

SOLANGE ALINE DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA REGIÕES
ALVOS DE RESISTÊNCIA À *MELOIDOGYNE* SSP. EM
*PHASEOLUS VULGARIS***

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**

**Urutaí (GO)
2018**



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Urutaí, Março de 2018

SOLANGE ALINE DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA REGIÕES ALVOS DE
RESISTÊNCIA À *MELOIDOGYNE* SSP. EM *PHASEOLUS*
*VULGARIS***

Orientador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)
2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

C331d Carvalho, Solange Aline de.

Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para regiões alvos de resistência à *Meloidogyne* ssp. em *Phaseolus vulgaris*. [Manuscrito] / Solange Aline de Carvalho. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.

29 fls.

Orientador: Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Marcadores de DNA. 2. Seleção assistida. 3. Resistência genética. I. Título.

CDU 57



FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	<i>Determinação e caracterização de microrganismos para regiões alvo de resistência a Meloidoyne spp em Phaxellus vulgaris.</i>
Orientador:	Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Autora:	Solange Aline De Carvalho

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **26 de março de 2018**, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Prof.ª Dra. **Ana Clara de Oliveira F. Barbosa**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof.ª Dra. **Alcione da Silva Arruda**
Universidade Estadual de Goiás – Campus Ipameri
Membro titular

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”
(George Bernard Shaw)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido vivenciar essa experiência, dando-me força, paciência e saúde para superar cada dificuldade.

Aos meus pais Gerson e Rosângela, pelo incansável incentivo e apoio em todas as minhas decisões. São meus exemplos de perseverança, trabalho e conquista.

À Letícia de Maria Oliveira Mendes, que não mediu esforços para me auxiliar em todas as etapas do meu projeto. Agradeço pela dedicação e amizade.

Aos demais colegas de laboratório que me acolheram tão bem, oferecendo além da amizade e boa vontade, o conhecimento teórico e prático, primordiais ao bom funcionamento do laboratório. Agradeço à Aryanny Irene Domingos de Oliveira, Thiago Henrique de Lima, Rafaela Ribeiro Brito, Karine Maria de Sousa Viana e Caio César de Oliveira Pereira.

Aos colegas de turma pelas horas de descontração, colaboração, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes pela orientação, valiosos ensinamentos e incentivo às novas realizações.

Aos demais professores do mestrado que oportunizaram excelentes momentos de aprendizado, contribuindo imensamente para minha formação profissional.

À banca examinadora, pelas importantes contribuições a este trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LaGeM) por proporcionar tudo o que foi necessário para realização do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado e ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí pela oportunidade, financiamento e concessão à bolsa e pelo suporte físico e técnico oferecido para que eu pudesse desenvolver todas as atividades acadêmicas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	04
2.1. Busca pela sequência de DNA e pesquisa de similaridade	04
2.2. Identificação de marcadores EST-SSR	05
2.3. Extração e quantificação de DNA	05
2.4. Testes e otimização de amplificação via PCR.....	06
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	08
3.1. Homologia e desenho dos <i>Primers</i> SSR	08
3.2. Testes para otimização de amplificação	15
4. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	17
ANEXO	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Teste de amplificação de nove *primers* candidatos a resistência à *Meloidogyne* selecionados em gel de agarose a 1,2%..... 15
- Figura 2-** Marcadores microsatélites detectados para os *primers* (A) IFRT15, IFRT20; IFRT26; (B) IFRT02; (C) IFRT09; (D) IFRT25; (E) IFRT06; IFRT03 e (F) IFRT11, respectivamente. 16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Protocolo para reação de PCR para uma amostra do genótipo de <i>P. vulgaris</i>	07
Tabela 2- Descrição de 26 EST-SSRs candidatos a resistência ao nematoide em feijão com sequências <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R), ID do <i>Primer</i> ; ^A : <i>Primer</i> identificado a partir do <i>SSRLocator</i> , ^B : <i>Primer</i> identificado a partir do <i>WebSat</i> , ^{AB} : <i>Primer</i> identificado em ambas metodologias; Gene de origem; Cromossomo de origem (Cr.); Temperatura <i>de melting</i> (TM); Tamanho esperado (TE); Motivo de repetição; (*) <i>Primer</i> selecionado para os testes de amplificação e otimização; Número do acesso <i>NCBI</i>	09
Tabela 3- Processos celulares ligados às sequências homólogas	12
Tabela 4- Número de <i>EST-SSR</i> classificados pelo motivo de repetição e tipos por programa gerados	14
Tabela 5- Temperatura de anelamento (TA) adequada e obtidas no teste de gradiente dos <i>primers</i> selecionados	16

RESUMO

O uso de marcadores moleculares tem crescido exponencialmente nos últimos anos, principalmente em estudos de genética de populações de plantas, quando se trata da conservação de espécies importantes ou que estão inseridas em biomas que precisam ser preservados. A exemplo disso, tem-se a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivado no bioma Cerrado, sendo exposto a diferentes tipos de solos, climas e patógenos. Dentre os patógenos radiculares, os nematoides de galha se destacam, sendo considerados pragas do feijoeiro. Diante disso, o objetivo foi desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites que confirmam resistência ao nematoide *Meloidogyne spp.* em feijão comum. Para isso, sequências de *QTLs* foram selecionadas no banco de dados *NCBI*, por apresentarem genes homólogos aos da soja por possuírem resistência ao patógeno em questão, sendo identificadas para o feijão, usando o programa “BLAST” no site *Phytozome*. Nove *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer3*. Foi feita a extração de DNA de sementes de feijão comum, utilizando protocolo de extração pelo método SDS 10%. A quantificação foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídeo (0,5%/ml) em solução tampão (TBE) 1x. Para amplificação e otimização por PCR, o DNA de um único genótipo foi usado, utilizando termociclador. As PCRs funcionais foram submetidas à eletroforese vertical em géis de poliacrilamida (4%) e corados com nitrato de prata. A transferibilidade permite aumentar a eficiência na transferência de informação genômica através da homologia de EST de genes de interesse. Nove de 26 EST-SSR candidatos em feijão distribuídos em sete diferentes genes que conferem resistência a nematoide de galha em soja estão disponíveis para validação.

Palavras-chave: Marcadores de DNA; Seleção assistida; Resistência genética.

ABSTRACT

The use of molecular markers has grown exponentially in recent years, especially in studies of plant populations genetics, when it comes to the conservation of important species or that are inserted in biomes that need to be preserved. As an example, we have the bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivated in the Cerrado biome, being exposed to different types of soils, climates and pathogens. Among the root pathogens, the gill nematodes stand out, being considered pest of the common bean. Therefore, the target was develop and characterize microsatellite markers that confer resistance to the nematode *Meloidogyne* spp. in common beans. For this, QTL sequences were selected in the NCBI database because they presented genes homologous to those of soybeans because they had resistance to the pathogen in question and were identified for the bean using the BLAST program at Phytozome. Nine primers were designed using the *Primer3* software. The DNA extraction of common bean seeds was done using a 10% SDS extraction protocol. Quantification was performed on 0.8% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (0.5%/ml) in 1x buffer solution (TBE). For amplification and PCR optimization, the DNA of a single genotype was used, using thermocycler. Functional PCRs were submitted to vertical electrophoresis in polyacrylamide gels (4%) and stained with silver nitrate. Transferability allows to increase the efficiency in the transfer of genomic information through EST homology of genes of interest. Nine of 26 EST-SSR bean candidates distributed in seven different genes conferring nematode resistance to gall in soya are available for validation.

