

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

GISELI VALENTINI

**Estrutura populacional e diversidade genética em acessos de feijão
comum e co-segregação dos genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* da cultivar
Ouro Negro**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO – 2015

GISELI VALENTINI

Estrutura populacional e diversidade genética em acessos de feijão comum e co-segregação dos genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* da cultivar Ouro Negro

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Celeste Gonçalves Vidigal.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO – 2015

Aos meus pais Francisco Valentini e Delci Valentini
Aos meus irmãos Giovani Valentini e Géssica Valentini

Com alegria e carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, pela concessão da capacidade pessoal e intelectual, possibilitou a conquista de mais este ideal.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de doutorado no Brasil e bolsa doutorado Sanduíche.

Ao *Soybean Genomics and Improvement Laboratory* do *United States Department of Agriculture* (USDA), *Agricultural Research Service* (ARS), Beltsville, Maryland, Estados Unidos, pela oportunidade de realizar o doutorado Sanduíche.

À Professora doutora Maria Celeste Gonçalves Vidigal, pelo incentivo, ensinamentos, orientação, disponibilidade constante, pela confiança em mim depositada e pela concessão do uso do Laboratório de Melhoramento do Feijão Comum e de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura.

Ao Professor doutor Pedro Soares Vidigal Filho apoio, colaboração e ensinamentos.

Ao doutor Marcial Antonio Pastor-Corrales, pela orientação durante o Doutorado Sanduíche realizado no USDA-ARS, pelos ensinamentos, incentivo, pela amizade e pelas longas e agradáveis conversas.

Ao doutor Perry Cregan, pela possibilidade da realização das análises de genotipagem com marcadores SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) em seu laboratório *Soybean Genomics and Improvement Laboratory* do USDA-ARS e, acima de tudo, pela amizade.

Ao doutor Qijian Song, pela assistência nas pesquisas realizadas durante o Doutorado Sanduíche no USDA/ARS e, especialmente, pelo desenvolvimento dos *primers* SSR utilizados.

Aos eternos, grandes e verdadeiros amigos Daiana Bampi, Joana Neres da Cruz Baldissera e Marlon Mathias Dacal Coan, pela convivência, amizade e presença constante.

Aos amigos e colegas do Nupagri, os quais me trouxeram alegria e aprendizado, em especial Marilda Pereira Caixeta, Júlio Cesar Ferreira Elias, Vanesca Priscila Rocha, Talita Mayara de Campos Jumes, Lorena Lopes Sousa,

Noimilto Nicolau Mindo, Leonel Domingos Moiana, Vanusa da Silva Ramos Martins, Alex Henrique Tiene Ortiz, Rafael Felipin Azevedo, Giselly Figueiredo Lacanallo, Rodrigo Chimenez Franzon e Maria da Conceição Martiniano de Souza.

Aos queridos amigos do USDA-ARS Rita Walker, Reham Yousseff, Patrick Elia, Edward Fickus e Charles Quigley, pela agradável convivência e auxílio nas pesquisas durante o período de Doutorado Sanduíche.

BIOGRAFIA

GISELI VALENTINI, filha de Francisco Valentini e Delci Valentini, nasceu aos 16 de agosto de 1986, na cidade de Chapecó, estado de Santa Catarina.

Em 1992, iniciou a vida estudantil na Escola Isolada Municipal da Linha Divisora, na cidade de Guatambú, estado de Santa Catarina.

Em 1997, iniciou o ensino fundamental na Escola de Educação Básica Agilberto Zandavalli, na cidade de Guatambú, estado de Santa Catarina.

Em 2001, iniciou o ensino médio na Escola de Educação Básica Leonor Lopes Gonzaga, na cidade de Guatambú, Santa Catarina.

Em fevereiro de 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Comunitária Regional de Chapecó (UNOCHAPECÓ), na cidade de Chapecó, estado de Santa Catarina, obtendo o título de Bacharel em Agronomia em fevereiro de 2009.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Produção Vegetal, no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), na cidade de Lages, Santa Catarina, obtendo o título de Mestre em Produção Vegetal.

Em março de 2011, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá, Paraná.

Durante o período de Agosto de 2013 a dezembro de 2014, como parte do Doutorado Sanduíche, desenvolveu atividades de pesquisa no *Soybean Genomics and Improvement Laboratory* do *United States Department of Agriculture (USDA)*, *Agricultural Research Service (ARS)*, Beltsville, Maryland, Estados Unidos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Panorama mundial e nacional da cultura do feijão comum	4
2.2. Origem e domesticação do feijão comum	5
2.3. <i>Pool</i> gênicos e raças do feijão comum.....	8
2.4. Diversidade genética no feijão comum.....	11
2.5. Conservação de germoplasma de feijão comum em bancos ativos	14
2.6. Caracterização genética do feijão comum mediante o uso de marcadores moleculares	16
2.7. Melhoramento visando resistência a doenças em feijão comum	19
2.8. Ferrugem no feijão comum	21
2.9. Antracnose no feijão comum	24
2.10. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem e antracnose no feijão comum.....	27
2.11. <i>Clusters</i> de genes para resistência a doenças no feijão comum	30
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CHAPTER I	60
Population structure and genetic diversity of common bean in Brazil	60
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUCTION	61
2. MATERIAL AND METHODS	63
2.1. Plant material	63
2.2. Molecular characterization of the accessions.....	66
2.3. Data analysis.....	67
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	69
4. CONCLUSIONS.....	78
5. REFERENCES.....	78
CHAPTER II	86
Genetic linkage of <i>Ur-14</i> rust resistance gene and <i>Co-3⁴/Phg-3</i> anthracnose and angular leaf spot resistance gene cluster in the common bean cultivar Ouro Negro	86
ABSTRACT.....	86
1. INTRODUCTION	87
2. MATERIAL AND METHODS	90
2.1. Plant material	90

2.2. Rust resistance evaluation	90
2.3. Anthracnose resistance evaluation	91
2.4. Single Nucleotide Polymorphism assay	92
2.5. Generating and testing Simple Sequence Repeats markers.....	93
2.6. Mapping of <i>Ur-14</i> and <i>Co-3⁴/Phg-3</i> resistance genes.....	94
3. RESULTS.....	95
4. DISCUSSION	100
5. CONCLUSION	105
6. REFERENCES.....	106
4. CONCLUSÕES GERAIS	114

RESUMO

VALENTINI, Giseli, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2015. **Estrutura populacional e diversidade genética em acessos de feijão comum e co-segregação dos genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* da cultivar Ouro Negro.** Professora orientadora: Maria Celeste Gonçalves Vidigal. Professor conselheiro: Marcial Antonio Pastor-Corrales.

O sucesso de um programa de melhoramento genético de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) depende principalmente do conhecimento do germoplasma existente. Da mesma forma, a caracterização genética de acessos para características como resistência a doenças e a identificação de marcadores moleculares ligados a estes genes auxiliam e aceleram o processo de melhoramento desta cultura. Os objetivos deste trabalho foram: 1) estudar a estrutura populacional e a diversidade genética de acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de feijão comum do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), utilizando marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*); e 2) investigar a associação entre o gene *Ur-14* de resistência à ferrugem e o *cluster Co-3⁴/Phg-3* de resistência à antracnose e mancha angular na cultivar Ouro Negro, por meio de análise de co-segregação, e adicionalmente desenvolver marcadores SSR ligados a estes genes de resistência. Os resultados demonstraram que os acessos de feijão comum do Banco Ativo de Germoplasma do Nupagri, possuem elevada diversidade genética e estrutura de população bem definida, distribuída entre os *pool* gênicos Andino e Mesoamericano. Os acessos foram alocados em cinco grupos distintos. As análises de co-segregação revelaram que o gene *Ur-14* encontra-se ligado ao *Co-3⁴/Phg-3 cluster* e são herdados juntos para resistência e suscetibilidade à ferrugem e antracnose/mancha angular em Ouro Negro. O mapeamento genético envolvendo 18 marcadores SSR revelou que o gene *Ur-14* está ligado, em fase de acoplamento, a uma distância de 0,5 cM do *loci Co-3⁴/Phg-3* no grupo de ligação Pv04. A proximidade dos marcadores SSR e os *loci Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* indica elevado potencial de utilização destes marcadores em seleção assistida em programas de melhoramento do feijão comum para resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha angular.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaseolus vulgaris* L., *Pseudocercospora griseola*, *Simple Sequence Repeats*, *Single Nucleotide Polymorphism*, *Uromyces appendiculatus*.

ABSTRACT

VALENTINI, Giseli, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, march, 2015. **Population structure and genetic diversity of common bean and co-segregation of *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* resistance genes in the Ouro Negro cultivar.** Adviser: Maria Celeste Gonçalves Vidigal. Committee member: Marcial Antonio Pastor-Corrales.

The genetic improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) depends on the information of the available germplasm. Similarly, genetic characterization of disease resistance genes and the identification of molecular markers linked to these genes accelerate the common bean breeding process. The objectives of this research were: 1) to study the population structure and genetic diversity of common bean accessions from the Common Bean Germplasm Bank at Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) using SSR (Simple Sequence Repeats) markers; and 2) to investigate the association between the *Ur-14* rust resistance gene and *Co-3⁴/Phg-3* gene cluster promoting resistance to anthracnose and angular leaf spot in Ouro Negro cultivar using co-segregation analysis and develop SSR markers linked to these resistance genes. The results show that the common bean accessions from the Nupagri Common Bean Germplasm Bank have high genetic diversity and well-defined population structure, distributed between the Andean and Mesoamerican gene pools. The accessions were structured in five distinct subpopulations. Co-segregation analysis revealed that *Ur-14* gene and the *Co-3⁴/Phg-3* gene cluster were inherited together for resistance to rust and anthracnose/angular leaf spot in Ouro Negro. Genetic mapping involving 18 SSR markers revealed that *Ur-14* gene is linked in coupling phase at 0.5 cM from *Co-3⁴/Phg-3* loci in Pv04 linkage group. The proximity of the SSR markers to the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci indicates the potential use of these markers for marker-assisted selection in common bean breeding programs developing resistant cultivars to rust, anthracnose and angular leaf spot.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaseolus vulgaris* L., *Pseudocercospora griseola*, Simple Sequence Repeats, Single Nucleotide Polymorphism, *Uromyces appendiculatus*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais produzidas no mundo e se destaca como a terceira espécie mais importante, depois da soja (*Glycine max* L.) e do amendoim (*Arachis hypogea* L.) (Gepts et al., 2005). Além disso, os grãos e vagens do feijão comum são fontes de proteína, fibra, ferro, carboidratos complexos, minerais e vitaminas para milhões de pessoas em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, sendo considerado um dos alimentos básicos para as populações da América do Sul e Leste e Sul da África (Lin et al., 2008).

O melhoramento genético é apontado como o principal responsável pelo incremento na produtividade das grandes culturas (Phillips, 1993). O aumento da produtividade de grãos do feijão comum devido ao melhoramento genético é de 0,72%, o que reflete um acréscimo de 17,3 kg ha⁻¹ por ano (Faria et al., 2013). No futuro, a contribuição do melhoramento genético necessitará ser ainda maior, para atender a uma população crescente e exigente em qualidade e, principalmente, no que tange à redução dos efeitos ambientais decorrentes do uso de insumos agrícolas e às mudanças climáticas, especialmente aquelas associadas ao aumento da temperatura e à deficiência hídrica (Ramalho et al., 2009). Todas as evidências disponíveis, especialmente o conteúdo de variabilidade genética, indicam que há possibilidade de continuar tendo sucesso nos programas de melhoramento do feijão comum (Raposo et al., 2000).

O acesso à diversidade genética, existente em genótipos cultivados e silvestres de feijão comum, é essencial para a ampliação da base genética e sustentação de um programa de melhoramento (Singh, 2001). Da mesma forma, o conhecimento do processo de domesticação das plantas e da variabilidade existente auxilia o melhoramento genético do feijão comum, em resposta a uma crescente demanda da população, que exige aumento da produtividade e da qualidade do grão (Tang et al., 2010).

A caracterização genética e fenotípica de acessos e cultivares é fundamental para a administração dos bancos de germoplasma, desenvolvimento de coleções de referência, estudos de associação e preservação de genótipos que estão sob ameaça (Blair et al., 2007). Além disso, fornece parâmetros para identificar os genitores com maior capacidade de combinação e maior possibilidade de obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes.

O estudo da diversidade genética, existente em cultivares tradicionais de feijão comum, oriundas de diferentes regiões ecológicas e variados sistemas de cultivo, depende de um trabalho responsável e criterioso de coleta, introdução, manutenção, caracterização e avaliação. A coleção de feijão comum, mantida pelo Banco Ativo de Germoplasma de Feijão Comum no Laboratório Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), da Universidade Estadual de Maringá (UEM) concentra um grupo de cultivares tradicionais e melhoradas advindas de várias regiões do Brasil. As cultivares tradicionais Pitanga, Jalo Vermelho, Jalo Listras Pretas, Corinthiano, Crioulo 159, Amendoim Cavalo e Jalo Pintado 2, por exemplo, foram coletadas junto a pequenos agricultores dos estados do Paraná e de Santa Catarina, e são importantes fontes de resistência à antracnose, uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Gonçalves-Vidigal et al., 2008; 2009; 2012; Coelho et al., 2013; Castro et al., 2014; Frias et al., 2014; Nanami et al., 2014).

As doenças fúngicas antracnose, causadas por *C. lindemuthianum*, ferrugem, causada pelo patógeno *Uromyces appendiculatus* e mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, destacam-se como as mais devastadoras que atacam o feijão comum (Allen et al., 1989), causando perdas econômicas irreparáveis à cultura, quando em condições de clima favorável (Stavelly e Pastor-Corrales, 1989; Pastor-Corrales et al., 1995). O uso de cultivares resistentes é o método mais indicado para controle das três doenças (Miklas et al., 2006).

Vários genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular têm sido identificados e caracterizados em diferentes cultivares de origem Andina e Mesoamericana (Kelly e Vallejo, 2004; Miklas et al., 2006; Rodríguez-Suárez et al., 2007). A cultivar Ouro Negro tem sido extensivamente utilizada no Brasil, em cruzamentos artificiais, com o objetivo de desenvolver cultivares resistentes a doenças, uma vez que Ouro Negro possui genes de resistência à antracnose (*Co-3⁴*), ferrugem (*Ur-14*) e mancha angular (*Phg-3*) (Souza et al., 2011; Gonçalves-Vidigal et al., 2013). De acordo com Gonçalves-Vidigal et al. (2013), os genes *Co-3⁴* e *Phg-3* co-segregam e, são herdados pela descendência como *cluster* (*Co-3⁴/Phg-3*). O *cluster Co-3⁴/Phg-3*, presente em Ouro Negro, está ligado ao marcador g2303, a uma distância de 0,0 cM (Gonçalves-Vidigal et al., 2013) e a uma distância de 7,8 cM do marcador molecular SF10, no cromossomo Pv04. O marcador SF10 está

também ligado ao gene de resistência à ferrugem *Ur-14*, a uma distância de $6,0 \pm 1,3$ cM (Corrêa et al., 2000). Da mesma forma, relatos demonstraram que os genes *Co-3⁴* e *Ur-14* estão ligados e não segregam independentemente (Faleiro et al., 2000a).

Mediante a importância de caracterização da resistência genética em cultivares, o presente trabalho teve como objetivos: 1) Estudar a estrutura populacional e diversidade genética em acessos de feijão comum, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de feijão comum, do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), por meio de marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*); 2) investigar a associação entre os genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* de resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular presentes na cultivar Ouro Negro, e 3) desenvolver marcadores moleculares SSR ligados a estes genes de resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama mundial e nacional da cultura do feijão comum

A dieta de milhões de pessoas de países subdesenvolvidos da África e da América Latina possui quantidades suficientes de carboidratos, provenientes principalmente de culturas como mandioca, milho, arroz e trigo, no entanto, a dieta é pobre em proteínas (Gepts et al., 2005). As fontes de proteínas de origem animal como ovos, leite e carne, muitas vezes possuem custo elevado, e podem ser substituídas por produtos obtidos a partir de plantas leguminosas (Broughton et al., 2003; Gepts et al., 2005). No Brasil, o consumo de grãos de feijão comum varia de 20,8 kg ano⁻¹ na região Nordeste a 18,2 kg ano⁻¹ nas regiões Sul e Sudeste. Na região Leste e Sul da África, o consumo aumenta significativamente, chegando a 66 kg ano⁻¹ em algumas regiões do Quênia, e 40 kg ano⁻¹ em Ruanda e Burundi (Broughton et al., 2003).

Dentre os maiores países produtores de feijão comum no mundo, destacam-se Myanmar, Índia e Brasil. O Brasil é o terceiro maior produtor de feijão comum, com produção na safra 2014/2015 de aproximadamente 3,29 milhões de toneladas do grão (FAO, 2015) e uma área produzida de 3,04 milhões de hectares, segundo a CONAB (2016). O feijão comum é cultivado sob diferentes condições ambientais, em diversos sistemas de cultivo e em quase todas as regiões brasileiras.

Segundo dados da CONAB (2016), o estado do Paraná, localizado na região sul do País, destaca-se no cenário da produção brasileira, respondendo pela maior parte da produção total de feijão comum, com participação de 640,9 mil toneladas, distribuídas em 405,7 mil hectares, com produtividade média de 1.580 kg ha⁻¹ na safra 2014/2015.

A produção de feijão comum no Brasil tem sofrido modificações nas últimas décadas. Na década de 70, grandes áreas de produção de feijão comum no sul do País foram transferidas para a produção de soja e novas áreas no Cerrado e Nordeste brasileiro foram destinadas à produção de feijão comum na década de 80, devido a alterações do solo e melhor manejo agrônomo nas regiões de Cerrado.

Apesar da importância da produção de feijão comum na região central do País, sistemas de cultivo altamente tecnificados representam um terço da produção do País, enquanto o uso da cultura como de subsistência ainda é predominante

(CTSBF, 2010). O cultivo de feijão comum no Brasil é representado pela produção de subsistência e pela produção tecnificada (Blair et al., 2013a). Através do cultivo do feijão comum, pequenos e grandes agricultores participam do sistema de produção das grandes culturas e se beneficiam com o rápido retorno financeiro e baixo investimento necessário para a produção de feijão comum (CTSBF, 2010).

2.2. Origem e domesticação do feijão comum

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das culturas mais antigas do mundo, apresentando diversos métodos de cultivo, alta adaptabilidade ambiental e elevada variabilidade morfológica (Gepts, 1998; Broughton et al., 2003). O gênero *Phaseolus* compreende mais de 100 espécies, entre as quais cinco possuem importância para o consumo humano: feijão comum (*P. vulgaris* L.); feijão Ayocote (*P. coccineus* L.); feijão lima (*P. lunatus* L.); feijão tepari (*P. acutifolius*); e *P. polyanthus* (Debouck, 1999).

A relação entre o genoma de duas espécies pode ser estudada por meio de sintenia, a qual tem sido extensivamente utilizada na cultura do feijão comum. A presença de sintenia entre espécies do gênero *Phaseolus* e outras leguminosas está negativamente correlacionada à distância filogenética, sendo que, os níveis mais elevados de sintenia são observados com o gênero *Vigna* (feijão frade e feijão mungo), seguido da soja e, mais distante, ervilha, alfafa, grão de bico e lentilha (Gepts et al., 2008).

O gênero *Phaseolus* é membro da tribo Phaseoleae, que também inclui o feijão caupi, feijão guandu e soja (Lavin et al., 2005). A tribo Phaseoleae divergiu da tribo IRLC (*Inverted Repeat-Lacking Clade*) há cerca de 55 milhões de anos. Sendo que a tribo IRLC inclui as leguminosas predominantemente de clima temperado, como a ervilha, alfafa, grão de bico e lentilha. Estudos de sintenia entre o feijão comum e a soja revelam que as duas espécies divergiram há 19 milhões de anos (Lavin et al., 2005; Stefanović et al., 2009). Análises moleculares, utilizando marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), revelaram que sequências do genoma do feijão comum e da soja possuem elevado grau de homologia. Baseado no fato de que as sequências sintênicas presentes nas duas culturas possuem uma cópia no genoma do feijão comum e duas cópias no genoma da soja. Há evidências de que a soja passou por um grande processo de duplicação

dos cromossomos, seguido por rearranjos, sugerindo que o feijão comum é a espécie diploide ($2n = 2x = 22$), modelo para a soja (McClellan et al., 2010).

Estudos baseados em isoenzimas (Singh et al., 1991a), proteínas de sementes (Gepts e Bliss, 1986), características morfológicas (Durán et al., 2005) e marcadores de DNA (Blair et al., 2009) comprovam a existência de dois centros de origem geograficamente diferentes para o feijão comum: Mesoamericano e Andino (Gepts et al., 1986). Acredita-se que a diferenciação do feijão comum silvestre para o feijão comum cultivado ocorreu aproximadamente 165.000 anos atrás (Schmutz et al., 2014). O *pool* gênico Mesoamericano inclui genótipos de sementes pequenas, e representa os genótipos oriundos da região Norte do México até a Colômbia. Os genótipos Andinos possuem seu centro de origem distribuído do Sul do Peru ao Noroeste da Argentina, e são caracterizados por genótipos de sementes grandes (Gepts et al., 1986).

O feijão comum silvestre é restrito ao Norte do México e ao Noroeste da Argentina, em altitude variando de 500 a 2.000 metros, e precipitação pluvial de 500 a 1800 milímetros, de acordo com os relatos de Gepts (1998). Segundo o mesmo autor, diferenças foram encontradas em características morfológicas e moleculares entre as populações dos dois extremos destas localizações geográficas, o que levou à conclusão de que a espécie *Phaseolus vulgaris* silvestre era organizada em dois *pool* gênicos diferentes, um Andino e um Mesoamericano.

Posteriormente, estudos com análise de proteínas de sementes de populações silvestres de feijão comum, distribuídas no Norte do Peru e Equador, mostraram que as populações presentes nestas regiões eram diferentes daquelas encontradas nos *pool* gênicos Mesoamericano e Andino (Debouck et al., 1993), pois estas populações possuem padrão de faseolina tipo I, não encontrados em outros grupos (Kami et al., 1995). Tal fato sugeriu que um terceiro *pool* gênico está presente entre os ancestrais silvestres do feijão comum, o que corrobora com os resultados encontrados por Bitocchi et al. (2012). Em outro estudo, Blair et al. (2012), utilizando análise de estrutura genética de genótipos silvestres, identificou cinco populações ou *pool* gênicos, os quais incluem Mesoamericano (México), Guatemaleno, Colombiano, Norte Equatoriano-Peruviano e Andino (Argentina, Bolívia e Sul do Peru).

No entanto, é atribuído ao feijão comum dois centros de origem, um Andino e um Mesoamericano. A existência dos dois maiores conjuntos gênicos cultivados,

Mesoamericano e Andino, proporciona desafios e oportunidades para os melhoristas do feijão comum, pois eventos de recombinação entre genótipos dos dois *pool* gênicos podem promover novas recombinações entre genes, uma vez que o isolamento reprodutivo e a reduzida performance nas progênes podem ser superados (Gepts, et al., 1986; Gepts, et al., 1988).

Por outro lado, verificam-se problemas como o baixo vigor das progênes resultantes do cruzamento entre cultivares Andinas e Mesoamericanas, o que é resultado da interação entre dois genes complementares, o *DL₁* e o *DL₂*, de origem Mesoamericana e Andina, respectivamente (Koinange e Gepts, 1992; Hannah et al., 2000).

A existência de duas populações distintas, geográfica e morfologicamente, levou ao surgimento da questão de onde a domesticação do feijão comum ocorreu (Gepts e Bliss, 1986). Antes da domesticação, o *P. vulgaris* silvestre já havia divergido em dois *pool* gênicos (Gepts, 1998), sugerindo que a existência dos *pool* gênicos do feijão comum cultivado reflete os múltiplos eventos da domesticação independentes (Gepts e Bliss, 1986; Gepts, 1998).

Trabalhos recentes de Bitocchi et al. (2012) sugerem que a origem do feijão comum é Mesoamericana, provavelmente localizado na parte central do México. Baseados em dados de diversidade de nucleotídeos de diferentes genes presentes em acessos silvestres representativos de cada *pool* gênico, foi possível verificar que os genótipos Andinos foram resultado do evento de migração de populações silvestres Mesoamericanas e que o evento da domesticação ocorreu somente depois, separadamente, para cada um dos *pool* gênicos. Além disso, a partir da análise de estrutura de população, houve uma forte indicação da ocorrência de estreitamento da base genética, antes da domesticação, nos Andes.

A domesticação das plantas e animais propiciou modificações em várias características, de modo que as atuais espécies domesticadas são diferenciadas dos antecessores, devido à seleção de características morfológicas e fisiológicas, sendo essas mudanças chamadas de Síndrome da Domesticação (Koinange et al., 1996). Informações precisas de quando ocorreu a domesticação do feijão comum não estão disponíveis, mas provavelmente o evento ocorreu a cerca de cinco a sete mil anos atrás (Broughton et al., 2003).

A distribuição dos genes da síndrome da domesticação para o feijão comum foi concentrada em três regiões genômicas com maior efeito, os quais afetam

fortemente características importantes para determinar a adaptação ao ambiente onde as plantas se desenvolvem, como o hábito de crescimento e fenologia, a dispersão e dormência das sementes, e a dimensão do fruto e da semente (Koinange et al., 1996). Os caracteres foram importantes na fase de domesticação do feijão comum, e continuam a desempenhar papel na aceitação pelo agricultor e pelo consumidor (Gepts et al., 2008).

2.3. *Pool* gênicos e raças do feijão comum

Os dados morfológicos, agrônômicos e moleculares de cultivares latino-americanas, que representam os dois centros de domesticação do feijão comum nas Américas, revelaram que os dois grandes grupos de germoplasma, Mesoamericano e Andino, de feijão comum cultivado, estão subdivididos em raças. Com base em características morfológicas dos genótipos e nos ambientes onde foram encontrados, o feijão comum foi dividido em seis raças, sendo que, três delas correspondem ao *pool* gênico Mesoamericano (raças Durango, Jalisco e Mesoamerica) e três se referem ao *pool* gênico Andino da América do Sul (raça Chile, Nueva Granada e Peru) (Singh et al., 1991b). Contudo, não existe unanimidade entre a comunidade científica quanto a esta classificação, uma vez que as informações consideradas, como o tipo do marcador (morfológico ou molecular), análises estatísticas, e número de indivíduos analisados podem gerar diferentes resultados.

Conforme descrito por Singh et al. (1991b), a raça Mesoamerica inclui genótipos de sementes pequenas ($<25 \text{ g } 100 \text{ sementes}^{-1}$) de todas as cores e hábitos de crescimento. A raça está distribuída pelas regiões das planícies tropicais e altitude intermediária do México, América Central, Colômbia, Venezuela e Brasil.

Os genótipos da raça Durango são predominantemente caracterizados pelo hábito de crescimento indeterminado prostrado tipo III. As sementes possuem frequentemente uma coloração bronzeada, mas também podem ser amarelo, creme, cinza, preto, branco, vermelho ou rosa, com ou sem manchas ou listras. A raça Durango está distribuída por todo o semiárido central e planalto norte do México e no sudoeste dos Estados Unidos (Singh et al., 1991b).

