08 entre a região de 44,5 Mb e 46 Mb.

No trabalho realizado por Almeida et al. (2021) os autores identificaram locos de resistência a mancha angular em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. As populações foram avaliadas quanto à resistência a mancha angular nos estágios V2, V3 em casa de vegetação e R8 em campo. Diferentes QTL foram detectados para os três estágios e ambas as populações, mostrando um perfil quantitativo diferente da doença em diferentes estágios desenvolvimento da planta. Estes resultados mostram o quanto esse caráter é complexo e envolvem muitos genes.

2.5 Marcadores Moleculares

A avaliação de um caráter quantitativo é de difícil mensuração, pois além de envolverem muitos genes, há grande influência ambiental. Uma ferramenta para auxiliar à seleção fenotípica é a utilização de marcadores moleculares de DNA (HANAI et al., 2010). No melhoramento genético é frequente o uso de marcadores moleculares, sendo estes, uma marca localizada no DNA capaz de co-segregar ao alelo de interesse. Além desta característica, os marcadores podem ser usados em estudos de fluxo gênico, estimativa de taxa de cruzamento e parentesco, análise de diversidade genética, identificação de genótipos, construção de mapas genéticos, seleção assistida por marcadores, dentre outros (SANTOS, 2011). O advento das técnicas de biologia molecular culminou no desenvolvimento de várias classes de marcadores. A escolha do melhor marcador dependerá de inúmeros fatores, tais como: objetivo da pesquisa, recursos financeiros e infraestrutura disponível (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Com o advento do sequenciamento de nova geração, e a redução dos custos de genotipagem (POLAND and RIFE, 2012; ZHU et al., 2008) aumentou-se o uso dos marcadores SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de

nucleotídeo único). Os SNPs são fonte abundante de variação ao nível de DNA (HYTEN et al., 2010), consiste em variações pontuais encontradas ao longo do DNA, isto é, são diferenças em um único nucleotídeo (JEHAN; LAKHANPAUL, 2006). Eles são o resultado de mutações que ocorrem ao longo dos ramos da árvore genealógica relacionando as cópias homólogas de um determinado sítio no genoma. Para ser considerado um SNP a variação deve ocorrer em pelo menos 1% da população. Assim, os SNPs também chamados de pontos de mutações (ZHANG; ZHANG, 2005).

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 locos de característica quantitativa (QTL), avaliação de diversidade genética, análise de associação e seleção assistida por marcadores (SOUZA et al., 2012). O uso de SNP's em populações adequadas para mapeamento genético de alta resolução tornam a análise simples e detalhada em relação a distância genética e física entre os locos (RAFALSKI, 2002).

Uma vantagem da utilização do mapeamento por SNPs, é que ensaios automatizados de alto rendimento podem ser projetados para sua detecção uma vez que os SNPs não precisam ser detectados pela medição do comprimento dos fragmentos de DNA (GAITÁN-SOLÍS et al., 2008). Uma das principais aplicações do uso de marcadores SNP's é a na construção de mapas genéticos para a identificação de QTLs associados a características agronômicas, estudos de associação e seleção genômica ampla. Esta técnica de seleção economiza tempo e aumenta a eficiência de identificação de genótipos superiores (DA SILVA, et al., 2018). Nos últimos anos, os marcadores SNPs têm sido cada vez mais desenvolvidos e aplicados na análise genética do feijão-comum (MÜLLER et al., 2015; VALDISSER et al., 2017).

Outra metodologia é a Tecnologia de Matrizes de Diversidade (DArT) DArT Pty Ltd, que foi originalmente desenvolvida para o arroz e é baseada na redução da complexidade do genoma e na detecção de SNP utilizando a enzima *PstI* de corte raro em combinação com uma ou mais enzimas de corte frequente, como a *MseI* (JACCOUD et al., 2001; KILIAN et al., 2012). As amostras digeridas são ligadas a adaptadores específicos aos primers utilizados na etapa de enriquecimento por PCR. O método DArT permite a detecção simultânea de milhares polimorfismos de DNA (dependendo da espécie) decorrentes de alterações em uma única base e pequenas inserções e deleções (InDels) marcando a presença ou ausência de fragmentos de DNA em representações genômicas geradas a partir de amostras de DNA

genômico (SÁNCHEZ-SEVILLA et al., 2015). A tecnologia DArT já foi empregada com sucesso em estudos sobre diversidade genética e mapeamento em várias culturas, como ervilha (YANG et al. 2006), sorgo (MACE et al. 2008), centeio (BOLIBOK-BRĄGOSZEWSKA et al. 2009), cevada (ROY et al. 2010) e trigo (ZHANG et al. 2011). No feijão-comum já foram utilizados marcadores DArT para detectar locos associados ao florescimento (ATES et al., 2018; NADEEM et al., 2021), a absorção de Ca e Mn (ERDOGMUS, et al., 2020), e em estudos de caracterização de genomas (VALDISSER, et al., 2017), e à resistência genética a mancha angular (BRÍÑEZ et al. 2012; OBLESSUC et al. 2013). Atualmente tem-se utilizado a tecnologia DArT-SeqTM que combina o método de redução da complexidade de hibridização do DArT (WENZL et al., 2004) com o sequenciamento de próxima geração e pode ser otimizado para qualquer espécie (CRUZ et al. 2013). O DArTseqTM está rapidamente ganhando popularidade e se tornou o método preferido de genotipagem e seleção genômica ampla. Da mesma forma que o método DArT é baseado em hibridizações, essa tecnologia é otimizada para cada organismo e é aplicado selecionando o método de redução de complexidade mais adequado (SÁNCHEZ-SEVILLA et al., 2015). Portanto, atualmente, a plataforma DArT gera duas variantes de marcadores (marcadores SNP DArTSeq e DailicoDArT). Os marcadores SilicoDArT são dominantes e são principalmente pontuados pela ausência (0) ou presença (1) de um único alelo, enquanto os SNPs DArTSeq são marcadores codominantes (KILIAN et al., 2012).

2.6 Utilização de populações RILs no melhoramento do feijão-comum.

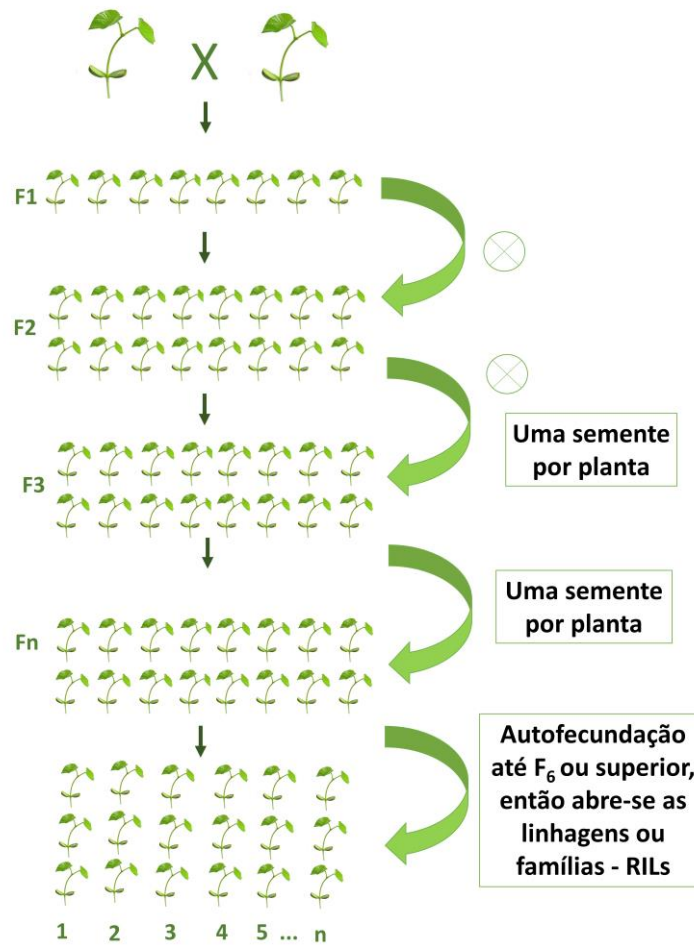
A identificação e posição de genes responsáveis por um caráter de interesse é de grande importância no melhoramento de plantas. Uma estratégia utilizada para esse fim é a realização do mapeamento genético que consiste no processo de detecção da posição e distância entre marcadores nos cromossomos com a finalidade de obter um mapa de ligação. Os mapas de ligação são úteis na identificação de regiões cromossômicas contendo genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que são locos associados a características quantitativas geralmente responsáveis por um caráter de interesse. Para a construção destes mapas, são usadas informações fenotípicas e genotípicas (TAR'AN; MICHAELS; PAULS, 2002).

Diferentes tipos de populações podem ser utilizados para identificação de regiões genômicas responsáveis por determinadas características em feijoeiro. No entanto, as populações RILs (*Recombinant Inbred Lines* ou Linhagens Endogâmicas Recombinantantes), vem sendo usadas como uma ferramenta poderosa para o mapeamento genético (BROMAN,

2005). Dentre as vantagens da utilização de populações RILs, estão a alta variabilidade para detecção de polimorfismo, elevado grau de homozigose que permite a fácil multiplicação, possibilidade de utilização em experimentos com repetições em vários locais, aumentando a acurácia experimental e uma maior resolução no mapeamento. Entre as desvantagens estão o tempo requerido para obtenção da população, de 6 a 8 gerações de autofecundação, além de não permitir a estimação de parâmetros associados a efeitos de dominância dos locos mapeados (BROMAN, 2005; SCHUSTER; CRUZ, 2008). Além disso, para se obter estimativas precisas é necessário levar em conta o tamanho populacional e o número de marcas. Silva et al., (2007) realizam um trabalho de simulação para verificar o melhor tamanho populacional e número de marcas em populações RILs. Os autores verificaram que seriam necessários tamanhos mínimos populacionais de 200, 300 e 500 indivíduos com os níveis de saturação do genoma de 5, 10 e 20 cM, respectivamente.

Para a obtenção das populações RILs é necessário que os genitores sejam contrastantes para o caráter de interesse. A partir da geração F_2 são realizadas sucessivas gerações de autofecundação empregando-se o método SSD (*Single Seed Descent*, ou descendência de uma única semente). Nessa metodologia cada planta F_2 é avançada sucessivamente até a geração F_6 ou superior, utilizando-se uma semente por planta para o avanço das gerações (Figura 1). Cada RIL representa uma planta F_2 , dessa forma, espera-se que toda variabilidade existente na população F_2 esteja representada nas RIL's (SCHUSTER; CRUZ, 2004; POLLARD, 2012).

Figura 1- Metodologia SSD (*Single Seed Descent*) utilizada para a obtenção da população RILs.



Fonte: Do Autor (2022).

Diversos trabalhos utilizando populações RILs já foram realizados na cultura do feijoeiro (BRUN et al., 2010; OBLESSUC et al., 2012, 2015; BASSI et al., 2017; BRIÑEZ et al., 2017). Uma das principais populações de mapeamento do feijoeiro foi derivada de cruzamentos entre as linhagens BAT 93 (Mesoamericana) e Jalo EEP558 (Andina). Essa população foi usada para construção de um mapa genético integrado para o feijão (MIKLAS et al., 2006).