Keywords: DNA markers; Assisted selection; Genetic resistance.

APRESENTAÇÃO

O feijão é uma das culturas mais produzidas no Brasil e no mundo, possui relevância nutricional e econômica, pois, além de ser fonte de proteínas (chegando a 33%), é rico em carboidratos e ferro; e seu valor energético é de 341 cal/100g (POMPEU, 1987). O gênero mais cultivado é *Phaseolus* (com cerca de 55 espécies) com produção mundial de 12,7 milhões de toneladas, cujo maior produtor deste gênero é o Brasil e dentre as espécies cultivadas, o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) se destaca (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

O feijão-comum é cultivado na maioria dos estados brasileiros, com destaque na produção para os estados da região Centro-Oeste, Tocantins, São Paulo e Minas Gerais, nos quais o bioma Cerrado se faz presente em todos eles, sendo produzido em diferentes regiões climáticas, formas de manejo, sistemas e épocas de cultivo, o que ocasiona o cultivo do feijão durante todo o ano, permitindo disponibilidade contínua da produção. Entretanto, aliados a essas alterações de paisagem para o plantio, podem surgir doenças causados por fitopatógenos, dos quais se destacam os nematoides de galha.

Em geral, as ferramentas utilizadas no combate aos nematoides são prejudiciais ao ambiente e afetam diretamente à saúde do homem, sendo necessária outra forma de manejo mais eficaz e que cause o mínimo de impacto possível. Diante disso, a utilização de marcadores moleculares torna-se uma ferramenta ideal, uma vez que fornece um grande número de informações de forma simples e rápida para o desenvolvimento de uma variedade resistente, capaz de sanar os problemas causados pelo fitopatógeno, auxiliam na conservação dos recursos genéticos, e conseqüentemente na conservação do bioma no qual está inserido.

A seguir será apresentado o capítulo referente ao presente estudo, o qual abordará de forma sequencial uma introdução, com uma breve revisão da literatura (na qual os aspectos gerais relacionados ao feijão-comum, ao nematoide de galha e aos marcadores moleculares serão apresentados), os métodos utilizados para a realização da pesquisa, os resultados e discussão dos mesmos e, por fim, a conclusão. Segue ainda, a lista de referências bibliográficas utilizadas no decorrer deste estudo, e por fim, o anexo com o artigo publicado com a parte computacional deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa de alto valor econômico e aceitação de mercado em 113 países tropicais e subtropicais, devido à sua composição química balanceada, incluindo diversas proteínas, carboidratos complexos, minerais e vitamina do complexo B (BROUGHTON et al., 2003). O Brasil é líder mundial na produção e consumo de feijão, embora ainda não seja autossuficiente na produção do mesmo (WANDER, 2005). O feijoeiro é cultivado na maioria dos estados brasileiros, em uma variedade de solos, climas, época de cultivo e sistemas de cultivo (SILVA; WANDER, 2013). As adversidades as quais o feijoeiro tem sido exposto no Cerrado contribuem para elevada diversidade encontrada na cultura, possibilitando a seleção, isto é, a variação genética para o melhoramento (BURLE et al., 2010) e desenvolvimento sustentável.

Esta disponibilidade de variabilidade gera uma demanda por informações detalhadas acerca de seus recursos genéticos para proporcionar um uso integrado com questões ambientais, a qual será necessária para atender a um processo de expansão sustentável. Entre os principais recursos ambientais ou naturais que devem ser preservados estão os recursos genéticos presentes na natureza e que constituem parte imensurável da riqueza de um país (DULLEY, 2004). Sobretudo no Cerrado, que possui alta biodiversidade, embora seja ameaçado em virtude do esgotamento de seus recursos devido principalmente a exploração extrativista, e que se mal conduzida pode prejudicar a riqueza biológica do ecossistema motivando prejuízo severo ao recurso natural explorado, reduzindo assim, sua capacidade de resiliência (RIBEIRO et al., 2008).

Nas últimas décadas, a cultura do feijoeiro vem passando por diversas modificações na forma de manejo, sistemas de produção e de melhoramento genético. Aliados às alterações de paisagem para plantio, surgem os mais variados problemas fitossanitários, fazendo com que doenças causadas por fitopatógenos provoquem um forte gargalo para se obter melhores produtividades no país em diversas culturas, a exemplo do feijão comum (VIEIRA et al., 1998). Essas alterações contribuíram para a introdução de patógenos emergentes, além de antigas doenças que não eram consideradas problemas para a cultura passaram a merecer destaque. Dentre os patógenos radiculares, um importante exemplo são os nematoides de galha, considerados pragas do feijoeiro apenas em algumas regiões produtoras do Brasil. Embora doenças causadas por nematoides não estejam amplamente distribuídas nos estados brasileiros, seus danos levam a produção

brasileira a não suprir a demanda de abastecimento do mercado interno (YOKOYAMA, 2007), acometendo além do feijão comum, o arroz, o feijão de corda, o girassol, o milho e a soja (INOMOTO e ASMUS, 2006).

As ferramentas utilizadas no manejo e controle de nematoides, sobretudo no gênero *Meloidogyne* spp. são semelhantes às utilizadas no manejo de pragas e doenças, com adaptações segundo sua espécie e a situação climática e socioambiental. Dentre elas pode-se citar: i) o revolvimento do solo para expor possíveis fontes de inóculo ao sol e inviabilizá-los, contudo esse método pode desestruturar o solo, diminuindo sua fertilidade; ii) enxarcamento do solo a fim de criar condições anaeróbicas que reduzem a população dos nematoides, embora não seja um método muito usado devido à grande quantidade de água utilizada e às consequências para o solo, como a falta de oxigênio e degradação da estrutura do solo, que podem levar a perdas na produção e; iii) controle químico que é a utilização de nematicidas que causam diversos problemas ambientais, contaminação de água, solo, biota e conseqüentemente interferem na saúde humana. (DUTRA; CAMPOS; TOYOTA, 2003; COYNE et al., 2009; COLLANGE et al., 2011).

Diante disso, uma importante forma de manejo dos nematoides é o uso de variedades resistentes, as quais, apesar de já terem sido encontradas para *Meloidogyne* spp. ainda são pouco exploradas na cultura do feijoeiro (CARNEIRO et al., 1992; WALBER et al., 2003). Fato, que ressalta a importância no desenvolvimento de ferramentas que ajudem a produzir informação detalhada para uso dessa variedade, além de definir recomendações preventivas, que mitigue os impactos sobre o ambiente. Nesse contexto, os marcadores de DNA constituem ferramenta biotecnológica de valoração rápida que pode ajudar no delineamento de estratégias de uso dos recursos genéticos disponíveis no Cerrado.