A raça Jalisco inclui genótipos com hábito de crescimento do tipo IV. As plantas apresentam altura superior a três metros no seu habitat natural. As sementes

apresentam tamanho médio, e a forma pode ser redonda, oval, ou ligeiramente alongada e cilíndrica ou em formato de rim. A raça Jalisco tem como habitat natural as montanhas úmidas da região central do México e Guatemala, onde a diversidade máxima é encontrada (Singh et al., 1991b).

Por meio de análises utilizando marcadores moleculares, verificou-se que a subdivisão das raças dentro do *pool* gênico Mesoamericano é mais complexa do que o indicado pelas características morfológicas. Beebe et al. (2000) utilizaram marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e confirmaram a estruturação de raças, e também de sub-raças em genótipos Mesoamericanos. Os resultados apontaram que a raça Mesoamerica era composta por dois grupos, uma oriunda do México e outra da América Central. As raças Jalisco e Durango apresentaram ampla divergência entre elas, e puderam ser rearranjadas, com a presença de subdivisões em cada uma delas. E, finalmente, o diferenciado germoplasma da Guatemala foi considerado uma nova raça. Utilizando marcadores microssatélites, Díaz e Blair (2006) e Blair et al. (2009) avaliaram novamente a estrutura populacional dentro do *pool* gênico Mesoamericano, identificando a presença das raças Mesoamerica, Durango e Jalisco.

O *pool* Andino pode ser estreitamente dividido em três raças, com base em dados morfológicos descritos por Singh et al. (1991b). Segundo os mesmos autores, a raça Nueva Granada representa os genótipos com sementes médias a grandes, de hábitos de crescimento I, II, ou III, e inclui a maioria das cultivares comerciais em uso hoje. A Raça Nueva Granada é o tipo Andino mais cultivado em regiões de média altitude dos Andes e na África, em ambientes de várzea quente do Brasil, México e Caribe, e em clima temperado da América do Norte e também da Europa.

A raça Peru engloba os genótipos Andinos de hábito de crescimento trepador tipo IV. A maioria dos genótipos são adaptadas a ambientes montanhosos acima de 2.000 m, acima do nível do mar. As características morfológicas desta raça incluem vagens alongadas, sementes com formato redondo ou oval que também podem ser alongadas (Singh et al., 1991b).

A raça Chile corresponde aos genótipos típicos do Chile, sendo caracterizada por hábito de crescimento prostrado tipo III, sementes de tamanho médio, arredondado a oval, e normalmente cores pálidas. A raça é distribuída em regiões secas de baixa altitude no Sul dos Andes (Sul do Peru, Bolívia, Chile e Argentina) (Singh et al., 1991b).

Em trabalhos subsequentes, Beebe et al. (2001) apresentaram resultados da diversidade e estrutura populacional em genótipos Andinos silvestres e cultivados utilizando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Baseados em seus resultados, as três raças previamente definidas não se mostraram distinguíveis a nível molecular. Segundo os autores, as raças Nueva Granada, Peru e Chile foram definidas essencialmente pela morfologia e forma de adaptação. Porém, as três raças Andinas possuem uma origem comum, em que, elas podem ser resultado da intensiva seleção de características morfológicas e agronômicas de importância agronômica e nutricional realizadas pelo homem.

Por sua vez, Blair et al. (2007), utilizando marcadores microssatélites, encontraram resultados semelhantes aos obtidos por Singh et al. (1991b). Ressalta-se porém, que a característica hábito de crescimento para caracterizar as raças de feijão comum deve ser utilizada com precaução, uma vez que, os diferentes hábitos de crescimento se mostram misturados nas diferentes raças dentro dos *pool* gênicos Andino e Mesoamericano (Singh et al., 1991b).

A diversidade existente nos tipos de faseolina tem sido especialmente útil para a classificação do feijão comum nos conjuntos gênicos Andino e Mesoamericano (Gepts, 1990). As cultivares de um centro de domesticação possuem um conjunto de tipos de faseolina que não são encontradas em cultivares ou plantas silvestres do outro centro de domesticação (Gepts et al., 1986; Gepts e Bliss, 1986).

Em trabalho utilizando genótipos silvestres e cultivados de feijão comum dos *pool* gênicos Mesoamericano e Andino, Gepts et al. (1986) determinaram um padrão para o tipo de faseolina. Os genótipos silvestres Mesoamericanos apresentaram um padrão de faseolina dos tipos S e M, enquanto os cultivados apresentaram apenas faseolina do tipo S. Já os genótipos silvestres Andinos apresentaram exclusivamente o tipo T de faseolina. A maioria dos genótipos cultivados Andinos apresentaram faseolina do tipo T, porém, alguns exibiram o tipo C, H e A.

Dessa forma, foi possível verificar um padrão de faseolina de acordo com o *pool* gênico e região geográfica. A categoria S predomina entre os genótipos Mesoamericanos, enquanto a categoria T prevalece entre os genótipos Andinos da América do Sul (Gepts et al., 1986).

Pesquisas conduzidas por Gepts e colaboradores (1986), revelaram que há uma associação entre o tamanho da semente e o padrão de faseolina, devido o fato

de que os genótipos com padrões de faseolina do tipo T, C, H e A, têm geralmente maior tamanho de sementes em comparação com as sementes dos genótipos com padrão S de faseolina. E nenhuma diferença significativa de tamanho de sementes foi observada entre as raças com padrões T, C, H e A de faseolina (Gepts et al., 1986).

A associação com patógenos também exhibe divergência com relação às origens Andina e Mesoamericana, em que se verifica que raças de patógenos Andinos geralmente são mais patogênicas em cultivares Andinas e as raças de patógenos Mesoamericanos geralmente são patogênicas para ambas as cultivares de origem Andina e Mesoamericana (Guzmán et al., 1995; Pastor-Corrales, 1996; Sandlin et al., 1999).

Os resultados da diversidade patogênica de 948 isolados de *C. lindemuthianum*, de 13 países da América Latina, também sugerem a existência de dois grupos neste patógeno, um Mesoamericano e um Andino. Conforme Pastor-Corrales (1996) a preferência dos isolados de *C. lindemuthianum* de um grupo pelas cultivares do mesmo grupo, sugere um processo evolutivo separadamente para os *pool* gênicos Mesoamericano e Andino.

Segundo Balardin e Kelly (1998), o fato de o feijão comum ter origem Mesoamericana explica a presença de maior diversidade de fenótipos de virulência na América Central em comparação aos Andinos, uma vez que evidências morfológicas e moleculares demonstram que a diversidade existente nos genótipos Mesoamericanos é maior do que nos genótipos Andinos. As raças de *C. lindemuthianum* Mesoamericanas possuem um espectro mais amplo de virulência, atacando tanto genótipos Mesoamericanos, quanto Andinos, enquanto as raças de *C. lindemuthianum* Andinas atacam apenas genótipos Andinos, demonstrando a maior variabilidade do feijão comum oriundo da América Central.

2.4. Diversidade genética no feijão comum

O feijão comum é uma cultura bicêntrica, onde dois centros de origem foram descritos, o Mesoamericano e o Andino. Com base nos padrões de faseolina e sequências nucleotídicas de cloroplastos de formas domesticadas e silvestres, verifica-se que a maior variação genética ocorre entre genótipos do *pool* gênico Mesoamericano (Gepts e Bliss, 1986; Gepts et al., 1986; Chacón et al., 2005).

A ocorrência de baixos níveis de diversidade genética nos genótipos do *pool* gênico Andino pode ter uma ou várias causas. Segundo Koenig et al. (1990), a principal causa está relacionada ao fato de que a maioria das espécies silvestres do gênero *Phaseolus* está distribuída na América Central, o que leva à hipótese de que a espécie *P. vulgaris* silvestre, presente nos Andes, se deve à ocorrência de eventos de dispersão, deriva genética e seleção para adaptação à novos ambientes, resultando em uma redução de diversidade genética. A segunda causa está relacionada ao tipo de faseolina que pode estar ligado a *loci* que desempenham papel adaptativo do feijão comum nos Andes, como por exemplo, o tamanho da semente.

O habitat do feijão silvestre na América Central é constituído por vegetação secundária, cujos principais componentes são arbustos perenes. Por outro lado, na região dos Andes, a vegetação característica são florestas que se estendem da Venezuela à Argentina. No caso específico da Cordilheira dos Andes a seleção pode ter favorecido aqueles genótipos com um maior conteúdo de reservas nas sementes, tais como proteínas (especialmente faseolina) ou carboidratos. Nesse caso, a faseolina é considerada como um dos principais constituintes da semente, podendo ter influenciado o tamanho das mesmas (Koenig et al., 1990).

Estudos conduzidos utilizando análises de polimorfismo de DNA de cloroplasto em feijão comum contribuiu para o entendimento da organização genética do feijão comum. Os dados apresentados por Chacón et al. (2005) sugerem a presença de efeito fundador da domesticação dos *pool* gênicos Andino e Mesoamericano, em que: um subconjunto de haplótipos de DNA presente em acessos silvestres está presente nos acessos cultivados.

A redução na diversidade genética presente em sequências de DNA de cloroplastos parece ter sido mais forte no *pool* Andino (55%) do que no Mesoamericano (38%). No *pool* Andino, a maioria dos acessos cultivados apresentou o mesmo haplótipo, enquanto quatro haplótipos foram encontrados nos acessos silvestres, sugerindo um evento simples de domesticação.

A divergência genética entre os conjuntos Andino e Mesoamericano tem implicações diretas para o melhoramento genético, porém, o que se verifica é que ainda não foram completamente explorados. Apesar do parcial isolamento reprodutivo, os dois *pool* gênicos ainda pertencem à mesma espécie. Na maioria dos cruzamentos, as progênies obtidas são viáveis e férteis e, portanto, genes podem

ser transferidos entre os dois *pool* gênicos (Gepts, 1998). A domesticação de plantas envolve alterações genéticas, geralmente associadas a mudanças morfológicas, que proporcionam adaptação das plantas ao ambiente de cultivo. Sob esta perspectiva, a domesticação é um processo contínuo, que no presente momento é representada pelo desenvolvimento de cultivares elites em programas de melhoramento (Sonnante et al., 1994; Hyten et al., 2009).

As mudanças em níveis moleculares podem oferecer importantes estimativas da diversidade genética presente em uma espécie. Por meio da impressão digital ou *fingerprinting* de DNA, Sonnante et al. (1994) quantificaram a diversidade genética durante o processo de domesticação do feijão comum, utilizando ancestrais silvestres, linhagens adaptadas e cultivares melhoradas. Os autores concluíram que o processo de evolução foi caracterizado pela redução da diversidade genética nos dois *pool* gênicos, o Mesoamericano e o Andino. Duas importantes fases do processo de domesticação podem ser observadas, a primeira fase se refere à seleção por adaptação dos genótipos cultivados nos centros de origem e, uma segunda fase, pela seleção por adaptação nas áreas não pertencentes aos centros de origem.

Os padrões de faseolina são exemplos de quão estreita pode ter se tornado a variabilidade genética do feijão comum cultivado. Os dados disponíveis revelam alguns tipos de faseolina que estão presentes em acessos silvestres de feijão comum, não são encontradas em acessos cultivados, o que confirma a tendência de redução da diversidade genética nas formas cultivadas de *P. vulgaris* (Gepts e Bliss, 1986; Gepts et al., 1986; Koenig et al., 1990). Da mesma forma, as análises de sequências de nucleotídeos de cloroplastos revelaram que, de 14 diferentes haplótipos identificados em feijões silvestres, cinco ocorrem no feijão domesticado (Chacón et al., 2005).

A diversidade de nucleotídeos permitiu identificar, além da redução na diversidade genética em ambos os conjuntos gênicos, que a redução foi maior no conjunto gênico Andino, em comparação com o Mesoamericano. Possivelmente, este resultado está relacionado a um evento de estreitamento da base genética ocorrido antes da domesticação nos Andes. Acredita-se que o *pool* gênico Andino tenha sido formado a partir de um pequeno número de genótipos oriundos da região da América Central, propiciando uma grande redução da variabilidade genética após a domesticação (Bitocchi et al., 2013).

A redução na variabilidade genética contrasta com a grande diversidade observada para características morfológicas, como tipo de semente e hábito de crescimento. Esta discrepância é oriunda da natureza fenotípica dos caracteres morfológicos, que poderiam estar submetidos ao processo de seleção.

A ampla variabilidade morfológica que caracteriza um *pool* gênico cultivado é resultado da seleção, durante a domesticação, de novas variantes que podem ter aparecido pelo efeito de mutação ou de recombinação (Sonnante et al., 1994). Estudos realizados em progênies derivadas de cruzamento entre cultivares de feijão comum nos Estados Unidos, demonstraram que a maioria das cultivares recomendadas são resultado de cruzamentos entre genótipos pertencentes à mesma classe comercial, o que proporciona uma redução da diversidade genética (McClellan et al., 1993).

O intenso processo de melhoramento tem sido caracterizado por estratégias conservativas de melhoramento designadas para atender a rigorosa preferência do consumidor para tamanho, forma e cor das sementes e, principalmente, resistência às principais doenças que afetam a produção da cultura (Voysest et al., 1994).

A preferência do consumidor pelos genótipos de origem Mesoamericana tem reduzido o número de acessos usados em hibridações e tem limitado a variabilidade genética disponível para programas de melhoramento e de conservação de germoplasma. Portanto, é científica e socialmente importante estudar a diversidade genética presente no germoplasma disponível, em especial, *landraces* ou cultivares crioulas que estão disponíveis em Bancos de Germoplasma ou em seu ambiente de cultivo, junto a agricultores (Maciel et al., 2003).

2.5. Conservação de germoplasma de feijão comum em bancos ativos

Grande parte da variabilidade genética da espécie de feijão comum no mundo tem sido conservada em bancos de germoplasma (Hidalgo, 1991). O armazenamento da variabilidade em grandes coleções é fundamental para o apoio e desenvolvimento dos programas de melhoramento (Mariante et al., 2009). A coleta, a introdução e o intercâmbio de germoplasma, a conservação *ex situ* em câmara com ambiente controlado, a multiplicação, a regeneração e a disponibilização de banco de dados para utilização destas fontes de genes, ampliam as opções de pesquisas nas mais diferentes linhas da ciência agrônoma, possibilitando garantir a

segurança alimentar e a sustentabilidade no agronegócio brasileiro (Mariante et al., 2009; Embrapa, 2013).

Conforme Walter et al. (2005), podem ser enumeradas quatro razões principais para realizar a coleta e manutenção do germoplasma: o germoplasma está em perigo de erosão genética ou mesmo de extinção; a demanda pelo germoplasma é expressa por usuários em nível nacional e mundial; a diversidade que o germoplasma representa está sendo perdida ou é insuficientemente representada nas coleções *ex situ* de germoplasma existentes e o conhecimento sobre o germoplasma deve ser aplicado.

As coleções em Bancos de Germoplasma são mantidas sob duas condições: de curto a longo prazo são mantidas as coleções ativas ou coleções de trabalho, para uso e distribuição imediato; a longo prazo ou coleções base, que tem como objetivo preservar a variabilidade genética para o futuro.

As sementes armazenadas por períodos de tempo curto podem ter no mínimo 80% da germinação inicial, a umidade da semente é mantida entre 11 e 14%, e a temperatura da sala mantida entre 5 e 8°C. Sob estas condições, a viabilidade inicial pode ser mantida por até cinco anos. As sementes em coleções base podem ter no mínimo 90% da germinação inicial e a umidade das sementes é mantida entre 6-8%. A temperatura de armazenamento é de -20°C, e nestas condições a viabilidade das sementes pode ser preservada por até 100 anos (Hidalgo, 1991).

O Brasil possui cerca de 40.000 - 50.000 espécies de plantas vasculares, aquelas que possuem tecido especializado para o transporte de seiva e água, e representam aproximadamente 18% da diversidade de plantas do mundo, considerando que a fauna e flora mundial contemplam cerca de 257.400 espécies. Apesar de o Brasil ter uma grande riqueza em espécies nativas, a maioria das atividades agrícolas são baseadas em espécies exóticas, como por exemplo: a cana-de-açúcar, originária da Nova Guiné; o café da Etiópia; a soja e a laranja, originárias da China; entre outros.

Para atender a demanda por germoplasma exótico, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um sistema de troca de germoplasma que, de 1976 a 2007, incluiu cerca de 500.000 amostras, sendo que 400.000 são originárias de todas as partes do mundo. O sistema alimenta uma rede de 350 Bancos Ativos de Germoplasma (BAG), composta por 212 gêneros e cerca de 670 espécies. Este

sistema fornece suporte para centenas de programas de melhoramento desenvolvidos no Brasil (Mariante et al., 2009).

O Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa de Feijão do CNPAF (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão), desde 1975 introduz e conserva germoplasma de feijão comum cultivado. Esse é o maior Banco de Germoplasma do Brasil, com cerca de 14.350 registros, entre acessos nacionais e do exterior. Dentre estes, 31% é representado por germoplasma tradicional, oriundo de coletas em diversas regiões produtoras do país (Embrapa, 2013).

O Banco Ativo de Germoplasma de Feijão Comum da Universidade Estadual de Maringá (UEM) é mantido pelo Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) e contempla atualmente 214 acessos diferentes. Os acessos são oriundos de várias localidades do país, principalmente dos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso e foram coletados junto a pequenos agricultores de várias localidades. As cultivares tradicionais ou crioulas possuem grande diversidade genética e potencial de adaptação às variadas condições de cultivo brasileiro. Elas constituem fontes de genes de inestimável valor ao melhoramento, por serem fontes alternativas para a melhoria das cultivares comerciais em uso no Brasil (Embrapa, 2013).

2.6. Caracterização genética do feijão comum mediante o uso de marcadores moleculares

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para uma variedade de aplicações, incluindo investigações sobre a relação genética entre indivíduos, mapeamento de gene, construção de mapas de ligação, seleção assistida por marcadores moleculares e estudos de filogenia e genética de populações (Kalia et al., 2011). Os marcadores moleculares correspondem a segmentos específicos de DNA, sendo que estas sequências podem expressar uma proteína ou não (Kalia et al., 2011).

De acordo com os mesmos autores, dentre os marcadores moleculares de segmentos específicos de DNA destacam-se os RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) e os Minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e uma gama de marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os marcadores mais conhecidos são RAPD (*Random Amplified*

Polymorphic DNA), microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Para estudos de diversidade genética no feijão comum, os marcadores isoenzimáticos foram vastamente utilizados para determinar os padrões de faseolina, os quais são altamente variáveis, dependendo das populações analisadas (Gepts e Bliss, 1986; Gepts et al., 1986; Gepts et al., 1988; Koenig et al., 1990). Entre os marcadores baseados em segmentos de DNA, os mais utilizados foram RFLP (Becerra-Velásquez e Gepts, 1994); RAPD (Beebe et al., 2000; Maciel et al., 2001; Durán et al., 2005), AFLP (Beebe et al., 2001; Rosales-Serna et al., 2005) e SSR (Blair et al., 2006; Blair et al., 2009; Kwak e Gepts, 2009; Burle et al., 2010; Blair et al., 2012). Mais recentemente, o uso dos marcadores SNP possibilitou a análise de genótipos de feijão comum com milhares de marcadores dispersos por todos os grupos de ligação (Galeano et al., 2012; Blair et al., 2013b).

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites se destacam como os mais utilizados em estudos de diversidade genética, não somente no feijão comum, mas em várias espécies (Frankham et al., 2008) e isso é devido às suas propriedades, que permitem a eles especificidade, alto polimorfismo, codominância, alta reprodutibilidade e alta cobertura do genoma (Grisi et al., 2007; Collard et al., 2005).

Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são desenvolvidos a partir de sequências do *GenBank* e bibliotecas genômicas, necessitando, por isso, de sequenciamento e conhecimento prévio do genoma (Grisi et al., 2007). Os primeiros microssatélites para o feijão comum baseados em informações do *GenBank* foram desenvolvidos por Yu et al. (2000), resultando em 37 marcadores. Logo após, Blair et al. (2003) desenvolveram uma coleção de 57 marcadores microssatélites.

Os primeiros microssatélites, desenvolvidos através de bibliotecas genômicas enriquecidas, foram obtidos por Gaitán-Solís et al. (2002), resultando em 68 marcadores. Grisi et al. (2007) desenvolveram 61 marcadores microssatélites baseados em informações de biblioteca genômica e marcadores EST (*Expressed Sequence Tag*).

Os níveis de duplicações e a quantidade de sequências repetidas no genoma do feijão comum são geralmente baixas. Experimentos de mapeamento

demonstram que a maioria dos locos são constituídos por cópias simples (Vallejos et al., 1992; Freyre et al., 1998). Adicionalmente, as famílias de genes também tendem a ser pequenas e, tradicionalmente, as grandes famílias de genes estão relacionadas a sequências de genes que codificam proteínas quinases, que proteínas conhecidamente relacionadas à resistência a doenças em plantas (Rivkin et al., 1999; Vallad et al., 2001).

As plantas possuem em seu genoma abundantes regiões microssatélites, distribuídas em regiões codificantes ou não codificantes do DNA nuclear, bem como no DNA de mitocôndrias e cloroplastos. As variações no número de unidades repetidas proporcionam polimorfismo aos marcadores microssatélites e são resultado da variação no número de unidades repetidas, causados pelo *slippage* durante a replicação do DNA ou crossing-over desigual durante a meiose (Kalia et al., 2011).

O polimorfismo encontrado nos marcadores microssatélites gênicos (codificantes de proteínas) e marcadores genômicos (não codificantes de proteínas) são diferentes. O polimorfismo encontrado nas regiões genômicas, que se refere às sequências de genes não expressos, é maior, quando comparado ao polimorfismo encontrado em marcadores SSR gênicos, que se referem às sequências de genes expressos do genoma (Blair et al., 2003; Burle et al., 2010).

Na atualidade, estudos de diversidade genética e estrutura de populações vêm adotando metodologias baseadas em modelos probabilísticos, principalmente os baseados nas pesquisas de agrupamento Bayesiano, tais como os desenvolvidos por Pritchard et al. (2000). O método pode ser aplicado a vários tipos de marcadores, por exemplo, microssatélites, RFLP e SNP, desde que se assuma que os marcadores encontram-se não ligados e em equilíbrio de ligação.

Nessas análises são descritos modelos baseados em métodos de agrupamento, utilizando dados multilocos para inferir na estrutura de populações e atribuir indivíduos às populações. Assume-se a existência de K populações (onde K pode ser um número desconhecido), em que cada grupo é caracterizado por um conjunto de frequências de alelos em cada loco.

Utilizando frequências alélicas estimadas, é possível computar a verossimilhança de um dado genótipo em cada população. Posteriormente, os indivíduos desconhecidos podem ser atribuídos às populações de acordo com sua verossimilhança (Pritchard et al., 2000).

2.7. Melhoramento visando resistência a doenças em feijão comum

O desenvolvimento de cultivares com maior resistência a estresses biótico e abiótico é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de feijão comum em todo o mundo. O uso de cultivares com resistência a patógenos pode reduzir a dependência de pesticidas, evitar o risco de perdas de rendimento, devido às pragas e doenças, e permitir uma produção mais estável (Miklas et al., 2006). Vários estudos têm demonstrado que a base genética em cultivares de feijão comum melhoradas é estreita (Sonnante et al., 1994), devido ao fato de que um pequeno número de feijão comum silvestre foi domesticado (Gepts et al., 1986), suportando as evidências de que uma grande redução na variabilidade genética ocorreu durante a domesticação (Koenig et al., 1990). Resistência a doenças, tais como cretamento bacteriano comum e mofo branco são escassas na maioria das cultivares comerciais. Desta forma, são necessárias novas fontes de resistência, a fim de ampliar a base genética do feijão comum e desenvolver cultivares com resistência ampla e duradoura (Singh, 1999).

A disponibilidade de fontes de resistência é um dos pontos mais importantes do processo de melhoramento do feijão comum. As *landraces* ou cultivares crioulas e acessos silvestres de feijão comum são fontes de resistência que vêm sendo utilizadas nos programas de melhoramento do feijão comum, porém, a proporção do germoplasma que tem sido explorado ainda é muito pequena.

Fontes de resistência, com amplo espectro de resistência à ferrugem no feijão comum, têm sido encontradas em acessos silvestres. A cultivar silvestre mesoamericana PI 181996 (*Ur-11*), é uma das fontes de resistência à ferrugem mais utilizada no mundo. PI 181996, originário da Guatemala, é resistente a todas as raças de *U. appendiculatus* mantidas na coleção do USDA-ARS em Beltsville, MD, porém, é suscetível à raça 108 do patógeno causador da ferrugem (Stavely, 1990).

Novos genes de resistência à ferrugem também foram descobertos nas cultivares silvestres PI 260418 e PI 310762. Os genes de resistência à ferrugem, nestas duas cultivares, propiciam resistência a todas as raças de *U. appendiculatus* mantidas na coleção do USDA-ARS, incluindo a 108, que quebra a resistência do gene *Ur-11* no PI 181996. Porém, a resistência em PI 260418 e PI 310762 é quebrada pela raça 84 e 85, respectivamente (Pastor-Corrales, 2005; Pastor-Corrales et al., 2012).

Várias estratégias de melhoramento estão sendo utilizadas para incorporar resistência a uma série de patógenos que atacam a cultura do feijão comum. Entre elas, a piramidação de genes consiste na combinação ou introdução de diferentes alelos de resistência em uma única cultivar, e tem sido adotada para aumentar a durabilidade e o espectro de resistência a doenças em várias culturas (Young e Kelly, 1996a).

A piramidação de diferentes genes é o meio mais eficiente para assegurar uma resistência duradoura para um ou vários patógenos que possuem alta diversidade genética. Os fungos *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum* causadores das doenças ferrugem e antracnose no feijão comum, respectivamente, possuem alta diversidade genética, distribuída entre as diversas raças (Pastor-Corrales e Tu, 1989; Stavely et al., 1994). A piramidação de genes de resistência na mesma cultivar proporcionará um espectro de resistência bastante amplo para várias raças do mesmo patógeno.

A cultivar PI 181996 (*Ur-11*) possui amplo espectro de resistência, porém, ela é suscetível à raça 108 de *U. appendiculatus*, enquanto as cultivares Aurora (*Ur-3*) e Early Gallatin (*Ur-4*) são resistentes a várias raças do patógeno causador da ferrugem, incluindo a raça 108. Dessa forma, a piramidação dos genes *Ur-11* e *Ur-3* ou *Ur-11* e *Ur-4* proporcionará total proteção para uma cultivar, contra todas as raças Andinas e Mesoamericanas de *U. appendiculatus* no mundo.

A detecção de genes de resistência em uma mesma cultivar muitas vezes se torna difícil, especialmente em condições em que interações epistáticas estão envolvidas. Alternativamente, uma ferramenta importante que tem sido adotada para auxiliar no processo de piramidação de genes de resistência, é o uso de marcadores moleculares, monitorando a introgressão dos alelos de resistência, bem como, auxiliando no entendimento das interações epistáticas entre as fontes de resistência (Kelly et al., 2003).