Briñez et al. (2017) realizaram um mapeamento de QTLs para tolerância à seca em uma população RILs derivada do cruzamento das linhagens SEA 5 e AND 277. O mapa foi construído com 331 marcadores que cobriram todos os 11 cromossomos do feijoeiro. Os autores identificaram 22 QTLs relacionados com características associadas à tolerância à seca. Blair et al. (2010) com o uso de marcadores do tipo RAPD e SSR realizaram um mapeamento

a partir de uma população RILs derivada do cruzamento entre as linhagens G14519 e G4825, para identificação de genes responsáveis pelo teor de ferro e zinco nos grãos de feijoeiro. Obléssuc et al. (2012) identificaram vários QTLs responsáveis pela resistência a mancha angular do feijoeiro utilizando uma população de 346 linhagens recombinantes provenientes do cruzamento entre IAC-UNA x CAL 143. Bassi et al. (2017) visando a construção de um mapa genético de locos responsáveis pela resistência a mancha angular e ao oídio no feijoeiro, utilizaram uma população de 105 linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento de AND 277 e SEA 5. Identificando quatro QTLs para a resistência a mancha angular e dois para a resistência ao oídio.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. P. et al. Angular leaf spot resistance loci associated with different plant growth stages in common bean. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- AMARO, G.B.; ABREU, A. de F.B.; RAMALHO, M.A.P. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with carioca-type grains for 22 resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.584-588, 2007
- ARANTES, L. O.; ABREU, Â.F. B.; RAMALHO, M. A. P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 232-237, 2010.
- ATES, D. et al. Association mapping of days to flowering in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by DArT markers. **Molecular Breeding**, v. 38, n. 9, p. 1-14, 2018.
- BALBI, B. P. et al. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 52, p. 56-57, 2009.
- BARBOSA, F. R.; OLIVEIRA GONZAGA, A. C.. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira**. 2012.
- BARILI, L. D. et al. Five decades of black common bean genetic breeding in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 3, p. 259-266, 2016.
- BASSI, D. et al. Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. **Genetics and molecular biology**, v. 40, p. 109-122, 2017.
- BEEBE, S. et al. Common bean breeding in the tropics. **Plant breeding reviews**, v. 36, p. 357-426, 2012.
- BELLUCCI, E. et al. Genomics of Origin, Domestication and Evolution of *Phaseolus vulgaris*. In: **Genomics of Plant Genetic Resources**. Springer Netherlands. p. 483-507, 2014.
- BIANCHINI, A. et. al. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et. al., . **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., 2005
- BLAIR, M. W. et al. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 6, p. 1059-1070, 2010.
- BOLIBOK-BRAÇOSZEWSKA, H. et al. DArT markers for the rye genome-genetic diversity and mapping. **Bmc Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2009.
- BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009.

- BRINÑEZ, B. et al. Mapping QTLs for drought tolerance in a SEA 5 x AND 277 common bean cross with SSRs and SNP markers. **Genetics and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 813-823, 2017.
- BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Collingwood, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1951.
- BROMAN, K. W. The Genomes of Recombinant Inbred Lines. **Genetics Society of America**, v. 1146, n. February, p. 1133–1146, 2005.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus spp.*) –model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- BRUN, H. et al. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. **New Phytologist**, v. 185, n. 1, p. 285-299, 2010.
- BRUNO, A. et al. Variety× environment× management interaction of diseases and yield in selected common bean varieties. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 6, p. 2450-2462, 2017.
- BUSO, G. S. C. et al. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Resources**, v. 6, n. 1, p. 252-254, 2006.
- CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 384 p., 2015.
- CARRER, H.; BARBOSA, A.L.; RAMIRO, D. A., Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.
- CARVALHO, G. A. de et al. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 482-485, 1998.
- CHILAGANE, L. A. et al. Characterization of the common bean host and *Pseudocercospora griseola*, the causative agent of angular leaf spot disease in Tanzania. **African Journal of Plant Science**, v. 10, n. 11, p. 238–245, 2016.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Portal de Informações Agropecuárias: Feijão**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 2 mar. 2022.
- CORRÊA, RONAN X. et al. Inheritance of resistance to the common bean angular leaf spot and identification of molecular markers flanking the resistance locus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 27-32, 2001.
- 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, n. 2, p. 543-556, 2021.
- CROUS, P. W. et al. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1, p. 163-173, 2006.

- CRUZ, V. M. V.; KILIAN, A.; DIERIG, D. A. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the US collection of the new oilseed crop lesquerella and related species. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64062, 2013.
- GUZMÁN, P. et al. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, n. 5, p. 600-607, 1995.
- DA SILVA, L. C. et al. Linkage fine-mapping and QTLs affecting morpho-agronomic traits of a Mesoamerican× Andean RIL common bean population. **Euphytica**, v. 214, n. 12, p. 1-15, 2018.
- DAMASCENO-SILVA, K. J. et al. Variability Among *Pseudocercospora Griseola* Isolates By Anastomosis Among Hyphae. *Bean Improvement Cooperative*, p. 60–61, 2015.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. **Embrapa**, 1998.
- 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.
- ERDOGMUS, S. et al. Genome-wide association studies of Ca and Mn in the seeds of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4536-4546, 2020.
- GAITÁN-SOLÍS, E. et al. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Crop science*, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, 2002.
- GAITÁN-SOLÍS, E. et al. Single nucleotide polymorphisms in common bean: their discovery and genotyping using a multiplex detection system. *The Plant Genome*, v. 1, n. 2, 2008.
- GARCIA, P. A. V.; CARNEIRO, M. S.; SARTORADO, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and rapid diversity. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 49, p. 209-210, 2006.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M C et al. Virulence and genetic diversity of *Pseudocercospora griseola* isolates from Paraná state, Brazil. **Annual Report of The Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 1, n. 59, p.41-42. abr. 2016.
- 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, n. 9, p. 2245-2255, 2013.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Linkage mapping of the Phg-1 and Co-1 4 genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. **Theoretical and applied genetics**, v. 122, n. 5, p. 893-903, 2011.
- HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, 1970.

- HANAI, L. R. et al. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 1, p. 25-45, 2010.
- HYTEN, D. L. et al. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2010.
- ISHIKAWA, F. H., et al. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal biology**, v. 114, n. 1, p. 2-9, 2010.
- ISHIKAWA, F. H.; BARCELOS, Q. L.; COSTA, L. C.; SOUZA, E. A. Investigating variability within race 81 of *Colletotrichum lindemuthianum* strains from Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 55, p. 141–142, 2012.
- JACCOUD, D. et al. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 4, p. e25-e25, 2001.
- JARA, C et al. Virulence diversity of *Pseudocercospora griseola* and its implication for breeding Common bean for resistance to angular leaf spot. In: **International Center for Tropical Agriculture (CIAT)**. Cali, Colombia: poster 1 p, 2015.
- JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP)–Methods and applications in plant genetics: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 435-459, 2006.
- KAMFWA, K.; CICHY, K. A.; KELLY, J. D. Genome-wide association study of agronomic traits in common bean. **The Plant Genome**, v. 8, n. 2, p. plantgenome2014.09.0059, 2015.
- KELLER, B. et al. Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 5, p. 813-826, 2015.
- KILIAN, A. et al. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In: **Data production and analysis in population genomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 67-89.
- LEITICH, R. K. et al. Pathogenic variability of angular leaf spot disease of common bean in Western Kenya. **International Journal of Applied Agricultural Sciences**, v. 2, n. 6, p. 92-98, 2016.
- LEMOS, R. do C. et al. A half century of a bean breeding program in the South and Alto Paranaíba regions of Minas Gerais. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, 2020.
- LIBRELON, S. S. et al. Increasing the efficiency of recurrent selection for angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 60, n. 2, p. 751-758, 2020.
- MACE, E. S. et al. DArT markers: diversity analyses and mapping in *Sorghum bicolor*. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2008.

- MAHUKU, G. S.; IGLESIAS, Á. M.; JARA, C. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. **Euphytica**, v. 167, n. 3, p. 381–396, 2009.
- MAHUKU, G. S. et al. Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. **Molecular Breeding**, v. 28, n. 1, p. 57-71, 2011.
- 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.
- 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.
- MILLER, Tamara et al. Alternative markers linked to the Phg-2 angular leaf spot resistance locus in common bean using the Phaseolus genes marker database. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 26, p. 818-828, 2018.
- MIKLAS, P. N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, n. 1-2, p. 105-131, 2006.
- MODA-CIRINO, V. et al. Mancha-angular. In: PAULA JÚNIOR, T. J. de; WENDLAND, A. (Eds.). Melhoramento Genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Viçosa, MG: **Epamig Suprema**, p. 71-80, 2012.
- MOGHADDAM, S. M. et al. Genome-wide association study identifies candidate loci underlying agronomic traits in a middle american diversity panel of common bean. **The Plant Genome**, Madison, v. 9, n. 3, p. 1–21, Nov. 2016.
- MÜLLER, B. S. F. et al. An operational SNP panel integrated to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean. **Plant molecular biology reporter**, v. 33, n. 6, p. 1697-1711, 2015.
- MÜLLER, B. S. F. et al. Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) towards the development and characterization of long motifs SSRs. **Plant molecular biology**, v. 86, n. 4, p. 455-470, 2014.
- MURUBE, E.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. **PLoS one**, v. 14, n. 2, p. e0212298, 2019.
- MYERS, James R.; KMIECIK, Ken. Common bean: Economic importance and relevance to biological science research. In: The common bean genome. **Springer**, Cham, 2017. p. 1-20.
- NAMAYANJA, A. et al. Inheritance of resistance to angular leaf spot in common bean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection out side the mapping population. **Euphytica**, p. 361–369, 2006.

- NADEEM, M. A. et al. Genetic dissection of days to flowering via genome-wide association studies in Turkish common bean germplasm. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 27, n. 7, p. 1609-1622, 2021.
- NAY, M. M. et al. A review of angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 59, n. 4, p. 1376, 2019
- NELSON, R. et al. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21-33, 2018.
- NIETSCHKE, S. et al. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, Jan. 2002.
- NIETSCHKE, S. et al. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal Of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, v. 148, n. 2, p. 117-121, 2000.
- OBLESSUC, P. R. et al. Common bean reaction to angular leaf spot comprises transcriptional modulation of genes in the ALS10. 1 QTL. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 152, 2015.
- OBLESSUC, P. R. et al. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 10, p. 2451-2465, 2013.
- PÁDUA, P. F. de et al. Efficiency of a recurrent selection method to achieve resistance of common beans to *Pseudocercospora griseola* in a short period. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, p. 15–22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 2, p. 161-171, 1998.
- PAULA JÚNIOR, T. J. de et al. Doenças do Feijoeiro: Estratégias Integradas de Manejo. In: CARNEIRO, J. E; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa, Mg: Editora UFV, Cap. 11. p. 270-299, 2015.
- PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 5044-5053, 2015.
- PEREIRA, R.; ABREU, M. J. ; SOUZA, E. A. Alternative method to assess the reaction of common bean lines to *Pseudocercospora griseola*. **Bean Improvement Cooperative**, v. 54, p. 104–105, 2011.

- PERSEGUINI, Juliana Morini Küpper Cardoso 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.
- POLAND, J. A.; RIFE, Trevor W. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. **The Plant Genome**, v. 5, n. 3, 2012.
- POLLARD, D. A. Design and construction of recombinant inbred lines. In: Quantitative Trait Loci (QTL). **Humana Press**, 2012. p. 31-39.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. dos. Genetic progress after four cycles of recurrent selection for yield and grain traits in common bean. **Euphytica, Wageningen**, v. 144, n. 1, p. 23-29, Feb. 2005.
- REZENDE, B.. et al. Severity Evaluation Methods in Common Bean Recurrent Selection Programme for Resistance to Angular Leaf Spot. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 10, p. 643-649, 2014.
- ROY, J. K. et al. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. **Molecular Breeding**, v. 26, n. 2, p. 243-256, 2010.
- SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F. et al. Diversity arrays technology (DArT) marker platforms for diversity analysis and linkage mapping in a complex crop, the octoploid cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144960, 2015.
- SANGLARD, D. A. et al. Reaction of common bean cultivars and elite lines to isolates of *Pseudocercospora griseola*. **Bean Improvement Cooperative**, v. 52, p. 64–65, 2009.
- SANTOS, J.B. **Marcadores Moleculares**. Lavras: UFLA, 2011. 74p.
- SARTORATO, A. et al. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 637-642, 2000.
- SARTORATO, A. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 78-81, 2002.
- SARTORATO, A.; ALZATE-MARIN, A.L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 235-237, 2004.
- 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.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Universidad Federal de Viçosa, 2008.

SCHWARTZ, H. F.; CORRALES, M. A. P. (Ed.). Bean production problems in the tropics. **CIAT**, 1989.

SILVA, K.J.D. et al. 2008. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology** 156: p. 602-606, 2008.

SILVA, L. da C.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. De. 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.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, 2010.

SOUZA, T. L. P. O et al. Major angular leaf spot resistance loci in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Bean Improvement Cooperative Annual Report**. v. 59, p. XV, 2016.

