

MATEUS RODRIGUES PEREIRA

**Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites  
para o Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436d  
2005

Pereira, Mateus Rodrigues, 1978-

Desenvolvimento de marcadores microssatélites para o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). / Mateus Rodrigues Pereira. – Viçosa: UFV, 2005.  
xii, 37f : il. ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referência bibliográfica: f. 31-37

1. Feijão – Cultivares. 2. Feijão – Genética. 3. Microssatélites (Genética). 4. Marcadores genéticos.  
5. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6523

MATEUS RODRIGUES PEREIRA

**Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites  
para o Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2005.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Cosme Damião Cruz  
(Conselheiro)

---

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro

---

Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

*Aos meus pais Gilberto e Marilene  
Aos meus irmãos Tiago e Raquel  
À tia Ana Célia*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e pela oportunidade de vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus maravilhosos pais Gilberto e Marilene, pelo incentivo constante, pelo apoio em todos os momentos através das orações, e pela confiança em mim depositada.

Aos meus irmãos Tiago e Raquel pelas orações e por terem compartilhado comigo os momentos de dificuldade.

À tia Ana Célia e à prima Lígia pelas orações, pelo incentivo em todos os momentos e pelo apoio financeiro concedido.

Às tias Cleuza e Zizinha que oraram e torceram por mim.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira pela orientação e por ter me aceitado como integrante de sua equipe de trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela orientação e pelo apoio concedido durante a realização da pesquisa.

Ao professor Cosme Damião Cruz pelas sugestões e pelo aprendizado obtido durante o curso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e melhoramento pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para a realização do curso.

Ao amigo Vagner Tebaldi de Queiroz por ter me apoiado durante todo o curso, transmitindo seus conhecimentos sem medir esforços, pelos ensinamentos críticos e sugestões que foram fundamentais para minha formação.

Às amigas Cassiana Severiano de Sousa, Márcia Costa e Valéria Mafra que me ensinaram muito durante nosso convívio no laboratório, pelas sugestões, críticas, que foram fundamentais para a realização do trabalho.

Aos amigos do laboratório: João Paulo, Naldo, Márcia Flores, Luciano, Newton, Fábio (Zulu), Luiz, Janaína, Fernanda, Klever, Tiago, Edgard, Suelen, Demerson, Francisco, David, Marcinho (Patarroyo) que sempre se mostraram aptos a auxiliar nas horas necessárias e pelo excelente convívio.

Aos amigos do laboratório de seqüenciamento: Andréia, Ana, Polyana e Viviane pela amizade, pelo excelente convívio e pelo apoio de todos os momentos.

Aos funcionários Aloísio, Gláucia e Fausto, pelo apoio na condução do trabalho.

À todos que com amizade e companheirismo contribuíram para que esta etapa fosse vencida.

## **BIOGRAFIA**

MATEUS RODRIGUES PEREIRA, filho de Gilberto Pereira Marques e Marilene Rodrigues Vicente Marques, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 22 de agosto de 1978.

De 1994 a 1996, cursou o Ensino Médio no Colégio Sagrado Coração de Maria em Ubá, Minas Gerais.

Em maio de 1999 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), colando grau em março de 2003.

Em agosto de 2003, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Genética Molecular e Melhoramento Vegetal, defendendo tese em julho de 2005.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE BREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Marcadores moleculares.....	4
3.1.1. Marcadores microssatélites.....	4
3.2. Ocorrência dos microssatélites.....	6
3.3. Distribuição dos microssatélites.....	7
3.4. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites.....	7
3.5. Desenvolvimento de <i>primers</i> microssatélites para o feijoeiro-comum...	8
3.6. Mapeamento genético do feijoeiro-comum utilizando marcadores SSR	10
3.7. Programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Material genético.e extração de DNA.....	12
4.2. Digestão do DNA genômico, separação e purificação dos fragmentos...	12
4.3. Remoção das extremidades coesivas e desfosforilação dos fragmentos.	13
4.4. Ligação do adaptador universal SNX aos fragmentos de DNA.....	13
4.5. Confirmação da eficiência da reação de ligação.....	14