A utilização dos marcadores de DNA se dá pela capacidade de obter grande número de informações em variados genótipos através de processos considerados mais simples e rápidos (BARED; NETO; CARVALHO, 1997; TELLES et al., 2003). Dentro da tecnologia de marcadores de DNA, existe o grupo de marcadores microssatélites também chamados de *Simple Sequence Repeats* (SSR), que são pequenas sequências de nucleotídeos repetidas *em tandem*, abundantes e distribuídas aleatoriamente pelo genoma (OLIVEIRA et al., 2006). Além destas características, os SSRs apresentam alto nível de polimorfismo e são de fácil identificação; são codominantes, permitindo a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos; são amplificados via PCR (*Polymerase Chain*

Reaction), o que permite a amplificação com reduzidas quantidades de DNA e são altamente reprodutíveis, o que possibilita serem compartilhados entre laboratórios, o que torna o seu uso uma excelente ferramenta no estudo da diversidade genética de plantas (SANTANA, 2014, COUTINHO; GUIMARÃES; VIDAL, 2014).

Os marcadores de DNA, a exemplo dos microssatélites ou SSR têm sido frequentemente utilizados em programas de melhoramento de feijão (MÜLLER et al., 2014), na caracterização genética (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014) e na seleção assistida (ALZATE-MARIAN et al., 2005; KAUR et al., 2015). A obtenção de marcadores SSR seletivos, desenvolvidos a partir de bancos de dados, ficou mais fácil, rápida e econômica, quando comparada aos desenvolvidos por métodos convencionais (BUSO et al., 2006). Assim, os recentes avanços de sequenciamento genômico total, bem como o aumento dos bancos de sequências expressas (*EST*) de diferentes espécies, tem facilitado estudos de analogia genética entre espécies próximas filogeneticamente (SCHMUTZ et al., 2014; WANG et al., 2014).

A seleção de plantas resistentes assistida por marcadores moleculares pode eliminar aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, melhorando a eficiência do processo, uma vez que os marcadores não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente. Com o auxílio de marcadores moleculares, a seleção pode ser feita de forma precoce, diminuindo os custos com manutenção de populações de nematoides, multiplicação e inoculação de plantas (FUGANTI et al., 2004), além de contribuir com o ambiente, evitando formas de controle prejudiciais à biota local e ao ser humano.

A utilização de marcadores moleculares tem se destacado nos últimos anos, principalmente em estudos de genética de populações de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), referentes à conservação de espécies importantes ou que estão inseridas em biomas que precisam ser preservados (AVISE; HAMRICK, 1996), a exemplo do feijão no bioma Cerrado. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites para regiões alvos de resistência à *Meloidogyne* ssp. em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com potencial utilização a favor da conservação dos recursos naturais do bioma Cerrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Busca pela sequência de DNA e pesquisa de similaridade

Inicialmente este estudo utilizou materiais de fonte secundária para encontrar artigos que abordavam genes ou sequências de DNA identificadas que conferem um comportamento fenotípico de resistência a nematoides pertencentes a *Meloidogyne* ssp. na soja (*Glycine max*), dentro das seguintes bases de dados: *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Scopus*, *Science Direct* e Periódicos CAPES. A pesquisa foi realizada utilizando os seguintes termos de indexação em várias combinações: 1) *Resistance*; 2) *Glycine*; 3) *Meloidogyne*; 4) *gene*; 5) *QTL*; 6) *marker*; todos os descritores foram buscados nos idiomas Português e Inglês. Foram utilizados artigos relacionados ao tema publicados entre os anos de 1990 e 2016. A partir dos primeiros artigos lidos foram identificados outros potenciais, segundo a metodologia "bola de neve" (BERNARD, 2011).

Identificados os artigos de interesse que mencionavam a determinação de resistência genética ao nematoide de galha em soja, era feita a sua leitura para transcrever o #id da sequência ou genes que conferiam um comportamento fenotípico de resistência. Com estes nomes de #id ou genes foram acessadas suas respectivas sequências de DNA na íntegra, utilizando o banco de dados do *NCBI*. Em seguida, cada sequência foi salva separadamente em formato "*FASTA*" (usado para comparações tanto de sequências de proteínas quanto sequências de DNA).

As sequências "*FASTA*" encontradas foram utilizadas, separadamente, para identificação de regiões homólogas no genoma de feijão, utilizando a ferramenta "*BLAST*" (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no programa online *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>). As sequências de "*Assembly EST*" similares obtidas foram escolhidas para valor de E-value para $< 1 e^{-50}$ com tamanhos acima de 1000 pb. Para confirmar os processos celulares das sequências alvo identificadas em feijão comum foi utilizado o método *blastx* e anotação funcional, buscando no banco de dados *NCBI* por meio do programa *Blast2GO* (CONESA et al., 2015). Em seguida, as sequências alvos selecionadas em feijão comum foram usadas para identificação de marcadores de microssatélites.

2.2. Identificação de marcadores EST-SSR

As sequências selecionadas e homólogas em feijão comum foram copiadas e editadas para identificação de marcadores de microssatélites candidatos utilizando dois procedimentos metodológicos, o primeiro baseado no uso do software *SSRLocator* + *Primer3* e o segundo, baseado apenas no software *WebSat*.

O software *SSRLocator* é utilizado para descoberta de SSRs, desenho de pares de *primers* e simulação de PCR entre os esses iniciadores (*primers*) obtidos a partir de sequências originais e outros arquivos de *FASTA* (MAIA et al., 2008). O *Primer3* é utilizado para sugerir iniciadores de PCR para uma variedade de aplicações, como por exemplo para criar STSs (locais marcados de sequência), para o mapeamento híbrido de radiação, ou para amplificar sequências de polimorfismo de nucleotídeo único (ROZEN; SKALETSKY, 1999).

O software *WebSat* é utilizado para localização de SSRs e desenho de pares de *primers*, orientado pelos tipos de repetição, produzindo di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. O *WebSat* não gera SSRs imperfeitos que geralmente são compostos por perfeitos pequenos, e imperfeitos pequenos isolados tem o uso muito limitado no desenvolvimento de marcadores (MARTINS et al., 2009).

Em ambos processos metodológicos o modelo teste de PCR *in silico* foi realizado utilizando os pares de *primers* de microssatélites desenhados através da ferramenta *primer-BLAST* disponível no *NCBI*. Essa ferramenta é utilizada para verificação de especificidade do par de *primers* contra um banco de dados de interesse, que por ocasião foi o genoma de *P. vulgaris*.

Para a verificação da presença de dímeros entre as sequências *forward* e *reverse* de cada *primer* foi utilizado o *AutoDimer*, um programa que faz uso de um algoritmo de deslizamento semelhante, capaz de comparar duas cadeias sobrepostas de DNA (VALLONE; BUTLER, 2004). Em seguida, os pares de *primers* EST-SSR desenhados foram nomeados de “IFRTXX”, sendo IFRT referente a Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí e XX o número do *primer* SSR (Tabela 2).