SOUZA, T. L. P.O et al. Single nucleotide polymorphism discovery in common bean. **Molecular breeding**, v. 30, n. 1, p. 419-428, 2012.

STENGLEIN, S.A.; FERMOSELLE, G.E.; BALLATI, P.A. Pathogenic and molecular studies of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 48, p. 92-93, 2005.

TAR'AN, B.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K. P. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 544-556, 2002.

TOCK, A. J. et al. Genome-wide linkage and association mapping of halo blight resistance in common bean to Race 6 of the globally important bacterial pathogen. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1–17, July 2017.

TRYPHONE, G. M. et al. Genetic characterization of angular leaf spot resistance in selected common bean landraces from Tanzania. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 43, p. 2943-2948, 2015.

VALDISSER, P.A.M.R. et al. SNP discovery in common bean by restriction-associated DNA (RAD) sequencing for genetic diversity and population structure analysis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1277-1291, 2016.

VALENTINI, G. et al. High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 8, p. 1705-1722, 2017.

VELOSO, J. S. et al. Genetic divergence of common bean cultivars. **Genet. Mol. Res**, v. 14, n. 3, p. 11281-11291, 2015.

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, A. F. et al. Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. **Genetics and Molecular Research** 17 (3): gmr18066.,2018.
- WENZL, P. et al. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 26, p. 9915-9920, 2004.
- YU, K. et al. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, v. 91, n. 6, p. 429-434, 2000.
- ZHANG, D.; ZHANG, Z. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) discovery and linkage disequilibrium (LD) in forest trees. **Forestry Studies in China**, v. 7, n. 3, p. 1-14, 2005.
- ZHANG, L. et al. Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers. **BMC genetics**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2011.
- ZHU, C. et al. Status and prospects of association mapping in plants. **The plant genome**, v. 1, n. 1, 2008.
- ZUIDERVEEN, G. H. et al. Genome-wide association study of anthracnose resistance in andean beans (*Phaseolus vulgaris*). **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. 1–17, Jan. 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**IDENTIFICATION OF GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE
TO *PSEUDOCERCOSPORA GRISEOLA* IN COMMON BEAN LINE MAIII-16.159**

**Normas da Revista Theoretical and Applied Genetic
(VERSÃO PRELIMINAR)**

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is widely grown in tropical and subtropical countries, and is an important source of proteins, carbohydrates, fiber, vitamins, and minerals. Angular leaf spot (ALS), caused by the fungus *Pseudocercospora griseola*, is of the most main diseases that affects the crop, leading to yield losses. The best strategy of disease control includes using resistant cultivars. The line MAIII-16.159 obtained from the recurrent selection program for ALS conducted by the Universidade Federal de Lavras in partnership with Embrapa, in Brazil has presented high resistance to *P.griseola* isolates. During the Common Bean Disease Workshop on Angular Leaf Spot and Root Rot, held in Skukuza, South Africa, in 2015, this line was indicated to compose the new international set of differential cultivars for the ALS. Despite the high level of resistance presented by this line, there is no information about its resistance genes. Therefore, it is important not only to identify these genes, but also to mapping the same. The MAIII-16.159 (resistant) line was crossed with the cultivar BRS Horizonte (susceptible) and advanced to the F₇ generation by the SSD method (Single Seed Descent). 184 recombinant lines (RIL's) were obtained. Phenotyping was carried out for ALS resistance in stage V2 and V3 using a isolate of race 63-63 of *P. griseola* and then genotyping using the DArTseq analysis facility (DArT Pty Ltd., Bruce, Australia). There was directional selection and loss of RILs, during advance of inbreeding generations, that is not be possible to carry out mapping. Therefore an association study was performed in this population that has presented high linkage disequilibrium. Two statistically significant associations for angular leaf spot resistance were identified at stage V2 and one at stage V3 (dart3496, dart7825, dart7260). These markers have presented a negative effect, that is, they act to reduce the severity of the ALS, two of which are located on chromosome Pv08 and one on Pv04. The locus found on chromosome Pv08 in V2 validated an earlier study region of the already described *Phg-2* locus. This marker (dart7825) explained about 57% of the phenotypic variation caused by race 63-63. Markers dart3496 (Pv04) and dart7260 (Pv08) explained 53% and 44% of the phenotypic variation in V2 and V3, respectively. Therefore, the MAIII-16.159 line has alleles of greater effect located on chromosomes Pv08 and Pv04, responsible for resistance to *P. griseola* in both V2 and V3 developmental stages of the common bean.

Keywords: Angular leaf spot, *Phaseolus vulgaris*. Plant breeding. Genetic resistance. Association study.

Key message: Association analyses using SNPs and DArT genotyping revealed different loci in common bean genome conferring resistance to race 63-63 of *Pseudocercospora griseola*.

1. Introdução

A mancha angular do feijão-comum é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, sendo considerada uma das doenças mais importantes para a cultura (Nay et al., 2019). As perdas podem chegar até 80% se as condições são favoráveis para o desenvolvimento da mancha angular. Embora o uso de fungicidas seja frequente para o controle de doenças que acometem a cultura, a estratégia de controle mais econômica e sustentável é o uso da resistência genética (Oblessuc et al., 2015). Portanto, importante a identificação de genes responsáveis pela resistência para o uso em programas de melhoramento genético.

Estudos sobre o controle genético da resistência do feijão-comum à mancha angular têm sido realizados em algumas oportunidades, sendo identificada a presença de resistência monogênica e poligênica, esta última considerada o principal tipo de resistência no patossistema *P. griseola*-feijoeiro (Pereira et al., 2015; Oblessuc et al., 2013; Rezende et al., 2014; Librelon et al., 2020). Uma estratégia para a obtenção de linhagens com resistência durável é o uso da seleção recorrente, que visa aumentar a frequência de alelos favoráveis de forma gradual (Nelson et al., 2018). A Universidade Federal de Lavras em parceria com a Embrapa desde 1998 tem desenvolvido um programa de seleção recorrente para a resistência à *P.griseola*. Várias linhagens têm sido obtidas ao longo dos ciclos, com destaque para a linhagem MAIII-16.159 que tem-se apresentado altamente resistente (Amaro et al., 2007; Arantes; Abreu; Ramalho, 2010; Rezende et al., 2014). Durante o Workshop “Angular Leaf Spot and Root Rot”, realizado em Skukuza na África do Sul em 2015, esta linhagem foi indicada para compor o novo conjunto internacional de cultivares diferenciadoras para a mancha angular. Apesar do alto nível de resistência apresentado em vários trabalhos (Pereira; Abreu; Souza, 2011; Pereira et al., 2015; Pádua, et al., 2021), ainda não há informações sobre os genes de resistência presentes nessa linhagem. Portanto, é importante a identificação desses genes

Para a identificação e mapeamento de genes maiores e de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de resistência no feijão-comum tem sido utilizado com sucesso o emprego de

populações RILs (*Recombinant Inbred Lines*) (Oblessuc et al., 2013; Bassi et al., 2017). As populações RILs são constituídas de linhagens endogâmicas obtidas a partir do cruzamento de dois genitores puros e contrastantes para o caráter em questão, sendo realizadas posteriormente, sucessivas gerações de autofecundação pelo método SSD (*Single Seed Descent*) até a geração F₈ ou superior, portanto, obtém-se um elevado grau de homozigose (Broman, 2005). As linhagens obtidas no final do processo apresentam a variabilidade presente na F₂ e também, aquela que está encoberta no heterozigoto e que será disponibilizada nas sucessivas gerações de autofecundação até que a homozigose seja atingida. Dessa forma, o uso dessas linhagens recombinantes possibilita a identificação de marcadores polimórficos e a realização do mapeamento de genes de interesse (Pollard, 2012). RILs são linhas puras, com taxa de homozigose esperada de 99% e, portanto, seu genótipo pode ser replicado em diferentes locais e anos, o que permite a realização de experimentos com maior precisão (Yan et al., 2017) O advento do sequenciamento de nova geração, e a utilização de marcadores SNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único) têm oferecido a oportunidade para a realização de mapeamento fino de vários genes relacionados à resistência à doenças (Hyten et al., 2010). Os marcadores 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 locos de características quantitativas (QTL), avaliação de diversidade genética, análise de associação e seleção assistida por marcadores (Souza et al., 2012). Uma estratégia para a genotipagem é a utilização da metodologia de matrizes de diversidade (DART- Diversity Arrays Technology methodology), que é baseada na redução de complexidade do genoma e detecção de SNP por meio de hibridização de fragmentos de PCR (Jaccoud et al., 2001; Kilian et al., 2012).

Muitos esforços têm sido dispendidos para identificar genes responsáveis pela resistência à mancha angular e desenvolver marcadores moleculares para seleção assistida por marcadores (MAS) (Nay et al. 2019). Estudos de associação têm sido realizados na cultura do feijoeiro para a identificação de regiões genômicas associadas a várias características de interesse, incluindo resistência a doenças (Kamfwa; Cichy; Kelly, 2015; Moghaddam et al., 2016; Perseguini et al., 2016; Tock et al., 2017; Zuiderveen et al., 2016; Almeida et al., 2021).

A vantagem da utilização de mapeamento por associação é que não há necessidade de sintetizar uma população, esta pode ser, por exemplo, um conjunto diverso de indivíduos,

populações, germoplasmas e coleções nucleares (Schmutz et al., 2014). Devido à ocorrência de seleção direcional e perda de RILs durante o avanço das gerações de autofecundação, não foi possível fazer o mapeamento. Contudo, foi realizado um estudo de associação para identificar regiões genômicas responsáveis pela resistência à mancha angular na linhagem MAIII-16.159. O princípio básico para a realização tanto da análise de ligação quanto da análise de associação é a existência do desequilíbrio de ligação (DL), também denominado desequilíbrio gamético, que representa a associação não aleatória entre alelos de diferentes locos em uma população. O uso de uma população estruturada como retrocruzamento, F_2 e RILs (“Recombinant Inbred Lines”), que apresentam alto desequilíbrio de ligação são mais poderosas na identificação de QTLs, em vez de sua localização. Neste caso, a falta de recombinação entre um QTL e um marcador ligado aumenta o poder de detecção (Mackay E Powell, 2007). Portanto, esse tipo de população apresenta menor resolução que análises de associação, onde muitas gerações de recombinação ocorreram entre o marcador e o QTL. Assim, espera-se que somente marcas fortemente ligadas ao QTL permaneçam em desequilíbrio (associadas ao caráter de interesse) (Gupta et al., 2005).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar regiões genômicas associadas a resistência a mancha angular na Linhagem MAIII-16.159, por meio do estudo de associação genômica ampla (GWAS).

2. Material e Métodos

Foram utilizadas duas linhagens MAIII- 16.159 (resistente) e BRS Horizonte (suscetível), de grãos tipo carioca, ou seja, grãos de cor bege com estrias marrons claro, para a realização das hibridações e obtenção da população RILs. A linhagem MAIII- 16.159 é proveniente do programa de seleção recorrente UFLA/EMPRAPA para a resistência à mancha angular (Amaro et al., 2007). A cultivar BRS Horizonte foi desenvolvida pela EMPRAPA e apresenta boa produtividade e qualidade de grãos (Carvalho; Albrecht, 2007). Os experimentos de fenotipagem foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, na casa de vegetação e câmara de nebulização do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras localizados no município de Lavras- MG.

2.1 Multiplicação das sementes das linhagens de feijão-comum utilizadas

Para obter maior pureza genética, as sementes das linhagens MAIII- 16.159 e BRS Horizonte, foram multiplicadas em vasos com capacidade de 10 litros de solo (três plantas

por vaso). As sementes de cada planta foram colhidas individualmente. Após a colheita uma amostra de sementes de cada planta foi utilizada em um teste de patogenicidade nos estádios V2 e V3 conforme descrito no item 2.3 para verificar a pureza das mesmas.