O uso de marcadores moleculares tem aumentado gradualmente. Um progresso substancial foi feito em reprodução e resistência com herança simples. No entanto, a melhoria da resistência à mancha-bacteriana marrom, ferrugem do halo, podridão da raiz e mela, tem sido lenta e localizada. Além disso, as cultivares com altos níveis de resistência a uma ou mais doenças hereditárias, quantitativamente, (por exemplo, crestamento bacteriano comum e mofo branco) são raras. Estratégias simultâneas e integradas para melhoria de características herdadas, qualitativa e

quantitativamente, são de extrema importância para o melhoramento genético do feijão comum (Singh e Schwartz, 2010).

2.8. Ferrugem no feijão comum

A ferrugem do feijão comum é causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. Esta doença possui distribuição mundial e causa sérios danos na produção de feijão comum, principalmente em regiões tropicais e subtropicais úmidas (Stavely e Pastor-Corrales, 1989). O fungo *U. appendiculatus* possui alta diversidade de virulência, distribuída entre diversas raças no mundo (Pastor-Corrales, 2001).

As raças de *U. appendiculatus* são determinadas, utilizando um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras, propostas por Steadman et al. (2002) (Quadro 1). O conjunto de cultivares diferenciadoras inclui uma série de seis cultivares Andinas e seis cultivares Mesoamericanas, associadas a um código binário.

Quadro 1 - Diferenciadoras para ferrugem do feijão comum, apresentadas no 3th *Bean Rust International Workshop*, como o padrão internacional para a classificação de raças de *Uromyces appendiculatus* (Steadman et al., 2002)

Valores no sistema binário	Cultivar diferenciadora	Pool gênico	Gene de resistência	Grupo de ligação
1	Early Gallatin	A/MA	<i>Ur-4</i>	Pv06
2	Redlands Pioneer	A	<i>Ur-13</i>	Pv08
4	Montcalm	A	-	-
8	PC-50	A	<i>Ur-9, Ur-12</i>	Pv01 (<i>Ur-9</i>), Pv07 (<i>Ur-12</i>)
16	Golden Gate Wax	A/MA	<i>Ur-6</i>	Pv11
32	PI 260418	A	-	-
1	Great Northern 1140	MA	<i>Ur-7</i>	Pv11
2	Aurora	MA	<i>Ur-3</i>	Pv11
4	Mexico 309	MA	<i>Ur-5</i>	Pv04
8	Mexico 235	MA	<i>Ur-3+</i>	-
16	CNC	MA	-	-
32	PI 181996	MA	<i>Ur-11</i>	Pv11

Assim como a diversidade genética do hospedeiro *P. vulgaris*, as raças de *U. appendiculatus* segregam em dois *pool* gênicos distintos, o Andino e o Mesoamericano (Pastor-Corrales e Aime, 2004). O grupo de isolados do fungo *U. appendiculatus* Andino possui uma estreita e específica relação com o hospedeiro,

sendo compatíveis somente com cultivares Andinas. Isolados Andinos ocorrem nas regiões onde predomina o cultivo do feijão comum de origem Andina. Quanto ao grupo de isolados Mesoamericanos, eles possuem ampla e não específica relação com o hospedeiro, sendo compatíveis com cultivares de feijão comum de origem Mesoamericana e também Andina (Pastor-Corrales, 2004).

Um total de 14 genes de resistência para a ferrugem foram descritos. Os genes de origem Mesoamericana mais utilizados em programas de melhoramento incluem *Ur-3*, descrito na cultivar Aurora (Ballantyne, 1978), *Ur-5* na cultivar Mexico 309 (Stavely, 1984), *Ur-7* descrito na cultivar Great Northern 1140 (Augustin et al., 1972), *Ur-11* na cultivar PI 181996 (Stavely, 1990) e *Ur-14* na cultivar Ouro Negro (Souza et al., 2011).

Os genes de origem Andinos incluem *Ur-4* na cultivar Early Gallatin (Ballantyne, 1978), *Ur-6* na cultivar Golden Gate Wax (Ballantyne, 1978), *Ur-9* na cultivar Pompadour Checa 50 (Finke et al., 1986), *Ur-12* na cultivar Pompadour Checa 50 (Jung et al., 1998) e *Ur-13* na cultivar Redlands Pioneer (Liebenberg e Pretorius, 2004). Estes dez genes têm sido descritos em seis grupos de ligação do feijão comum, Pv01, Pv04, Pv06, Pv07, Pv08, e Pv11 (Quadro 2).

Quadro 2 - Genes de resistência à ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*, fonte de resistência, *pool* gênico e grupo de ligação

Gene	Cultivar	<i>Pool</i> gênico	Grupo de ligação	Referência
<i>Ur-1</i>	B1627	MA	-	Ballantyne (1978)
<i>Ur-2</i>	B2090	MA	-	Ballantyne (1978)
<i>Ur-2²</i>	B2055	MA	-	Ballantyne (1978)
<i>Ur-3</i>	Aurora	MA	Pv11	Ballantyne (1978)
<i>Ur-4</i>	Early Gallatin	A	Pv06	Ballantyne (1978)
<i>Ur-5</i>	Mexico 309	MA	Pv04	Stavely (1984)
<i>Ur-6</i>	Golden Gate Wax	A	Pv11	Ballantyne (1978)
<i>Ur-7</i>	Great Northern 1140	MA	Pv11	Augustin et al. (1972)
<i>Ur-8</i>	U.S. #3	A	-	Christ e Groth (1982)
<i>Ur-9</i>	Pompadour Checa 50	A	Pv01	Finke et al. (1986)
<i>Ur-10</i>	Cape e Resisto	A/MA	-	Webster e Ainsworth (1988)
<i>Ur-11</i>	PI 181996	MA	Pv11	Stavely (1990)
<i>Ur-12</i>	Pompadour Checa 50	A	Pv07	Jung et al. (1998)
<i>Ur-13</i>	Redlands Pioneer	A/MA	Pv08	Liebenberg e Pretorius (2004)
<i>Ur-14</i>	Ouro Negro	MA	Pv04	Souza et al. (2011)

Os demais genes descritos, *Ur-1* e *Ur-2* (Ballantyne, 1978), são indisponíveis para uso, devido ao fato de que não há sementes das cultivares B1627 (*Ur-1*) e B2090 (*Ur-2*). O gene *Ur-8* (Christ e Groth, 1982), suscetível à maioria das raças do fungo causador da ferrugem, tem sido ignorado pela maioria dos melhoristas. O gene *Ur-10*, da mesma forma, não tem sido explorado em programas de melhoramento de feijão comum. Adicionalmente, alguns genes de resistência à ferrugem, ainda não nomeados, foram descritos nas cultivares PI 310762, PI 260418 e Dorado. O gene de resistência na cultivar Compuesto Negro Chimaltenango (CNC) ainda não foi nomeado (Miklas et al., 2002).

O gene presente na cultivar PI 190078, foi descrito como o mesmo gene presente na cultivar PI 181996 (*Ur-11*), porém, o teste de alelismo nunca foi realizado (Stavely, 1998). Outras fontes de resistência à ferrugem ainda incluem os genes *Ur-3+*, descrito nas cultivares Mexico 235, Ecuador 299, 51051 e NEP 2, e o gene *Ur-6+*, descrito na cultivar Olathe (Ballantyne, 1978; Pastor-Corrales, 1985).

A identificação da presença de um ou mais genes de resistência à ferrugem pode ser realizada através do uso de marcadores moleculares e raças específicas de *U. appendiculatus*. O uso de raças do patógeno causador da ferrugem em inoculações múltiplas de raças individuais é uma técnica extremamente eficiente para detectar genes de resistência à ferrugem. A raça 47 é usada para detectar o gene *Ur-6*, a raça 53, para *Ur-3*, a raça 67, para *Ur-11*, e a raça 49 para detectar a presença de *Ur-4* e *Ur-11* conjuntamente. Adicionalmente, as raças 41, 44, 73 e 108 são usadas para confirmar esses resultados (Pastor-Corrales e Stavely, 2002).

A caracterização de genes de resistência à ferrugem, utilizando raças específicas, é relativamente fácil e muito eficiente. Entretanto, raças específicas para detectar genes epistáticos não estão disponíveis. Alternativamente, os marcadores moleculares têm sido úteis para a manutenção de genes de resistência à ferrugem hipostáticos na presença de genes de resistência epistáticos (Kelly et al., 2003).

Epistasia entre genes de resistência à ferrugem tem sido relatada para alguns genes. O gene *Ur-5* (Mexico 309) é epistático sobre o gene *Ur-4* (Early Gallatin) (dados não publicados). O gene *Ur-11* presente nas cultivares BelMiDak-RR-1 e BelMiDak-RR-2, derivadas do cruzamento com PI 181996, é epistático sobre a resistência condicionada pelo gene *Ur-4* (Early Gallatin) (Miklas et al., 1993). Os genes de resistência *Ur-3* (Aurora) e *Ur-6* (Golden Gate Wax), por outro lado, são epistáticos sobre *Ur-11* (PI 181996) (Pastor-Corrales e Stavely, 2002).

2.9. Antracnose no feijão comum

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi e Cava, é uma das doenças economicamente mais importantes do feijão comum e pode causar perdas em torno de 95% em cultivares de feijão comum suscetíveis (Melotto et al., 2000).

A antracnose apresenta maior severidade em locais onde predominam temperaturas amenas e umidade relativa acima de 90% (Vieira, 1967). A eficiência na transmissão do patógeno *C. lindemuthianum* via sementes, e as perdas econômicas proporcionadas pela antracnose, qualificam-na como a doença fúngica foliar mais importante do feijão comum (Rey et al., 2005).

A diversidade genética do *C. lindemuthianum* é um dos principais fatores limitantes no controle da antracnose do feijão comum (Ceolin et al., 2007). Um total de 247 raças de *C. lindemuthianum*, distribuídas por 28 diferentes países, foi identificadas até o momento, e mais de 57 raças foram identificadas somente no Brasil (Nunes et al., 2013).

As raças *C. lindemuthianum* são identificadas utilizando um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras para antracnose, as quais são associadas a um sistema binário para a determinação do nome de cada raça, como apresentado no Quadro 3 (Pastor-Corrales, 1991).

Quadro 3 - Diferenciadoras para antracnose no feijão comum, definidas como padrão internacional para a classificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Pastor-Corrales, 1991)

Número	Cultivar diferenciadora	Número Binário	Gene	Pool Gênico
1	Michelite	1	Co-11	MA
2	Michigan Dark Red Kidney	2	Co-1	A
3	Perry Marrow	4	Co-1 ³	A
4	Cornell 49242	8	Co-2	MA
5	Widusa	16	Co-1 ⁵	A
6	Kaboon	32	Co-1 ²	A
7	Mexico 222	64	Co-3	MA
8	PI 207262	128	Co-4 ³ , Co-3 ³	MA
9	TO	256	Co-4	MA
10	TU	512	Co-5	MA
11	AB 136	1024	Co-6	MA
12	G 2333	2048	Co-4 ² , Co-5 ² , Co-3 ⁵	MA

MA: Mesoamericano; A: Andino.

Um total de 20 genes independentes e quatro séries alélicas controlam a resistência à antracnose no feijão comum. Destes, 13 *loci* independentes foram caracterizados e identificados como *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-8*, *Co-11*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-16* e *Co-17*, os quais foram mapeados em sete diferentes cromossomos: Pv01, Pv02, Pv03, Pv04, Pv07, Pv08 e Pv11 (Miklas et al., 2002; Gonçalves-Vidigal et al., 2013; Trabanco et al., 2015). Adicionalmente, seis outros genes identificados como *Co-u*, *Co-v*, *Co-w*, *Co-x*, *Co-y* e *Co-z* foram descritos (Geffroy, 1997; Geffroy et al., 1999; 2008) (Quadro 4).

O gene *Co-1* foi descrito por McRostie (1919) na cultivar MDRK. O locus *Co-1* possui uma série alélica formada por *Co-1*² presente na cultivar Kaboon (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1*³, na cultivar Perry Marrow (Melotto e Kelly, 2000), *Co-1*⁴/*Phg-1* presente na cultivar AND 277 (Alzate-Marin et al., 2003a; Gonçalves-Vidigal et al., 2011) e *Co-1*⁵ presente na cultivar Widusa (Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006). Estudos de co-segregação conduzidos por Gonçalves-Vidigal et al. (2011), revelaram que gene *Co-1*⁴ está mapeado no Pv01 a 0.0 cM do gene *Phg-1* presente na cultivar AND 277, os quais conferem resistência à antracnose e mancha angular, respectivamente. O gene *Co-x* foi recentemente mapeado no Pv01, sendo independente do gene *Co-1* e apresentou sintonia com uma das extremidades do cromossomo 18 de *Glycine max*, na qual está localizado o gene *Rhg1* que confere resistência do cisto do nematoide da soja (Richard et al., 2014).

O gene *Co-2* foi descrito primeiramente como gene *Are* na cultivar Mesoamericana Cornell 49-242 e está localizado no grupo de ligação Pv11 (Mastenbroek, 1960).

O gene *Co-3*, denominado anteriormente de Mexique 1, foi primeiramente identificado na cultivar diferenciadora Mexico 222 por Bannerot (1965). O locus *Co-3* apresenta uma série alélica. O alelo *Co-3*² está presente na cultivar Mexico 227 (Fouilloux, 1976; 1979). O alelo *Co-3*³ foi identificado primeiramente na cultivar BAT 93 e está presente na cultivar PI 207262 (Geffroy et al., 1999; Méndez-Vigo et al., 2005; Alzate-Marin et al., 2007; Rodríguez-Suárez et al., 2008; Geffroy et al., 2009; Campa et al., 2011). Por sua vez, o alelo *Co-3*⁴ identificado por Gonçalves-Vidigal et al. (2013) está presente na cultivar Ouro Negro (inicialmente teve a denominação de *Co-10* por Alzate-Marin et al., 2003b). O alelo *Co-3*⁵ (Pastor-Corrales et al., 1994; Young et al., 1998; Sousa et al., 2014) foi descrito na cultivar G 2333 originalmente como *Co-7* (Young et al., 1998) e renomeado de *Co-3*⁵ por Sousa et al. (2014).

Quadro 4 - Genes de resistência à antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, fonte de resistência, *pool* gênico e grupo de ligação

Gene	Cultivar (<i>símbolo antigo</i>)	<i>Pool</i> gênico	GL	Referência
Co-1	MDRK	A	Pv01	McRostie (1919)
Co-1 ²	Kaboom	A	Pv01	Melotto e Kelly (2000)
Co-1 ³	Perry Marrow	A	Pv01	Melotto e Kelly (2000)
Co-1 ⁴	AND 277	A	Pv01	Alzate-Marin et al. (2003a); Gonçalves-Vidigal et al. (2011)
Co-1 ⁵	Widusa	A	Pv01	Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006)
Co-2	Cornell 49-242	MA	Pv11	Mastenbroek (1960)
Co-3	Mexico 222	MA	Pv04	Bannerot (1965)
Co-3 ²	Mexico 227	MA	Pv04	Fouilloux (1976; 1979)
Co-3 ³	BAT 93; PI 207262	MA	Pv04	Geffroy et al. (1999); Méndez-Vigo et al. (2005); Alzate-Marin et al. (2007); Rodríguez-Suárez et al. (2008); Geffroy et al. (2009); Campa et al. (2011)
Co-3 ⁴	Ouro Negro	MA	Pv04	Gonçalves-Vidigal et al. (2013)
Co-3 ⁵	G 2333; MSU 7-1; H1 line	MA	Pv04	Pastor-Corrales et al. (1994); Young et al. (1998); Sousa et al. (2014)
Co-4	TO	MA	Pv08	Fouilloux (1976; 1979)
Co-4 ²	G 2333; Sel 1308	MA	Pv08	Young et al. (1998)
Co-4 ³	PI 207262	MA	Pv08	Alzate-Marin et al. (2007)
Co-5	TU	MA	Pv07	Young e Kelly (1996a); Young et al. (1998); Alzate-Marin et al. (2007)
Co-5 ²	G 2333; Sel 1360	MA	Pv07	Vallejo e Kelly (2009)
Co-6	AB 136	MA	Pv07	Schwartz et al. (1982); Gonçalves-Vidigal (1994); Kelly e Young (1996); Young e Kelly (1996a)
co-8	AB 136	MA		Alzate-Marin et al. (1997)
Co-11	Michelite	MA	-	Gonçalves-Vidigal et al. (2007)
Co-12	Jalo Vermelho	A	-	Gonçalves-Vidigal et al. (2008)
Co-13	Jalo Listras Pretas	A	Pv03	Gonçalves-Vidigal et al. (2009)
Co-14	Pitanga	A	Pv01	Gonçalves-Vidigal et al. (2012)
Co-15	Corinthiano	A	Pv04	Sousa et al. (2015)
Co-16	Crioulo 159	MA	Pv04	Coelho et al. (2013)
Co-17	Sel 1308	MA	Pv03	Trabanco et al. (2015)
Co-u	BAT 93	MA	Pv02	Geffroy (1997); Geffroy et al. (2008)
Co-v	BAT 93	MA	Pv07	Geffroy (1997)
Co-w	Jalo EEP 558	A	Pv01	Geffroy (1997); Geffroy et al. (2008)
Co-x	Jalo EEP 558	A	Pv01	Geffroy (1997); Geffroy et al. (2008)
Co-y	Jalo EEP 558	A	Pv04	Geffroy et al. (1999)
Co-z	Jalo EEP 558	A	Pv04	Geffroy et al. (1999)

GL: grupo de ligação; MA: Mesoamericano; A: Andino.

O gene Co-4 foi identificado na cultivar diferenciadora TO como Mexique 2 por Fouilloux (1976; 1979). O gene Co-4 possui uma série alélica, sendo o alelo Co-

4² presente na linhagem SEL 1308 (Young et al., 1998), e o alelo *Co-4*³ presente na cultivar diferenciadora PI 207262 (Alzate-Marin et al., 2007).

A cultivar mesoamericana AB 136 apresenta o gene *Co-6* (Schwartz et al., 1982; Gonçalves-Vidigal et al., 2001; Kelly e Young, 1996; Young e Kelly, 1996a). Adicionalmente, um gene recessivo de resistência à antracnose, *co-8*, foi descrito na cultivar diferenciadora mesoamericana AB 136 (Alzate-Marin et al., 1997).

Os genes *Co-11*, *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15* e *Co-16* foram caracterizados nas cultivares Michelite, Jalo Vermelho, Jalo Listras Pretas, Pitanga, Corinthiano e Crioulo 159, respectivamente (Gonçalves-Vidigal et al., 2007; 2008; 2009; 2012; Sousa et al., 2015, Coelho et al., 2013). O gene *Co-17* foi descrito na cultivar Sel 1308 (Trabanco et al., 2015).

A cultivar andina Jalo EEP 558 possui os genes *Co-w*, *Co-x*, *Co-y* e *Co-z* (Geffroy, 1997; Geffroy et al., 1999; 2008). A cultivar Mesoamericana BAT 93 possui os genes *Co-u* e *Co-v* (Geffroy, 1997; Geffroy et al., 2008).

Novas fontes de resistência foram descritas nas cultivares de origem Andina Paloma, Amendoim Cavalo e Jalo Pintado 2 (Castro et al., 2014; Frias et al., 2014; Nanami et al., 2014), nas quais a resistência genética à antracnose é controlada por um gene com efeito dominante. Desta forma, todos os genes previamente descritos apresentam herança dominante, exceto o *locus* de resistência *co-8*, o qual é controlado por um gene recessivo (Alzate-Marin et al., 1997).

2.10. Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem e antracnose no feijão comum

Marcadores moleculares têm sido utilizados para o desenvolvimento de mapas genéticos, mapeamento de genes, seleção assistida por marcadores e estudo da diversidade genética (Hyten et al., 2010; Kalia et al., 2011).

Para o mapeamento de genes de resistência em feijão comum, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), têm sido muito utilizados. Conforme apresentado nos Quadro 5 e 6, diversos marcadores moleculares RAPD, SCAR e SSR foram descritos por estar associados a genes conferindo resistência à ferrugem e à antracnose em feijão.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, a fonte mais abundante de variação do DNA para desenvolver marcadores moleculares são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Hyten et al., 2010). Os marcadores SNPs têm se tornado uma excelente escolha para diversas aplicações na pesquisa, devido à abundância destes marcadores e das várias tecnologias disponíveis para as análises de genotipagem de SNP (Fan et al., 2006). A genotipagem por SNP tem sido muito utilizada no feijão comum nos últimos anos. Com o evento do sequenciamento do genoma do *Phaseolus vulgaris* (Schmutz et al., 2014), estima-se que os avanços para desenvolver marcadores SNP sejam ainda maiores.

Quadro 5 - Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem no feijão comum

Gene	Pool Gênico	Cultivar	Grupo de ligação	Marcadores Moleculares	Referência
Ur-3	MA	Aurora	Pv11	OK14 ₆₂₀ ; SK14 ₆₂₀	Haley et al. (1994); Nemchinova e Stavely (1998)
Ur-4	A	Early Gallatin	Pv06	OA14 ₁₁₀₀ ; SA _{141079/800}	Miklas et al. (1993); Mienie et al. (2004)
Ur-5	MA	Mexico 309	Pv04	OF10 ₉₇₀ ; OI19 ₄₆₀ ; SI19 ₄₆₀ ; SI19 ₄₆₀	Haley et al. (1993); Melloto e Kelly (1998); Souza et al. (2007)
Ur-6	A	Golden Gate Wax	Pv11	OBC06 ₃₀₈ ; SBC06 ₃₀₈ ; OAG15 ₃₀₀ ; OAY15 ₂₀₀	Park et al. (2003a; 2004)
Ur-7	MA	Great Northern 1140	Pv11	OAD12 ₅₃₇ ; SAD12 ₅₃₇ ; OAA11 ₅₀₀ ; OAF17 ₉₀₀ ; OAE16 ₈₅₀ ; OAD9 ₅₅₀ ; OAB18 ₆₅₀	Park et al. (1999a; 2003b)
Ur-9	A	PC-50	Pv01	OJ13 ₁₁₀₀ ; OAO4 ₁₀₅₀	Jung et al. (1998); Park et al. (1999b)
Ur-11	MA	PI 181996	Pv11	OAC20 ₄₉₀ ; OAE19 ₈₉₀ ; SAE ₈₉₀ ; OGT02 ₄₅₀ ; SGT02 ₄₅₀	Johnson et al. (1995); Queiroz et al. (2004b); Boone et al. (1999)
Ur-13	A	Redlands Pioneer	Pv08	SKB126 _{430/405} ; SKB85 _{310/288} ; SKB4 _{250/186}	Mienie et al. (2005)
Ur-14	MA	Ouro Negro	Pv04	OBA08 ₅₃₀ ; SBA08 ₅₃₀ ; OF10 ₁₀₇₂ ; SF10 ₁₀₇₂ ; OX11 ₅₅₀	Corrêa et al. (2000); Faleiro et al. (2000b)

Shin e colaboradores (2014) utilizaram a metodologia de genotipagem por SNP para identificar a posição do gene de resistência à ferrugem na cultivar PI 310762, no grupo de ligação Pv04. Da mesma forma, Felicetti et al. (2012)

desenvolveram marcadores SSR, ligados ao gene *sd* no Pv07 que controla o baixo escurecimento no tegumento do grão do feijão comum, baseados em resultados prévios de genotipagem com SNPs.

Bello et al. (2014) aplicaram *Bulk Segregant Analysis* (BSA) *in silico* em um conjunto de 500 linhagens pertencentes ao *BeanCAP Diversity Panel* genotipadas com SNPs, assim, foi possível desenvolver marcadores moleculares ligados ao gene *I* que controla a resistência ao vírus do mosaico comum no feijão comum (BCMV).

Na cultura do feijão comum, os marcadores SCAR foram desenvolvidos para aumentar a reprodutibilidade dos marcadores RAPD (Miklas et al., 2002; Kelly et al., 2003). No entanto, relatos apontam que nem todos os marcadores têm sido utilizados com sucesso no processo de seleção assistida por marcadores moleculares. Por exemplo, o marcador molecular OA14₁₁₀₀, ligado ao gene *Ur-4* no Pv06 (Miklas et al., 1993), tem sido usado para selecionar plantas com o gene *Ur-4*, porém sua utilidade é restrita apenas para uso em cruzamento envolvendo cultivares Mesoamericanas, uma vez que as progênies de um cruzamento entre Early Gallatin (*Ur-4*) e uma cultivar Andina não segregam para o marcador OA14₁₁₀₀.

Os marcadores moleculares SSRs e SNPs, associados a genes de resistência à ferrugem, passaram a ser utilizados recentemente. Os trabalhos desenvolvidos no USDA-ARS *Soybean Genomic and Improvement Laboratory* utilizaram a genotipagem de SNPs associados ao *Bulk Segregant Analysis* (BSA).

Utilizando a técnica de genotipagem com SNPs associado ao BSA, foram desenvolvidos marcadores SNPs associados ao gene de resistência presente na cultivar PI 310672 e, posteriormente, foram desenvolvidos marcadores moleculares SSRs na região de interesse (Shin et al., 2014).

Desta forma, os resultados obtidos por Shin et al., (2014) demonstraram que o gene de resistência à ferrugem na cultivar PI 310672 está estreitamente ligado ao marcador SSR1167 (BARCPVSSR04569) a 0,1 cM, ao marcador SSR1170 (BARCPVSSR04574) em 0,5 cM e ao marcador SSR1168 (BARCPVSSR04570) a 0,9 cM.

Os marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados para identificar a maioria dos genes de resistência à antracnose no feijão comum. A piramidação de genes de resistência, usando a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), é proposta como uma das melhores práticas para fornecer eficiente controle da herança da resistência à antracnose (Balardin e Kelly, 1998).