2.3. Extração e quantificação de DNA

Todos os métodos e procedimentos para a obtenção e análise dos dados moleculares foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular (LaGeM), localizado no Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sementes de feijão comum, utilizando protocolo de extração pelo método SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) 10% (MCDONALD, 1994). O DNA genômico foi obtido a partir da porção de 1/2 da semente cortada de 20 genótipos diferentes. Três as amostras de cada semente cortadas foram colocadas em tubos de 2 ml, separadamente, com uma esfera de aço inox (8 mm). Em seguida os tubos foram colocados em rack plástico e com movimentos fortes unidirecionais (para cima e para baixo) durante 30 segundos foram macerados. Alíquotas do DNA extraído foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídeo (0,5%/ml). A quantificação foi realizada visualmente, por meio da comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas de DNA com os marcadores de massa molecular conhecida, de DNA fago λ (50, 100 e 200 ng/ μ L). Em seguida, foi feita a diluição do DNA de apenas um dos indivíduos, tomando como parâmetro sua quantificação de 100 pares de base (pb), no qual sua concentração final de DNA foi de 10 ng/ μ l.

2.4. Testes e otimização de amplificação via PCR

Nove prováveis marcadores SSRs ligados a genes de resistência à *Meloidogyne* ssp. em feijão comum foram selecionados (Tabela 2). Apenas os microsatélites com motivos de repetições igual ou maiores de três e perfeitos foram usados para o desenho dos *primers forward* (F) e *reverse* (R).

Para os testes de amplificação e otimização das condições de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) o DNA de um único genótipo foi usado, utilizando o termociclador GeneMate *Series Advance*. Para esta etapa foram utilizados quatro indivíduos para testar o padrão de amplificação dos *primers* sintetizados. O protocolo para o preparo das reações de PCR foi montado para volume final igual a 12 μ l, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Protocolo para reação de PCR para uma amostra do genótipo de *P. vulgaris*.

Reagentes	Concentração	Volume (μ l)	Concentração final
H ₂ O ultrapura	-	6,3	-
DNA	10ng/ μ l	2,0	1,6 ng/ μ l
Primer <i>forward</i>	10 μ M	0,4	0,33 μ M
Primer <i>reverse</i>	10 μ M	0,4	0,33 μ M
Tampão (50mM de KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3)	1X	1,2	1x
MgCl ₂	50 mM	0,5	2,08 mM
dNTP	2,5 mM	1,0	0,20 mM
Taq-polimerase	5U	0,2	1 U
Total	-	12	-

A PCR para o teste de gradiente para temperatura de anelamento (TA) foi realizada. Foi estabelecido um gradiente de 12 TAs para cada *primer* com variação de 0,5 °C para mais e para menos a partir da temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer*. Por exemplo, para os primers com T_m= 55 °C, tivemos como TAs: T1= 50°C, T2= 50,5°C, T3= 51,2°C, T4= 52,2°C, T5= 53,4°C, T6= 54,6°C, T7= 55,8°C, T8= 56,9°C, T9= 58,0°C, T10= 59,0°C, T11= 59,4°C, T12= 60,0°C. As reações foram realizadas para as seguintes condições e etapas: (i) desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; (ii) 35 ciclos com etapas de desnaturação (1 min a 94 °C), (iii) anelamento (1 min, temperatura em gradiente); (iv) extensão (1 min a 72 °C); e por fim, (v) extensão final de 72 °C por mais 7 min.

Em seguida, as PCRs funcionais foram submetidas à eletroforese vertical em géis de poliacrilamida (4%) e corados com nitrato de prata. Após a revelação e secagem do gel, o mesmo foi analisado sob luz branca, permitindo a identificação dos genótipos e a sua qualidade no que diz respeito à nitidez das bandas e a existência ou não de ampliações inespecíficas. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram obtidos estimados usando marcador de peso molecular (*Ladder* 50 pb).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Homologia e desenho dos primers SSR

A partir das seguintes bases de dados: *NCBI*, *Scopus*, *Science Direct* e Periódicos CAPES, foi encontrado sete genes descritos na literatura que conferem resistência à nematoide de galha (*Meloidogyne* ssp.) em soja (*Glycine max*), sendo eles: Rhg1, Rhg4 (CONCIBIDO et al., 2004), Rmi1 (LUZZI et al., 1994), Extensin 1, Extensin 2, PectinEsterase 1 e EREBP (PHAM et al., 2013), com elevada homologia em feijão comum e ocorrência de marcadores (Tabela 2).

Foram identificadas regiões com cerca de 70% de homologia em feijão comum, para sequências dos genes selecionados, exceto para o gene *Pectin Esterase 1*, gerando uma taxa de transferibilidade de sequência de 87%. Este sucesso de sintenia gênica entre as duas espécies já é bem reportado na literatura, o qual se deve ao fato de serem grupos irmãos filogeneticamente, favorecendo a alta ocorrência de genes ortólogos entre elas (SCHMUTZ et al., 2014).

Tabela 2: Descrição de 26 EST-SSRs candidatos a resistência ao nematoide em feijão com sequências *forward* (F) e *reverse* (R), ID do primer; ^A: Primer identificado a partir do *SSRLocator*, ^B: Primer identificado a partir do *WebSat*, ^{AB}: Primer identificado em ambas metodologias; Gene de origem; Cromossomo de origem (Cr.); Temperatura de melting (TM); Tamanho esperado (TE); Motivo de repetição; (*) Primer selecionado para os testes de amplificação e otimização; Número do acesso *NCBI*.

Nº	ID do Primer	Gene	Cr.	TM	TE	Sequência do Primer (5' – 3')	Motivo de Repetição	Número de Acesso <i>NCBI</i>
1	IFRT01 ^A	EREBP	9	59°C	202	F: TGTGTGGAGGAGCTATTATCTCTG R: GCAAAGGGTTTGGACTTGGTG	(CGG) ₃	XM_007139006.1
2	IFRT02 ^{A*}	EREBP	9	59°C	206	F: GGGTGGTAACCTCACCTTCA R: GGCGAGGAAAACAGACACTC	(ATT) ₃ (ATT) ₃	XM_007133308.1
3	IFRT03 ^{AB*}	EREBP	9	59°C	197	F: TCGTTCATGGAGTTCATAGCA R: AATCCACAGAGCCATCCTTG	(CTT) ₄	No match
4	IFRT04 ^A	Ext1	3	60°C	201	F: CCCACACACTCCACTTCCTT R: AGGAACACATTGTGCACTGG	(GTT) ₃	XM_007154277.1
5	IFRT05 ^A	Ext1	3	60°C	201	F: CCCTAAAAGCCACGTCACAT R: GAGAGGGTGGAGGGGAGTAA	(CGCCAC) ₃	XM_007154277.1
6	IFRT06 ^{A*}	Ext1	3	60°C	200	F: CACCTCCTTCCACCACAAAC R: TCTGGGGTAGTTTCCATTGC	(CGG) ₃ (CTA) ₃ (CCG) ₄ (CTA) ₃	XM_007154277.1
7	IFRT07 ^B	Ext1	3	60°C	187	F: GTTCCTCTTGTGAAAACCCTTG R: GGTGGAGGTGGTGGTAGTAGG	(CGC) ₃	XM_007154277.1
8	IFRT08 ^B	Ext1	3	59°C	242	F: CCTACTACTCACCACCTCCACC R: AAGCAAGAACACCAGAAAGGAG	(CCG) ₄	XM_007154277.1
9	IFRT09 ^{B*}	Ext1	3	59°C	291	F: CAAGAAACGAGAAAAGAAGGGA R: GGTGCTGACCAAATAAGACTCAC	(TT) ₅	XM_007154277.1