2.2 Identificação de genes resistência da linhagem MAIII -16.159 de feijão-comum

2.2.1 Obtenção da população RILs

Para obtenção da população RILs a linhagem MAIII-16.159 foi cruzada com um genitor suscetível, a cultivar BRS Horizonte. As sementes da linhagem MAIII-16.159 e da cultivar BRS Horizonte foram semeadas em vasos de polietileno contendo solo previamente adubado. Foram utilizados 10 vasos por linhagem e três plantas por vaso. Foram realizados os cruzamentos de todas as plantas da linhagem MAIII-16.159 com todas as plantas da cultivar BRS Horizonte. Os cruzamentos foram realizados com auxílio de uma pinça. As sementes F₁ de cada cruzamento foram colhidas e semeadas na próxima safra para obtenção das sementes F₂. A população F₂ foi composta por 184 plantas e o avanço de gerações foi realizado utilizando o método SSD (*Single Seed Descent*, ou descendência de uma única semente). A variabilidade genética da população F₂ foi mantida semeando-se uma semente de cada planta F₂ por geração, até F₆. A semeadura foi realizada em vasos com 2/3 de solo previamente adubado e 1/3 de substrato, com capacidade de 10 litros de terra (três plantas por vaso). Ao final da obtenção das RILs em F₆, elas foram multiplicadas no campo para a condução dos experimentos, obtendo-se a geração F₇.

2.2.2 Avaliação fenotípica das linhagens RILs

As linhagens RILs e os genitores foram avaliados em casa de vegetação quanto a reação ao isolado da raça 63-63 de *P. griseola*. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação nos estádios V₂ e V₃. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (DBC) com três repetições e cinco plantas por parcela, para a avaliação em ambos os estádios. O teste de patogenicidade foi realizado conforme descrito no item 2.3.

2.3 Teste de patogenicidade

2.3.1 Inoculação e avaliação das RILs no estágio V2

Para o teste de patogenicidade uma amostra de sementes de cada planta foi semeada em bandejas de poliestireno, contendo substrato HA hortaliças®. Após 12 dias do plantio, as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de conídios. A suspensão de conídios foi

obtida a partir de discos de micélio da colônia de um isolado de *P. griseola* da raça 63-63, proveniente da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, que foram replicados para tubos de ensaio contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e mantidos à 24°C na incubadora (B.O.D), por um período de 12 dias, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foi realizada a raspagem do micélio com adição de 5-10 mL de água destilada estéril em cada tubo. A suspensão obtida foi filtrada através de uma camada de gaze. A partir desta suspensão foi realizada a contagem dos conídios, feita em câmara de Neubauer para padronizar a concentração de inóculo para 2×10^4 conídios/mL (PEREIRA et al., 2011). As plântulas com folhas cotiledonares expandidas (estádio V2), foram inoculadas pulverizando-se ambas as faces das folhas com pulverizador até o ponto de escorrimento. Após 15 dias da inoculação foi realizada a avaliação utilizando uma escala com nove graus de severidade proposta por Librelon et al. (2015): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 0,5% de lesões; 3 - presença de até 4% de lesões foliares; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 7% da área foliar; 5 - presença de várias lesões cobrindo 7.1-16% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões cobrindo entre 16.1-26% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões cobrindo entre 26.1- 32% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões que cobrem entre 32.1-38% da área foliar; e 9 - sintomas severos da doença com lesões cobrindo entre 38.1- 60% da área foliar.

2.3.2 Inoculação e avaliação das RILs no estágio V3

Para inoculação e avaliação no estágio V3, as sementes foram semeadas em vasos de 5L contendo 1/3 de substrato e 2/3 de solo, previamente adubado. Foi obtida a suspensão conídios conforme já descrito no item 2.2. No entanto, as plantas foram inoculadas após a expansão completa das folhas trifolioladas (estádio V3), que foram pulverizadas em ambas as faces até o ponto de escorrimento. Após 15 dias da inoculação foi realizada a avaliação das plantas utilizando-se a escala de notas com nove graus de severidade proposta por Van Schoonhoven; Pastor Corrales (1987): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8 - presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da

área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta.

2.4 Extração de DNA

A extração de DNA de todas as linhagens RILs e dos genitores foi realizada usando o Mini Kit da Planta DNeasy (Qiagen, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração do DNA extraído foi aferida utilizando o equipamento Qubit (Thermo Scientific®, Waltham, EUA). A integridade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

2.5 Genotipagem de marcadores SNP e DArT

As amostras de DNA de 184 plantas RILs e os genitores foram enviadas para a empresa Diversity Arrays Technology Pty. Ltd Yarralumia ACT. Canberra, Australia; sendo genotipadas por meio da tecnologia DArT, conforme descrito por Kilian et al. (2012).

2.6 Análise de associação em população sob alto desequilíbrio de ligação

A análise de associação foi realizada em uma população de 184 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), que é caracterizada pelo alto desequilíbrio de ligação (DL).

Para a análise de associação foi utilizado um modelo fixo e aleatório do modelo Circulating Probability Unification - FarmCPU (Liu et al., 2016) no programa GAPIT (Wang et al., 2021). Foi realizada a correção da estrutura da população por PCA (Análise de Componentes Principais) e pela matriz de parentesco. Os gráficos de Manhattan foram gerados para os p-valores por meio do pacote qqman v 0.1.2 (Turner 2014). Todas as análises foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2015).

2.7 Identificação de genes candidatos

A partir da identificação de dos marcadores DArTs e SNPs significativamente associados ($P < 0,05$) à reação de resistência a raça 63-63 de *P. griseola*, foi realizada uma busca por genes candidatos usando-se o Jbrowse Phytozome v13.0 (Goodstein et al., 2012). A anotação funcional para esses genes foi registrada a fim de inferir seu possível papel em conferir resistência à mancha angular.

2.8 Análise de variância e Correlação de Spearman

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para os estádios V2 e V3, e foi estimado o coeficiente de variação experimental (CV) das análises. A normalidade dos resíduos da ANOVA foi testada pelo teste Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965), na ausência de normalidade, os dados foram normalizados pela transformação Box-Cox (Box e Cox, 1964). Os efeitos das diferentes fontes de variação foram considerados significativos pelo teste F quando $p < 0,05$. Foi estimada também a correlação de Spearman entre as linhagens avaliadas no estádio V2 e V3, e a significância pelo teste t de Student.

2.9 Índice de coincidência

As linhagens avaliadas nos estádios V2 e V3 foram classificadas com base em sua capacidade de resistir à infecção por *P. griseola*. Linhagens com notas de severidade da doença entre 1 a 3 foram consideradas resistentes, enquanto linhagens com notas acima de 3 foram classificadas como suscetíveis. O Índice de coincidência (CI) para a relação entre as avaliações em V2 e V3 foi estimado (Libreton et al., 2020).

$$CI = (\text{Número de linhagens coincidentes}^* / \text{Número total de linhagens}) \times 100$$

*onde: número de linhagens coincidentes refere-se às linhagens que apresentaram a mesma reação à doença (resistente ou suscetível) quando avaliadas no estádio V2 e V3.

3. RESULTADOS

3.1 Análise de variância e fenotipagem das linhagens RILs.

O efeito dos genótipos ($p < 0,01$) foi significativo, indicando a presença de variabilidade genética para reação das linhagens RILs a raça 63-63 de *P. griseola* nos dois estádios avaliados. As estimativas dos coeficientes de variação foram de baixa magnitude para as avaliações nos estádios V2 e V3, indicando uma boa precisão experimental.

As 184 RILs avaliadas apresentaram notas médias de severidade 6,7 e 3,9 nos estádios V2 e V3. As notas no estádio V2 foram mais severas, variando de 1 a 8,8. No estádio V3 as notas foram menores variando de 1 a 7,3, o que refletiu nas estimativas de variâncias cujo valor foi menor para o estádio V3 (Tabela 1).

Tabela 1 Estimativas das médias e variâncias e dos coeficientes de variação das notas médias da severidade das 184 RILs avaliadas nos estádios V2 e V3 do feijão-comum inoculadas com a raça 63-63 de *P.griseola*.

Estádios	V2	V3
Média (LI-LS)	6,7 (1,0- 8,8)	3,95 (1,0 -7,3)
Variância	7,53	4,11
CV (%) *	7,5	12,3

*CV: Coeficiente de variação experimental

A distribuição de frequência das notas de severidade das linhagens avaliadas nos estádios V2 e V3 é apresentada na Figura 2. Uma maior distribuição das notas ocorreu no estádio V2 (1-9), ou seja, a doença foi mais severa nesse estádio (Figura 2).

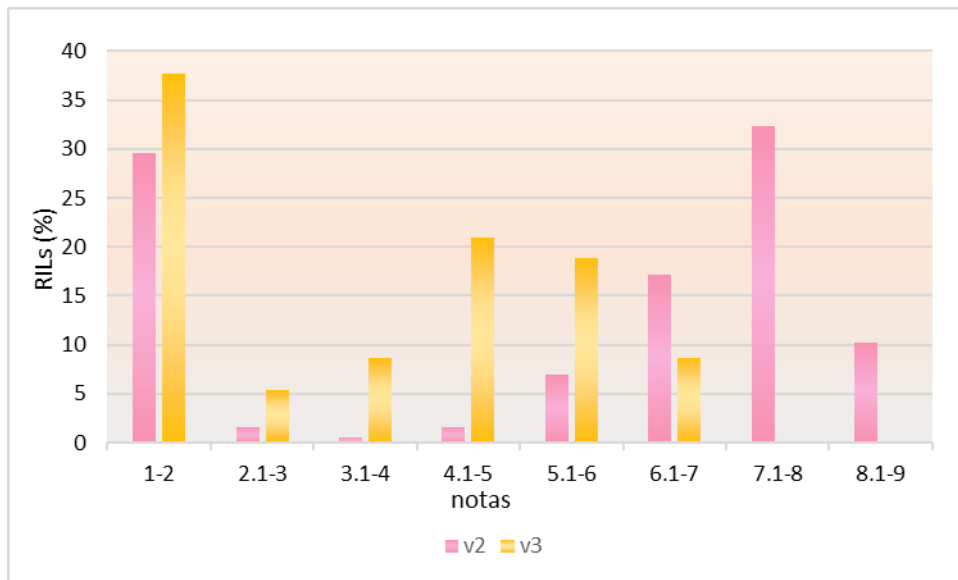


Fig. 2 Distribuição de frequência das notas médias de severidade da mancha angular (1-9) nos estádios V2 e V3 de desenvolvimento do feijão-comum das linhagens RILs obtidas do cruzamento MAIII-16.159 x BRS Horizonte.

Foi observada a correlação significativa ($\rho = 0,77$, $p \leq 2.2e^{-16}$) entre linhagens avaliadas no estádio V2 e V3, pelo teste t de Student.

Quanto à classificação das linhagens nos dois estádios de avaliação, 87% das linhagens apresentaram a mesma classificação, ou seja, foram resistentes ou suscetíveis à *P.griseola* em ambos os estádios. Cerca de 12% das linhagens foram suscetíveis em V2 e resistentes em V3, e 1% suscetíveis em V3 e resistentes em V2 (Figura 3).