Quadro 6 - Marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à antracnose no feijão comum, Kelly e Vallejo (2004) com modificações

Gene	Cultivar	Marcador molecular	Grupo de ligação	Referência
<i>Co-1</i>	MDRK	OF10 ₅₃₀ ; AT003	Pv01	Young e Kelly (1997); Campa et al. (2011)
<i>Co-1</i> ²	Kaboon	SE _{ACT} /M _{CCA}	Pv01	Vallejo e Kelly (2002)
<i>Co-1</i> ⁴	AND 277	CV542014 ₄₅₀ ; TGA 1.1 ₅₇₀	Pv01	Gonçalves-Vidigal et al. (2011)
<i>Co-1</i> ⁵	Widusa	OA18 ₁₅₀₀	Pv01	Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006)
<i>Co-2</i>	Cornell 49-242	OH20 ₄₅₀ ; SH20 ₄₅₀ ; PvH20; OQ4 ₁₄₄₀ ; SQ4 ₁₄₄₀ ; B355 ₁₀₀₀ ; SCAreoli	Pv11	Adam-Blondon et al. (1994); Geffroy et al. (1998); Young e Kelly (1996b); Awale et al. (2008); Campa et al. (2011)
<i>Co-3</i> ³	BAT 93	SB12 ₃₅₀ ; SW12 ₇₀₀ ; OF10 ₁₁₀₀ ; SB10; Pv-ctt001; SI19	Pv04	Mendéz-Vigo et al. (2002; 2005); Miklas et al. (2000); Campa et al. (2011)
<i>Co-3</i> ⁴	Ouro Negro	SBA08; OF10 ₁₀₇₂ ; SF10 ₁₀₇₂ ; g2303	Pv04	Corrêa et al. (2000); Faleiro et al. (2000b); Gonçalves-Vidigal et al. (2013)
<i>Co-4</i>	TO	SY20 ₈₃₀ ; SC8 ₉₁₀	Pv08	Awale e Kelly (2001); Kelly et al. (2003); Queiroz et al. (2004a)
<i>Co-4</i> ²	SEL1308	OAS13 ₉₅₀ ; OAL19 ₇₄₀ ; OC8; SAS13 ₉₅₀ ; SH18 ₁₁₀₀ ; SBB14 _{1150/1050} ; OH18 ₈₃₀	Pv08	Young et al. (1998); Awale e Kelly (2001); Kelly et al. (2003); Alzate-Marin et al. (2000; 2001)
<i>Co-4</i> ³	PI 207262	OOY20; AS13 _{950c}	Pv08	Alzate-Marin et al. (2007); Arruda et al. (2000)
<i>Co-5</i>	TU	OAB3 ₄₅₀ ; SAB3 ₄₀₀	Pv07	Young e Kelly (1996b); Young et al. (1998); Vallejo e Kelly (2001)
<i>Co-5</i> ²	SEL1360 MSU 7-1	OF10 ₁₀₀₀ ; OI16 ₈₅₀ ; OAK20 ₈₉₀ ; SAS8; SW12; SBA3; BM183; g1233 ₃₂₅₀	Pv07	Vallejo e Kelly (2009) ; Sousa et al. (2014)
<i>Co-6</i>	AB136	SZ20 ₈₄₅ ; OPZ04 ₅₆₀ ; SZ4 ₅₆₇ ; OAH1 ₇₈₀ ; OAK20 ₈₉₀	Pv07	Queiroz et al. (2004a); Young e Kelly (1997); Alzate-Marin et al. (2000)
<i>Co-11</i>	Michelite	OPAZ04 ₅₆₅	-	Silva et al. (2009)
<i>Co-13</i>	Jalo L. Pretas	OV20 ₇₀₀	Pv03	Lacanallo e Gonçalves-Vidigal (2015)
<i>Co-15</i>	Corinthiano	g2685 ¹⁵⁰	Pv04	Sousa et al. (2015)

No Brasil, bem como em outros países como Estados Unidos, a SAM tem sido utilizada com sucesso para a seleção de plantas (Miklas et al., 2003; Ragagnin et al., 2009). Contudo, precauções devem ser tomadas (Ernest e Kelly, 2004). A

seleção indireta, por meio de marcadores, deve ser verificada periodicamente por meio da seleção direta, de forma a garantir que o gene de resistência esteja sendo transferido (Miklas et al., 2006).

O mapeamento tem confirmado a localização da maioria dos genes que conferem resistência à antracnose, propiciando oportunidades para a piramidação de genes e, assim, desenvolver cultivares melhoradas com resistência mais durável à variabilidade existente no patógeno *C. lindemuthianum* (Kelly e Vallejo, 2004).

2.11. Clusters de genes para resistência a doenças no feijão comum

A resistência genética para várias doenças é determinada por membros individuais de uma família de genes dominantes, sendo que, cada membro confere resistência a uma raça específica de um patógeno, em um modelo de interação gene-a-gene (Flor, 1956; Michelmore e Meyers, 1998). A genética clássica tem demonstrado que genes que promovem resistência a doenças, tendem a ser frequentemente agrupados em *clusters*. Os dados moleculares têm suportado esta hipótese. Genes de resistência em diversos patógenos e em várias espécies foram clonados e identificou-se que eles codificam proteínas com *motifs* em comum (Michelmore e Meyers, 1998).

Independente da planta ou do agente patogênico considerado, a maioria dos genes R clonados codificam proteínas NB-LRR (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*) (McHale et al., 2006; Schmutz et al., 2014). Estas proteínas contêm um domínio central NB (*Nucleotide-Binding*) e um domínio LRR (*C-Terminal Leucine-Rich Repeat*) comum (Michelmore e Meyers, 1998). As proteínas NB-LRR podem ser divididas em duas subclasses baseadas no domínio N-terminal: TIR-NB-LRR (TNL) contendo uma *Toll Interleukin-1 Receptor*, e CC-NB-LRR (CNL) com um domínio *Coiled-Coil* (Pan et al., 2000).

No genoma do feijão comum foram observados densos conjuntos de genes associados à resistência a doenças. A maioria deles corresponde a regiões associadas a genes de resistência em plantas que codificam genes NB-LRR. 376 genes NB-LRR foram identificados e destes, 106 codificam o domínio *N-terminal Toll Interleukin-1 Receptor* (TNL) e 108 codificam o domínio N-terminal *Coiled-Coil* (CNL). A maioria das sequências NB-LRR foram fisicamente organizadas em agrupamentos complexos, frequentemente localizadas nas extremidades dos

cromossomos. Em particular, três grandes aglomerados foram localizados nas extremidades dos cromossomos Pv04, Pv10 e Pv11, os quais contêm mais de 40 genes NB-LRR, enriquecidos principalmente por genes CNL (Pv04 e Pv11) e genes TNL (Pv10) (Schmutz et al., 2014).

Na literatura foi reportado um grande número de *clusters* de genes de resistência para a ferrugem, crestamento bacteriano comum e mofo branco localizado nos grupos de ligação Pv01, Pv04, Pv07, e Pv11 do feijão comum. Os *clusters* de genes para resistência à ferrugem e antracnose foram descritos no Pv01, Pv04 e Pv011 (Kelly et al., 2003; Kelly e Vallejo, 2004).

O mais estudado *cluster* do feijão comum reúne vários genes de resistência a doenças de origem Andina e Mesoamericana e está localizado em uma das extremidades do cromossomo Pv04 (David et al., 2009; Geffroy et al., 2009). O *cluster* de resistência no Pv04 inclui os genes e alelos *Co-3*, *Co-3²*, *Co-3³*, *Co-3⁴*, *Co-3⁵*, *Co-y*, *Co-z* e *Co-RVI* de resistência à antracnose (Bannerot, 1965; Fouilloux, 1979; Geffroy et al., 1999; Gonçalves-Vidigal et al., 2013) e os genes *Ur-5*, *Ur-14* e *Ur-Dorado*, para resistência à ferrugem (Stavely, 1984; Miklas et al., 2000; Souza et al., 2011). Mais recentemente, o gene de resistência à ferrugem, presente em PI 310762, também foi mapeado no Pv04 (Shin et al., 2014). Da mesma forma, o gene *Phg-3* de resistência à mancha angular causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, presente na cultivar Ouro Negro foi mapeado no Pv04.

Estudos de co-segregação revelaram que os genes *Co-3⁴* e *Phg-3* estão intimamente ligados a 0,0 cM um do outro e do marcador molecular g2303 e mapeados no Pv04 (Gonçalves-Vidigal et al., 2013). Assim, a seleção de plantas resistentes em uma população segregante, proveniente do cruzamento com o parental Ouro Negro pode ser realizada simultaneamente para ambos os patógenos *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

Além dos genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular, o *cluster* no Pv04 contém outros genes R específicos de resistência, incluindo *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (agente causador do crestamento bacteriano aureolado) (David et al., 2008) e um QTL de resistência contra o vírus do mosaico dourado do feijão comum (BGYMV) (Lopez et al., 2003).

Outro complexo *cluster* de genes de resistência fica localizado no grupo de ligação Pv11 (Geffroy et al., 1998). O *cluster* de genes no Pv11 inclui o gene *Co-2* de resistência à antracnose (Adam-Blondon et al., 1994) e os genes *Ur-3*, *Ur-6*, *Ur-7* e

Ur-11 (Haley et al., 1994; Jung et al., 1998; Park et al., 2003a; Kelly e Vallejo, 2004) de resistência à ferrugem no feijão comum.

O complexo *cluster* de resistência, localizado no grupo de ligação Pv01, hospeda vários genes e alelos de resistência à antracnose, *Co-1*, *Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴ e *Co-1*⁵ (Young e Kelly, 1997; Vallejo e Kelly, 2002; Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006; Gonçalves-Vidigal et al., 2011) e os genes *Co-w* e *Co-x* (Geffroy et al., 2008). O *cluster* de genes de resistência no Pv01 inclui também o gene *Ur-9* de resistência à ferrugem (Jung et al., 1998; Park et al., 1999b) e o gene *Phg-1* de resistência à mancha angular (Gonçalves-Vidigal et al., 2011). Os genes *Co-1*⁴ e *Phg-1* estão ligados a 0.0 cM no grupo de ligação Pv01. Os marcadores moleculares CV542014⁴⁵⁰ e TGA1.1⁵⁷⁰ estão ligado aos genes *Co-1*⁴/*Phg-1 cluster* a 0,7 e 1,3 cM, respectivamente (Gonçalves-Vidigal et al., 2011). O *cluster* de genes de resistência no Pv01 está presente em cultivares de origem Andina.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDOM, A.F.; SEVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose. **Theoretical Applied Genetics**, 88:865-870, 1994.

ALLEN, D.J.; DESSERT, M.; TRUTMANN, P.; VOSS, J. Common beans in Africa and their constrains. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES M.A. (eds.). **Bean production problems in the tropics**. Second edition. Cali, Colombia: CIAT, 1989. p. 9-31.

ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND 277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:173-174, 2003a.

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

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003b.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; BAÍA, G.S.; PAULA-JÚNIOR, T.J.; SOUZA, K.A.; COSTA, M.R.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G 2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. **Journal of Phytopathology**, 149:259-264, 2001.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CHAGAS, J.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of RAPD marker linked to the *Co-6* anthracnose resistant gene in common bean cultivar AB 136. **Genetics and Molecular Biology**, 23:633-637, 2000.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.M.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4³* and *Co-9* in common bean cultivar Tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, 154:1-8, 2007.

ARRUDA, M.C.; ALZATE-MARIN, A.L.; CHAGAS, J.M.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 90:758-761, 2000.

AUGUSTIN, E.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli* typical Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 97:526-529, 1972.

AWALE, H.E.; ISMAIL, S.M.; VALLEJO, V.A.; KELLY, J.D. SQ4 marker linked to the *Co-2* gene on B11 appears to be linked to the *Ur-11* gene. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 51:174-175, 2008.

AWALE, H.E.; KELLY, J.D. Development of SCAR markers linked to *Co-4²* gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:119-120, 2001.

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

BALLANTYNE, B. **The genetic basis of resistance to rust caused by *Uromyces appendiculatus* in bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Ph. D. Thesis, University of Sidney, Australia. 1978. 262p. (Ph.D. Thesis).

BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Annual de Amélioré des Plantes**, 15:201-222, 1965.

BECERRA-VELAZQUEZ, L.; GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centers of origin. **Genome**, 37:256-263, 1994.

BEEBE, S.; RENGIFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science**, 41:854-862, 2001.

BEEBE, S.; SKROCH, P.; TOHME, J.; DUQUE, M.C.; PEDRAZA, F.; NIENHHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, 40:264-273, 2000.

BELLO, M.H.; MOGHADDAM, S.M.; MASSOUDI, M.; MCCLEAN, P.E.; CREGAN, P.B.; PHILLIP N MIKLAS, P.N. Application of *in silico* Bulk Segregant Analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common bean. **BMC Genomics**, 15:1-13, 2014.

BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; ZEULI, P.S.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, 197:300-313, 2013.

BITOCCHI, E.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; ROSSI, M.; GIARDINI, A.; ZEULI, S.P.; LOGOZZO, G.; STOUGAARD, J.; MCCLEAN, P.; ATTENE, G.; PAPA, R. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Science**, 109:788-796, 2012.

BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.V.P.; DIAZ, L.M.; DEL PELOSO, M.J. Diversity and population structure of common bean from Brazil. **Crop Science**, 53:1983-1993, 2013a.

BLAIR, M.W.; CORTÉS, A.J.; PENMETSA, R.V.; FARMER, A.; CARRASQUILLA-GARCIA, N.; COOK, D.R. A high-throughput SNP marker system for parental

polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 126:535-548, 2013b.

BLAIR, M.W.; DÍAZ, L.M.; BUENDÍA, H.F.; DUQUE, M.C. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 119:955-972, 2009.

BLAIR, M.W.; DIAZ, J.M.; HIDALGO, R.; DIAZ, L.M.; DUQUE, M.C. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 116:29-43, 2007.

BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; BUENDIA, H.F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 113:100-109, 2006.

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1362-1374, 2003.

BLAIR, M.B.; SOLER, A.; CORTÉS, A.J. Diversification and population structure in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plos One**, 7:1-12, 2012.

BOONE, W.E.; STAVELY, J.R.; WEEDEN, N.F. Development of a sequence-tagged site (STS) marker for *Ur-11*, a gene conferring resistance to the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:33-34, 1999.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, 252:55-128, 2003.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a

secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:801-813, 2010.

CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Genetic analysis of the resistance to eight anthracnose races in the common bean differential cultivar Kaboon. **Phytopathology**, 101:757-764, 2011.

CASTRO, S.A.L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; NANAMI, D.S.Y.; FRIAS, A.A.T.; FRANZON, R.C.; POLETINE, J.P.; LACANALLO, G.F.; GALVÁN, M.Z. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Paloma cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:163-164, 2014.

CEOLIN, A.C.G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KVITSCHAL, M.V.; GONELA, A.; SCAPIM, C.A. Genetic divergence of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) group Carioca using morpho-agronomic traits by multivariate analysis. **Hereditas**, 144:1-9, 2007.

CHACÓN, M.I.; PICKERSGILL, S.B.; DEBOUCK, D.G. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:432-444, 2005.

CHRIST, B.J.; GROTH, J.V. Inheritance of resistance in three cultivars of beans to the bean rust pathogen and the interaction of virulence and resistance genes. **Phytopathology**, 72:771-773, 1982.

COELHO, R.T.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; LACANALLO, G.F.; DARBEN, L.M.; SILVA, C.R.; SOUSA, L.L.; CRUZ, A.S. Characterization of the anthracnose resistance gene in the Mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:43-44, 2013.

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, 142:169-196, 2005.

CONAB. **Companhia nacional de abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 20, Junho, 2016.

CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD-GOD, P.I.; REGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Sequence characterization amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

CTSBF - COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo do feijão na Região Sul Brasileira 2009**. Florianópolis: Epagri, 2010.164p.

DAVID, P.; CHEN, N.W.G.; PEDROSA-HARAND, A.; THAREAU, V.; SÉVIGNAC, M.; CANNON, S.B.; DEBOUCK, D.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. **Plant Physiology**, 151:1048-1065, 2009.

DAVID, P.; SÉVIGNAC, M.; THAREAU, V.; CATILLON, Y.; KAMI, J.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. BAC end sequences corresponding to the B4 resistance gene cluster in common bean: a resources for markers and syteny analyses. **Molecular Genetics Genomics**, 280:521-533, 2008.

DEBOUCK, D. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: Singh, S.P. **Common bean improvement in the twenty-first century**. Dordrecht: Kluwer, 1999. p. 25-52.

DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. **Economic Botany** 47:408-423, 1993.

DÍAZ, L.M.; BLAIR, M.W. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:143-154, 2006.

DURÁN, L.A.; BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; MACCHIAVELLI, R.; PROPHETE, E.; NIN, J.C.; BEAVER, J.S. Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean. **Crop Science**, 45:1320-1328, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc3-bancos-ativos-de-germoplasma-de-especies-leguminosas-oleaginosas-e-fibrosas/planos-de-acao/pa4-banco-ativo-de-germoplasma-de-feijao-phaseolus-vulgaris>. Acesso em: 27, Maio, 2013.

ERNEST, E.G.; KELLY, J.D. The Mesoamerican anthracnose resistance gene, *Co-4²*, does not confer resistance in certain Andean genetic backgrounds. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:245-246, 2004.

FALEIRO, G.F.; RAGAGNIN, V.A.; CORRÊA, R.X.; VINHADELLI, W.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijoeiro comum Ouro Negro. **Revista Ceres**, 47:375-382, 2000a.

FALEIRO, F.G.; VINHADELI, W.S.; RAGAGNIN, V.A.; CORRÊA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23:399-402, 2000b.

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

FAN, J.B.; CHEE, M.S.; GUNDERSON, K.L. Highly parallel genomic assays. **Nature Review Genetics**, 7:632-644, 2006.

FAO. **Faostat database gateway**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acesso em 20, fevereiro, 2015.

FELICETTI, E.; SONG, Q.; JIA, G.; CREGAN, P.; BETT, K.E.; MIKLAS, P.N. Simple Sequence Repeats linked with slow darkening trait in pinto bean discovered by Single Nucleotide Polymorphism assay and whole genome sequencing. **Crop Science**, 52:1600-1608, 2012.

FINKE, M.L.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R. The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar normalities in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, 35:969-982, 1986.

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

FOUILLLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:36-37, 1976.

FOUILLLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: MARAITE, H.; MEYER, J.A. (eds.). **Diseases of Tropical Food Crops**. Belgium, 1979. p. 221-235.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos da genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. 262p.

FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA, P.A.; TSAI, S.M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:847-856, 1998.

FRIAS, A.A.T.; CASTRO, S.A.L.; NANAMI, D.S.Y.; LACANALLO, G.F.; SOUZA, M.C.M.; GALVÁN, M.Z.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Genetic analysis of anthracnose resistance in Jalo Pintado 2 dry bean cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:167-168, 2014.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M.C.; EDWARDS, K.J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, 42:2128-2136, 2002.

GALEANO, C.H.; CORTÉS, A.J.; FERNÁNDEZ, A.C.; SOLES, A.; FRANCO-HERRERA, N.; MAKUNDE, G.; VANDERLEYDEN, J.; BLAIR, M.W. Gene-based Single Nucleotide Polymorphism markers for genetic and association mapping in common bean. **BMC Genetics**, 13:1-11, 2012.

GEFFROY, V. **Dissection génétique de la résistance à *Colletotrichum lindemuthianum*, agente de l' anthracnose, chez deux génotypes représentatifs des pools géniques de *Phaseolus vulgaris***. Paris-Grignon: Institut National Agronomique Paris Grignon, 1997. 263p. (Thèse de Doctorat).

GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SÉVIGNAC, M.; ADAM-BLONDON, A.F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2 locus* for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, 96:494-502, 1998.

GEFFROY, V.; DELPHINE, S.; OLIVEIRA, J.C.; FSEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, 12:774-784, 1999.

GEFFROY, V.; MACADRÉ, C.; DAVID, P.; PEDROSA-HARAND, A.; SÉVIGNAC, M.; DAUGA, C.; LANGIN, T. Molecular analysis of a large subtelomeric Nucleotide-Binding-Site-Leucine-Rich-Repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, 181:405-419, 2009.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; BILLANT, P.; DRON, M.; LANGIN, T. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:407-415, 2008.

GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) Beans. **Economic Botany**, 44:28-38, 1990.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience**, 33:1124-1130, 1998.

GEPTS P.; ARAGÃO, F.; BARROS, E.; BLAIR, M.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNANDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; McCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SANCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. **Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics**. In: MOORE, P.H.; MING R, (ed). Genomics of Tropical Crop Plants. New York: Springer, 2008. p. 113-143.

GEPTS, P.; BEAVIS, W.D.; BRUMMER, E.C.; SHOEMAKER, R.C.; STALKER, H.T.; WEEDEN, N.F.; YOUNG, N.D. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiology**, 137:1228-1235, 2005.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, 40:469-478, 1986.

GEPTS, P.; KMIECIK, K.; PEREIRA, P.; BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. **Economic Botany**, 42:73-85, 1988.

GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, 40:451-468, 1986.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. **Herança da resistência às raças alfa, delta e capa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 52p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; GARCIA, A.; KAMI, J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; McCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. 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**, 122:893-903, 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; PACHECO, C.; M.N.A.; MCCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose *Co-10* and angular leaf spot *Phg-ON* disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. **Theoretical and Applied Genetics**, 126:2245-55, 2013.

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

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

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SAKIYAMA, N.S.; VIDIGAL FILHO, P.S.; AMARAL, J.R.A.T.; POLETINE, J.P.; OLIVEIRA, V.R. Resistance of common bean cultivar AB 136 races 31 and 69 of *Colletotrichum lindemuthianum*: the *Co-6* locus. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:99-104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SILVA, C.R.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M.V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, *Co-11*. **Genetics and Molecular Biology**, 30:589-593, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.E.; PASTOR-CORRALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, 49:133-138, 2009.

GRISI, M.C.M.; BLAIR, M.W.; GEPTS, P.; BRONDANI, C.; PEREIRA, P.A.A.; BRONDANI, R.P.V. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Research**, 6:691-706, 2007.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, S.R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A.B.C.; GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, 85:600-607, 1995.

HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; KELLY, J.D. Heterogeneous inbred populations are useful as source of near-isogenic lines for RAPD marker localization. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:337-342, 1994.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY J.R.; BYRUM, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512, 1993.

HANNAH, M.A.; IQBAL, M.J.; SANDERS, F.E. The DL gene system in common bean: a possible mechanism for control of root-shoot partitioning. **New Phytologist**, 147:487-496, 2000.

HIDALGO, R. CIAT's World Phaseolus Collection. In: SCHOONHOVEN, A van, VOYSEST, O. (eds.). **Common Beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1991. p. 163-198.

HYTEN, D.L.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; TUCKER, M.L.; SONG, Q.; CREGAN, P.B. Bulk Segregant Analysis using the GoldenGate Assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, 49:265-271, 2009.

HYTEN, D.L.; SONG, Q.; FICKUS, E.W.; QUIGLEY, C.V.; LIM, J.-S.; CHOI, I.-I.; HWANG, E.-Y.; PASTOR-CORRALES, M.A.; CREGAN, P.B. High through-put SNP discovery and assay development in common bean. **BMC Genomics**, 11:475-483, 2010.

JOHNSON, E.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling and repulsion RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:659-664, 1995.

JUNG, G.; COYNE, D.P.; BOKOSI, J.; STEADMAN, J.; NIENHUIS, J. Mapping genes for specific and adult plant resistance to rust and abaxial leaf pubescence and their genetic relationship using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:859-863, 1998.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, 177:309-334, 2011.

KAMI, J.; BECERRA-VELASQUEZ, V.; DEBOUCK, D.G.; GEPTS, P. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 92:1101-1104, 1995.

KELLY, J.D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P.N.; COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 82:135-154, 2003.

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

KELLY, J.D.; YOUNG, R.A. Proposed symbols for anthracnose resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 39:20-24, 1996.

KWAK, M.; GEPTS, P. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, 118:979-992, 2009.

KOENIG, R.L.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 44:50-60, 1990.

KOINANGE, E.M.K.; GEPTS P. Hibrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. **The Journal of Heredity**, 83:135-139, 1992.

KOINANGE, E.M.K.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common-bean. **Crop Science**, 36:1037-1045, 1996.

LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Mapping of an Andean gene for anthracnose resistance (*Co-13*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo Listras Pretas landrace. **Australian Journal of Crop Science**, 9:394-400, 2015.

LAVIN, M.; HERENDEEN, P.S.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. **Systematic Biology**, 54:575-594, 2005.

LIEBENBERG, M.M.; PRETORIUS, Z.A. Proposal for designation of a rust resistance gene in the large-seeded cultivar Kranskop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:255-256, 2004.

LIN, L-Z.; HARNLY, J.M.; PASTOR-CORRALES, M.A.; LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, 107:399-410, 2008.

LOPEZ, C.E.; ACOSTA, I.F.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; GALLEGU, G.; BEEBE, S.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, 93:88-95, 2003.

MACIEL, F.L.; GERALD, L.T.S.; ECHEVERRIGARAY, S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of South-Brazil. **Euphytica**, 120:257-263, 2001.

MACIEL, F.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; GERALD, L.T.S.; GRAZZIOTIN, F.G. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 50:887-893, 2003.

MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. **State of the Brazil's plant genetic resources**: Second national report. Brasilia: Embrapa, 2009. 163p.

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

McHALE, L.; TAN, X.P.; KOEHL, P.; MICHELMORE, R.W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology**, 7:1-11, 2006.

McCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; McCONNELL, M.; CHIKARA, S.; LEE, R. Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. **BMC Genomics**, 11:184, 2010.

McCLEAN, P.E.; MYERS, J.R.; HAMMOND, J.J. Coefficient of parentage and cluster analysis of North American dry bean cultivars. **Crop Science**, 33:190-197, 1993.

McROSTIE, G.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. **Phytopathology**, 9:141-148, 1919.

MELOTTO, M.; BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (eds.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St. Paul, Minnesota, 2000. p. 346-361.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1 locus* conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, 116:143-149, 2000.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. SCAR markers linked to major disease resistance genes in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:64-65, 1998.

MENDÉZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ, C.; PAÑEDA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J.J. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:116-117, 2002.

MENDÉZ-VIGO, B.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J.J.; GIRALDEZ, R. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. **Euphytica**, 141:237-245, 2005.

MICHELMORE, R.W.; MEYERS, B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Research**, 8:1113-1130, 1998.

MIENIE, C.M.S.; NAIDOO, R.; LIEBENBERG, M.M. Conversion of the RAPD marker for *Ur-4* to a co-dominant SCAR marker SA14_{1079/800}. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:261-262, 2004.

MIENIE, C.M.S.; LIEBENBERG, M.M.; PRETORIUS, Z.A.; MIKLAS, P.N. SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene *Ur-13*. **Theoretical and Applied Genetics**, 111:972-979, 2005.

MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:745-749, 1993.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, M.J.; STAVELY, J.R.; STEADMAN, J.R.; BASSETT, M.J.; BEAVER, J.S. Bacterial, fungal, virus disease

loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado/XAN176'). **Journal American Society of Horticultural Science**, 125:476-481, 2000.

MIKLAS, P.N.; PASTOR-CORRALES, M.A.; JUNG, G.; COYNE, D.P.; KELLY, J.D.; MCCLEAN, P.E.; GEPTS P. Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:125-129, 2002.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, 147:105-131, 2006.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; SINGH, S.P. Registration of anthracnose-resistant pinto bean germplasm line USPT-ANT-1. **Crop Science**, 43:1889-1890, 2003.

NANAMI, D.S.Y.; FRIAS, A.A.T.; CASTRO, S.A.L.; ELIAS, J.C.F.; LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Amendoim Cavalo. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:165-166, 2014.

NEMCHINOVA, Y.P.; STAVELY, J.R. Development of SCAR primers for the *Ur-3* rust resistance gene in common bean. **Phytopathology**, 88:S67, 1998.

NUNES MP, GONÇALVES-VIDIGAL MC, LACANALLO GF, COIMBRA GK. Comprehension of genetic variability and virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Abstracts, 2013.

PAN, Q.L.; LIU, Y.S.; BUDAI-HADRIAN, O.; SELA, M.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; FLUHR, R. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. **Genetics**, 155:309-322, 2000.

PARK, S.O.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R. Molecular markers linked to the *Ur-7* gene conferring specific resistance to rust in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42:31-32, 1999a.

PARK, S.O.; COYNE, D.P.; BOKOSI, J.M.; STEADMAN, J.R. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. **Euphytica**, 105:133-141, 1999b.

PARK, S.O.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R.; CROSBY, K.M.; BRICK, M.A. RAPD and SCAR markers linked to the *Ur-6* Andean gene controlling specific rust resistance in common bean. **Crop Science**, 44:1799-1807, 2004.

PARK, S.O.; CROSBY, K.M.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R. Development of a SCAR marker linked to the *Ur-6* gene for specific rust resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 46:189-190, 2003a.