N°	ID do Primer	Gene	Cr.	TM	TE	Sequência do <i>Primer</i> (5' – 3')	Motivo de Repetição	Número de Acesso NCBI
10	IFRT10 ^A	Ext2	8	59°C	198	F: AGTCTCCTCCTCCACCATCA R: GAGACTTGTAGTAGTAGGGAGGTGG11T	(CTA) ₃ (CAC) ₃	XM_007139060.1
11	IFRT11 ^{A*}	Ext2	8	59°C	197	F: CATCACCACCACCACCATAC R: TGATGGATCAGGTGGAGGA	(TAC) ₃ (CCA) ₃ (TAC) ₃ (TAC) ₃ (CTA) ₃	XM_007139060.1
12	IFRT12 ^A	Ext2	8	59°C	211	F: CACCACCACCCCATACTAC R: TGGTGAGGGTGAGGATAAGC	(CTA) ₃ (CCA) ₃ (CAC) ₄ (CTA) ₃ (CTC) ₃	XM_007139060.1
13	IFRT13 ^A	Ext2	8	61°C	182	F: TCCTCCTCCACCTTCTCCAT R: AGTAGGGTGGTGGTGGTGAT	(CTA) ₃ (CCA) ₃ (CAC) ₃	XM_007139060.1
14	IFRT14 ^B	Ext2	8	59°C	394	F: ATCACCACCACCACCCTACTAC R: ACCGACAACCTTAACGATCAAT	(CTC) ₄	XM_007139060.1
15	IFRT15 ^{AB*}	Ext2	8	60°C	190	F: GTCGCTTATCCTCACCTCA R: GTCGAAGCATCAGCATCAGA	(ATT) ₅	XM_007135485.1
16	IFRT16 ^{AB}	Ext2	8	61°C	208	F: ACCTCCTCCACCTGATCCAT R: AGATGGTGGTGGTGGTGACT	(CAC) ₄	XM_007139060.1
17	IFRT17 ^A	Rhg1	1	59°C	200	F: CTCCACATCACTTCCAACACA R: AGCAGAGTCCACACCCAGAA	(AAGA) ₃	XM_007163524.1
18	IFRT18 ^A	Rhg1	1	59°C	220	F: GGTGGGAGTTCCAAGAATGA R: AGCTCCCATTTCAAGGCATTA	(CTT) ₃	XM_007163524.1
19	IFRT19 ^A	Rhg1	1	59°C	204	F: TGTACCTCCATTCCCAGGAG R: TGGAGTTGGCTTTCTTCAGC	(GCT) ₃	XM_007163524.1
20	IFRT20 ^{B*}	Rhg1	1	59°C	208	F: TCTCTCTCTCACGCTCTCAA R: AGGTTGGTTTTCTCCACTACCA	(TC) ₅	XM_007163524.1

N°	ID do Primer	Gene	Cr.	TM	TE	Sequência do <i>Primer</i> (5' – 3')	Motivo de Repetição	Número de Acesso NCBI
21	IFRT21 ^B	Rhg1	1	59°C	357	F: TGGTAGTGGAGAAAACCAACCT R: ACGGAAGCTGGATCACAATAAC	(AAG) ₃	XM_007163524.1
22	IFRT22 ^A	Rhg4	1	60°C	185	F: GTTCCAAAGTTCCCAAGCAA R: ACCACAATACCTCCGATCCA	(GGT) ₃	XM_007163741.1
23	IFRT23 ^B	Rhg4	1	60°C	344	F: TTGCTATATGTTTGCTGTTGGG R: AGTATCGTCCAATGCCCTTCTA	(TTT) ₄	No match
24	IFRT24 ^{AB}	Rhg4	1	60°C	221	F: CTCCACTGCCTTGCAATTTT R: CGGTGATCAGTTCCATCAAA	(TTTAG) ₃	XM_007136854.1
25	IFRT25 ^{AB*}	Rhg4	1	59°C	212	F: AACCTACCAAAGGCCAGAT R: TGCAGGAATGCTTGATTGAG	(GAA) ₄	XM_007163741.1
26	IFRT26 ^{B*}	Rmi1	2	60°C	352	F: AAAATTCCCATTGTCCTCTCCT R: GAAACAACTTTTGGCTTTGGTG	(CGA) ₄	XM_007159942.1

VIEIRA et al., 2016.

Usando as sequências alvos homólogas em feijão comum foi possível recuperar os processos funcionais verificados nos genes selecionados na soja, com exceção do gene *Ext1*, com média de similaridade de 82,5% e valores de *e-value* variando de 0 a 2,9 e-168. Em geral, os processos funcionais envolveram cinco categorias: estrutura e organização da parede celular, componente integral de membrana, atividade da proteína quinase, regulação de transcrição e formação de órgãos florais (Tabela 3). Esta comparação corrobora com a integralidade funcional por homologia, obtida utilizando a transferibilidade de *ESTs* (*Expressed Sequence Tag*) de soja em feijão comum.

Tabela 3. Processos celulares ligados às sequências homólogas.

Gene	Proteínas	Processos celulares
EREBPm	Factor de transcrição responsivo ao etil rap2-12	Regulamento de transcrição
Ext1	Proteína extensa com extensão de rica em leucina 6	-
Ext2	Proteína de pólen ole e i-like protein	Estrutura e organização da parede celular
Rhg1	Quinase receptora	Atividade da proteína quinase
Rhg4	Quinase receptora tmk4	Componente integral da membrana
Rmi1	Recq mediou a proteína de instabilidade do genoma 1	Formação de órgãos florais

A identificação de *EST* heterólogas através da abordagem *in silico* dos estudos comparativos de genes intraespecíficos evolutivamente, tornou-se uma estratégia fácil e de baixo custo, não praticado antes da Era pós-genômica (ZANE et al., 2002; PANDEY; SHARNA, 2012). Esse entendimento permitiu avanços no desenvolvimento de forma eficiente de marcadores SSRs funcionais (STERKY et al., 1998; KALISWAMY et al., 2015), a exemplo deste trabalho e outros (GUPTA et al., 2010; VICTORIA et al., 2011; WANG et al., 2014), demonstrando que os *ESTs* são boas fontes de sequências para prospecção de marcadores microsatélites funcionais (ANDERSEN; LUBBERSTEDT, 2003), que no caso deste estudo estão associados à resistência ao nematoide de galha em feijão.

Vinte e seis SSRs diferentes foram identificados para os *ESTs* encontrados em feijão comum a partir de genes de resistência genética à nematoide de galha em soja. Para cada um dos seis genes foram identificados pelo menos três SSRs com motivos de

repetição diferentes, com exceção do gene *Rmi1* para o qual identificou-se apenas um SSR (Tabela 2). Ainda nesta tabela, pode-se observar uma seleção diferencial de SSRs através dos programas *WebSat* e *SSRLocator*, sendo a maior distinção para os SSRs imperfeitos e interrompidos, os quais foram apenas selecionados pelo segundo programa. Essa diferença permite indicar que o *SSRLocator* é mais específico na exploração de SSRs, disponibilizando um maior número de configurações quando comparado ao *WebSat*.