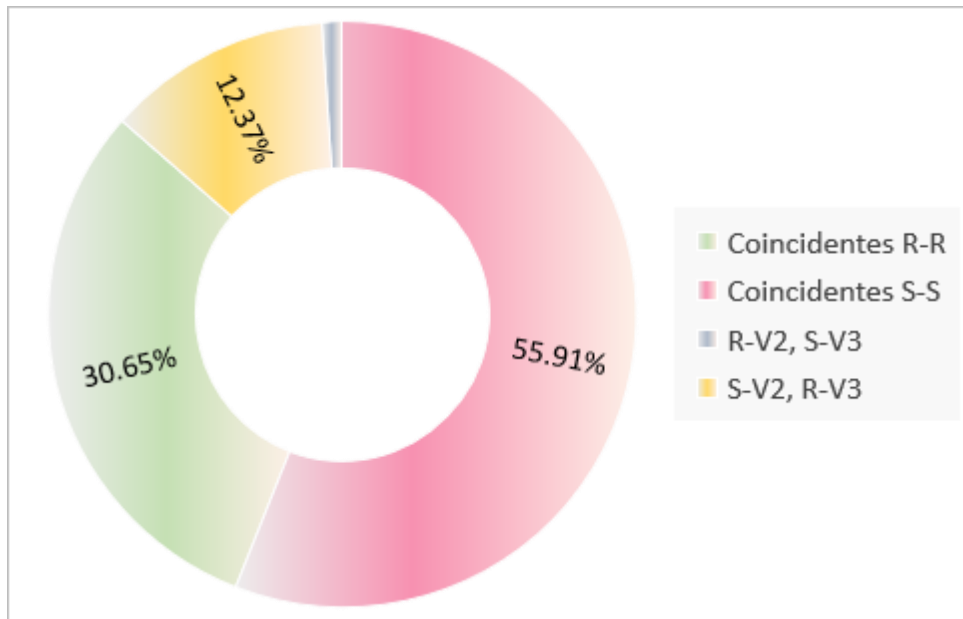


Fig. 3 Porcentagem de coincidência das 184 linhagens RILs avaliadas nos estádios V2 e V3, de acordo com a classificação: resistente (R) e suscetível (S). Coincidentes R-R: linhagens resistentes nos estádios V2 e V3; Coincidentes S-S: linhagens suscetíveis nos estádios V2 e V3; R-V2, S-V3: linhagens resistentes no estádio V2 e suscetíveis no estádio V3; S-V2, R-V3: linhagens suscetíveis no estádio V2 e resistentes no estádio V3.

3.2 Análise do desequilíbrio de ligação

A extensão, o decaimento do DL e a densidade de marcadores podem ser visualizadas na Figura 1. O DL atinge 0.2 em aproximadamente 6 Mb, com 99.75% dos marcadores dentro dessa extensão (Figura 4).

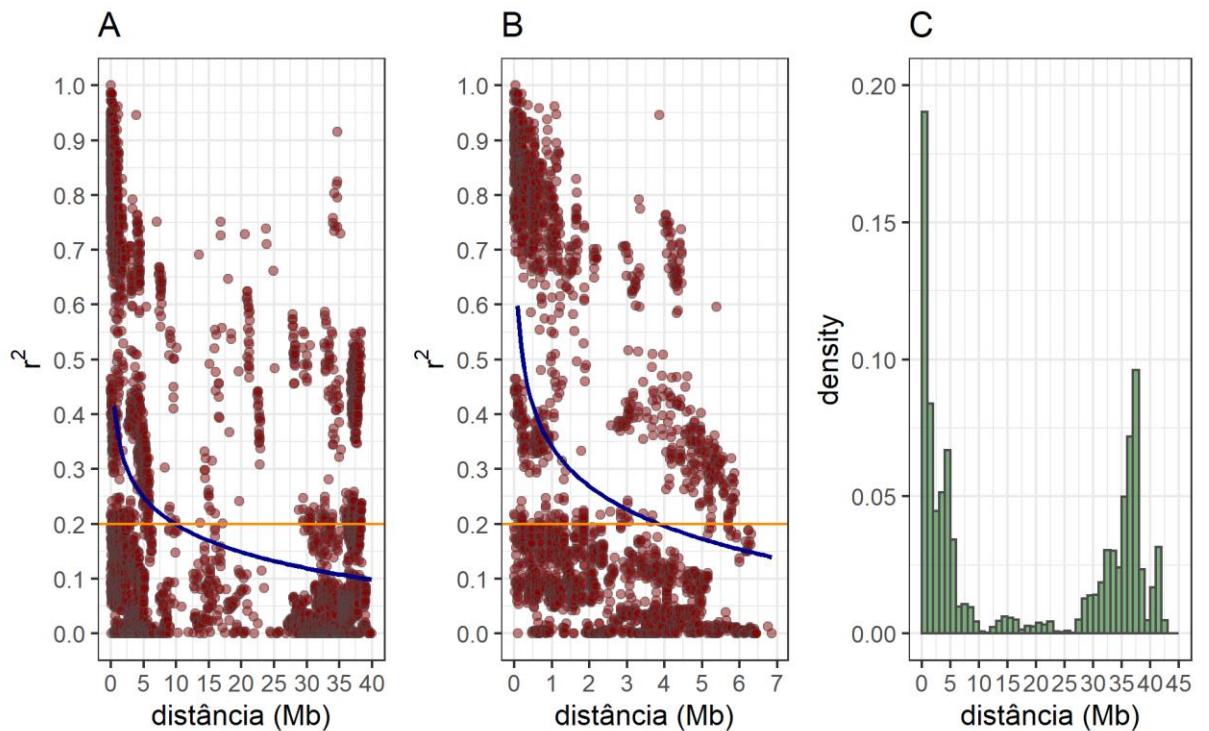


Fig. 4 Cada ponto nos gráficos A e B representa a distância entre dois marcadores. A linha azul representa o decaimento do desequilíbrio de ligação (DL) em todo o genoma (A) e em uma janela de 7 Mb que representa o ponto em que o decaimento do LD atinge o ponto de corte (B). O ponto de corte, $r^2 = 0.2$, está indicado pela linha alaranjada (A e B). C – Representação da densidade de marcadores ao longo da distância.

3.3 Genotipagem de marcadores SNP e DarT

Foram gerados 14.018 marcadores DArTs e 9768 marcadores SNPs. Os 23.786 marcadores SNPs e DArTs foram filtrados retirando-se aqueles com call rate $> 0,90$, aqueles que foram monomórficos nos genitores, bem como para alelos com menor frequência ($MAF > 0,05$). Foram selecionados 3575 marcadores para análise de associação. Destes 941 foram SNPs e 2634 foram sílico Dart (DArT) (Tabela 2). O número médio de marcadores SNPs por cromossomo foi 85, variando de 30 no cromossomo 9 a 139 nos cromossomos 6 e 7. Já para os marcadores DArTs o número médio por cromossomo foi de 239, variando de 97 no cromossomo 5 a 472 no cromossomo 8 (Tabela 3).

Tabela 2- Filtros aplicados nos marcadores SNPs e DArTs

Marcador	SNP	DArT
Total	9768	14018
MAF $> 0,05$	5282	11068
Call Rate > 0.90	2503	316
Monomórficos nos genitores	1042	-
Filtrados Totais	941	2634

Tabela 3 - Distribuição de SNPs-DArT por cromossomos do feijão-comum

Cromossomo	Número de marcadores	
	SNP	DArT
Pv01	88	205
Pv02	125	360
Pv03	69	224
Pv04	37	240
Pv05	48	97
Pv06	139	226
Pv07	139	245
Pv08	131	472
Pv09	30	159
Pv10	95	260
Pv11	40	146
Total	941	2634

3.4 Análise de associação

Dois marcadores significativamente associados (p -valor $< 0,01$) à resistência a raça 63-63 de *P. griseola* foram identificados no estádio V2 e um marcador no estádio V3. Esses marcadores apresentaram efeito negativo, ou seja, atuam na redução da severidade da doença, sendo que dois estão localizados no cromossomo Pv08 e um no Pv04. (Tabela 4, Figura 5). Os resultados foram visualizados por meio dos Manhattan plots e QQ plots (Figura 5).

Tabela 4 Marcadores associados à resistência a raça 63-63 de *P. griseola* nos estádios V2 e V3 de desenvolvimento do feijão-comum pela análise de associação das 184 linhagens RILs e 3575 marcadores SNPs e DArTs.

Estádio	Marcador	Cromossomo	Posição Física (pb)	FDR ¹	MAF*	R ²	Efeito
V2	dart3496	Pv04	900058	7,40E ⁻⁰⁷	0,37	0,53	-1,10749
	dart7825	Pv08	61962995	3,03E ⁻⁰⁶	0,35	0,57	-1,08247
V3	dart7260	Pv08	45857418	1,90E ⁻⁰⁴	0,49	0,44	-1,28181

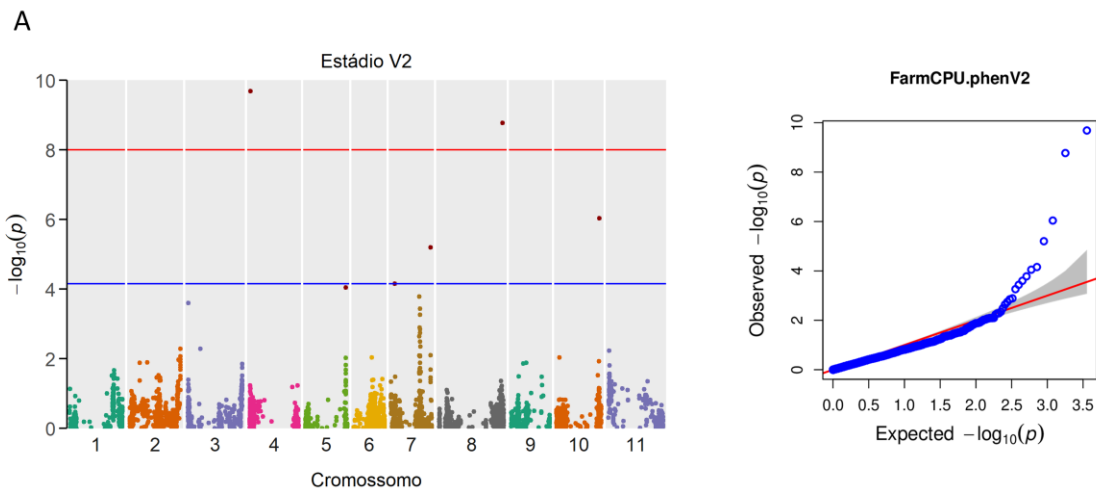
¹FDR: False Discovery Rate

*MAF: Minimum Allele Frequency

Na tabela 5 estão apresentados os marcadores que apresentaram efeito negativo com suas respectivas sequências de nucleotídeos, que poderão ser transformadas posteriormente em marcadores úteis para a identificação de locos responsáveis pela resistência à *P. griseola* em outras linhagens.

Tabela 5 Sequência de nucleotídeos dos marcadores que apresentaram efeito negativo associados à resistência a raça 63-63 de *P.griseola* nos estádios V2 e V3 de desenvolvimento do feijão-comum pela análise de associação das 184 linhagens RILs.

Marcador	Cromossomo	Sequência de Nucleotídeos
dart3496	Pv04	TGCAGCGATAGATACAAGAAAAACCCTACAAAAAAGAATC ATAGCAGCAGAATTGAGCTTACACACCCA
dart7825	Pv08	TGCAGGGCAATATTTTCAGAATCAATTTTCAACCTTGTC AACC TTACTTATTTATCTCTGTCATGGAACA
dart7260	Pv08	TGCAGAATTACAAGTTTGTTCAGATCTTAGCCATACATCATAAA ATATTGTATAATCAAGTTACAGATCG



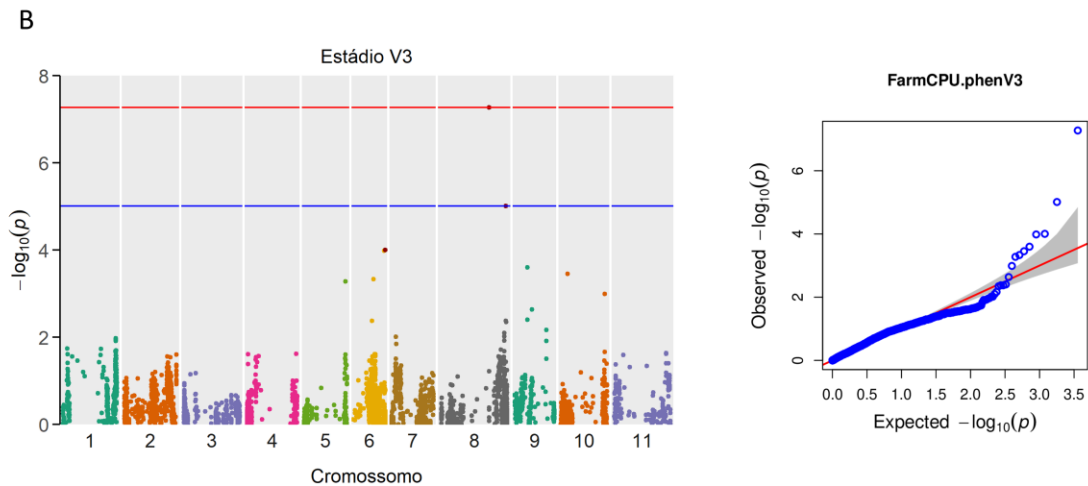


Fig.5 Manhattan-plots e QQ plots para análises de associação usando 184 RILs obtidas do cruzamento MAIII-16.159 x BRS Horizonte genotipadas com 3575 marcadores e avaliadas quanto à reação à *P. griseola* nos estádios V2 (A) e V3 (B). O limite (linha verde) foi definido pelo teste de Bonferroni (cutoff $\alpha = 0,05$) e pelas 1.000 permutações.