PARK, S.O.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R.; SKROCH, P.W. Mapping of the *Ur-7* gene for specific resistance to rust in common bean. **Crop Science**, 43:1470-1476, 2003b.

PASTOR-CORRALES, M.A. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A. (eds.). **Frijol: Investigación y Producción**. Cali: CIAT, 1985. p. 172-180.

PASTOR-CORRALES, M.A. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, 81:694, 1991.

PASTOR-CORRALES, M.A. Traditional and molecular confirmation of the coevolution of beans and pathogens in Latin America. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 39:46-47, 1996.

PASTOR-CORRALES, M.A. The reaction of 19 bean rust differential cultivars to 94 races of *Uromyces appendiculatus* and the implication for the development of rust

resistance cultivars. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:103-104, 2001.

PASTOR-CORRALES M.A. Review of co-evolution studies between pathogens and their common bean hosts: Implication for the development of disease-resistant beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:67-68, 2004.

PASTOR-CORRALES, M.A. Inheritance of resistance in PI 260418 an Andean bean resistant to most races of the bean rust pathogen. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 48:134-135, 2005.

PASTOR-CORRALES, M.A.; AIME, M.C. Differential cultivars and molecular markers segregate isolates of *Uromyces appendiculatus* into two distinct groups that correspond to the gene pools of their common bean host. **Phytopathology**, 94:S82, 2004.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. **Plant Disease** 78:959-962, 1994.

PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M.; MOLINA, A.; SINGH, S.P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant Disease**, 79:63-67, 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A.; SHIN, S.H.; WOLF, J. Exceptional rust resistance in Mesoamerican common bean accession PI 310762. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 55:147-148, 2012.

PASTOR-CORRALES, M.A.; STAVELY, J.R. Using races of the common bean rust pathogen to detect resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:78-79, 2002.

PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.C. **Anthracnose**. p.77-104. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. Bean production problems in the tropics. CIAT. Second edition, 1989.

PHILLIPS, R.L. Plant genetics: out with the old, in with the new? **The American Journal of Clinical Nutrition**, 58:259S-63S, 1993.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.

QUEIROZ, V.T.; SOUSA, C.S.; COSTA, M.R.; SANGLAD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:249-250, 2004a.

QUEIROZ, V.T.; SOUSE, C.S.; SOUZA, T.L.P.O.; COSTA, M.R.; SANGLARD, D.A. REGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:271-272, 2004b.

RAGAGNIN, V.A.; SOUZA, T.L.P.O.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; COSTA, M.R.; ALZATE-MARIN, A.L.; CARNEIRO, J.E.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Development and agronomic performance of common bean families simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, 128:156-163, 2009.

RAMALHO, M.A.P. SILVA, G.S.; DIAS, L.A.S. Genetic plant improvement and climate changes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9:189-195, 2009.

RAPOSO, F.V.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Comparação de métodos de condução de populações segregantes do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:1991-1997, 2000.

REY, M.S.; BALARDIN, R.S.; PIEROBOM, C.R. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira Agrobiências**, 11:113-116, 2005.

RICHARD, M.M.S.; PFLIEGER, S.; SEVIGNAC, M.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; LI, Y.; JACKSON, S.A. GEFFROY, V. Fine mapping of Co-x, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 127:1653-1666, 2014.

RIVKIN, M.; VALLEJOS, C.; MCCLEAN, P. Disease-related sequences in common bean. **Genome**, 42:41-47, 1999.

ROSALES-SERNA, R.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; GONZÁLEZ-PAZ, M.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; MAYEK-PÉREZ, N. Genetic Relationships and diversity revealed by AFLP markers in Mexican common bean bred cultivars. **Crop Science**, 45:1951-1957, 2005.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; MENDÉZ-VIGO, B.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J.J.; GIRALDEZ, R. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Theoretical and Applied Genetics**, 114:713-722, 2007.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; FERREIRA, J.J.; CAMPA, A.; PAÑEDA, A.; GIRADLES, R. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:807-814, 2008.

SANDLIN, C.M. STEADMAN, J.R.; ARAYA, C.M.; COYNE, D.P. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. **Plant Disease**, 83:108-113, 1999.

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

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A. CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; ABERNATHY, B.; BARRY, K.; BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVIATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D.H.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.C.; ROKHSAR D.S.; JACKSON, S.A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, 46:707-713, 2014.

SHIN, S.H.; SONG, Q. CREGAN, P.B.; PASTOR-CORRALES, M.A. SSR DNA markers linked with broad-spectrum rust resistance in common bean discovered by Bulk Segregant Analysis using a large set of SNP markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:187-188, 2014.

SILVA, C.R.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; GARCIA, A.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A. Identification of a molecular marker linked to *Co-11* anthracnose resistance gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 52:46-47, 2009.

SINGH S.P. Production and Utilization. In: SINGH S.P. (ed). **Common bean improvement in the twenty-first century**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.1-24.

SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, 41:1659-1675, 2001.

SINGH, S.P.; NODARI, R.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. **Crop Science**, 31:19-23, 1991a.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 45:379-396, 1991b.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, 50:2199-2223, 2010.

SONNANTE G.; STOCKTON, T.; NODARI, R.O.; BECERRA-VELFISQUEZ V.L.; GEPTS, P. Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 89:629-635, 1994.

SOUSA, L.L.; GONÇALVES, A.O.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; FERNANDEZ, A.C.; AWALE, H.; KELLY, J.D. Genetic characterization and mapping of anthracnose resistance of common bean landrace cultivar Corinthiano. **Crop science**, 55:1-11, 2015.

SOUSA, L.L.; CRUZ, A.S.; VIDIGAL FILHO, P.S.; VALLEJO, V.A.; KELLY, J.D.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Genetic mapping of the resistance allele *Co-5²* to *Colletotrichum lindemuthianum* in the common bean MSU 7-1 line. **Australian Journal of Crop Science**, 8:317-323, 2014.

SOUZA, T.L.P.O.; ALZATE-MARIN, A.L.; DESSAUNE, S.N.; NUNES, E.S.; QUEIROZ V.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Inheritance study and validation of SCAR molecular marker for rust resistance gene in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:11-15, 2007.

SOUZA, T.L.P.O.; DESSAUNE, S.N.; SANGLARD, D.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Characterization of the rust resistance gene present in the common bean cultivar Ouro Negro, the main rust resistance source used in Brazil. **Plant Pathology**, 60:839-845, 2011.

STAVELY, J.R. Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. **Phytopathology**, 74:339-344, 1984.

STAVELY, J.R.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Rust**. In: Bean production problems in the tropics. SCHWARTZ H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.). Second edition. Cali, Colombia: CIAT, 1989. p. 159-194.

STAVELY, J.R. Genetics of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80:1056, 1990.

STAVELY, J.R. Recombination of two major dominant rust resistance genes that are linked in repulsion. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 41:17-18, 1998.

STAVELY, J.R.; KELLY, J.D.; GRAFTON, K.F. BelMiDak-Rust-Resistant Navy dry beans germplasm families. **Hortscience**, 29:709-711, 1994.

STEADMAN, J.R.; PASTOR-CORRALES, M.A.; BEAVER, J.S. An overview of the 3th Bean Rust and 2nd Bean Common Bacterial Blight International Workshops, march 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:120-125, 2002.

STEFANOVIĆ, S.; PFEIL, B.E.; PALMER, J.D.; DOYLE, J.J. Relationships among phaseoloid legumes based on sequences from eight chloroplast regions. **Systematic Botany**, 34:115-128, 2009.

TANG, H.; SEZEN, U.; PATERSON, A.H. Domestication and plant genomes. **Plant Biology**, 13:160-166, 2010.

TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Identification of a new chromosomal region involved in the genetic control of resistance to anthracnose in common bean. **The plant genome**, 8:1-11, 2015.

VALLAD, G.; RIVKIN, M.; VALLEJOS, C.; McCLEAN, P. Cloning and homology modelling of a Pto-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 103:1046-1058, 2001.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the *Co-5* locus in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 44:121-122, 2001.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. The use of AFLP analysis to tag the *Co-1²* gene conditioning resistance to bean anthracnose. Disponível em: http://www.intl-pag.org/pag/10/abstracts/PAGX_P233.html. **Plant and Animal genome X Conference 2002**, San Diego, CA, 2002.

VALLEJO, V.D. KELLY, J.D. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G 2333. **The Open Horticulture Journal**, 2:29-33, 2009.

VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A Molecular Marker-Based Linkage Map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, 131:733-740, 1992.

VIEIRA, C. **O feijoeiro comum**: cultura, doenças e melhoramento. Viçosa: Imprensa Universitária, 1967. 220p.

VOYSEST, O.; VALENCIA, M.C.; AMEZQUITA, M.C. Genetic diversity among Latin American Andean and Mesoamerican common bean cultivars. **Crop Science**, 34:1100-1110, 1994.

WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.; BIANCHETTI, L.B.; VALLS, J.F.M. Origem da agricultura, centros de origem e diversificação das plantas cultivadas. In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T. B. (eds.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 27-55.

WEBSTER, D.M.N.; AINSWORTH, P.M. Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap beans to *Uromyces appendiculatus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 113:938-940, 1988.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80:650-654, 1996a.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 121:37-41, 1996b.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common beans. **Crop Science**, 37:940-946, 1997.

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

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of Single Sequence Repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The American Genetic Association**, 91:429-434, 2000.

CHAPTER I

Population structure and genetic diversity of common bean in Brazil

ABSTRACT

Brazil is one of the largest producer and consumer of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the world. The cultivation of common bean occurs throughout the Brazilian territory, ranging from small to large farms, in diverse production systems and provides economic and social advantages. Brazil can be considered a secondary center of common bean diversification, and the landraces grown throughout Brazil are valuable sources of alleles and genes for common bean breeding programs and evolutionary studies. The objective of this study was to use informative Simple Sequence Repeats (SSR) markers to evaluate the genetic diversity and population structure of 109 accessions of common bean, including cultivars and landraces collected in the southern and central-western regions of Brazil. The population structure analysis based on 18 SSR markers demonstrates that the accessions can be separated into two distinct subpopulations, the Andean and the Mesoamerican, with some admixture observed according to Delta $K = 2$ groups. The optimal number of groups was found at $K = 5$, a level at which the Andean accessions were divided into two subpopulations and the Mesoamerican accessions into three subpopulations. Due to climate, farming systems and consumer preference, the Mesoamerican accessions are predominant in Brazil. Accordingly, the Andean accessions preserved in collections such as the Common Bean Gene bank (BGF) maintained by the Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) of the Universidade Estadual de Maringá (UEM), are an important source of genes for germplasm conservation programs and the development of common bean cultivars.

Keywords: Common bean landraces, gene bank, *Phaseolus vulgaris* L., Simple Sequence Repeat (SSR) markers.

1. INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important legume for direct human consumption (Schmutz et al., 2014); it is source of protein, fiber, iron, carbohydrates, vitamins and minerals for millions of people in developed and underdeveloped countries and is one of the basic foods for the populations of South America and eastern and southern Africa (Lin et al., 2008). Brazil, with a population of 191 million people, is one of the largest producer and consumer of common bean in the world (Blair et al., 2013). The combination of rice and common bean, which is popular throughout the Brazilian territory, is a basic food for most of the population. Together, rice and common bean provide all of the essential amino acids for the human body (Geil and Anderson, 1994).

The diversity of common bean is structured in two major eco-geographically distinct gene pools. The large-seeded Andean cultivars were originally distributed throughout the South American countries of Peru, Chile, Bolivia and Argentina, and the small to medium-seeded Mesoamerican cultivars comprise those distributed in Central America, from northern Mexico to Colombia (Gepts and Bliss, 1986; Singh et al., 1991). Following the initial domestication phase, cultivated common bean spread from Mesoamerica to South America and then to Europe and Africa after exploration of the Americas by Europeans (Gepts and Bliss, 1988; Gepts et al., 1988).

Although the routes of immigration events of common bean in Brazil remain unclear, some hypotheses can be postulated. Reports indicate that Andean genotypes were most likely introduced by indigenous Brazilian Guarani, who transported common bean seeds from Peru and Bolivia to Brazil. Regarding Mesoamerican genotypes, black bean, the second most cultivated variety in the country, may have been introduced through the Caribbean and Colombia, regions where black bean is common (Blair et al., 2013). Archeological data show that common bean was cultivated by native populations in Brazil prior to European colonization (Freitas, 2006); the later colonization of Brazil by the Portuguese also suggests a second immigrant flux of common bean. The Cranberry variety found in southern Brazil may have been introduced by Italian immigrants (Blair et al., 2013; Gepts et al., 1988).

The cultivation of common bean in Brazil is extremely diverse due to different environments, multiple production systems and farmer preferences (Bertoldo et al.,

2014; Coelho et al., 2007). Based on the success of common bean cultivation in Brazil, the country can be considered a secondary center for diversification (Burle et al., 2010). The success of a breeding program depends on the genetic diversity available to breeders (Hoisington et al., 1999) for developing genotypes highly adapted to distinct environments and production systems. The importance of plant breeding will likely increase in the future in an effort to feed a growing population demanding specific characteristics, and regard to reduce environmental effects due the use of agricultural inputs and climate change, specifically those associated with increases in temperature and water stress. The available evidence, particularly the degree of genetic diversity of common bean, suggests an opportunity for successful breeding programs (Ramalho et al., 2009; Raposo et al., 2000).

Among the resources available for plant breeding, landraces or local varieties are some of the most important sources of genetic diversity for allele preservation (Bertoldo et al., 2014). Defining the term landrace can be complex; however, Zeven (1998) suggests that a landrace is a variety with a high capacity to tolerate biotic and abiotic stress, resulting in high yield stability and an intermediate yield level under a low-input agricultural system. The major challenge related to the potential use of landraces in breeding programs is related to the careful work of collecting, maintaining, characterizing and evaluating these resources.

The Common Bean Gene Bank maintained at the Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) of the Universidade Estadual de Maringá (UEM) possesses important accessions, including cultivars and landraces obtained from small farmers in Brazil. Among these accessions are Pitanga, Jalo Vermelho, Jalo Listras Pretas, Corinthiano, Crioulo 159, Paloma, Amendoim Cavalo and Jalo Pintado 2 from small farms in the states of Paraná and Santa Catarina. These accessions were found to be important sources of new genes for resistance to anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi e Cavara (Gonçalves-Vidigal et al., 2008; 2009; 2012; Coelho et al., 2013; Castro et al., 2014; Frias et al., 2014; Nanami et al., 2014), and are being used to improve resistance to anthracnose in common bean cultivars.

The objectives of this study were to genotype and determine the level of population structure and genetic diversity in common bean accessions from the Nupagri Common Bean Gene Bank collection using Simple Sequence Repeat (SSR) markers.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

This study was developed at the Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) in the Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brazil. A total of 109 accessions of common bean currently maintained in the Nupagri Common Bean Gene Bank (BGF) were evaluated with a set of 18 microsatellites molecular markers (Table 1).

Table 1 - Germplasm identification, common name, type, gene pool and origin of the 109 accessions evaluated

BGF ID	Common name	Type	Gene pool	Origin
BGF 34	Preto III	Landrace	M	Paraná
BGF 35	Preto IV	Landrace	M	Paraná
BGF 36	Rosinha Paraná	Landrace	M	Paraná
BGF 37	Roxinho Paraná	Landrace	A	Paraná
BGF 38	Jalo Listra Pretas	Landrace	A	Paraná
BGF 39	Jalo Pardo	Landrace	A	Paraná
BGF 40	Jalo Pintado I	Landrace	A	Paraná
BGF 41	Jalo Pintado II	Landrace	A	Paraná
BGF 42	Jalo Mulato	Landrace	A	Paraná
BGF 43	Bolinha	Landrace	A	Paraná
BGF 44	Rosinha Opaco	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 45	Rosinha A	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 46	Rosinha B	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 47	Rosinha C	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 49	Roxinho A	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 50	Carioquinha Limpo	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 52	Mulatório Lustroso	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 53	Bico de Ouro A	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 54	Bico de Ouro B	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 55	Mulatinho Vagem Roxa A	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 56	Mulatinho Vagem Roxa B	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 57	Carioca Vagem Rosada	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 58	Rosinha	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 59	Manteiguinha	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 60	Uberabinha Preto	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 62	Jalo sem Cipó	Landrace	A	Mato Grosso do Sul
BGF 63	Carioca sem Cipó	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 64	Bodoquena	Landrace	A	Mato Grosso do Sul

Table 1, Cont.

BGF 66	Rosinha sem cipó	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 68	Manteiga com Cipó	Landrace	A	Mato Grosso do Sul
BGF 69	Carioca com Cipó	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 70	Bolinha	Landrace	A	Mato Grosso do Sul
BGF 71	Roxinho Mineiro	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 72	Preto Guamirim	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 74	Rosinha Guaicucos	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 75	Cara Suja	Landrace	M	Mato Grosso do Sul
BGF 76	Rio Tibagi	Cultivar	M	Introduzida Costa Rica
BGF 77	Aporé	Cultivar	M	Embrapa
BGF 82	Carnaval 1 SC	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 83	Carnaval 2 SC	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 84	Preto Brilhante	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 85	Preto SC	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 86	MSU 2003	Cultivar	A	EUA (Michigan)
BGF 87	Roxinho	Landrace	A	Paraná
BGF 88	Hinook 2000	Cultivar	A	EUA (Michigan)
BGF 90	Azulão Caxambú do Sul	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 92	Preto Precoce Cunha Porã	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 94	Crioulo Brilhoso	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 95	Crioulo 159	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 96	CF 75	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 97	FC 2016	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 99	FC 2045	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 100	Crioulo Brilhoso Ponte Serrada	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 103	FC 89	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 105	FC 117	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 106	FC 163	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 108	FC 2004	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 109	Preto Redondo FC 1193	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 110	Azulão ponte Serrada	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 111	Azulão Ab. Luz	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 112	Porto Real	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 113	Safira	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 114	Amendoim Cavalo	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 115	Vermelho Tozzo	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 116	Iratim	Landrace	M	Paraná
BGF 118	Carioca SC	Landrace	M	Santa Catarina
BGF 119	Jalo Listras Vermelhas	Landrace	A	Paraná
BGF 120	Rosa	Landrace	A	Paraná
BGF 121	Guarumbé	Landrace	M	Paraná
BGF 128	Jalo Precoce	Landrace	A	Paraná
BGF 138	Princesa	Landrace	M	Paraná
BGF 139	Jalo Vermelho	Landrace	A	Paraná
BGF 153	Mãezinha	Landrace	M	Paraná

Table 1, Cont.

BGF 154	Bolinha Rajado	Landrace	A	Paraná
BGF 155	Roxinho SC	Landrace	M	Paraná
BGF 161	Bolinha Vermelho	Landrace	A	Paraná
BGF 162	Bolinha amendoim	Landrace	A	Paraná
BGF 163	Branco PR	Landrace	A	Paraná
BGF 164	Roxo Mineiro	Landrace	M	Paraná
BGF 165	Jalo B	Landrace	A	Paraná
BGF 166	Branco Argentino	Landrace	A	Paraná
BGF 167	Cavalo	Landrace	A	Paraná
BGF 168	Preto Argentino	Landrace	M	Paraná
BGF 169	Roxinho PR	Landrace	M	Paraná
BGF 170	Uberabinha PR	Landrace	M	Paraná
BGF 172	Carnaval 1 PR	Landrace	A	Paraná
BGF 174	Bolinha 1 PR	Landrace	A	Paraná
BGF 188	Jalo A	Landrace	A	Paraná
BGF 194	Jalo	Landrace	A	Paraná
BGF 195	L9219	-	M	-
BGF 197	Jalo EEp558	Cultivar	A	Embrapa
BGF 198	Jalo Bordo	Landrace	M	Paraná
BGF 199	Feijão Cara Suja	Landrace	M	Paraná
BGF 200	Feijão Rosinha	Landrace	M	Paraná
BGF 201	Feijão Moro	Landrace	M	Paraná
BGF 203	Feijão Enxofre	Landrace	A	Paraná
BGF 204	Feijão Rosinha	Landrace	M	Paraná
BGF 205	Rosa	Landrace	M	Paraná
BGF 206	Guatambú	Landrace	A	Santa Catarina
BGF 208	Feijão Pernambuco 2	Landrace	M	Pernambuco
BGF 209	Feijão Carioca Mercado	Landrace	M	Pernambuco
BGF 210	Chita Fina	Landrace	A	Pernambuco
BGF 211	Fogo na Serra	Landrace	A	Pernambuco
BGF 214	Preto Argentino vagem roxa	Landrace	M	Paraná
BGF 215	BGF 215	Cultivar	M	Argentina
BGF 216	BGF 216	Landrace	A	Argentina
BGF 217	BGF 217	Cultivar	A	Argentina
BGF 218	BGF 218	Cultivar	A	Argentina
BGF 219	BGF 219	Cultivar	M	Argentina

The evaluated accessions were collected in different regions of Brazil, Argentina and United States (Figure 1). A total of 98 of the 109 accessions are landraces collected from small farms in the Brazilian states of Paraná (PR; 43), Santa Catarina (SC; 25), Mato Grosso do Sul (MS; 26) and Pernambuco (PE; 4). In addition, cultivars from Embrapa (3), Michigan State University (MSU; 2), Argentina (5) and a cultivar of unknown origin (1) were included in the evaluation.



Source: Google maps, 2014.
Figure 1 - Map of South America and Brazilian states.

2.2. Molecular characterization of the accessions

Young leaflets were collected from each accession and used for isolating total genomic DNA according to the protocol of Afanador et al. (1993), with modifications. DNA from the 109 accessions of common bean was used to perform genotyping with 18 SSR markers (Table 2); the selected markers cover both coding and non-coding regions of the common bean genome and are distributed among the 11 linkage groups of the common bean genome, except for that of Pv10, which is poor in SSR markers.

Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted as described in the original publications for the SSR markers (Yu et al., 2000; Gaitán-Solís et al., 2002; Blair et al., 2003; Blair et al., 2006; Grisi et al., 2007; McConnell et al., 2010). The PCR amplification products were visualized on 8% polyacrylamide non-denaturing gels, and staining of the DNA fragments was performed in gel with SYBR® Safe stain (Life Technologies™, Carlsbad, California, USA).

Table 2 - Description of the 18 SSR markers used to genotype 109 accessions of common bean

Marker	LG ¹	Motif	Type ²	Size (bp)	Reference
BM 146	1	(CTGTTG)4-(CTG)4-(TTG)3(CTG)3-(CTG)4	NC	281	Gaitán-Solís et al. (2002)
BMd-17	2	(CGCCAC)6	C	116	Blair et al. (2003)
BM 152	2	(GA)31	NC	127	Gaitán-Solís et al. (2002)
BM 164	2	(GT)9(GA)21	NC	182	Gaitán-Solís et al. (2002)
BMd-36	3	(TA)8	NC	164	Blair et al. (2003)
BMd-26	4	(GAT)6	C	141	Blair et al. (2003)
g 118	4	-	C	148	McConnell et al. 2010
BMd-20	5	(TA)5	C	123	Blair et al. (2003)
BMd-12	6	(AGC)7	NC	167	Blair et al. (2003)
BM 210	7	(CT)15	NC	166	Gaitán-Solís et al. (2002)
BMd-40	7	(AT)6	NC	197	Blair et al. (2003)
PvBr-233	7	(GA)4(AGAGA)3(AG)5	-	220	Grisi et al. (2007)
BMd-25	8	(GAT)6	C	118	Blair et al. (2003)
BM 188	9	(CA)18(TA)7	-	177	Gaitán-Solís et al. (2002)
Pv-at001	11	(TA)22	C	239	Yu et al. (2000)
BMd-33	11	(ATT)9	NC	110	Blair et al. (2003)
BMd-21	-	(CCT)6	C	190	Blair et al. (2003)
BMd-16	-	(CATG)4	C	136	Blair et al. (2003)

¹ Linkage Group; ² C – Coding region, NC – Non-coding region.

2.3. Data analysis

The population structure analysis was performed using the software Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) based on a Bayesian algorithm to categorize the accessions into *K* groups. The analysis was conducted by assigning 10,000 interactions as burn-in and performing 100,000 interactions using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method and 14 grouping simulations with the *K*-factor (number of groups in the population) ranging from 2 to 20.

To determine the optimal *K* groups, the "ΔK" parameter was estimated using the Structure Harvester program (Earl and von Holdt, 2012), as proposed by Evanno et al. (2005). The software GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2006) was used to estimate the allele frequencies per locus and to perform a principal coordinate (PCoA) analysis and analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). The statistical significance of the variances was tested using 999 random permutations at 1%. The genetic diversity of genes and alleles, the allele frequencies

and the Polymorphism Information Content (PIC) were calculated for each SSR locus using the Power Marker 3.25 software (Liu and Muse, 2005). A matrix based on the CS Chord distances (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) was used to develop a Neighbor Joining Tree in the software Mega version 6 (Tamura et al., 2007).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The SSR markers used to genotype 109 accessions of common bean from Brazil were spread across 10 of the 11 linkage groups of the common bean genome, including coding and non-coding regions (Table 3). The SSR markers produced a single fragment of the expected size, and the number of alleles per locus ranged from two to nine, with an average of four alleles per locus. In studies involving 279 common bean landraces from Brazil, Burle et al. (2010) found an average of six alleles per locus, whereas Blair et al. (2009) found an average of 18 alleles per locus when evaluating 604 accessions from the common bean CIAT collection. For the latter, the common bean samples were collected from many different regions worldwide, especially from the primary centers of origin of common bean.

Table 3 - Genetic diversity indices estimated for the 18 SSR loci

Marker	LG ¹	Type ²	No. Alleles	Mfa ³	GD ⁴	PIC ⁵
BM 146	1	NC	2	0.92	0.15	0.14
BMd-17	2	C	4	0.44	0.65	0.58
BM 152	2	NC	9	0.52	0.65	0.60
BM 164	2	NC	2	0.56	0.49	0.37
BMd-36	3	NC	7	0.49	0.59	0.51
BMd-26	4	C	4	0.51	0.56	0.47
g 118	4	C	2	0.56	0.49	0.37
BMd-20	5	C	4	0.49	0.54	0.44
BMd-12	6	NC	3	0.94	0.11	0.10
BM 210	7	NC	6	0.40	0.70	0.65
BMd-40	7	NC	3	0.53	0.51	0.39
PvBr-233	7	-	2	0.55	0.49	0.37
BMd-25	8	C	3	0.59	0.50	0.39
BM 188	9	-	2	0.74	0.38	0.31
Pv-at001	11	C	2	0.96	0.07	0.07
BMd-33	11	NC	6	0.56	0.52	0.42
BMd-21	-	C	2	0.99	0.02	0.02
BMd-16	-	C	2	0.57	0.49	0.37
Mean			4	0.63	0.44	0.36

^{1/} Linkage Group; ^{2/} C – Coding region; NC – Non-coding region; ^{3/} Most frequent allele; ^{4/} Genetic diversity; ^{5/} Polymorphism Information Content.