4.6. Reação de <i>nick-ligation</i> .....	14
4.7. Reação pós <i>nick-ligation</i> .....	15
4.8. Hibridização dos fragmentos pós <i>Nick-ligation</i> com oligonucleotídeos contendo microssatélites.....	15
4.9. Preparação das partículas magnéticas.....	15
4.10. Captura dos fragmentos de DNA hibridizados.....	16
4.11. Síntese de fragmentos de DNA fita dupla.....	17
4.12. Preparação dos fragmentos de DNA e do plasmídeo.....	17
4.13. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor e transformação de células competentes.....	18
4.14. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos <i>primers</i> microssatélites.....	18
4.15. Determinação das condições de amplificação dos <i>primers</i> SSR.....	19
4.16. Validação dos <i>primers</i> SSR.....	20
4.17. Nomenclatura dos <i>primers</i> microssatélites.....	21
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 22
5.1. Seqüenciamento, análise e classificação dos fragmentos de DNA contendo microssatélites.....	22
5.2. Desenho dos <i>primers</i> microssatélites.....	24
5.3. Validação dos <i>primers</i> microssatélites em cultivares geneticamente divergentes.....	26
5.4. Cálculo do Índice de Informação de Polimorfismo ( <i>PIC</i> ).....	28
 6. CONCLUSÕES.....	 30
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 31

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase iniciada arbitrariamente

BAC- Cromossomo bacteriano artificial

EMBL – European Molecular Biology Laboratory

Genbank- NCBI Genetic Sequence Database

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RAPD- Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RFLP- Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição

RIL's- linhagens endogâmicas recombinantes

SCAR- Regiões amplificadas caracterizadas por seqüência

SSR- Sequências simples repetidas

Pb – pares de base

kb – kilobase ( $10^3$  pb)

cM – centiMorgans

$T_m$  – temperatura de pareamento do *primer*

## RESUMO

PEREIRA, Mateus Rodrigues, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005. **Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para o Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Cosme Damião Cruz.

O feijão é um alimento protéico amplamente consumido pela população brasileira. O Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor mundial de feijão com produtividade média em torno de 700 Kg/ha. A cultura do feijão tem potencial para produzir acima de 4000 Kg/ha. Apesar de alta, a produção brasileira ainda sofre grandes prejuízos em virtude da indisponibilidade e inacessibilidade de uma tecnologia de plantio e manejo, cultivo em solos de baixa fertilidade, que exigem adubação, além da suscetibilidade de cultivares a diversas pragas e doenças, que constituem os principais fatores para a baixa produtividade nacional. Das estratégias utilizadas para minimizar as perdas na produção, o melhoramento genético do feijoeiro, visando à obtenção de cultivares de interesse econômico, tem se destacado, pois a utilização de tais cultivares é eficiente, segura e acessível a produtores. Atualmente, os programas de melhoramento têm sido grandemente auxiliados pelo uso de técnicas envolvendo marcadores moleculares. Marcadores microssatélites são constituídos de motivos que podem variar de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*. São de herança codominante e multialélica, apresentam um elevado conteúdo de informação e são altamente polimórficos. Os marcadores

microssatélites são amplificados pela técnica de PCR utilizando pares de *primers* específicos e são tecnicamente simples desde que existam *primers* disponíveis. Além disso, a amplificação dos fragmentos de DNA é bastante reprodutível. No mapa genético integrado da espécie, foram posicionados 115 marcadores microssatélites já desenvolvidos. Foi identificado um marcador microssatélite localizado a 7,6 cM associado a um gene de resistência à mancha-angular, e outro localizado dentro da região do terceiro intron do gene que confere resistência ao crestamento bacteriano. O presente trabalho teve como objetivo a construção de *primers* microssatélites para fornecer ferramentas que auxiliem o desenvolvimento de programas de melhoramento do feijoeiro-comum. Foram seqüenciados fragmentos obtidos de bibliotecas enriquecidas para repetições CCA, AT e GGC. As seqüências foram analisadas e os *primers* foram desenhados a partir das regiões flanqueadoras dos microssatélites. A análise das seqüências foi realizada com o auxílio dos programas *SeqMan* 3.57 (DNASTAR, Madison, WI, EUA) e SSRIT (<http://www.gramene.org/>). Os *primers* microssatélites foram desenhados com auxílio dos programas Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Os *primers* que geraram produtos de amplificação nos cultivares Ouro Negro e AND 277, foram utilizados para a validação em 28 variedades diferentes da espécie *Phaseolus vulgaris*. Algumas dessas variedades são mesoamericanas e outras são andinas. Foram desenhados 34 pares de *primers*, dos quais 25 se mostraram viáveis quando analisados pelo programa PrimerSelect 3.1. Destes 25, apenas três mostraram-se polimórficos entre as variedades testadas. Foi também determinado o conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC*) para tais *primers*. Pretende-se, em trabalhos futuros, construir novas bibliotecas para a obtenção de novos *primers* microssatélites.

## ABSTRACT

PEREIRA, Mateus Rodrigues, M. S., University Federal de Viçosa, July 2005.  
**Development of Microsatellite Markers for Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** Advisor: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Cosme Damião Cruz.