3.5 Identificação de genes candidatos para resistência à Mancha angular.

Os marcadores que apresentaram efeito negativo foram localizados dentro e próximos de genes relacionados com a resistência à patógenos do feijão-comum (Valentini et al. 2017; Nay et al.,2019). Os genes anotados baseados na posição física dos marcadores significativos que obtiveram um efeito negativo para o caráter estão descritos na Tabela 6. O marcador dart7825 (Pv08) associado à resistência ao estádio V2 está situado em uma região do genoma que codifica uma proteína de domínio de repetição rica em leucina (LRR).

Tabela 6 Anotação dos genes detectados baseados na posição física dos marcadores significativos que obtiveram um efeito negativo para o caráter.

Estádio	Gene	Marcador	Cromossomo	Anotação do gene
V2	Phvul.004G009461.1	dart3496	Pv04	- Proteína contendo repetições ricas em leucina
	Phvul.008G277226.1	dart7825	Pv08	- Domínio N-terminal de repetição rica em leucina (LRRNT_2)
V3	Phvul.008G142000.1	dart7260	Pv08	- ATPase de transporte de xenobióticos / ATPase de transporte de esteróides

O marcador *dart3496* (Pv04) também está relacionado ao estádio V2 e está aproximadamente a 6,89Kb de uma região que também codifica uma proteína de domínio de repetição rica em leucina (LRR). Já o marcador *dart7260* relacionado ao estádio V3 também no Pv08, está em uma região que codifica a enzima ATPase transportadora de xenobióticos. Esta enzima pertence à família das hidrolases, especificamente aquelas que atuam em anidridos ácidos para catalisar o movimento transmembrana de substâncias. Além disso, é conhecida como uma enzima de resistência a toxinas (Thomas et al., 2000).

O marcador *dart7825* é muito informativo pois está dentro do gene que codifica a proteína do receptor do domínio (LRR) em uma região já conhecida de resistência à mancha angular. Os indivíduos que apresentaram a presença do alelo na genotipagem assim como o parental resistente MAIII-16.159 para o marcador *dart7825* e *dart3496* no estádio V2, apresentaram as notas de severidade mais baixas. Da mesma maneira, os indivíduos que apresentaram ausência do alelo, assim como o genitor suscetível BRS Horizonte apresentaram notas mais altas (Figura 6A e B).

Considerando o marcador significativo *dart7260* no estádio V3, as linhagens apresentaram uma variação maior na amplitude das notas. As linhagens que não apresentaram presença do alelo, assim como o genitor suscetível BRS Horizonte apresentaram notas de severidade da doença mais altas (Figura 6C).

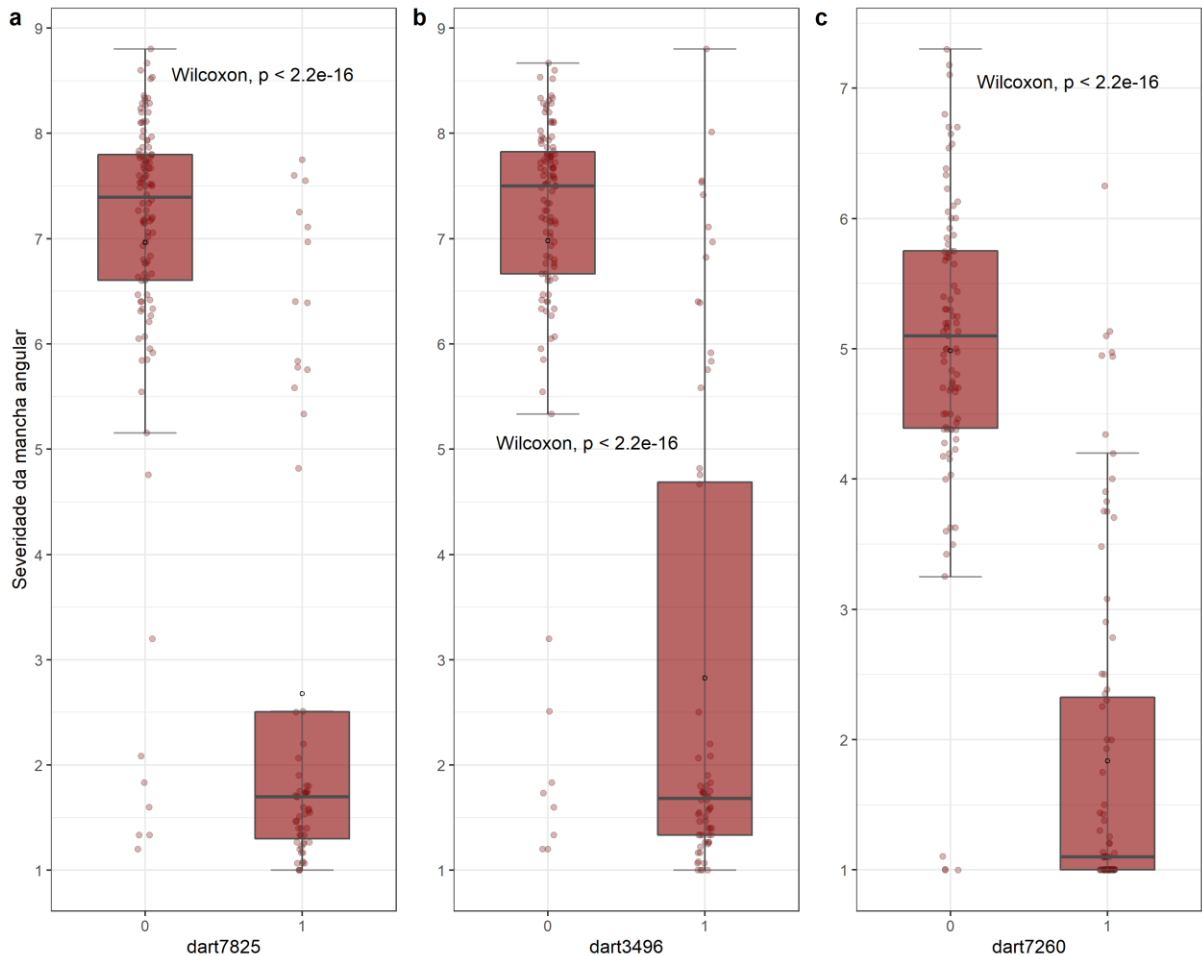


Fig. 6 Boxplot mostrando que as linhagens com a presença do alelo (1) apresentaram as notas de severidade da mancha angular, significativamente, menores comparadas com aquelas que não apresentaram a presença do alelo (0), pelo teste de Wilcoxon ($p = 2,2 \text{ E-}16$); A) Marcador “dart7825” B) Marcador “dart3496” C) Marcador “dart7260”.

4. DISCUSSÃO

O melhoramento visando à resistência a doenças é um desafio devido a natureza genética dos caracteres. O conhecimento sobre os genes que estão envolvidos na interação planta-patógeno é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de resistência durável. Para a identificação de locos associados à resistência a *P.griseola* foi utilizada uma população RILs derivada do cruzamento da linhagem MAIII-16.159 (resistente) com a linhagem BRS Horizonte (suscetível). Foi observada maior severidade da doença no estágio V2, comparada com as do V3 (Tabela 1). As estimativas de CV para os estádios V2 e V3

foram de baixa magnitude, evidenciando a precisão dos dados fenotípicos e confiabilidade nas análises de associação genotípica (Pereira et al., 2019).

As notas altas de severidade observadas nas plantas no estágio V2 para a mancha angular, tem sido relatada por outros autores (Librelon et al. 2015; Almeida et al. 2021). Este resultado favorece a seleção realizada em casa de vegetação, no estágio V2, para os genes responsáveis pela defesa da planta neste estágio. Assim como relatado por Pádua et al. (2021), a maioria das plantas selecionadas no estágio V2 também irão apresentar a resistência no estágio V3 (Figura 3). A avaliação no estágio V2 apresenta algumas vantagens como ser mais prática, com menor custo e mais rápida, podendo ser usada nos estágios iniciais de um programa de melhoramento (Pádua et al., 2021). Como podemos observar (Tabela 1) no estágio V3 a média das notas de severidade foram menores. Este resultado evidencia que outros genes de efeito menor estão se expressando no estágio V3 e contribuindo para o controle da doença. O aumento da resistência no estágio mais avançado sugere o efeito de “resistência de planta adulta” (Costa et al. 2006).

Muitos autores relatam que a herança da resistência à *P.griseola* é quantitativa e muitos locos associados à resistência têm sido identificados (Oblessuc et al., 2012, 2013, 2015; Keller et al., 2015; Perseguiuni et al., 2016; Bassi et al., 2017; Almeida et al., 2021). No trabalho de Pereira et al. (2015) a linhagem MAIII-16.159 apresentou nota de severidade da doença menor que três para alguns isolados da raça 63-63, além disso, as análises genéticas indicaram que além de genes menores, essa linhagem provavelmente também expressa uma resistência genética completa ou vertical, como evidenciado no presente trabalho.

Normalmente, genes de efeito menor retardam a infecção, o crescimento e a reprodução de patógenos e atuam principalmente em plantas adultas, mas não em plântulas (Brun et al., 2010; Costa et al., 2006). Além disso, genes de planta adulta, são parciais e não específicos à uma raça (Burdon, Barrett, Rebetzke, & Thrall, 2014). Provavelmente diferentes genes estão atuando em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas de feijão-comum, como já descrito por vários autores (Arruda, Bueno, Zamprogno, Lavorenti, & Urashima, 2005; Costa et al., 2006; Pereira, et al., 2019; Librelon, et al., 2020). No presente trabalho foram identificados marcadores moleculares significativos em ambos os estágios de desenvolvimento. Pereira et al. (2019) verificou alta correlação entre as notas de severidade da mancha nas plantas avaliadas no estágio V3 e no campo, onde as avaliações são realizadas

na planta adulta, sugerindo que apesar de diferentes genes atuarem em diferentes estádios de desenvolvimento, existem alguns genes que atuam em ambos os estádios.

É oportuno lembrar que a linhagem MAIII-16.159 utilizada como genitor resistente é oriunda do terceiro ciclo do programa de seleção recorrente visando resistência à *P.griseola* realizado na UFLA em parceria com a Embrapa (Amaro et al., 2007; Arantes; Abreu; Ramalho, 2010). Este programa é desenvolvido desde 1998. A população base foi obtida a partir de cruzamentos no esquema dialelo circulante entre sete linhagens de grãos do tipo Carioca e 10 fontes de resistência à mancha angular de diferentes classes comerciais, incluindo cultivares de feijão andino e mesoamericano (AN 512561, AND 277, Ouro Negro, Compuesto Negro Chimaltenango, CAL 143, MAR 2, MAR 1, G5686, MA 4.137, e Jalo) (Arantes; Abreu; Ramalho, 2010). O objetivo desse programa é acumular de forma gradual alelos de resistência à mancha angular de modo a obter resistência durável (Arantes; Abreu; Ramalho, 2010).

Para a mancha angular, já foram identificados cinco locos responsáveis pela resistência no feijão-comum, denominados de *Phg-1* a 5, e confirmados em várias fontes de resistência do feijão-comum (Souza et al., 2016; Nay et al., 2019). Alguns desses locos já foram identificados e mapeados como responsáveis pela resistência à mancha angular em algumas fontes de resistência (AND 277, Ouro Negro, MAR 2 e G5686) utilizadas neste programa de seleção recorrente (Nay et al., 2019).