The highest allele frequency was found using the SSR marker BMd-21, with a single-allele frequency of 99% in the population. The second allele identified by the SSR marker BMd-21 was extremely rare, found only in BGF 90 (Azulão Caxambú do

Sul). The average genetic diversity for the 18 molecular markers was 0.44. An average of 0.46 markers were found to be located in non-coding regions (genomic markers), and an average of 0.41 in coding regions (gene-based markers). The genomic markers detected a slightly higher degree of gene diversity and average allele number when compared to the gene-based markers. In our study, the two markers with the lowest diversity were gene-based markers; similar results were reported by Diaz and Blair (2006) and Burle et al. (2010).

The Polymorphism Information Content (PIC) of the molecular markers, which is highly dependent on the number of alleles per locus and allele frequencies in the population (Botstein et al., 1980), ranged from high to low. The most informative markers (PIC values higher than 0.5) were BMd-17, BM 152, BMd-36 and BM 210. Markers with low PIC values (less than 0.25) were BM 146, BMd-12, Pv-at001 and BMd-21.

Based on $K = 2$ groups, the population structure analysis clearly showed that the common bean accessions from Brazil are distributed between two gene pools: the Andean and the Mesoamerican (Figure 2). Combinations of genes from both gene pools can also be observed.

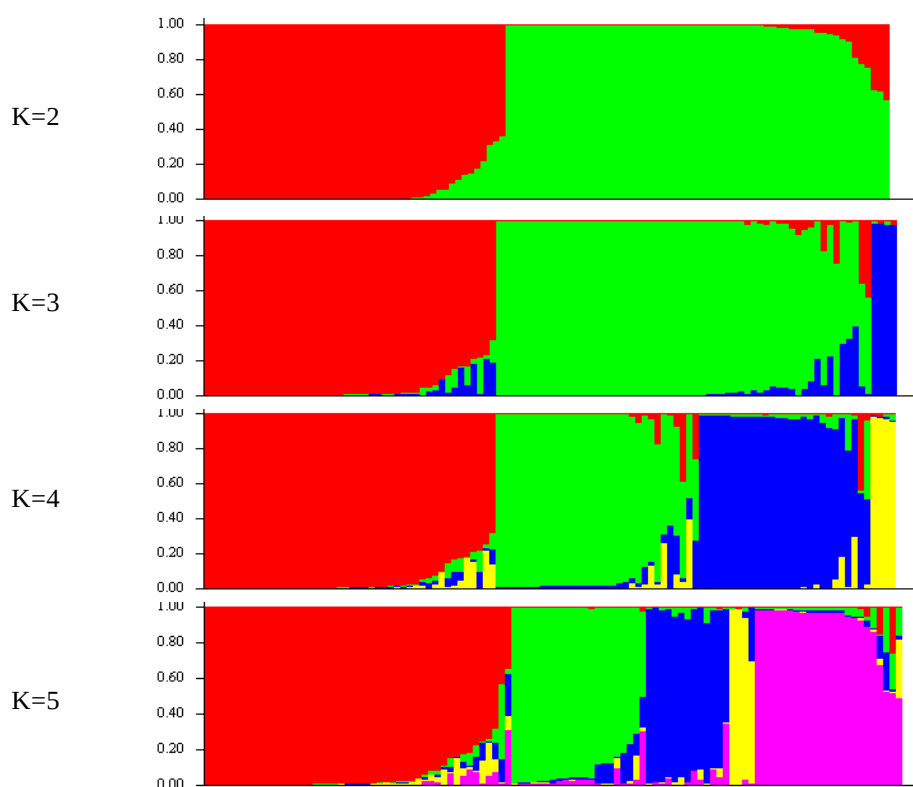


Figure 2 - Population structure of the 109 common bean accessions, assuming $K = 2$ to 5 groups, according to Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

At $K = 3$, four accessions were separated from the Andean (two accessions) and Mesoamerican (two accessions) groups. These four accessions are likely the result of hybridization between the two gene pools of common bean. For $K = 4$, the Mesoamerican accessions population was separated into two subpopulations, and three subpopulations resulting from the Mesoamerican group were formed at $K = 5$ groups.

According to a phaseolin analysis by Pereira and Souza (1992), two main types of phaseolin, S and T, are present in the common bean germplasm from Brazil. In that study, 80.6% of the accessions showed the pattern of phaseolin S, which was present in accessions with small seeds (Mesoamerican), and 19.4% of the accessions showed T-type phaseolin, which was characteristic of accessions with large seeds (Andean).

Additionally, the authors concluded that the accessions of both gene pools are distributed uniformly in common bean cultivation areas. Evaluating 279 common bean accessions geo-referenced in Brazil, Burle et al. (2010) found a clear distinction between Brazilian common bean accessions distributed into the two gene pools, with a predominance of Mesoamerican accessions.

Common bean from the Mesoamerican region is the most cultivated type in Brazil (Pereira and Souza, 1992; Pereira et al., 2009; Burle et al., 2010) as well as throughout Latin America, corresponding to approximately 84% of cultivated common bean (Beebe et al., 2000).

It is surprising that the Mesoamerican cultivars are prevalent in Brazil because the country is very close to the Andes. The predominance of Mesoamerican cultivars in Brazil may be due to multiple introductions of Mesoamerican germplasm. Similarities in climate and soil between Brazil and the Mesoamerican area may help explain the wide distribution of Mesoamerican bean germplasm in the country (Burle et al., 2010).

The optimal number of groups representing the population structure in this work was determined based on the Structure Harvester (Earl and von Holdt, 2012) program (Figure 3). According to the K value, the 109 accessions can be divided into five subpopulations. The population structure analysis assuming $K = 5$ showed that the common bean Andean accessions can be divided into two subpopulations, with the Mesoamerican accessions being divided into three subpopulations, as shown in Figure 4.

The subpopulation Andean 1 consists of 48 accessions, whereas the subpopulation Andean 2 consists of four common bean accessions. The Mesoamerican accessions were subdivided into three subpopulations. In this work, gene mixture between the Andean and Mesoamerican subpopulations was observed, as well as, mixture among the three Mesoamerican subpopulations.

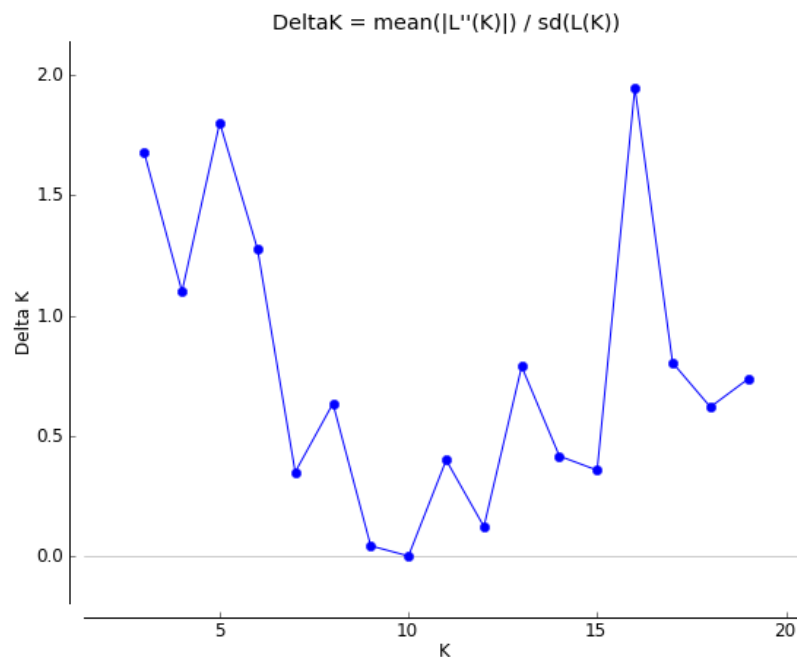


Figure 3 - Inference of the number of K groups for the 109 accessions according Pritchard et al. (2000), as obtained using the program Structure Harvester (Earl and von Holdt, 2012).

Blair et al. (2013) reported mixture between Andean and Mesoamerican subpopulations based on $K = 5$. However, Burle et al. (2010) identified intermediate accessions between Mesoamerican subpopulations and a low frequency of introgression between gene pools. Gene flow is an important feature of the genetic structure, occurring between common bean races, and it is evident between the Andean and Mesoamerican gene pools (Blair et al., 2007).

According to Blair et al. (2013), the inter-gene pool introgression process and the development of races in the Brazilian common bean germplasm may be quite advanced because of the number of generations of recombination between the gene pools. Thus, it is expected that Andean alleles were incorporated into the Mesoamerican germplasm and that Mesoamerican alleles were incorporated into the Andean germplasm.

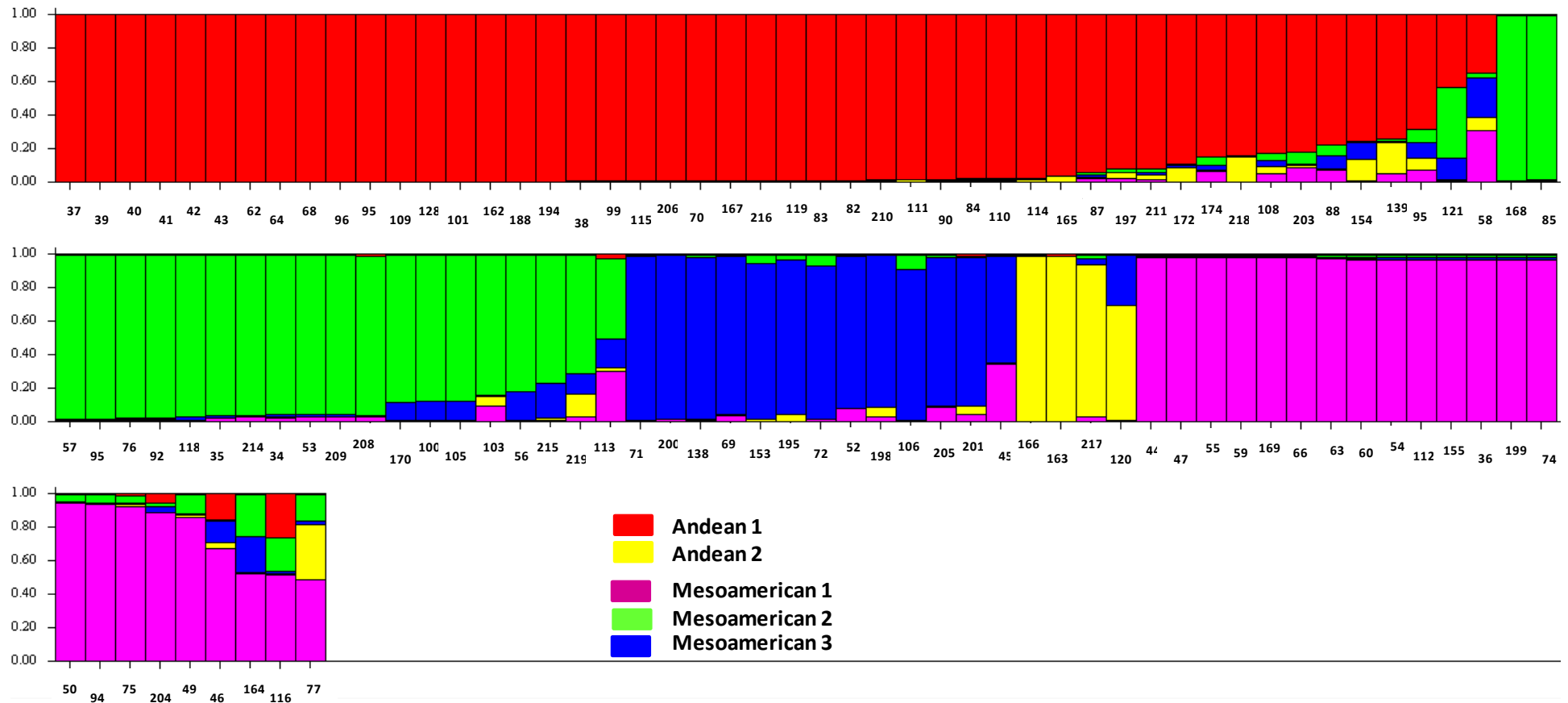


Figure 4 - Population structure of 109 common bean accessions, assuming the formation of $K = 5$ groups according to Structure 2.3.3 (Pritchard et al., 2000).

A neighbor joining tree was constructed, and groups were defined according to the corresponding color identified in the population structure analysis of $K = 5$ (Figure 5). The distribution of the common bean accessions shows the Andean and Mesoamerican identity of the Brazilian common bean germplasm as well as the presence of intermediate accessions, possibly the result of hybridization between the two gene pools. The concept of pure gene pools for the common bean germplasm from Brazil is not necessarily valid because many accessions are the result of introgression. For this reason, some Brazilian varieties, such as Jalo and Carioca, are not considered to be representative types of a respective gene pool (Blair et al., 2013).

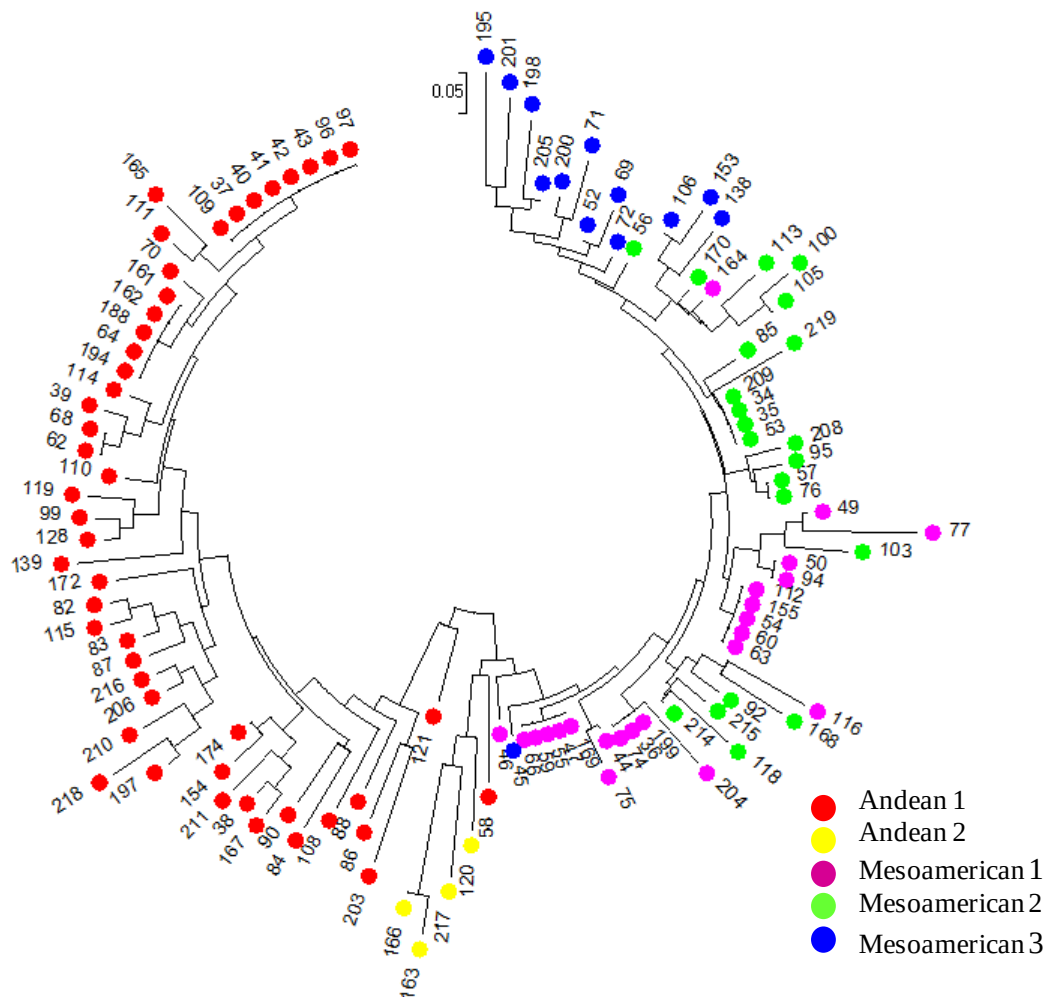


Figure 5 - Distribution of 109 common bean accessions based on 18 SSR loci obtained by the neighbor joining tree based on the genetic distance matrix of CS Chord (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967), assuming $K = 5$ groups (Pritchard et al., 2000).

The accessions included in the subpopulation 1 constitute a separated cluster containing Andean common bean, with a great diversity of seed color, as

yellow, purple, white, pink, purple, and even large black-seeded beans. The most part of the accessions included in the subpopulation 1 belong to the Nueva Granada race, represented mainly by Jalo and Roxo types of common bean. The Nueva Granada is precisely the main race represented in Brazil, and the presence of other races is difficult to confirm.

The sub-population Andean 2 is intermediate between the Andean and Mesoamerican accessions. It is possible that the four accessions BGF 120, BGF 163, BGF 166 and BGF 217 are the result of inter-gene pool hybridization; although they appear to be quite similar genetically to the Mesoamerican accessions, their seed weight characteristics demonstrate that they are more Andean. The characteristic 100-seed weight is 35.3, 49.1, 58.8 and 59.5 grams for BGF 120, BGF 163, BGF 166 and BGF 217, respectively. In this case, the number of molecular markers used was not sufficient to differentiate the subpopulations.

The Mesoamerican subpopulations 1 and 3 were very diverse groups among the three Mesoamerican subpopulations with many Preto, Carioca, Jalinho, Mulatinho and Roxinho seed types. The Mesoamerican subpopulation 2 was almost entirely made up of small-seeded Preto beans with very few different types of beans. The subdivision of the Brazilian sample in higher number of subpopulations deserves more investigation, by integrating other kinds of data, such as morphological and agronomic information as well as environmental information on local climate, vegetation, and soils.

According to the reports of Blair et al. (2013) and Burle et al. (2010), Mesoamerican cultivars are prevalent in the Brazilian territory. In this study, the Andean accessions were found to represent 46.29% of the total accessions evaluated, demonstrating that the common bean gene bank collection at Nupagri contains an interesting source of Andean accessions. The Nupagri collection presents a great source of genes for future use in common bean breeding programs, especially in the development of cultivars adapted to specific local (McCouch et al., 2013).

The principal coordinate analysis contributed to the interpretation of the results for genetic diversity and population structure.

Figure 6 shows the accession distribution in a two dimensions space based on the genetic distances. The first principal coordinate explains 71.5% of the variation among the accessions and is responsible for separating the Mesoamerican and

Andean accessions (Figure 6; Table 8). The second principal coordinate explains 7.2% of the total variation. Together, the two main components explain 78.7% of the variation.

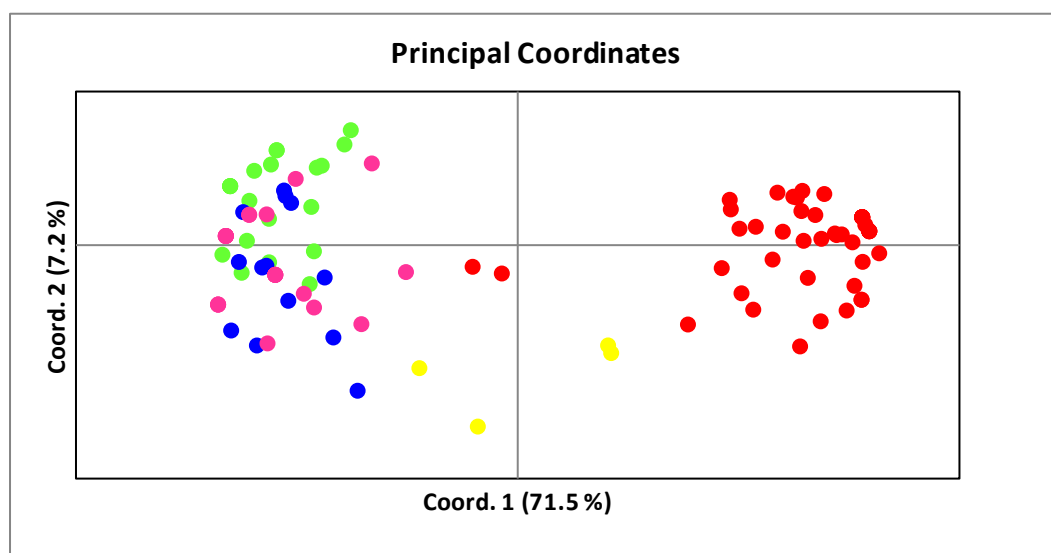


Figure 6 - Population structure among 109 common bean accessions based on the first two principal coordinates (Coord. 1 vs. Coord. 2).

The Mesoamerican accessions have a high genetic variability compared to the Andean accessions, as shown by the high dispersion of the points on the two-dimensional plane. The results from the principal coordinates analysis corroborate those of previous studies, demonstrating greater variability among the accessions from Central America than those from the Andes. Studies have shown that the center of origin of common bean is located in the central region of Mexico and was followed by migration events to the Andes, where domestication events occurred independently for each gene pool (Bitocchi et al., 2012).

Table 4 - Absolute and accumulated variation (%) by the first three principal coordinates for the 109 evaluated bean accessions

Variation	Principal Coordinates		
	1	2	3
Absolute %	71.50	7.21	6.96
Accumulated %	71.50	78.71	85.67

An AMOVA was conducted to quantify the variation among and within the groups. The greatest variability was allocated among the groups, at 66%. The

variation within the groups was 34%. The low variation within the groups indicates that the accessions in each group are highly similar to each other but differ from the accessions included in the other groups. The differentiation among the five corresponding groups can also be compared by the F_{ST} index, which estimates the genetic differentiation among groups. The obtained value of 0.67 indicates a high F_{ST} , differentiating the groups.

Table 5 - Analysis of molecular variance (AMOVA) of 109 common bean accessions based on $K = 5$ groups

Source	DF	SQ	QM	EV	%	Wright's F	p value
Among groups	4	1,027.21	256.80	12.95	66%	$F_{ST}=0.661$	0.01
Within groups	104	691.94	6.65	6.65	34%		
Total	108	1,719.16		19.60	100%		

DF – Degrees of freedom; SQ – Square Sum; QM – Mean square; EV – Estimated variance.

From a germplasm conservation perspective, the genetic variability among the accessions evaluated provides potential insurance for the conservation of *P. vulgaris* mainly from southern and central-western Brazil. With regard to breeding programs, our data reveal that the accessions maintained in the Nupagri gene bank represents a very diverse pool of alleles and genes that can be employed in breeding lines and cultivars. Additionally, the results demonstrate the potential utility of the accessions for developing common bean breeding cultivars for specific regions, such as in southern and central-western Brazil.

According to Kelly et al. (1998), we must recognize the current level of the improvement process the level we want to reach. These decisions can vary dramatically between among breeding programs. If the breeding program is focused exclusively on breeding lines, the lack of diversity in the germplasm used can be a limiting factor for progress in the breeding program.

4. CONCLUSIONS

The population structure and genetic diversity in the common bean accessions from Nupagri-UEM gene bank is distributed between the two distinguished gene pools: the Andean and the Mesoamerican. High differentiation between Andean and Mesoamerican gene pools was observed with presence of admixture among Mesoamerican subpopulations. Moreover, the accessions evaluated are important source of alleles for germplasm conservation programs and the development of common bean cultivars adapted to Southern and Central-Western regions of Brazil, considering the high significance of common bean production in the region.

5. REFERENCES

- AFANADOR, L.K., HALEY, S.D.; KELLY, J.D. Adoption of a 'mini-prep' DNA extraction protocol for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 36:10-11, 1993.
- BEEBE, S.; SKROCH, P.W.; TOHME, J.; DUQUE, M.C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, 40:264-273, 2000.
- BERTOLDO, J.G.; COIMBRA, J.L.M.; GUIDOLIN, A.F.; ANDRADE, L.R.B.; NODARI, R.O. Agronomic potential of genebank landrace elite accessions for common bean. **Scientia Agricola**, 71:120-125, 2014.
- BITOCCHI, E.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; ROSSI, M.; GIARDINI, A.; ZEULI, S.P.; LOGOZZO, G.; STOUGAARD, J.; MCCLEAN, P.; ATTENE, G.; PAPA, R. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 109:788-796, 2012.
- BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.V.P.; DÍAZ, L.M.; DEL PELOSO, M.J. Diversity and Population Structure of Common Bean from Brazil. **Crop Science**, 53:1983-1993, 2013.
- BLAIR, M.W.; DÍAZ, L.M.; BUENDÍA, H.F.; DUQUE, M.C. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 119:955-972, 2009.
- BLAIR, M.W.; DIAZ, J.M.; HIDALGO, R.; DIAZ, L.M.; DUQUE, M.C. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 116:29-43, 2007.

BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; BUENDIA, H.F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 113:100-109, 2006.

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1362-1374, 2003.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, 32:314-331, 1980.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:801-813, 2010.

CASTRO, S.A.L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; NANAMI, D.S.Y.; FRIAS, A.A.T.; FRANZON, R.C.; POLETINE, J.P.; LACANALLO, G.F.; GALVÁN, M.Z. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Paloma cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:163-164, 2014.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, 19:233-257, 1967.

COELHO, C.M.; COIMBRA, J.L.M.; SOUZA, C.A.; BOGO, A.; GUIDOLIN, AF. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, 37:1241-1247, 2007.

COELHO, R.T.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; LACANALLO, G.F.; DARBEN, L.M.; SILVA, C.R.; SOUSA, L.L.; CRUZ, A.S. Characterization of the anthracnose resistance gene in the Mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:43-44, 2013.

DÍAZ, L.M.; BLAIR, M.W. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:143-154, 2006.

EARL, D.A.; VON HOLDT, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4:359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131:479-491, 1992.

FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1199-1203, 2006.

FRIAS, A.A.T.; CASTRO, S.A.L.; NANAMI, D.S.Y.; LACANALLO, G.F.; SOUZA, M.C.M.; GALVÁN, M.Z.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Genetic analysis of anthracnose resistance in Jalo Pintado 2 dry bean cultivar. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:167-168, 2014.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M.C.; EDWARDS, K.J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus ssp.* **Crop Science**, 42:2128-2136, 2002.

GEIL, P.B.; ANDERSON, J.W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, 13:549-558, 1994.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, 40:469-478, 1986.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. **Economic Botany**, 42:86-104, 1988.

GEPTS, P., KMIECIK, K.; PEREIRA, P.; BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. **Economic Botany**, 42:73-85, 1988.

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

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, 49:133-138, 2009.

GRISI, M.C.M.; BLAIR, M.W.; GEPTS, P.; BRONDANI, C.; PEREIRA, P.A.A.; BRONDANI, R.P.V. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Research**, 6:691-706, 2007.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J.M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 96:5937-5943, 1999.

KELLY, J.D.; KOLKMAN, J.M.; SCHNEIDER, K. Breeding for yield in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, 102:343-356, 1998.

LIN, L-Z.; HARNLY, J.M.; PASTOR-CORRALES, M.A.; LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, 107:399-410, 2008.

LIU, K.J.; MUSE, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, 21:2128-2129, 2005.

McCONNELL, M.; MAMIDI, S.; LEE, R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M.; PAPA, R.; McCLEAN, P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 121:1103-1116, 2010.

McCOUCH, S.; BAUTE, G.J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P.K.; BUCKLER, E.; BURKE, J.M.; CHAREST, D.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R.L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C.M.; RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R.S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; KNAAP, E.V.D.; TASSEL, D.V.; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R.K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Agriculture: Feeding the Nuture. *Nature*, 499:23-24, 2013.