Common bean is a popular high-protein food consumed by the Brazilian population. Brazil ranks first worldwide as producer and consumer of common bean with a mean productivity of around 700 Kg/ha. The crop would have the potential to produce over 4000 Kg/ha. Despite the high production in Brazil, the output is still severely cut back by the lack of available and accessible planting and management technologies, cultivation on low-fertility soils that require fertilization, besides the susceptibility of cultivars to diverse pests and diseases which altogether represent the main factors for the low national productivity. Among the strategies used to mitigate production losses the genetic improvement of common bean, aiming at the establishment of cultivars of economical interest is worth mentioning, since the use of these cultivars is effective, safe and accessible for producers. In the recent past improvement programs have made considerable headway by using techniques that involve molecular markers. Microsatellite markers consist of motifs that can vary from 1 to 6 tandem repeated nucleotides. They have codominate and multiallelic heritability, a high information content and are highly polymorphic. Microsatellite markers are amplified by the PCR technique using specific primer pairs and are

technically simple if primers are available. Besides, the amplification of the DNA fragments is quite repeatable. One hundred and fifteen developed microsatellite markers were allocated in the integrated genetic map of the species. One microsatellite marker was identified at 7.6 cM associated to a gene of leaf spot resistance and another one in the region of the third intron of the gene that confers resistance against common bacterial blight. The present study had the objective of constructing microsatellite primers to provide tools that support the development of common bean improvement programs. Fragments obtained from libraries enriched for the repeats CCA, AT and GGC were sequenced. The sequences were analyzed and the primers designed based on the flanking regions of the microsatellites. The sequence analysis was performed on software *SeqMan* 3.57 (DNASTAR, Madison, WI, EUA) and SSRIT (<http://www.gramene.org/>). The primer microsatellites were designed using software Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) and PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). The primers that generated amplification products in the cultivars Ouro Negro and AND 277 were used to validate 28 different varieties of the species *Phaseolus vulgaris*. Some of these varieties are Mesoamerican and others Andean. Of the 34 designed primer pairs that were analyzed by PrimerSelect 3.1, twenty-five were viable. Only three of the 25 presented polymorphism among the tested varieties. The polymorphism information content (*PIC*) for these primers was also determined. New libraries for the establishment of new microsatellite primers are to be constructed in future studies.

# Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para o Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão é um alimento protéico amplamente consumido pela população brasileira, principalmente a de baixa renda. O hábito de consumo de feijão pelas famílias brasileiras, associadas à ampla adaptação climática dessa cultura, faz com que o feijão esteja distribuído por todo o território nacional. O Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor mundial de feijão. Na safra de 2003, a produção brasileira foi de aproximadamente três milhões de toneladas (IBGE, 2004). A produtividade média da cultura no país está ao redor de 700 kg/ha, mesmo considerando que, no Brasil, a cultura do feijão tem potencial para produzir acima de 4.000 kg/ha (IBGE, 2004).

Apesar de alta, a produção brasileira ainda sofre grandes prejuízos em virtude da indisponibilidade ou inacessibilidade de uma tecnologia de plantio e manejo adaptada aos pequenos e médios produtores, plantio em solos de baixa fertilidade, que exigem adubação, e associação simbiótica ineficiente (VIEIRA et al., 1998), além da suscetibilidade a diversas pragas e doenças que constituem os principais fatores contribuintes para a baixa produtividade nacional (BALARDIN, 1990). VIEIRA (1983) cita mais de 30 doenças que podem atingir o feijoeiro, das quais cerca de oito são de maior importância no território nacional. Dentre estas, merecem destaque as doenças fúngicas: ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*, a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. e a mancha-angular causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.).

Das estratégias utilizadas para minimizar as perdas na produção, o melhoramento genético do feijoeiro, visando a obtenção de cultivares de interesse econômico, tem se destacado, pois a utilização de tais cultivares é eficiente, segura e acessível a produtores. Atualmente os programas de melhoramento têm sido

grandemente auxiliados pelo uso de técnicas envolvendo marcadores moleculares (QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004a).

Os marcadores RAPD e SCAR têm sido, extremamente, úteis para identificar e selecionar genótipos com importantes genes de resistência a vários patógenos (FALEIRO et al., 2003; CAIXETA et al., 2003; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004a). Entretanto, os marcadores RAPD apresentam natureza dominante, baixo conteúdo de informação genética por loco e podem ainda não apresentar reprodutibilidade de resultados, quando a técnica é executada em diferentes condições. Em virtude dessas limitações, a necessidade da utilização de outras classes de marcadores moleculares, para auxiliarem o desenvolvimento dos programas de melhoramento genético do feijoeiro-comum, torna-se cada vez mais evidente.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o seqüenciamento de fragmentos de bibliotecas enriquecidas para SSR, análise dos fragmentos, desenho e teste de *primers* microssatélites para o feijoeiro-comum.