No presente trabalho foram encontrados sete marcadores estatisticamente significativos associados ao controle genético da resistência à mancha angular. Desses marcadores, dois (dart3496 e dart7825) no Pv04 e Pv08 apresentaram efeito negativo no estádio V2 e um (dart7260) no Pv08 no estádio V3. Portanto, locos responsáveis pela resistência nos estádios V2 e V3 encontram-se no cromossomo Pv08.

O marcador dart7825 está 61.76 Mpb da extremidade cromossomo Pv08. Portanto, localizado no centro de vários marcadores que flanqueiam a região responsável pela resistência à mancha angular no loco *Phg-2*. Há relatos na literatura de vários genótipos de feijão-comum resistentes à *P. griseola* que apresentam o alelo *Phg-2* (Gil et al., 2019; Gomes-Messias et al., 2022). Ao analisar as linhagens que deram origem ao programa de seleção recorrente que originou a linhagem MAIII-16.159, podemos destacar a linhagem MAR 2. Esta linhagem possui um único gene cujo alelo dominante é responsável pela resistência a raça 63-39 de *P. griseola*. (Ferreira et al., 2000), sendo que, trabalhos posteriores mostraram que o

loco *Phg-2* é o responsável pela resistência na MAR 2 (Nay et al., 2019). Este loco provavelmente é o mais forte já identificado associado à resistência a mancha angular. Outros estudos indicam que as cultivares mesoamericanas, incluindo Cornell 49-242, G10474, BAT 332, e G10909 contêm também o alelo *Phg-2* (Nay et al., 2019). Este loco foi identificado primeiramente na cultivar mesoamericana México 54 (Sartorato et al., 2000; Nay et al., 2019) e posteriormente, também foi relatado na cultivar Cornell 49-242 (Caixeta et al., 2005). Outro trabalho mostrou que a resistência à mancha angular nas cultivares México 54 e BAT 332 para a raça 63-39 é controlada por um único gene com o alelo dominante, também no Pv08 (Namayanja et al., 2006). As linhagens G10474 e G10909 também apresentaram um único gene, cujo alelo dominante é responsável resistência à raça 63-63 de *P. griseola* ligados aos marcadores SCAR codominantes PF5 e PF9260 próximos ao loco *Phg-2*, respectivamente (Mahuku, et al., 2004; 2011). Almeida et al. (2021) também identificou no estádio V3 um marcador próximo ao loco *Phg-2*, na posição 59.27 Mpb utilizando a raça 31-31 de *P. griseola*.

O mapa físico desenvolvido usando informações de sequência obtidas de marcadores moleculares ligados ao gene *Phg-2* e aos principais alelos que controlam a resistência à mancha angular em todas essas fontes, mostrou a presença de um único cluster de genes no Pv08 (Schmutz et al., 2014). O loco *Phg-2* é um dos cinco locos de resistência reconhecidos pelo Comitê de Genética BIC (Souza et al., 2016). Este loco está localizado no Pv08, no intervalo entre 61.87 e 62.14 Mpb (Lobaton et al., 2018; Gil et al., 2019). Sendo assim, podemos concluir que as posições físicas conhecidas desses marcadores sugerem que os genes de resistência a mancha angular nessas linhagens e na linhagem MAIII-16.159 são alelos de *Phg-2* da linhagem México 54, ou podem representar diferentes genes dentro de um cluster genético de resistência (Nay et al., 2019). Portanto, existe um importante cluster de genes de resistência na extremidade final do cromossomo Pv8 de feijoeiro (Meziadi et al., 2016; Gil et al., 2019).

Lobaton et al., (2018), identificaram alguns marcadores ligados ao loco *Phg-2*, um exemplo é o marcador *ALSChr08_CT_57798588* que mostrou especificidade superior, marcando no cromossomo 8 não apenas a fonte de resistência G10474, mas também a G4691, podendo ser usado na seleção assistida por marcadores (MAS).

A anotação gênica do marcador *dart7825* revelou que ele está situado na região genômica do gene *Phvul.008G277226* que codifica para uma proteína que contém em sua

estrutura domínios de repetições ricas em Leucina, classe LRR (*Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeats*), Os domínios LRR são considerados receptores imunológicos na detecção de moléculas efetoras produzidas por patógenos e, conseqüentemente, desencadeiam respostas de defesa em plantas (Padmanabhan; Cournoyer; Dinesh-Kumar, 2009) Os domínios LRR controlam várias vias de transdução de sinal que levam à divisão celular, diferenciação celular, resposta imune e patogênica, defesa contra patógenos, simbiose, desenvolvimento de plantas, orientação do tubo polínico e direcionamento do óvulo (Chakraborty et al., 2019) Esses domínios reconhecem efetores de patógenos. A ativação de moléculas responsáveis por esse reconhecimento eleva a expressão do gene de defesa e o acúmulo do fitohormônio ácido salicílico (SA), o que resulta em reprogramação transcricional que mediam as respostas imunes (Ngou et al., 2021). Gil et al. (2019) realizando o mapeamento na região do loco *Phg-2* no Pv08 identificou dois clusters de genes LRR altamente relacionados, sendo os melhores genes candidatos para *Phg-2*. Os autores mapearam uma região de 409 Kpb e identificaram 70 genes sendo que 14 são anotados para abrigar domínios LRR, sendo um desses genes o *Phvul.008G277226* o mesmo identificado no presente trabalho. Os autores também utilizaram o isolado da raça 63-63 de *P. griseola* para a realização dos experimentos (Gil et al., 2019).

No estágio V3 também foram identificados dois marcadores significativos no cromossomo Pv08. O marcador *dart7260* no Pv08 na posição 45,85 Mb, apresentou efeito negativo e explica cerca de 44% da variação. Embora o marcador não esteja tão próximo da região genômica do alelo *Phg-2*, ele explica grande parte da variação fenotípica em V3. Na análise fenotípica, a correlação de Spearman entre V2 e V3 foi de 77% e a coincidência entre resistentes e suscetíveis foi de 87%. Outros trabalhos também identificaram um bom grau de coincidência em diferentes estádios de desenvolvimento do feijoeiro quanto a resistência a mancha angular (Librelon et al., 2015; Pereira et al., 2019; Librelon et al., 2020; Pádua et al., 2022). Almeida et al. (2021) identificaram dois marcadores muito próximos, responsáveis pela resistência em V2 e V3, em Pv01, sugerindo assim o mesmo controle do caráter nos dois estádios.

No estágio V2 o marcador significativo *dart3496*, localizado no cromossomo Pv4, está localizado no loco de resistência à mancha angular denominado *Phg-3* encontrado na cultivar Ouro negro (Nay et al., 2019). Esta cultivar de feijão comum contém os alelos *Co-3⁴* (Valentini et al. 2017) e *Phg-3* que conferem resistência à antracnose e à mancha angular, respectivamente, e estão fortemente ligados no cromossomo Pv04. Gonçalves-Vidigal et al.

(2013) realizaram uma análise de co-segregação que revelou que *Co-3⁴* e *Phg-3* foram herdados juntos, conferindo resistência às raças 7 e 73 de *C. lindemuthianum* e à raça 63-39 de *P. griseola*. A linhagem G10909 além de apresentar marcadores ligados ao loco *Phg-2* no Pv08 também apresentou um marcador (*Pv-gaat001*) ligado ao loco *Phg-3* (Mahuku et al., 2011). Esse loco é responsável por conferir resistência a pelo menos 21 raças de *C. lindemuthianum* e sete raças de *P. griseola*, incluindo a raça altamente virulenta 63-63 (Nay et al., 2019). Alguns estudos são consistentes com a existência de um cluster gênico de resistência na extremidade do cromossomo Pv04 (Gonçalves-Vidigal et al., 2013; Murube et al., 2019). A cultivar Ouro Negro também é uma das cultivares genitoras da linhagem MAIII-16.159. Apesar desse marcador (*dart3496*) ser significativo apenas no estágio V2, ele representa um loco importante para a resistência, uma vez que apenas 1% das linhagens que foram resistentes na avaliação no estágio V2 foram suscetíveis no estágio V3 (Figura 5). Portanto, evidencia-se a importância de se avaliar a resistência expressa em estádios precoces de desenvolvimento do feijoeiro.

No programa de seleção recorrente para resistência à mancha angular a seleção de plantas resistentes sempre foi realizada em campo, onde há uma maior expressão de genes quantitativos (Arantes; Abreu; Ramalho, 2010). Entretanto, na busca pela resistência durável é importante que sejam fixados alelos de genes de resistência à *P. griseola* que se expressem nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, bem como aqueles que se expressam em ambos os estádios. Portanto, sugere-se que a avaliação da severidade da mancha angular seja realizada em ambos os estádios por meio de inoculação artificial do patógeno em casa de vegetação (Libreton et al., 2021). Dessa forma, o ganho genético com a seleção pode ser incrementado por meio da redução por unidade de tempo de cada ciclo de seleção recorrente (Pereira et al., 2019; Libreton et al., 2020; Pádua et al., 2021).

Os alelos responsáveis pela resistência identificados na linhagem MAIII-16.159 evidenciam a importância e o sucesso de um programa de seleção recorrente. A seleção recorrente permite que a cada geração de cruzamento ocorram recombinações e acúmulo de alelos favoráveis que estão em diferentes genitores. Além disso, genes de resistência de plantas estão, em sua grande maioria, em regiões teloméricas e subteloméricas onde são pontos quentes de recombinação intercromossômica (Meziadi et al., 2016). Estratégias de melhoramento que facilitem a recombinação entre os indivíduos ao longo do processo seletivo facilitarão o acúmulo de alelos favoráveis distribuídos em diferentes fontes de resistência a doenças, contribuindo sobremaneira para a resistência durável. Nesse estudo utilizamos o

isolado da raça 63-63 de *P.griseola*, sendo esta raça considerada a mais agressiva e frequente no Brasil (Pereira et al.,2019; Nay et al., 2019). Estudos sobre a herança apresentada pela linhagem MAIII-16.159 à isolados de diferentes raças de *P.griseola* são importantes para trabalhos posteriores.

Neste estudo, elucidamos a herança da resistência à mancha angular na linhagem de feijoeiro MAIII-16.159 e estabelecemos a relação genética entre os alelos de resistência já mapeados para a mancha angular. Os marcadores significativos deste trabalho poderão ser usados no melhoramento de plantas para seleção de linhagens resistentes. Os alelos dos genes de resistência identificados na linhagem MAIII-16.159 não estão normalmente em genótipos de feijoeiro adaptados para o Brasil. A linhagem MAIII-16.159 é uma linhagem adaptada, de grãos tipo carioca, atendendo ao padrão de qualidade comercial exigido pelo mercado consumidor brasileiro e com alto potencial produtivo. Essa linhagem é oriunda de cultivares comerciais que já passaram por um extenso processo de adaptação (Arantes et al., 2010). Portanto, poderá ser usada como fonte de resistência para programas de melhoramento de feijão carioca, bem como para outros grupos comerciais de grãos, como feijão preto e feijão vermelho, por meio de retrocruzamentos ou em programas de seleção recorrente visando a piramidação de genes de resistência à mancha angular com resistência durável contribuindo para uma agricultura sustentável.

5. CONCLUSÃO

A linhagem MAIII-16.159 possui alelos de efeito maior localizados nos cromossomos Pv08 e Pv04, responsáveis pela resistência à *P. griseola* em ambos os estádios V2 e V3 de desenvolvimento do feijão-comum.