NANAMI, D.S.Y.; FRIAS, A.A.T.; CASTRO, S.A.L.; ELIAS, J.C.F.; LACANALLO, G.F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. Inheritance and allelic relationships of anthracnose resistance in common bean Amendoim Cavalo. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:165-166, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**, 6:288-295, 2006.

PEREIRA, T.; COELHO, S.M.M.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A.F.; MIQUELLUTI, D.J. Diversity in common bean landraces from south Brazil. **Acta Botanica Croatica**, 68: 79-92, 2009.

PEREIRA, P.A.; SOUZA, C.R.B. Tipos de faseolina em “raças” de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 27:1219-1221, 1992.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.

RAMALHO, M.A.P. SILVA, G.S.; DIAS, L.A.S. Genetic plant improvement and climate changes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9:189-195, 2009.

RAPOSO, F.V.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Comparação de métodos de condução de populações segregantes do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, 35:1991-1997, 2000.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 45:379-396, 1991.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A. CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; ABERNATHY, B.; BARRY, K. BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVIATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D.H.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.C.; ROKHSAR D.S.; JACKSON, S.A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, 46:707-713, 2014.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24:1596-1599, 2007.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of Single Sequence Repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, 91:429-434, 2000.

ZEVEN, A.C. Landraces: a review of definitions and classifications. **Euphytica**, 104:127-139. 1998.

CHAPTER II

Genetic linkage of *Ur-14* rust resistance gene and *Co-3⁴/Phg-3* anthracnose and angular leaf spot resistance gene cluster in the common bean cultivar Ouro Negro

ABSTRACT

Rust caused by *Uromyces appendiculatus*, anthracnose (ANT) caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, and angular leaf spot (ALS) caused by *Pseudocercospora griseola* are some of the most widespread diseases of the common bean in the tropics. The most cost-effective strategy for controlling rust, ANT and ALS in common bean is use resistant cultivars. The Ouro Negro cultivar carries the rust resistance gene *Ur-14* and the gene cluster, *Co-3⁴/Phg-3*, that confers resistance to anthracnose and angular leaf spot. In this study, we elucidate the genetic association between *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci in the common bean cultivar Ouro Negro. A co-segregation test was conducted using 105 F_{2:3} families from Rudá × Ouro Negro cross which were phenotyped independently for their reaction to the rust and anthracnose pathogens. The location of *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci in the common bean genome was determined using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping, followed by mapping of the F_{2:3} families segregating for resistance to rust and anthracnose, using Simple Sequence Repeat (SSR) markers. A total of 104 F_{2:3} families exhibited similar co-segregation of resistance and susceptibility to both pathogens, indicating that *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes are closely linked. Genetic mapping of 18 polymorphic SSR markers revealed that *Ur-14* is linked in coupling phase at distance of 0.5 cM from the *Co-3⁴/Phg-3* loci on Pv04. The close proximity of the SSR markers to the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci indicate potential utility of these markers for marker-assisted selection in common bean breeding programs wanting to use these three disease resistance genes.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, Co-segregation analysis, *Pseudocercospora griseola*, Simple Sequence Repeats, Single Nucleotide Polymorphism, *Uromyces appendiculatus*.

1. INTRODUCTION

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the world's most important grain legume for direct human consumption. This crop is cultivated in numerous countries around the world, particularly in tropical and sub-tropical areas. Several factors affect common bean yield, among which the incidence of diseases is the biggest one. There are many pathogens that infect common bean plants causing economically significant yield losses to common bean producers. The common bean rust caused by *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger., anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi e Cavara, and angular leaf spot caused by *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous and Braun, are the three most important fungal diseases of common beans worldwide (Allen et al., 1989). Although rust, anthracnose and angular leaf spot diseases show worldwide distribution, they cause greater losses in production in temperate and subtropical zones, where relatively cool and humid conditions favor disease development (Pastor-Corrales et al., 1995; Stavely and Pastor-Corrales, 1989).

The most effective strategy to control the pathogens that cause common bean rust, anthracnose and angular leaf spot is the use of resistant cultivars that can reduce disease losses without the negative environmental impact caused by fungicide application (Miklas et al., 2006). However, the strength of the resistance is complex, and pathogens such as *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* and *P. griseola* show high diversity in their virulence (Pastor-Corrales and Tu, 1989; Stavely et al., 1994). A multitude of races of the rust, anthracnose and angular leaf spot pathogens have been reported. These races are differentiated by the reaction grade that each elicits on 12 differential cultivars (Pastor-Corrales et al., 1991; Pastor-Corrales and Jara, 1995; Steadman et al., 2002).

Correspondingly, several genes with race-specific resistance to the rust, anthracnose and angular leaf spot pathogens have been identified, named and mapped in different linkage groups in the common bean genome (Kelly and Vallejo, 2004; Miklas et al., 2006; Rodríguez-Suárez et al., 2007). Some resistance genes for many diseases of the common bean are organized in complex clusters comprising many tightly linked genes that are often located at the end of the chromosomes (Kelly et al., 2003; Kelly and Vallejo, 2004; Geffroy et al., 2009; Schmutz et al., 2014). Indeed, three large clusters expressing a number of resistance genes located at the

ends of chromosomes have been identified on Pv04, Pv10 and Pv11 of the *Phaseolus vulgaris* genome (Schmutz et al., 2014). Among those, one of the most complex disease-resistance clusters has been identified at the end of the short arm of chromosome Pv04 and contains a large number of genes that confer resistance to various common bean pathogens (Geffroy et al., 2009; Richard et al., 2014).

Previous reports indicate that the Ouro Negro cultivar carries a single dominant rust-resistance gene, *Ur-14* (Souza et al., 2011), and the gene cluster *Co-3⁴/Phg-3*, that confer resistance to anthracnose and angular leaf spot (Gonçalves-Vidigal et al., 2013). The Ouro Negro cultivar was developed by CIAT (Cali, Colombia) and was introduced in Brazil by Embrapa in 1991 (Alzate-Marin et al., 2003; Souza et al., 2011). Ouro Negro is a black-seeded common bean cultivar that is highly productive, exhibits excellent agronomic and cooking characteristics, and is an important source for disease-resistance genes in Brazil. Moreover, Ouro Negro has a very broad spectrum of resistance for many races of *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* and *P. griseola* (Faleiro et al., 2003).

Interestingly, the resistance genes for anthracnose (*Co-3⁴*), rust (*Ur-14*) and angular leaf spot (*Phg-3*) in Ouro Negro are closely located in the linkage group Pv04 (Corrêa et al., 2000; Gonçalves-Vidigal et al., 2013). According to Gonçalves-Vidigal et al. (2013), the *Co-3⁴* and *Phg-3* resistance genes in Ouro Negro are tightly linked to the marker g2303 at a distance of 0.0 cM on chromosome Pv04. Similarly, studies performed by Faleiro et al. (2000a) reported that the *Ur-14* and *Co-3⁴* genes are 12.3 cM apart on the same chromosome; consequently, these genes do not segregate independently.

Because the *Ur-14* gene and the *Co-3⁴/Phg-3* cluster are adjacent in the linkage group Pv04 and cannot segregate independently, developing molecular markers that flank these resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot will be an important contribution to common bean breeding programs around the world and especially in Brazil, where the Ouro Negro cultivar has been prominently used to develop resistant cultivars (Alzate-Marin et al., 2003).

The objectives of this present study were (a) to investigate the co-segregation between *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* resistance genes for rust and anthracnose/angular leaf spot using F_{2:3} families from Rudá × Ouro Negro cross phenotyped independently for their reactions to the rust and anthracnose pathogens, (b) to investigate the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* candidate position on the common

bean genome using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping of the $F_{2:3}$ families, (c) to designed Simple Sequence Repeat (SSR) markers in the candidate region containing *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes present in Ouro Negro and (d) to validate the SSR markers linked to *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes in the $F_{2:3}$ families from Rudá × Ouro Negro cross.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

Co-segregation analysis for rust resistance gene *Ur-14* and the anthracnose/angular leaf spot resistance loci *Co-3⁴/Phg-3* were performed using $F_{2:3}$ families from Rudá × Ouro Negro cross. The Ouro Negro cultivar has *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* resistance genes conferring resistance to races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus* and race 73 of *C. lindemuthianum*, respectively. However, Rudá cultivar is susceptible to all races of the two pathogens mentioned above.

The F_1 seeds from Rudá × Ouro Negro cross were produced at the Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) of the Universidade Estadual de Maringá (UEM), state of Paraná, Brazil. From the Rudá × Ouro Negro F_1 plants, a total of 105 F_2 seeds were obtained, which were sown to generate the $F_{2:3}$ families. The $F_{2:3}$ families, corresponding to F_3 seeds obtained by self-fertilizing individual F_2 plants, were used to characterize phenotypically the corresponding F_2 plants. The dominant violet flower trait, inherited from the resistant male parent Ouro Negro was observed in the F_1 plants, confirming they were hybrids.

Disease evaluations for rust and anthracnose on $F_{2:3}$ families from the Rudá × Ouro Negro cross were conducted at the Soybean Genomics and Improvement Laboratory of the USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center in Beltsville, MD. The $F_{2:3}$ families were tested for the rust and anthracnose pathogens independently, using 12 plants to evaluate the rust reaction and another 10 plants from each line to evaluate the reaction of the $F_{2:3}$ families to anthracnose disease as described by Gonçalves-Vidigal et al. (2001).

2.2. Rust resistance evaluation

Twelve seeds from each of the $F_{2:3}$ families of the Rudá × Ouro Negro cross, 20 seeds of each parent: Rudá and Ouro Negro, and eight seeds of each check: Pinto 114, Aurora (*Ur-3*), Early Gallatin (*Ur-4*), Golden Gate Wax (*Ur-6*) and PI 181996 (*Ur-11*) were sown in pots and maintained under greenhouse conditions at $20 \pm 5^\circ\text{C}$. When the primary leaves showed 2/3 of their full development, the plants were inoculated with races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus*.

Races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus* were obtained from the *Uromyces appendiculatus* collection of the USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center and were maintained under low humidity at -80°C. The inoculum solution was prepared by dilution of the *U. appendiculatus* spores in distilled water containing Tween 20 to obtain 2×10^4 uredospores mL⁻¹. The inoculation was performed using a cotton swab to apply the spore solution to the underside of the primary leaves of each plant. After inoculation, the plants were transferred to a mist chamber (20 ± 1°C, relative humidity >95%) and maintained in darkness for 18 h. After that period, the plants were transferred to the greenhouse, where they were kept for 14 days before evaluation.

Evaluation of symptoms was conducted based on the six-degree scale proposed by Stavely et al. (1983), where 1 = immune, no visible symptoms; 2 = necrotic spots without sporulation (hyper sensibility); 2+ = necrotic spots 300-1,000 µm (1 mm) in diameter; 2++ = necrotic spots 1-3 mm in diameter; 2+++ = necrotic spots larger than 3 mm in diameter; 3 = tiny sporulating pustules less than 300 µm in diameter; 4 = sporulating pustules 300-500 µm in diameter; 5 = sporulating pustules 500-800 µm in diameter; and 6 = sporulating pustules larger than 800 µm in diameter. Individual plants that presented degrees of three or less were classified as resistant, whereas those that predominantly showed degree four or higher were considered susceptible.

2.3. Anthracnose resistance evaluation

Ten seeds from each of the F_{2:3} families of the Rudá × Ouro Negro cross, 20 seeds from each parent: Rudá and Ouro Negro, and ten seeds from each check: Michelite (Co-11) and Cornell 49-242 (Co-2) were sown in trays and maintained under greenhouse conditions at 20 ± 5°C. After the expansion of their first trifoliolate leaf, the plants were inoculated with race 73 of *C. lindemuthianum*.

The *C. lindemuthianum* race 73 used in this work was obtained from the mycology collection of Nupagri. The pathogen cultivated in petri dishes containing potato dextrose agar medium were transferred to young pods in test tubes and incubated at 22°C for 14 days in darkness to permit sporulation. Spore suspensions were adjusted to 1.2×10^6 conidia mL⁻¹ and the inoculation was performed using an AirBrush-Depot compressor model TC-20. The plants were transferred to a mist

chamber for 48 h at a temperature of $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with 12 h of daylight, 12 h of darkness and relative humidity $>95\%$. After that period, plants were transferred to a greenhouse at $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, where they were kept for 14 days before evaluation.

Anthrachnose symptoms were evaluated according to the severity scale proposed by Pastor-Corrales et al. (1995) with scores of 1-9, where 1 = plants with no visible symptoms; 2 = few isolated small lesions on mid-veins in the lower leaf surface; 3 = higher frequency of small lesions on mid-veins in the lower leaf surface; 4 = lesions present in the mid-vein and occasionally in secondary leaf veins; 5 = many small lesions scattered on middle and secondary veins; 6 = many small lesions as described in grade 5 in the lower and upper leaf surface and in the stems and petioles; 7 = large lesions scattered over the leaf blade and many lesions in the stems and petioles; 8 = many large coalesced lesions accompanied by tissue breakdown and chlorotic or abscised leaflets, reduced plant growth, and many lesions in stems and petioles; and 9 = severely diseased or dead plants. Plants with disease reaction scores between one and three were considered resistant, whereas those whose scores were predominantly four or higher were considered susceptible.

2.4. Single Nucleotide Polymorphism assay

The molecular analyses on the $F_{2:3}$ families from Rudá x Ouro Negro were performed at the Soybean Genomics and Improvement Laboratory of the USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center in Beltsville MD. Leaf tissue from 10 F_3 plants representing each $F_{2:3}$ family were collected, bulked and used for subsequent DNA extraction as described by Keim et al. (1988).

Total genomic DNA was isolated from the $F_{2:3}$ families and parents using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. The DNA was quantified using 1.5% agarose gel (Agarose SFR, Amresco) with TBE buffer (Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid) and stained with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide.

The DNA samples from the 105 $F_{2:3}$ families and the corresponding parents Rudá and Ouro Negro were screened for 5,399 SNP DNA markers on the BARCBear6K_3 Illumina BeadChip by following the Infinium HD Assay Ultra Protocol (Illumina, Inc. San Diego, CA). The BeadChip was imaged using the Illumina BeadArray Reader to measure fluorescence intensity. Automatic allele calling for

each locus was performed with the GenomeStudio Genotyping Module v1.8.4 (Illumina, San Diego, CA).

All allele call data were manually checked, and positive markers for *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* were recorded when a SNP was polymorphic between Rudá and Ouro Negro, susceptible F_{2:3} families clustered tightly with Rudá, resistant F_{2:3} families clustered tightly with Ouro Negro, and heterozygosity in the GenomeStudio output appeared phenotypically intermediate in the resistant and susceptible groups, demonstrating the presence of two alleles in the same F₂ plant.

2.5. Generating and testing simple Sequence Repeats Markers

When the segregation of the F_{2:3} families appeared to identify a SNP associated with the resistance genes *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3*, the SNP-containing DNA sequence that was used in the development of the Illumina Infinium SNP detection assay was aligned to the common bean genomic DNA sequence (*Phaseolus vulgaris* V1.0) at Phytozome, DOE, JGI (<http://www.phytozome.net>) by using standalone Megablast (Morgulis et al., 2008) at stringency of W = 50 and p = 95 to determine the genomic positions of the SNPs.

The sequence scaffold to which a SNP-containing sequence had aligned was then interrogated for the presence of SSRs using the Perl script “MISA” (Thiel et al., 2003) as described by Song et al. (2010). Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed for the flanking sequence of SSRs using Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

The loci containing the SSR sequences were amplified from the genomic DNA of the parents Rudá and Ouro Negro. Polymerase chain reaction mixes were performed with 30 ng of genomic DNA, 0.25 mM of forward and reverse primers, 1 X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM KCl, 2 mM each dNTP, 10% glycerol, 15 mM MgCl₂ and 20 ng/μl of single-strand binding protein (SSB)) and 0.1 unit of Taq DNA polymerase.

The PCR cycle consisted of 3 min at 92°C and 38 cycles of 50 s at 90°C, 45 s at 58°C and 45 s at 72°C, followed by a 5 min extension at 72°C and a hold at 10°C. The resulting PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels (Agarose SFR, Amresco) with 1x TBE buffer (Tris-borate-EDTA) and were stained with 1 μg mL⁻¹ ethidium bromide.

2.6. Mapping of *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* resistance genes

SSRs that distinguished the two parents Rudá and Ouro Negro were further used to analyze the 105 F_{2:3} families from the Rudá x Ouro Negro cross. Chi-square tests were used to determine the closeness to phenotypic and genotypic 1:2:1 ratios for the segregation of the rust and anthracnose/angular leaf spot single resistance genes in the F_{2:3} families. Linkage between the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci and the SSR markers was determined using JoinMap 4.1 (van Ooijen, 2011) software. Default settings for the Regression Mapping algorithm based on the Kosambi map function were used to define linkage order and distances (cM). A minimum likelihood of odds (LOD) ≥ 3.0 and a maximum distance of ≤ 50 cM were used to test linkage among markers.

3. RESULTS

The 105 F_{2:3} families from a cross between Rudá × Ouro Negro were inoculated separately with races 73 of *C. lindemuthianum* and races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus*, which Ouro Negro cultivar is resistant and Rudá cultivar is susceptible.

The segregation patterns for the rust and anthracnose resistance genes present in Ouro Negro fit the model of 1RR:2RS:1S in the F_{2:3} families (Table 1), suggesting the single, dominant genes *Ur-14* and *Co-3⁴* control resistance to rust and anthracnose, respectively, in the Ouro Negro cultivar. The rust resistance gene *Ur-14* showed segregation of 29RR:51Rr:25rr (*P* value = 0.82), while the anthracnose resistance gene *Co-3⁴* showed segregation of 29RR:50Rr:26rr (*P* = 0.81).

Table 1 - Observed and expected reactions of the Rudá (susceptible) and Ouro Negro (resistant) cultivars and of the F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross inoculated with races 73 of *C. lindemuthianum* and races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus* for the characterization of the resistant genes *Co-3⁴/Phg-3* and *Ur-14* in the Ouro Negro cultivar

Parental Cross	Generation	Observed ratio (RR:RS:SS)	Expected ratio (1RR:2RS:1SS)	χ^2	P value (2 df)
Race 73 of <i>C. lindemuthianum</i> , the anthracnose pathogen of the common bean					
Rudá	SP	0:0:20			
Ouro Negro	RP	20:0:0			
Rudá × Ouro Negro	F _{2:3}	29:50:26	26.25:52.5:26.25	0.41	0.81
Races 41, 47, 53 and 58 of <i>U. appendiculatus</i> , the rust pathogen of the common bean					
Rudá	SP	0:0:20			
Ouro Negro	RP	20:0:0			
Rudá × Ouro Negro	F _{2:3}	29:51:25	26.25:52.5:26.25	0.39	0.82

SP: susceptible parent; RP: resistant parent.

Previous co-segregation analysis reported an association between the resistance genes *Co-3⁴* and *Phg-3* (Gonçalves-Vidigal et al., 2013). The two genes are tightly associated and segregate as a cluster, the *Co-3⁴/Phg-3*. The 26 SNPs found to be positive for the F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross are located within an approximately 0-to-6.043 cM region in the linkage group Pv04, between the SNP markers ss715649768 and ss715650012 (Table 2).

Table 2 - SNPs positive for *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* in the F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross and the Rudá (susceptible) and Ouro Negro (resistant) parents

Index	BARCBEAN_3 6K SNP BeadChip id	SNP (NCBI ss#)	Physical position	SR F ₂ position (cM) ^{1/}
3659	sc01018ln115966_106370_T_G_313096321	ss715649768	11168	0.000
3666	sc01018ln115966_70654_C_T_313060605	ss715649777	46027	
3665	sc01018ln115966_61123_T_C_313051074	ss715649776	55042	
3664	sc01018ln115966_44630_G_T_313034581	ss715649774	70941	
3662	sc01018ln115966_24966_G_T_313014917	ss715649772	90666	
3661	sc01018ln115966_19464_C_T_313009415	ss715649771	96165	
2798	sc00518ln214431_198345_A_G_234724012	ss715640025	212864	3.072
2796	sc00518ln214431_184546_G_T_234710213	ss715640024	226600	
2795	sc00518ln214431_184086_T_C_234709753	ss715648681	227060	
2801	sc00518ln214431_55133_G_A_234580800	ss715648686	354682	
4624	sc02129ln45314_28919_T_C_393730134	ss715642306	447225	
3387	sc00835ln140787_9412_T_G_289590719	ss715649436	487659	
3388	sc00835ln140787_95095_C_T_289676402	ss715649437	575006	3.072
1271	sc00112ln569344_161308_A_C_97880308	ss715646891	1147939	3.072
1272	sc00112ln569344_169213_G_A_97888213	ss715646892	1155846	3.072
1273	sc00112ln569344_179490_C_T_97898490	ss715646893	1165722	
1280	sc00112ln569344_454416_G_A_98173416	ss715646903	1433996	
1282	sc00112ln569344_502760_T_G_98221760	ss715646908	1485804	
2037	sc00283ln338214_62016_G_T_171470170	ss715647821	1728453	
2028	sc00283ln338214_166029_A_G_171574183	ss715647807	1833878	
2031	sc00283ln338214_224160_C_T_171632314	ss715647813	1889393	4.671
2032	sc00283ln338214_239137_G_A_171647291	ss715647815	1904372	
2034	sc00283ln338214_293493_T_C_171701647	ss715647818	1953313	
3855	sc01149ln100495_6599_A_G_327155775	ss715650013	2000276	5.853
3853	sc01149ln100495_32702_T_C_327181878	ss715650010	2026101	6.043
3854	sc01149ln100495_48819_A_G_327197995	ss715650012	2042216	

^{1/} Linkage position (cM) of markers in the Stampede × Red Hawk (SR) F₂ population (Song et al., 2015).

The 105 F_{2:3} families and the Rudá and Ouro Negro parents genotyped with the BARCBEAN6K_3 SNP BeadChip revealed a total of 26 positive SNPs among the 5,399 SNPs screened in the 105 F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross. Positive SNPs were determined when: 1) the families susceptible to rust and anthracnose/angular leaf spot were tightly linked to the susceptible parent Rudá; 2) the families resistant to rust and anthracnose/angular leaf spot were tightly linked to the resistant parent Ouro Negro; and 3) the resistant heterozygous families were located between the susceptible and resistant F_{2:3} families and parents. Eighteen SSR were designed for the region harboring *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* (Table 3).

Table 3 - SSR markers linked to *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* on Pv04 and based on the SNP assay information and segregation in the F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross

SSR BARC ID	Motif	Left primer sequence	Right primer sequence	Product Size	SSR physical start position	SSR physical end position
BARCPVSSR04557	(TA)5	TCCAATTTGCGAGAGAGTGA	TGAGTCTCTTTGCTTTGCAATTA	285	28835	28844
BARCPVSSR04558	(AT)22	TCGTGCGACCACTTATATTG	TCATGTCATTGTTGAACA	299	50451	50757
BARCPVSSR04561	(AT)19	TTGGTGTTGATATCGAGGCA	GTTCTGGGAAGCAGAGGTTG	178	63888	63925
BARCPVSSR04562	(AT)12	CCATCGCATCACTGGTATTG	GGCCATCTGCTACAGTCCA	234	77702	77934
BARCPVSSR04569	(AT)15	AACAAAAGCACAGTCCACA	GCAGCATTGGTTAATACTTCCAG	285	245930	246186
BARCPVSSR04570	(TA)12	CCCCATTAAGGTAATGAAAAGC	TCTCAAAGACGGGGCATAAC	234	246235	246258
BARCPVSSR04574	(AT)11	CCCGATAAACTGGAACCAAA	ACCCCGGAAGAGATTTCAAG	278	349184	349461
BARCPVSSR04581	(AT)17	TGAATGATCATAATAACAAGACACAA	TGGTCATGATTTCTTATCCACAA	275	1033805	103413
BARCPVSSR04590	(AT)15	CCATACTGCCACCATGATTT	TTTTTCCCACATTCACCTCA	229	1196420	119644
BARCPVSSR04592	(TA)11	TTGATAATGAGTCATCCAAATCA	AAGAGAGCTCCAAAATCCACA	192	1202290	120231
BARCPVSSR04595	(AT)13	GGCTTCTTCTCCACACCATC	TGCAATTCGTACACACACACA	227	1225350	122537
BARCPVSSR04596	(AT)10	TGAACAATATCGTGCGAAAAA	GGCCACTCAAAATTTCAAACA	287	1230785	123080
BARCPVSSR04599	(AT)21	CAATTAAGGCACTACATTCACCA	TTGCACCAGAAAAGAAAAATGA	177	1259372	125941
BARCPVSSR04605	(AT)13	AACTATTTTGCATGGCCCTT	CGTTTCAACTGCAACTCCAA	288	1472186	147221
BARCPVSSR04607	(TA)10	TGGGAGACAGAGGAACACAC	TCAATACTCACACAGTTTGCATGT	200	1493480	149367
BARCPVSSR04617	(AT)10	CCGTTCAATTTTGAAGGACT	TGCATGTAGACCAAGTACAATGTG	206	1802355	180256
BARCPVSSR04619	(TA)11	GGCCCAATTCTTTTCTACCA	TTAAAACCGGCACTATTTGATT	297	1859540	185983
BARCPVSSR04626	(TA)11	TGATTCATGTTGCGAATCAAA	GGATGAAAACAATCCCAACAC	266	2018023	201828

In this work, the co-segregation study of the *Ur-14* gene and the *Co-3⁴/Phg-3* gene cluster in the F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross showed the identical phenotypes for rust and anthracnose/angular leaf spot diseases in 104 of the F_{2:3} families. In other words, the families that showed homozygous resistance to the rust pathogen also showed homozygous resistance to the anthracnose pathogen. Similarly, the F_{2:3} families that showed homozygous resistance or susceptibility to the rust pathogen also showed homozygous resistance or susceptibility to the anthracnose pathogen, respectively. The remaining F_{2:3} family showed different resistance or susceptibility for the rust and anthracnose pathogens suggesting the presence of recombination between the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci. As previously reported by Faleiro et al. (2000a), our data confirm that the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci present in Ouro Negro are closely associated at a distance of are 0.5 cM and do not segregate independently (Figure 1).

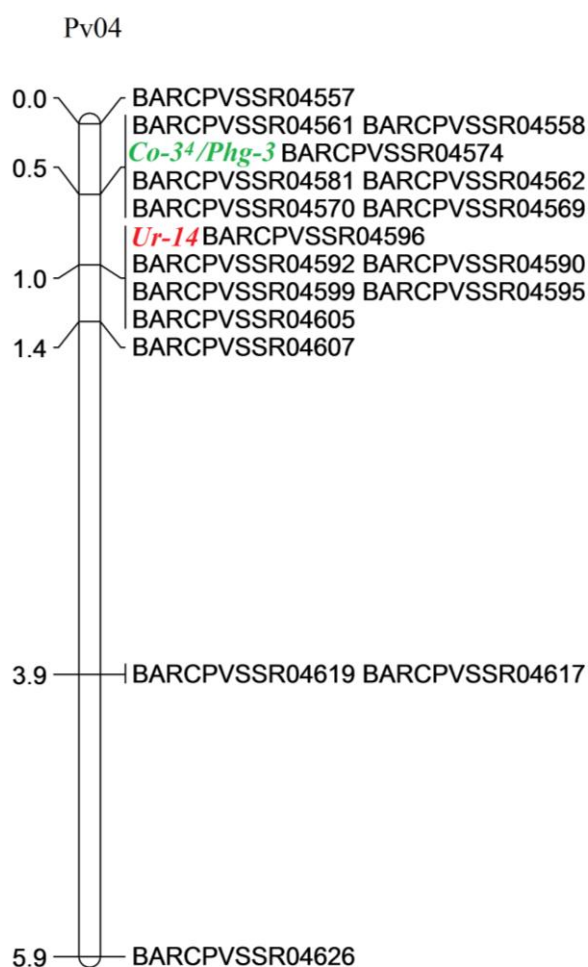


Figure 1 - Genetic linkage map of the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* region of the common bean linkage group Pv04. The genetic map was generated using Kosambi's mapping function with 105 F_{2:3} families from the Rudá × Ouro Negro cross.