O comprimento dos pares de *Primers* desenhados foram adequados, variando entre 18 e 26 pares de bases (pb), considerando que o comprimento aproximado de 20 pb definido como ótimo (WANG et al., 2014). O tamanho esperado do produto de amplificação via PCR variou entre 182 e 357 pb, com uma amplitude da temperatura de *melting* (T_m) de 59 à 61°C, que permite estimar um valor médio aproximado a 60°C tanto entre as sequências (*Forward* e *Reverse*) de cada e entre os pares de *primers*.

A pequena diferença média de T_m entre as sequências facilita o ajuste da temperatura de anelamento (T_a) do *primers F* e *R*, definidas pela expressão “ $T_a = T_m \pm 5$ ”, as quais devem ser similares. Definindo T_a como a temperatura em que ocorre o pareamento entre *primer* e a região flanqueadora do alvo de DNA de interesse. A ampla faixa de temperaturas e comprimento das sequências dos *primers* de SSR >18 pb confere aos marcadores desenhados uma alta stringência (BORNET; BRANCHARD, 2001). Essa maior confiabilidade e reprodutibilidade fornece a certeza de estar avaliando um loco específico, além de facilitar a comparação dos dados por diferentes pesquisadores.

Espera-se que os 26 EST-SSRs apresentem uma elevada taxa de amplificação, uma vez que não houve competição entre as sequências *F* e *R* de cada *primer*, tampouco a formação de auto dímeros. Ainda foi possível recuperar ESTs para 87% dos *primers* desenhados, utilizando a ferramenta *PrimerBLAST*, nos permitindo realizar uma pré-seleção mais criteriosa, buscando aumentar essa taxa de amplificação (Tabela 2). O sucesso desta taxa em estudos de transferibilidade através de ESTs tem sido elevada, sendo relatada na literatura valores de 60 a 90% em diferentes espécies (SAHA et al., 2004; LURO et al., 2008; WANG et al. 2014).

Considerando a classificação dos SSRs com base nos motivos de repetição identificados, verificou-se um maior número de marcadores de repetições trinucleotídeos, igual a 15, enquanto o menor número foi um (01) e equitativo para os motivos de repetições tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Quanto ao número de repetições em *tandem*

constatou-se um número relativamente baixo, variando de três a cinco repetições. Dos 18 SSRs, 12 foram classificados como perfeitos, cinco compostos e um interrompido (Tabela 4). SSRs perfeitos são aqueles com sequência de motivo de repetição não interrompida; já os interrompidos apresentam uma sequência do motivo de repetição descontínua por uma pequena e diferente sequência; as regiões imperfeitas são aquelas que possuem um par de bases diferente entre os motivos que se repetem e os compostos são aqueles formados com pelo menos dois motivos de repetição distintos (OLIVEIRA et al. 2006).

Tabela 4. Número de EST-SSR classificados pelo motivo de repetição e tipos por programa gerados.

Motivo de repetição	SSRLocator	WebSat
Dinucleotídeo	0	2
Trinucleotídeo	15	10
Tetranucleotídeo	1	0
Pentanucleotídeo	1	1
Hexanucleotídeos	1	0
Tipo do SSR		
Perfeitos	12	13
Imperfeitos	0	0
Interrompido	1	0
Composto	5	0
Total de SSR	18	13

A alta abundância de di-, trinucleotídeos e pequena amplitude no comprimento dos motivos de repetição no SSR estão relacionadas a estrutura alvo da sequência de EST e de sua dinâmica mutacional (SCHLÖTTERER, 2000). Em sequências expressas de vegetais, a predominância dessas repetições tem sido amplamente relatada (GUPTA et al., 2010; WANG et al., 2014; HONG et al., 2015; BOCCACCI et al., 2015). As regiões de ESTs são alvos transcricionais ricos em dímeros nas regiões transcritas não-traduzidas (UTR - Untranslated Region) e predomínio de trímeros na matriz de leitura aberta (ORF - Open Reading Frame) (ELLEGRÉN, 2004). Estas regiões apresentam menor taxa mutacional quando comparadas às outras regiões repetitivas do genoma não associadas a genes (LI et al., 2004), corroborando para uma menor amplitude dos motivos de repetições, visto que alterações bruscas em ORFs estariam sendo selecionadas negativamente (METZGAR et al., 2002). Esse fato indica que o tamanho reduzido se

deve à ação de seleção que visa preservar a estrutura do transcrito, pois alterações bruscas afetariam facilmente o produto gênico correspondente.

3.2 Testes para otimização de amplificação via PCR

Quinze dos 26 SSRs diferentes identificados foram selecionados por apresentarem um número de repetições maior que três (Tabela 2, VIEIRA et al., 2016) e nove destes 15 pares de *primers* foram sintetizados para a realização dos testes de amplificação. Foram escolhidos pelo menos dois SSRs com motivos de repetição diferentes, com exceção dos genes *Rhg1*, *Rhg4* e *Rmi1* para os quais identificou-se apenas um SSR (Tabela 2).

Os nove *primers* denominados: IFRT02, IFRT03, IFRT06, IFRT09, IFRT11, IFRT15, IFRT20, IFRT25 e IFRT26 foram submetidos a testes de amplificação (Figura 1). As reações foram conduzidas separadamente para cada par de *primers* seguindo a temperatura de *melting* como temperatura de anelamento, isto é, complementariedade (Tabela 2). Todos os *primers* selecionados amplificaram uma única banda entre 200 e 300 pares de bases (Figura 1 e 2). Isso indica o sucesso da transferibilidade do desenho dos *primers* baseados na homologia de sequências alvos de soja em feijão comum.

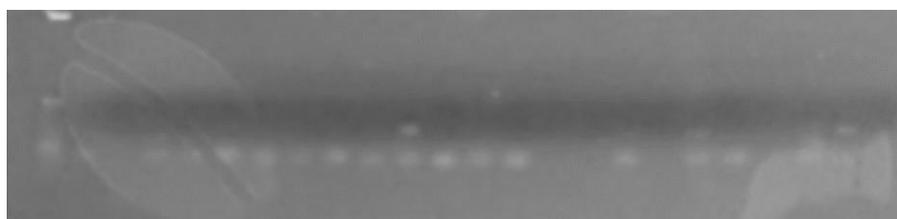


Figura 1. Teste de amplificação de nove *primers* candidatos a resistência à *Meloidogyne* selecionados em gel de agarose a 1,2%.

Embora, cada *primer* tenha gerado produto de amplificação aparentemente único em gel de agarose 1,2%, quando visualizados em gel de poliacrilamida a 4%, todos *primers* apresentaram produtos inespecíficos de amplificação. Como medida de mitigar a inespecificidade realizou-se teste de gradiente, uma vez que a T_a é uma das principais causas. No teste de gradiente definimos T_a adequadas de amplificação que variaram de 50 a 60 °C (Tabela 5). Todos os 09 pares de *primers* testados apresentaram amplificação específica, sendo identificada a temperatura ótima de amplificação (Figura 2).

Tabela 5. Temperatura de anelamento (TA) adequada e obtidas no teste de gradiente dos *primers* selecionados.