REFERÊNCIAS

- Almeida, C. P., de Carvalho Paulino, J. F., Bonfante, G. F. J., Perseguini, J. M. K. C., Santos, I. L., Gonçalves, J. G. R., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2021). Angular leaf spot resistance loci associated with different plant growth stages in common bean. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Almeida, C. P., de Carvalho Paulino, J. F., Bonfante, G. F. J., Perseguini, J. M. K. C., Santos, I. L., Gonçalves, J. G. R., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2021). Angular leaf spot resistance loci associated with different plant growth stages in common bean. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Amaro, G. B., Abreu, Â. D. F. B., Ramalho, M. A. P., & Silva, F. B. (2007). Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3), 584-588.
- Arruda, M. A., Bueno, C. R. N. C., Zamprogno, K. C., Lavorenti, N. A., & Urashima, A. S. (2005). Reação do Trigo à *Magnaporthe grisea* nos Diferentes Estádios de Desenvolvimento. *Fitopatologia Brasileira*, 30(2), 121–126.
- Bassi, D., Briñez, B., Rosa, J. S., Oblessuc, P. R., Almeida, C. P. D., Nucci, S. M., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2017). Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. *Genetics and molecular biology*, 40, 109-122.
- Broman, K. W. (2005). The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics*, 169(2), 1133-1146.
- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M., ... Andrivon, D. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 185(1), 285–299.
- Box, G. E. P., and Cox, D. R. (1964). An Analysis of Transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 26, 211–243.
- Burdon, J. J., Barrett, L. G., Rebetzke, G., & Thrall, P. H. (2014). Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications*, 7(6), 609–624.
- Caixeta, E. T., Borém, A., Alzate-Marin, A. L., Fagundes, S. D. A., Silva, M. G. D. M., de Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2005). Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. *Euphytica*, 145(3), 237-245.
- Carvalho, W. P., & Albrecht, J. C. (2007). BRS Horizonte: nova cultivar de feijoeiro comum com grão do tipo comercial carioca para a região do Distrito Federal. *Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Chakraborty, S., Nguyen, B., Wasti, S. D., & Xu, G. (2019). Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): structure, ligand perception, and activation mechanism. *Molecules*, 24(17), 3081.

- Costa, I. F. D. Da, Balardin, R. S., Medeiros, L. A., Bayer, T. M., Dias, M. D., Pinheiro, V. F., ... Levin, L. (2006). Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. *Ciência Rural*, 36(4), 1684–1688.
- Costa, I. F. D. Da, Balardin, R. S., Medeiros, L. A., Bayer, T. M., Dias, M. D., Pinheiro, V. F., ... Levin, L. (2006). Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. *Ciência Rural*, 36(4), 1684–1688.
- Costa, L. C., Nalin, R. S., Dias, M. A., Ferreira, M. E., Song, Q., Pastor-Corrales, M. A., ... & de Souza, E. A. (2021). Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(2), 543-556.
- Gil, J., Solarte, D., Lobaton, J. D., Mayor, V., Barrera, S., Jara, C., ... & Raatz, B. (2019). Fine-mapping of angular leaf spot resistance gene Phg-2 in common bean and development of molecular breeding tools. *Theoretical and applied genetics*, 132(7), 2003-2016.
- Gomes-Messias, L. M., et al. "Molecular characterization of parental lines and validation of SNP markers for anthracnose and angular leaf spot in common bean." *Euphytica* 218.5 (2022): 1-14.
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Cruz, A. S., Lacanallo, G. F., Vidigal Filho, P. S., Sousa, L. L., Pacheco, C. M. N. A., ... & Pastor-Corrales, M. A. (2013). Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose Co-10 and angular leaf spot Phg-ON disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9), 2245-2255.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1178-D1186.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., & Kulwal, P. L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant molecular biology*, 57(4), 461-485.
- Hyten, D. L., Song, Q., Fickus, E. W., Quigley, C. V., Lim, J. S., Choi, I. Y., ... & Cregan, P. B. (2010). High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics*, 11(1), 1-8.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research*, 29(4), e25-e25.
- Kamfwa, K., Cichy, K. A., & Kelly, J. D. (2015). Genome-wide association study of agronomic traits in common bean. *The Plant Genome*, 8(2), plantgenome2014-09.
- Keller, B., Manzanares, C., Jara, C., Lobaton, J. D., Studer, B., & Raatz, B. (2015). Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 128(5), 813-826.
- Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., ... & Uszynski, G. (2012). Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In *Data production and analysis in population genomics* (pp. 67-89). Humana Press, Totowa, NJ.

- Libreton, S. S., Pádua, P. F. D., Abreu, Â. D. F. B., Ramalho, M. A. P., & Souza, E. A. D. (2020). Increasing the efficiency of recurrent selection for angular leaf spot resistance in common bean. *Crop Science*, 60(2), 751-758.
- Libreton, S. S., Souza, E. A., Pereira, R., Pozza, E. A., & Abreu, A. F. B. (2015). Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 385-395.
- Libreton, S. S., Souza, E. A., Pereira, R., Pozza, E. A., & Abreu, A. F. B. (2015). Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 385-395.
- Liu, X., Huang, M., Fan, B., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2016). Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. *PLoS genetics*, 12(2), e1005767.
- Lobaton, J. D., Miller, T., Gil, J., Ariza, D., de la Hoz, J. F., Soler, A., ... & Raatz, B. (2018). Resequencing of common bean identifies regions of inter-gene pool introgression and provides comprehensive resources for molecular breeding. *The plant genome*, 11(2), 170068.
- Mahuku, G. S., Henríquez, M. A., Montoya, C., Jara, C., Teran, H., & Beebe, S. (2011). Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. *Molecular Breeding*, 28(1), 57-71.
- Mahuku, G. S., Iglesias, Á. M., & Jara, C. (2009). Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. *Euphytica*, 167(3), 381-396.
- Mahuku, G., Montoya, C., Henríquez, M. A., Jara, C., Teran, H., & Beebe, S. (2004). Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science*, 44(5), 1817-1824.
- Meziadi, C., Richard, M. M., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratias, A., ... & Geffroy, V. (2016). Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Science*, 242, 351-357.
- Moghaddam, S. M., Mamidi, S., Osorno, J. M., Lee, R., Brick, M. A., Kelly, J., ... & McClean, P. E. (2016). Genome-wide association study identifies candidate loci underlying agronomic traits in a Middle American diversity panel of common bean.
- Murube, E., Campa, A., & Ferreira, J. J. (2019). Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. *PLoS one*, 14(2), e0212298.
- Namayanja, A., Buruchara, R., Mahuku, G., Rubaihayo, P., Kimani, P., Mayanja, S., & Eyedu, H. (2006). Inheritance of resistance to angular leaf spot in common bean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection outside the mapping population. *Euphytica*, 151(3), 361-369.
- Nay, M. M., Souza, T. L., Raatz, B., Mukankusi, C. M., Gonçalves-Vidigal, M. C., Abreu, A. F., ... & Pastor-Corrales, M. A. (2019). A review of angular leaf spot resistance in common bean. *Crop Science*, 59(4), 1376.

- Nelson, R., Wiesner-Hanks, T., Wissler, R., & Balint-Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), 21-33.
- Ngou, B. P. M., Jones, J. D., & Ding, P. (2021). Plant immune networks. *Trends in plant science*.
- Oblessuc, P. R., Cardoso Perseguini, J. M. K., Baroni, R. M., Chiorato, A. F., Carbonell, S. A. M., Mondego, J. M. C., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2013). Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(10), 2451-2465.
- Oblessuc, P. R., Cardoso Perseguini, J. M. K., Baroni, R. M., Chiorato, A. F., Carbonell, S. A. M., Mondego, J. M. C., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2013). Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(10), 2451-2465.
- Oblessuc, P. R., Matioli, C. C., Chiorato, A. F., Camargo, L. E., Benchimol-Reis, L. L., & Melotto, M. (2015). Common bean reaction to angular leaf spot comprises transcriptional modulation of genes in the ALS10. 1 QTL. *Frontiers in plant science*, 6, 152.
- Oblessuc, P. R., Matioli, C. C., Chiorato, A. F., Camargo, L. E., Benchimol-Reis, L. L., & Melotto, M. (2015). Common bean reaction to angular leaf spot comprises transcriptional modulation of genes in the ALS10. 1 QTL. *Frontiers in plant science*, 6, 152.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., & Dinesh-Kumar, S. P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular microbiology*, 11(2), 191-198.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., & Dinesh-Kumar, S. P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular microbiology*, 11(2), 191-198.
- Pádua, P. F. D., Pereira, R., Abreu, Â. D. F. B., Ramalho, M. A. P., & Souza, E. A. (2021). Efficiency of a recurrent selection method to achieve resistance of common beans to *Pseudocercospora griseola* in a short period. *Ciência e Agrotecnologia*, 45.
- Pereira, R., Abreu, Â. D. F. B., Nalin, R. S., & Souza, E. A. D. (2019). Phenotyping for angular leaf spot severity and its implication in breeding common bean for resistance. *Scientia Agricola*, 76, 415-423.
- Pereira, R., Abreu, M. J., & Souza, E. A. (2011). Alternative method to assess the reaction of common bean lines to *Pseudocercospora griseola*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 54, 104-105.
- Pereira, R., Souza, E. A., Barcelos, Q. L., Abreu, A. D. F. B., & Librelon, S. S. (2015). Strains in Common Bean Genotypes and Implications for Genetic Improvement, 14(2), 5044–5053.
- Pereira, R., Souza, E. A., Barcelos, Q. L., Abreu, A. F. B., & Librelon, S. S. (2015). Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 5044-5053.
- Pereira, R., Souza, E. A., Barcelos, Q. L., Abreu, A. F. B., & Librelon, S. S. (2015). Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and

implications for genetic improvement. *Genetics and molecular research: GMR*, 14(2), 5044-5053.

Perseguini, J. M. K. C., Oblessuc, P. R., Rosa, J. R. B. F., Gomes, K. A., Chiorato, A. F., Carbonell, S. A. M., ... & Benchimol-Reis, L. L. (2016). Genome-wide association studies of anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS One*, 11(3), e0150506.

Pollard, D. A. (2012). Design and construction of recombinant inbred lines. In *Quantitative Trait Loci (QTL)* (pp. 31-39). Humana Press.

R Development Core Team. (2015) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Referências

Rezende, B. A., Abreu, Â. D. F. B., Ramalho, M. A. P., & de Souza, E. A. (2014). Severity evaluation methods in common bean recurrent selection programme for resistance to angular leaf spot. *Journal of Phytopathology*, 162(10), 643-649.

Sartorato, A., Nietsche, S., Everaldo, G., & Maurilio, A. M. (2000). Rapd And Scar Markers Linked To Resistance Gene to Angular Leaf Spot in Common Beans. *Fitopatol. Bras*, 25, 4.

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.

Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., ... & Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, 46(7), 707-713.

Schoonhoven, A. V., & Pastor-Corrales, M. A. (1987). Standard system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia, 56.

Schuster, I., & Cruz, C. D. (2004). Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. In *Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados* (pp. 568-568).

Souza, T. L. P. O., Gonçalves-Vidigal, M. C., Raatz, B., Mukankusi, C. M., & Abreu, A. F. B. (2016). Major angular leaf spot resistance loci in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Ann Rep Bean Improv Coop*, 59, 15-16.

Souza, T. L. P., de Barros, E. G., Bellato, C. M., Hwang, E. Y., Cregan, P. B., & Pastor-Corrales, M. A. (2012). Single nucleotide polymorphism discovery in common bean. *Molecular breeding*, 30(1), 419-428.

Thomas, C., Rajagopal, A., Windsor, B., Dudler, R., Lloyd, A., & Roux, S. J. (2000). A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *The plant cell*, 12(4), 519-533.

Tock, A. J., Fourie, D., Walley, P. G., Holub, E. B., Soler, A., Cichy, K. A., ... & Miklas, P. N. (2017). Genome-wide linkage and association mapping of halo blight resistance in common bean to race 6 of the globally important bacterial pathogen. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1170.

Turner, S. qqman: QQ and manhattan plots for GWAS data. 2014. R package version 0.1, 2.

Valentini, G., Goncalves-Vidigal, M. C., Hurtado-Gonzales, O. P., de Lima Castro, S. A., Cregan, P. B., Song, Q., & Pastor-Corrales, M. A. (2017). High-resolution mapping reveals

linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(8), 1705-1722.

Wang, J. & Zhang, Z. GAPIT Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 19, 1–12 (2021).

Xiao, Q., Bai, X., Zhang, C., & He, Y. (2022). Advanced high-throughput plant phenotyping techniques for genome-wide association studies: A review. *Journal of Advanced Resear*

Yan et al. 2017. Accelerated Generation of Selfed Pure Line Plants for Gene Identification and Crop Breeding. ch, 35, 215-230.

Zuiderveen, G. H., Padder, B. A., Kamfwa, K., Song, Q., & Kelly, J. D. (2016). Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). *PloS one*, 11(6), e0156391.