The *Co-3⁴/Phg-3* loci are linked at 0.0 cM from the markers BARCPVSSR04561, BARCPVSSR04558, BARCPVSSR04574, BARCPVSSR04581, BARCPVSSR04562, BARCPVSSR04570 e BARCPVSSR04569 and The *Ur-14* gene is located 0.0 cM from the SSR markers BARCPVSSR04596, BARCPVSSR04592, BARCPVSSR04590, BARCPVSSR04599, BARCPVSSR04595 and BARCPVSSR04605.

Based on the linkage map of the 105 F_{2:3} families tested with the rust and anthracnose pathogens and genotyped by 18 polymorphic SSR markers, revealed that *Ur-14* is linked in coupling phase at distance of 0.5 cM from the *Co-3⁴/Phg-3* loci on Pv04.

4. DISCUSSION

The results showed that the Ouro Negro cultivar has the single, dominant *Ur-14* and *Co-3⁴* genes, which confer resistance to the rust pathogen *U. appendiculatus* and the anthracnose pathogen *C. lindemuthianum*, respectively. Our data are in agreement with the results from Souza et al. (2011) and Gonçalves-Vidigal et al. (2013). Based on the phenotypic results of the F_{2:3} families that were separately inoculated with races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus* and race 73 of *C. lindemuthianum*, the two genes each segregated for resistance at a ratio of 1RR:2Rr:1rr, showing that one single, dominant gene confers rust resistance and that one single, dominant gene confers anthracnose resistance.

The *Ur-14* and *Co-3⁴* genes present in Ouro Negro confer a broad spectrum of resistance. For this reason, they are extensively used to improve rust and anthracnose resistance in cultivars of common bean, especially in Brazil. The resistance gene present in Ouro Negro discovered by Alzate-Marin et al. (2003) as *Co-10*, was renamed *Co-3⁴* by Gonçalves-Vidigal et al. in 2013. The gene provides very effective resistance to races 7, 9, 23, 55, 64, 67, 73, 79, 81, 83, 87, 89, 95, 102, 117, 119, 343, 453, 1033, 1545, and 1600 of *C. lindemuthianum* (Alzate-Marin et al., 2003; Gonçalves-Vidigal and Kelly, 2006; Ragagnin et al., 2009).

The *Co-3⁴* gene is part of a complex gene cluster involving different alleles at the *Co-3* locus to resistance to *C. lindemuthianum*. The *Co-3* gene, originally known as *Mexique 1*, was described in the Mexico 222 cultivar by Bannerot (1965). The *Co-3²* gene was described by Fouilloux (1979) in the Mexico 227 cultivar. The *Co-3³* locus, previously known as *Co-9*, was described in the PI 207262 and BAT 93 cultivars (Geffroy et al., 1999). The breeding value of the *Co-3* gene and of the alleles *Co-3²* and *Co-3³* are specific to certain locations, especially places where Andean races are predominant. To be effective in resistance breeding, these genes should be included as members of a gene pyramid (Kelly and Vallejo, 2004).

The *Ur-14* gene provides resistance to several isolates of *U. appendiculatus* in Brazil (Faleiro et al., 1999; 2001; Souza et al., 2007) and to 89 of the 90 races of *U. appendiculatus* that are maintained in the USDA-ARS collection (Dr. J. R. Stavelly, personal communication, cited by Alzate-Marin et al., 2004). The broad spectrum of rust resistance present in Ouro Negro is comparable to the spectrum of resistance

present in the PI 310762, PI 260418 and PI 181996 cultivars (Stavely, 1990; Pastor-Corrales, 2005; Pastor-Corrales et al., 2012).

The Ouro Negro and PI 181996 cultivars have the same reaction profile to the races of *U. appendiculatus* maintained at the USDA-ARS collection. They are resistant to all races except to race 108, to which both Ouro Negro and PI 181996 are susceptible. Despite their similar response to different races, the rust resistance genes present in Ouro Negro and PI 181996 are different. The gene present in Ouro Negro is located on Pv04, while PI 181996 bears the *Ur-11* gene, which has been mapped to Pv11 (Miklas et al., 2002; Freyre et al., 1998). No race of the rust pathogen has yet been found to elicit a distinguishable response from the two resistance genes present in Ouro Negro and PI 181996.

The Ouro Negro cultivar bears the *Phg-3* gene, conferring resistance to the angular leaf spot caused by the fungus *Pseudocercospora griseola*. The *Co-3⁴* and *Phg-3* genes are tightly linked 0.0 cM from the molecular marker g2303, showing that the genes *Co-3⁴* and *Phg-3* segregated together in a segregation population involving Ouro Negro cross (Gonçalves-Vidigal et al., 2013).

Thus, selection in a segregating population derived from a cross with an Ouro Negro parent can be performed simultaneously for the *Co-3⁴/Phg-3* gene cluster. These results are extremely important for breeding programs to develop common bean cultivars that are resistant to rust, anthracnose and angular leaf spot, three of the most important diseases in the common bean.

The response of the F_{2:3} families to the rust and anthracnose and to angular leaf spot pathogens revealed that the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes co-segregate and confer resistance to rust and anthracnose in the Ouro Negro cultivar. Among the 105 F_{2:3} families, only one family demonstrated a differential response to rust and anthracnose. The remaining 104 F_{2:3} families had the same response to both diseases, indicating that the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes in Ouro Negro are closely associated and segregate together. These results revealed that the *Ur-14* gene is linked to the *Co-3⁴/Phg-3* loci at distance of 0.5cM.

Co-segregation analyses in the common bean have primarily been described for resistance genes against anthracnose and angular leaf spot in the Andean cultivar AND 277. In this cultivar, the *Co-1⁴* and *Phg-1* genes are linked at 0.0 cM in the linkage group Pv01. The molecular markers CV542014⁴⁵⁰ and TGA1.1⁵⁷⁰ are linked to the *Co-1⁴* and *Phg-1* loci at 0.7 and 1.3 cM (Gonçalves-Vidigal et al., 2011).

Developing co-segregation studies to find molecular markers is very useful for breeding programs aimed at developing resistant bean cultivars using marker-assisted simultaneous selection against two pathogens.

The candidate region harboring the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci is located at the end of the linkage group Pv04. This chromosome contains one of the most important clusters of resistance-associated genes in the common bean genome, the Pv04 cluster (Richard et al., 2014). The Pv04 cluster includes the genes and alleles *Co-3*, *Co-3²*, *Co-3³*, *Co-3⁴*, *Co-15*, *Co-y*, *Co-z* and *Co-R_{VI}*, which confer resistance to anthracnose (Bannerot, 1965; Fouilloux, 1979; Geffroy et al., 1999; Alzate-Marín et al., 2003; Gonçalves-Vidigal et al., 2009), and the genes *Ur-5*, *Ur-14*, and *Ur-Dorado-108*, which confer resistance to rust (Stavely, 1984; Miklas et al., 2000; Souza et al., 2011). Most recently, the rust resistance gene present in PI 310762 was also discovered to be located in the cluster of resistance genes on Pv04 (Shin et al., 2014). In addition to the rust and anthracnose resistance genes, the Pv04 cluster has been genetically shown to harbor many tightly linked R-specific genes against other pathogens, including *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (the causative agent of halo blight) (David et al., 2008), and a resistance QTL against bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) (Lopez et al., 2003).

Dense clusters of resistance-associated genes in the common bean genome have been reported (Schmutz et al., 2014). Proteins containing a specific site called the NBS (Nucleotide-Binding site) and a LRR domain (C-Terminal Leucine-Rich Repeat) encode many resistance genes to various types of pathogens, and they are collectively known as NB-LRR (NL) genes (Geffroy et al., 1999; 2008). When the *P. vulgaris* genome was sequenced, more information was gained about the resistance gene organization of this crop. As described by Schmutz et al. (2014), the majority of NL sequences are physically organized in complex clusters that are often located at the ends of chromosomes. In particular, three large clusters were located at the ends of chromosomes Pv04, Pv10 and Pv11.

The genetic distance between *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* was estimated based on the co-dominant locus information from the 105 F_{2:3} families that were tested for rust and anthracnose resistance and genotyped with 18 SSR markers that were polymorphic for the Rudá and Ouro Negro parents. The combined genetic linkage analysis of the selected SSR markers resulted in a good fit to the expected ratio of 1RR:2Rr:1rr. All of the 79 families that showed homozygous or heterozygous

resistance to anthracnose (*Co-3⁴/Phg-3*) also had the Ouro Negro allele at the SSR loci BARCPVSSR04561, BARCPVSSR04558, BARCPVSSR04574, BARCPVSSR04581, BARCPVSSR04562, BARCPVSSR04570 and BARCPVSSR04569. Additionally, the 26 susceptible F₂ plants were homozygous for the Rudá allele at these SSR loci. Furthermore, it was observed that *Ur-14* was located 0.0 cM from the SSR markers BARCPVSSR04596, BARCPVSSR04592, BARCPVSSR04590, BARCPVSSR04599, BARCPVSSR04595 and BARCPVSSR04605.

The lack of recombination events between the molecular markers and the *Co-3⁴/Phg-3* locus indicated that the markers are tightly linked to these genes. Hence, this tight linkage will reduce the time and cost of pyramiding the *Ur-14/Co-3⁴/Phg-3* genes into commercial common bean cultivars. Of the 105 F_{2:3} families derived from the Rudá × Ouro Negro cross inoculated with races 41, 47, 53 and 58 of *U. appendiculatus* and race 73 of *C. lindemuthianum*, 104 of them presented a similar reaction of resistance or susceptibility, and co-segregated to both pathogens. Additionally studies conducted by Gonçalves-Vidigal et al. (2013) revealed that the g2303 molecular marker is linked at 0.0 cM to the cluster *Co-3⁴/Phg-3*.

The molecular marker OPF10₉₇₀ (Haley et al., 1993) linked to a major rust resistance gene *Ur-5* present in Mexico 309 and B-190 cultivars (Stavely, 1984; Kelly et al., 1996) was the model to develop the SCAR marker SF10 (Corrêa et al., 2000). The SF10 marker was linked to the rust resistance gene in Ouro Negro, suggesting that the rust resistance gene in Ouro Negro is conditioned by *Ur-5*. However, the allelism test presented by Alzate-Marin et al. (2004) showed that the *Ur-5* gene is not the resistance gene in Ouro Negro. Additional molecular markers linked to *Ur-14* include the marker OX11₆₃₀ at 5.8 ± 1.6 cM and the marker OF10_{1,050} at 7.7 ± 1.7 cM from the *Ur-14* resistance gene locus in Ouro Negro (Faleiro et al., 2000b). Additionally, Corrêa et al. (2000) developed the SCAR marker SBA08, which is linked the rust resistance locus *Ur-14* at 4.3 ± 1.2 cM.

As described above, the RR cluster on Pv04 has evolved different rust resistance genes, including *Ur-5* and the RR gene present in PI 310672. Our results showed that the *Ur-5* gene that is present in the Mexico 309 and B-190 cultivars is located 0.4 cM from the marker BARCPVSSR04569 and 2.6 cM from BARCPVSSR04619, which are also linked to *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* (unpublished data). Similarly, the rust resistance gene in PI 310672 is linked to SSR1167

(BARCPVSSR04569) at 0.1 cM, to SSR1170 (BARCPVSSR04574) at 0.5 cM and to SSR1168 (BARCPVSSR04570) at 0.9 cM (Shin et al., 2014). The SSR markers BARCPVSSR04569, BARCPVSSR04574 and BARCPVSSR04570 are tightly linked to the *Co-3⁴/Phg-3* gene cluster described in this work.

The physical linkage between *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3*, make possible them be inherited together as *Ur-14/Co-3⁴/Phg-3* cluster, and they can be monitored with the aid of the molecular markers described above. Therefore, these genes are part of a complex resistance gene cluster that is present in the Pv04 linkage group. These results will be very useful for common bean breeding programs that aim to develop cultivars with resistance to *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* and *P. griseola* by using marker-assisted selection. The SSR and SNP molecular markers described here may reduce the time and cost associated with pyramiding the *Ur-14*, *Co-3⁴* and *Phg-3* genes in commercial cultivars of common beans.

5. CONCLUSION

The co-segregation of 104 $F_{2:3}$ families for resistance and susceptibility to Rust and ANT/ALS pathogens, indicate that *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* genes are closely linked.

Genetic mapping of 18 polymorphic SSR markers revealed that *Ur-14* is linked in coupling phase at distance of 0.5 cM from the *Co-3⁴/Phg-3* loci on Pv04.

The close proximity of the SSR markers to the *Ur-14* and *Co-3⁴/Phg-3* loci indicate potential utility of these markers for marker-assisted selection in common bean breeding programs wanting to use these three disease resistance genes.

6. REFERENCES

ALLEN, D.J.; DESSERT, M.; TRUTMANN, P.; VOSS, J. Common beans in Africa and their constraints. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.). **Bean production problems in the tropics**. Second edition. Cali, Colombia: CIAT, 1989. p. 9-31.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, 133:165-169, 2003.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes *Ur-5* and *Ur-11*. **Journal of Phytopathology**, 152:60-64, 2004.

BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Annual de Amélioré des Plantes**, 15:201-222, 1965.

CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD-GOD, P.I.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA M.A.; BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, 40:804-807, 2000.

DAVID, P.; SÉVIGNAC, M.; THAREAU, V.; CATILLON, Y.; KAMI, J.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; GEFFROY, V. BAC end sequences corresponding to the B4 resistance gene cluster in common bean: a resource for markers and syntenic analyses. **Molecular Genetics and Genomics**, 280:521-533, 2008.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; CORRÊA, R.X.; VINHADELLI, W.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. **Revista Ceres**, 47:375-282, 2000a.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de

genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 28:059-066, 2003.

FALEIRO, F.G.; VINHADELLI, W.S.; RAGAGNIN, V.A. ; PAULA JR, T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência do feijoeiro comum a quatro raças de *Uromyces Appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, 46:11-18, 1999.

FALEIRO, F.G.; VINHADELLI, W.S.; RAGAGNIN, V.A.; STAVELY, J.R.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, 26:77-80, 2001.

FALEIRO, F.G.; WENDER SANTOS VINHADELLI, W.S.; RAGAGNIN, V.A.;1, CORRÊA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 23:399-402, 2000b.

FOUILLLOUX, G. **New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs**. In: MARAITE, H.; MEYER, J.A. (eds.). **Diseases of Tropical Food Crops**. Belgium, 1979. p. 221-235.

FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA, P.A.; TSAI, S.M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:847-856, 1998.

GEFFROY, V.; MACADRE, C.; DAVID, P.; PEDROSA-HARAND, A.; SÉVIGNAC, M.; DAUGA, C.; LANGIN, T. Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, 181:405-419, 2009.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; BILLANT, P.; DRON, M.; LANGIN, T. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:407-415, 2008.

GEFFROY, V.; SICARD, D.; OLIVEIRA, J.C.F.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 12:774-784, 1999.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; GARCIA, A.; KAMI, J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; McCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. 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**, 122:893-903, 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; CRUZ, A.S.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L.; PACHECO, C.; M.N.A.; MCCLEAN, P.; GEPTS, P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Co-segregation analysis and mapping of the anthracnose *Co-10* and angular leaf spot *Phg-ON* disease-resistance genes in the common bean cultivar Ouro Negro. **Theoretical and Applied Genetics**, 126:2245-55, 2013.

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

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SAKIYAMA, N.S.; VIDIGAL FILHO, P.S.; AMARAL, J.R.A.T.; POLETINE, J.P.; OLIVEIRA, V.R. Resistance of common bean cultivar AB 136 races 31 and 69 of *Colletotrichum lindemuthianum*: the *Co-6* locus. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:99-104, 2001.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.E.; PASTOR-CORRALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. **Crop Science**, 49:133-138, 2009.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; BYRUM, J.; KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:505-512,1993.

KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, 15:150-152, 1988.

KELLY, J.D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P.N.; COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, 82:135-154, 2003.

KELLY, J.D.; STAVELY, J.R.; MIKLAS, P.N. Proposed symbols for rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 39:25-31, 1996.

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

LOPEZ, C.E.; ACOSTA, I.F.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; GALLEGO, G.; BEEBE, S.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, 93:88-95, 2003.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, 147:105-131, 2006.

MIKLAS, P.N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, M.J.; STAVELY, J.R.; STEADMAN, J.R.; BASSETT, M.J. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/XAN 176). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 125:476-481, 2000.

MIKLAS, P.N.; PASTOR-CORRALES, M.A.; JUNG, G.; COYNE, D.P.; KELLY, J.D.; MCCLEAN, P.E.; GEPTS, P. Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:125-129, 2002.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T.L.; AGARWALA, R.; SCHAFFER, A.A. Database indexing for production MegaBLAST searches. **Bioinformatics**, 24:1757-1764, 2008.

PASTOR-CORRALES, M.A. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, 81:694, 1991.

PASTOR-CORRALES, M.A. Inheritance of resistance in PI 260418 an Andean bean resistant to most races of the bean rust pathogen. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 48:134-135, 2005.

PASTOR-CORRALES, M.A.; JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, 19:15-22, 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M.; MOLINA, A.; SINGH, S.P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant disease**, 79:63-67, 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A.; SHIN, S.H.; WOLF, J. Exceptional rust resistance in Mesoamerican common bean accession PI 310762. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 55:147-148, 2012.

PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.). **Bean production problems in the tropics**. Second edition. Cali, Colombia: CIAT, 1989. p.77-104.

RAGAGNIN, V.A.; SOUZA, T.L.P.O.; SANGULARD, D.A.; ARRUDA, K.M.A.; COSTA, M.R.; ALZATE-MARIN, A.L.; CARNEIRO, J.E.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Development and agronomic performance of common bean families simultaneously

resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, 128:156-163, 2009.

RICHARD, M.M.S.; PFLIEGER, S.; SEVIGNAC, M.; THAREAU, V.; BLANCHET, S.; LI, Y.; JACKSON, S.A.; GEFFROY, V. Fine mapping of *Co-x*, an anthracnose resistance gene to a highly virulent strain of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 127:1653-1666, 2014.

RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; MENDÉZ-VIGO, B.; PAÑEDA, A.; FERREIRA, J.J.; GIRALDEZ, R. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Theoretical and Applied Genetics**, 114:713-722, 2007.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, 132:365-386, 2000.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A. CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; ABERNATHY, B.; BARRY, K.; BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D.H.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.C.; ROKHSAR D.S.; JACKSON, S.A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, 46:707-713, 2014.

SHIN, S.-H.; SONG, Q. CREGAN, P.B.; PASTOR-CORRALES, M.A. SSR DNA markers linked with broad-spectrum rust resistance in common bean discovered by Bulk Segregant Analysis using a large set of SNP markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 57:187-188, 2014.

SONG, Q.J.; JIA, G.; ZHU, Y.; GRANT, D.; NELSON, R.T.; HWANG, E.-Y.; D.L. HYTEN, D.L.; CREGAN, P.B. Abundance of SSR motifs and development of

candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1.0) in soybean. **Crop Science**, 50:1950-1960, 2010.

SONG, Q.; JIA, G.; HYTEN, D.L.; JENKINS, J.; HWANG, E.Y.; SCHROEDER, S.G.; OSORNO, J.M.; SCHMUTZ, J.; JACKSON, S.A.; MCCLEAN, P.E.; CREGAN, P.B. SNP assay development for linkage map construction, anchoring whole-genome sequence, and other genetic and genomic applications in common bean. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 5:2285-90, 2015.

SOUZA, T.L.P.O.; ALZATE-MARIN, A.L.; DESSAUNE, S.N.; NUNES, E.S.; QUEIROZ, V.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Inheritance study and validation of SCAR molecular marker for rust resistance in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:11-15, 2007.

SOUZA, T.L.P.O.; DESSAUNE, S.N.; SANGLARD, D.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Characterization of the rust resistance gene present in the common bean cultivar Ouro Negro the main rust resistance source used in Brazil. **Plant Pathology**, 60:839-845, 2011.

STAVELY, J.R. Genetic of resistance to *Uromyces appendiculatus* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. **Phytopathology**, 74:339-344, 1984.

STAVELY, J.R. Genetics of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996. **Phytopathology**, 80:1056, 1990.

STAVELY, J.R.; FREYTAG, G.F.; STEADMAN, J.R.; SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 26:4-6, 1983.

STAVELY, J.R.; KELLY, J.D.; GRAFTON, K.F. BelMiDak-Rust-Resistant Navy dry beans germplasm families. **Hortscience**, 29:709-711, 1994.

STAVELY, J.R.; PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (eds.). **Bean production problems in the tropics**. Second edition. Cali, Colombia: CIAT, 1989. p.159-194.

STEADMAN, J.R.; PASTOR-CORRALES, M.A.; BEAVER, J.S. An overview of the 3rd Bean Rust and 2nd Bean Common Bacterial Blight International Workshops, March 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:120-124. 2002.

VAN OOIJEN, J.W. Multipoint maximum likelihood mapping in a full-sib family of an outbreeding species. **Genetics Research**, 93:343-349, 2011.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 106:411-422, 2003.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Feijão comum (BGF), do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) da Universidade Estadual de Maringá, possuem alta variabilidade genética e estrutura populacional bem definida, distribuídos entre os dois *pool* gênicos do feijão comum, o Andino e o Mesoamericano. Estes acessos têm sido constantemente incorporados ao programa de melhoramento genético do feijão comum do Nupagri, representando uma importante fonte de alelos e genes, contribuindo para manter a variabilidade genética na cultura. Com base nos resultados aqui obtidos, os genótipos que foram geneticamente caracterizados, poderão ser usados para desenvolver cultivares mais produtivas e adaptadas às condições climáticas do Sul e Centro-Oeste do Brasil.

A análise de co-segregação entre o gene de resistência *Ur-14* e cluster *Co-3⁴/Phg-3* de resistência à antracnose e mancha angular, presente na cultivar Ouro Negro, revela que os genes se encontram estreitamente associados, e não segregam independentemente. Análises moleculares utilizando 18 marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), associados aos genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3*, no grupo de ligação Pv04, demonstram que os dois *loci* estão ligados em fase de acoplamento, a uma distância de 0,5 cM. A co-segregação dos genes *Ur-14* e *Co-3⁴/Phg-3* indica que estes genes podem ser monitorados por meio do uso de marcadores moleculares, refletindo na redução de tempo e custo para a piramidação do cluster *Ur-14/Co-3⁴/Phg-3* em cultivares de feijão comum.

APÊNDICE



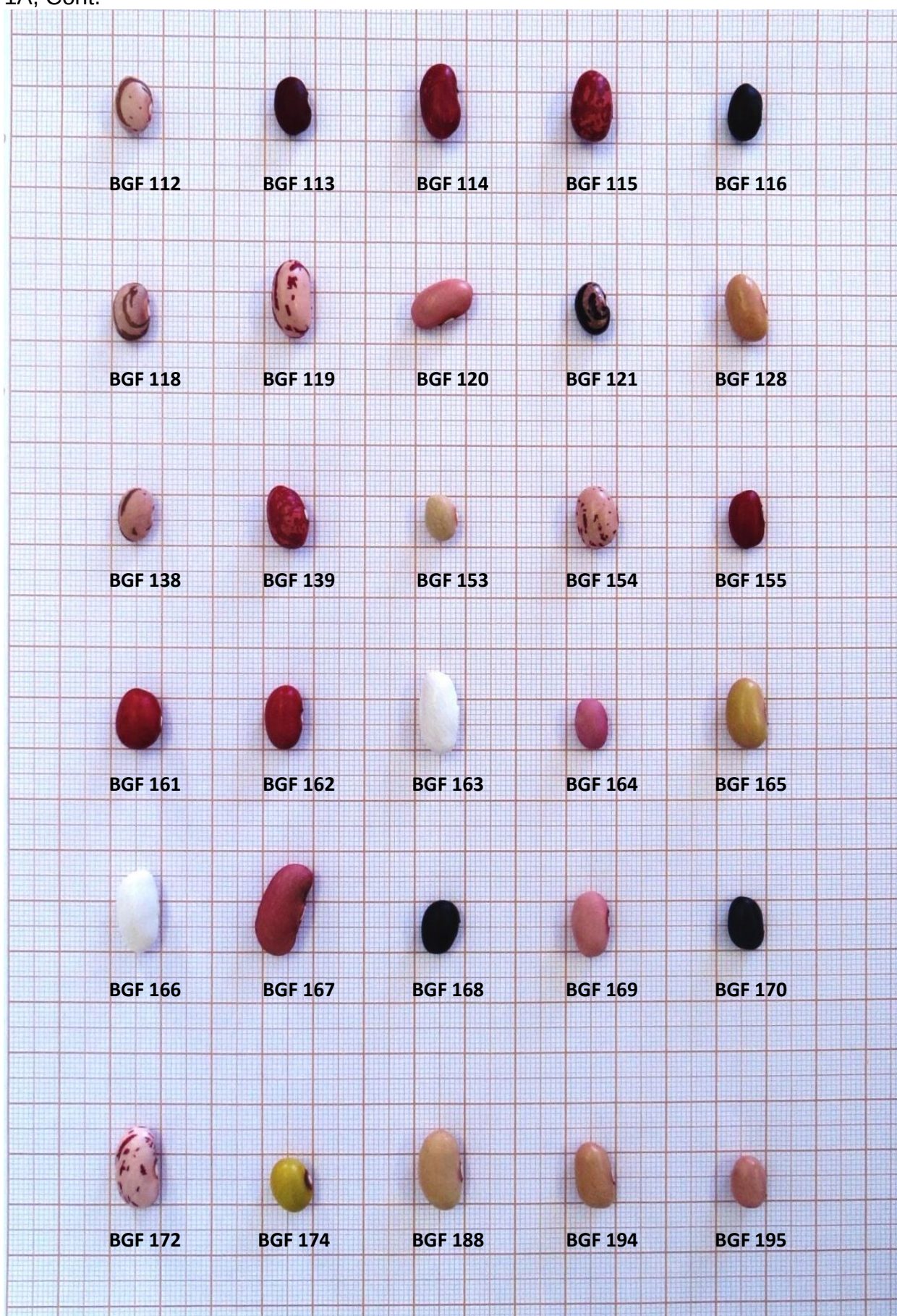
Fonte: Nupagri, 2013.

1A - Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão comum (BGF) da Universidade Estadual de Maringá avaliados, Maringá, 2013.

1A, Cont.



1A, Cont.



1A, Cont.