Pares de <i>Primer</i>	Melhor Ta (°C)	Padrão de amplificação
IFRT02	50,5	Bandas específicas
IFRT03	59,0	Bandas específicas
IFRT06	52,2	Bandas específicas
IFRT09	55,8	Bandas específicas
IFRT11	56,9	Bandas específicas
IFRT15	58,0	Bandas específicas
IFRT20	51,2	Bandas específicas
IFRT25	53,4	Bandas específicas
IFRT26	59,0	Bandas específicas

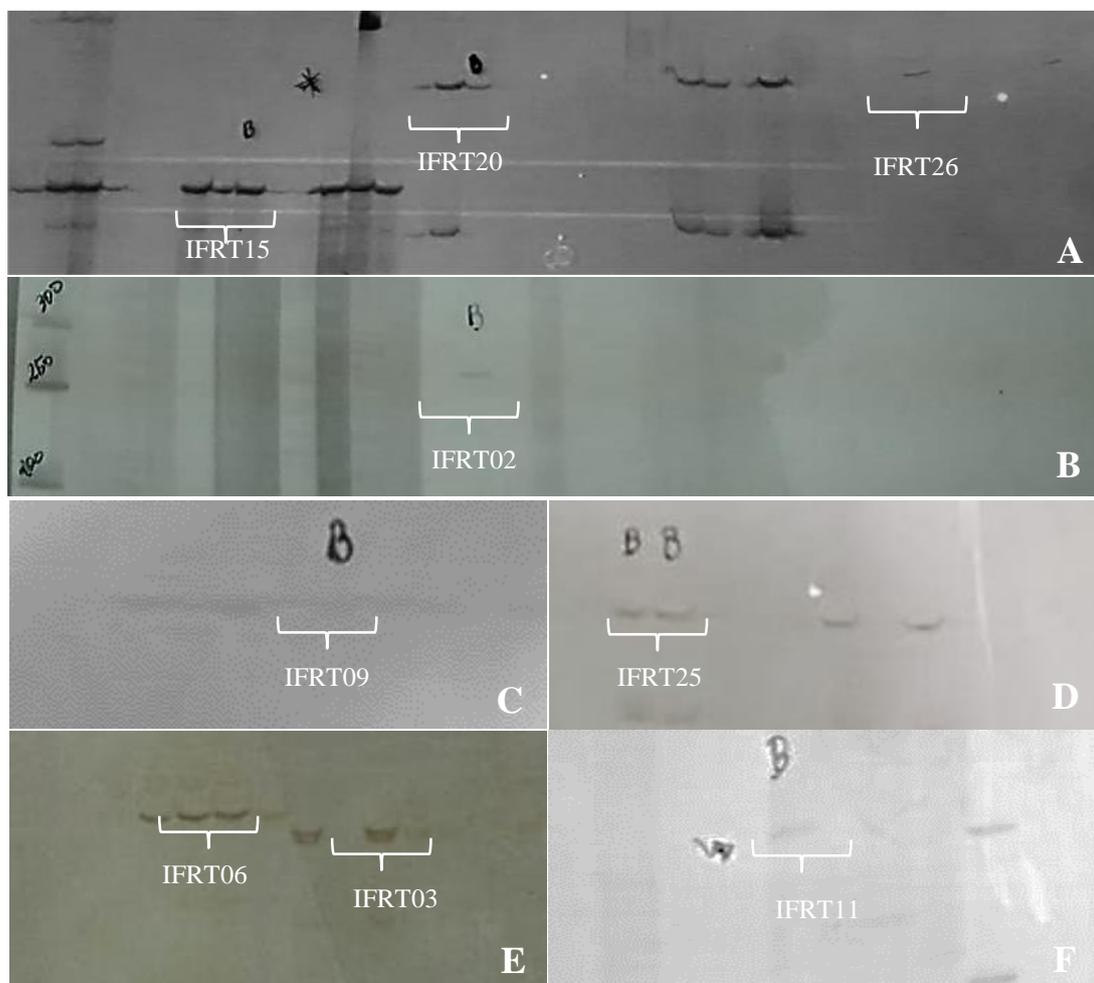


Figura 2. Marcadores microssatélites detectados para os *primers* (A) IFRT15, IFRT20; IFRT26; (B) IFRT02; (C) IFRT09; (D) IFRT25; (E) IFRT06; IFRT03 e (F) IFRT11, respectivamente, em gel de poliacrilamida 4%.

Este trabalho representa resultados promissores, no qual são identificados e desenhados marcadores de DNA candidatos à estarem associados à resistência a nematoide em feijão comum. Uma vez validada esta ligação genética, através de ensaios de avaliação fenotípica de hospedabilidade à nematoide de galha em feijão e estudos de associação ao polimorfismo amplificados pelos marcadores, estes poderão auxiliar a programas de melhoramento, delineando seus cruzamentos de forma direcionada ao fenótipo de interesse, neste caso a resistência à nematoide de galha. Ainda vale destacar que estes marcadores facilitarão o desenvolvimento de genótipos superiores com múltiplas fontes de resistência.

4. CONCLUSÃO

A transferibilidade entre espécies distintas, mas próximas evolutivamente a exemplo da soja e feijão comum, permite aumentar a eficiência na transferência da informação genômica através da homologia de *ESTs* de genes de interesse. Assim, com este trabalho, nove de 26 *EST-SSRs* candidatos em feijão distribuídos em sete diferentes genes que conferem resistência a nematoide de galha em soja estão disponíveis para validação.

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- ANDERSEN, J. R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends in plant science**, v. 8, n. 11, p. 554-560, 2003.
- AVISE, J. C. J. L. HAMRICK [eds.] Conservation genetics: case histories from nature. **Chapman and Hall**, New York, USA, 1996.
- BARBOSA, F. B.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247p. Documentos 272.
- BARED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v; 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERNARD, H. R. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. **Rowman Altamira**, 2011.

BOCCACCI, P.; BELTRAMO, C.; PRANDO, M. S.; LEMBO, A.; SARTOR, C.; MEHLENBACHER, S.; BOTTA, R.; MARINONI, D. T. In silico mining, characterization and cross-species transferability of EST-SSR markers for European hazelnut (*Corylus avellana* L.). **Molecular Breeding**, v. 35, n. 1, p. 1-14, 2015.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.

BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 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**, v. 121, n. 5, p. 801-813, 2010.

BUSO, G.; AMARAL, Z.; BRONDANI, R.; FERREIRA, M. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 252-254, 2006.

CARDOSO, P. C.; BRONDANI, C.; MENEZES, I. P. P.; VALDISSER, P. A. M. R.; BORBA, T. C.; DEL PELOSO, M. J.; VIANELLO, R. P. Discrimination of common bean cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1964-1978, 2014.

CARDOSO, P. C.; VEIGA, M. M.; MENEZES, I. P. P.; VALDISSER, P. A. M. R.; BORBA, T. C.; MELO, L.; DEL PELOSO, M. J.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Resources**, v. 12, n. 4, p. 5467-5484, 2013.

CARNEIRO, R. G.; FERRAZ, S.; REGAZZI, A. J. Estudo de mecanismo de resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em variedades de feijoeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 16, n. 1/2, p. 41-52, 1992.

COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHIAN, M. Rootknot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, p. 1251-1262, 2011.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v. 44, n. 4, p. 1121-1131, 2004.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

- COUTINHO, T. C.; GUIMARÃES, M. A.; VIDAL, M. S. Diversidade genética entre acessos de algodão por meio de marcadores microsatélites. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 1447-1458, 2014.
- COYNE, D.L.; FOURIE, H.H.; MOENS, M. **Current and Future Management Strategies in Resource poor Farming**. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR J.L (Ed.). Root-knot 46 Nematodes. UK: CAB Internationa, 2009. p.444-475.
- DULLEY, R. D. Noções de natureza, ambiente, meio ambiente, recursos ambientais e recursos naturais. **Agric. São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 15-26, 2004.
- DUTRA, M.R; CAMPOS, V.P; TOYOTA, M. Manejo do solo e da irrigação para o controle de *Meloidogyne javanica* em Alface. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.1, p.29-34, 2003.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998. 220p.
- FUGANTI, R.; BENEVENTP, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARRABALARIAS, C. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de Marcadores Moleculares de Microsatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 125130, 2004.
- GUPTA, S.; SHUKLA, R.; ROY, S.; SEN, N.; SHARMA, A. In silico SSR and FDM analysis through EST sequences in *Ocimum basilicum*. **Plant Omics J**, v. 3, n. 4, p. 121-128, 2010.
- HONG, J.-H.; KWON, Y.-S.; MISHRA, R. K.; KIM, D. H. Construction of EST-SSR Databases for Effective Cultivar Identification and Their Applicability to Complement for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Distinctness Test. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 01, p. 113, 2015.
- INOMOTO, M. M; ASMUS, G. L. Controle de nematoides une resistência, rotação e nematicidas. **Visão agrícola**, n. 6, jul-dez, 2006.
- KALISWAMY, P.; VELLINGIRI, S.; NATHAN, B.; SELVARAJ, S. Microsatellite analysis in the genome of Acanthaceae: An in silico approach. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 152, 2015
- KAUR, S.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KAUR, V. Simple Sequence Repeat Markers in Genetic Divergence and Marker-Assisted Selection of Rice Cultivars: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 41-49, 2015.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology Evolution**, v. 21, p. 991-1007, 2004.

LURO, F. L.; COSTANTINO, G.; TEROL, J.; ARGOUT, X.; ALLARIO, T.; WINCKER, P.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 287, 2008.

LUZZI, B.; BOERMA, H.; HUSSEY, R. A gene for resistance to the southern root-knot nematode in soybean. **Journal of Heredity**, v. 85, n. 6, p. 484-486, 1994.

MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; DE SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; DE CARVALHO, F. I. F.; COSTA DE OLIVEIRA, A. SSR Locator: Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. **International Journal of Plant Genomics**, v. 08, 2008.

MARTINS, W. S.; LUCAS, D. C. S.; DE SOUZA NEVES, K. F.; BERTIOLI, D. J. WebSat- A web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282, 2009.

McDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v. 22, p. 171-176, 1994.

METZGAR, D.; LIU, L.; HANSEN, C.; DYBVIK, K.; WILLS, C. Domain-level differences in microsatellite distribution and content result from different relative rates of insertion and deletion mutations. **Genome Research**, v. 12, n. 3, p. 408-413, 2002.

MÜLLER, B. S.; SAKAMOTO, T.; DE MENEZES, I. P. P.; PRADO, G. S.; MARTINS, W. S.; BRONDANI, C.; DE BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P. Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs. **Plant Molecular Biology**, v. 86, n. 4-5, p. 455-470, 2014.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I. VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PANDEY, M.; SHARMA, J. **Efficiency of microsatellite isolation from orchids via next generation sequencing**. 2012.

PHAM, A.-T.; MCNALLY, K.; ABDEL-HALEEM, H.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Fine mapping and identification of candidate genes controlling the resistance to southern root-knot nematode in PI 96354. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1825-1838, 2013.

POMPEU, A. S. **Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. In: FEIJÃO FATORES DE PRODUÇÃO E QUALIDADE, Coord. E.A. BULISANI, Campinas: Fundação Cargill, p.1-28, 1987.

RIBEIRO, J. F.; OLIVEIRA, M. C.; GULIAS, A. P. S. M; FAGG, J. M. F.; AQUINO, F. G. **Usos múltiplos da biodiversidade no bioma cerrado: estratégia sustentável para a sociedade, o agronegócio e os recursos naturais**. In: FALEIRO, F. G.; FARIA NETO,

A. L. (Ed.) Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológico, 2008. p. 337-360.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. *Primer3* on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Springer, p. 365-386, 1999.

SAHA, M. C.; MIAN, M. R.; EUJAYL, I.; ZWONITZER, J. C.; WANG, L.; MAY, G. D. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, n. 4, p. 783-791, 2004.

SANTANA, A. R. **Transferibilidade e desenvolvimento de sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus vogel* (Fabaceae)**. Dissertação – Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Goiânia, 2014.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

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

SILVA, O. F.; WANDER, A. E. **O feijão-comum no Brasil passado, presente e futuro**. 2013

STERKY, F.; REGAN, S.; KARLSSON, J.; HERTZBERG, M.; ROHDE, A.; HOLMBERG, A.; AMINI, B.; BHALERAO, R.; LARSSON, M.; VILLARROEL, R. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 22, p. 13330-13335, 1998.

TELLES, M.P.C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - *Annonaceae*) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for *Primer*-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VICTORIA, F. C.; DA MAIA, L. C.; DE OLIVEIRA, A. C. *In silico* comparative analysis of SSR markers in plants. *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 1, p. 15, 2011.

VIEIRA, C.; VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.; BORÉM, A. Adubação mineral e calagem. *Feijão*, v. 2, p. 115-142, 1998.

VIEIRA, L. D.; SILVA, J. O.; PEREIRA, C. C. O.; CARVALHO, S. A.; SILVEIRA, R. D. D.; MALAFAIA, G.; MENEZES, I. P. P. In silico identification of putative expressed sequence tag (EST)-simple sequence repeats (SSRs) markers of resistance to

Meloidogyne spp. in common bean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 23, p. 2007-2012, June, 2016.

WALBER, R.; JULIATTI, F.; SANTOS, M. Avaliação de acessos de feijoeiro em relação aos nematoides das galhas. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 2003. **Sociedade Brasileira de Fitopatologia Brasília**. p. 293-294.

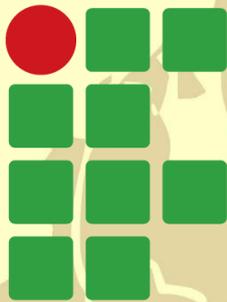
WANDER, A. E. **Perspectivas de mercado interno e externo para o feijão**. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. 2005. p. 892-895.

WANG, B.; ZHU, P.; YUAN, Y.; WANG, C.; YU, C.; ZHANG, H.; ZHU, X.; WANG, W.; YAO, C.; ZHUANG, Z. Development of *EST*-SSR markers related to salt tolerance and their application in genetic diversity and evolution analysis in *Gossypium*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3732-3746, 2014

YOKOYAMA, L. Cultivo do feijoeiro comum: importância econômica. **Sistemas de Produção**, v. 2, 2007.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ANEXO



**INSTITUTO
FEDERAL**

Goiano

Campus
Urutaí