### 2.2. Objetivos específicos

- Seqüenciamento de fragmentos obtidos de bibliotecas enriquecidas para repetições CCA e AT;
- Análise de seqüências e desenho de *primers* baseados nas seqüências flanqueadoras dos microssatélites;
- Validação dos *primers* através de PCR envolvendo diferentes linhagens do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Marcadores moleculares

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA, bem como uma nova classe de marcadores genéticos. Classificados como marcadores moleculares, estes se baseiam na variação natural da seqüência de bases do DNA. Apresentam nível de polimorfismo geralmente alto para cada loco estudado e não são afetados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo, sendo amplamente utilizados em análises genéticas, incluindo a construção de mapas de ligação.

Os marcadores RFLP foram os primeiros a serem empregados na construção de mapas genéticos (BOTSTEIN et al., 1980). Com o surgimento da técnica do PCR (MULLIS e FALOONA, 1987), uma nova geração de marcadores moleculares ganhou grande importância, sendo classificados como marcadores baseados em PCR. Podem ser citados, dentre eles, o RAPD, o AFLP, o SCAR e os microssatélites (SSR). A maioria dos mapas de ligação em feijoeiro-comum se baseia primariamente em RFLP e RAPD. RAPD ou AP-PCR foram denominações descritas por dois grupos distintos - WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e McCLELLAND (1990), respectivamente - para descrever a mesma metodologia, tendo a primeira denominação se tornado mais conhecida. As bandas de DNA originadas pelo RAPD podem ser excisadas, purificadas e clonadas. A partir da clonagem, seqüenciamento e análise das seqüências obtidas, pode-se fazer o desenho de *primers* específicos. Essa metodologia permite a conversão dos marcadores RAPD em SCAR (PARAN e MICHELMORE, 1993).

##### 3.1.1. Marcadores Microssatélites

Atualmente, a classe de marcadores de principal interesse são os microssatélites. Os microssatélites (LITT e LUTY, 1989) foram inicialmente denominados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou seqüências simples repetidas em que um único par ou um pequeno número de pares de bases de DNA

(normalmente menos que 6 pb) é repetido várias vezes (RONGWEN et al., 1995). O comprimento do microssatélite normalmente varia entre 15 e 50 pb (PETES et al. 1997). As repetições podem ser simples perfeitas, simples imperfeitas, compostas perfeitas ou compostas imperfeitas (REDDY et al., 2001). Alguns microssatélites com tamanho de 12 pb foram encontrados e tiveram seus respectivos *primers* desenhados e testados, apresentando polimorfismo entre variedades testadas (CAIXETA et al., 2003a; YU et al., 2000). BECKMANN e SOLLER (1990) criaram a denominação de STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*) que significa sítios de microssatélites marcados por seqüência. Os microssatélites são de natureza co-dominante, multialélicos, apresentam o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo entre as diferentes classes de marcadores, não apresentam os problemas de reprodutibilidade dos marcadores RAPD, são muito freqüentes e se encontram distribuídos ao acaso nos genomas. Todas estas características fazem com que marcadores microssatélites sejam marcadores ideais para mapeamento genético de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo de um loco microssatélite pode ser evidenciado por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se um par de *primers* específicos e complementares a seqüências conservadas que flanqueiam o loco. Deste modo, cada segmento amplificado com diferente tamanho representa um alelo diferente do mesmo loco (YU et al. 1999; CAIXETA et al., 2003a). O polimorfismo é gerado pela perda ou ganho de seqüências repetidas, mais provavelmente através do ganho. Este fenômeno não é ainda completamente entendido, porém acredita-se que esta expansão ocorra durante a replicação. Segundo RICHARDS e SUTHERLAND (1994) após a dissociação das fitas durante a replicação, ocorre uma reassociação desalinhada. A estrutura gerada pode ser estabilizada por conformações do tipo *hairpin*, triplex ou rearranjo quadruplex das fitas do DNA, sendo as repetições  $(CTG)_n/(CAG)_n$ ,  $(CCG)_n/(CGG)_n$ ,  $(GAA)_n/(TTC)_n$ ,  $(AGG)_n/(CCT)_n$ , e  $(TGG)_n/(CCA)_n$  as que mostram um considerável potencial para

formar as estruturas alternativas mencionadas anteriormente (GACY et al., 1995; BIDICHANDANI et al., 1998). Segundo YOU-CHUN LI et al. (2002), dois mecanismos mutacionais podem estar envolvidos. O primeiro envolve os “escorregões” (*slippage*) da DNA polimerase. Através da atividade exonucleásica de *proofreading* 3'→5' da DNA polimerase, são formados *hairpins* fazendo com que a enzima replique a mesma região duas vezes. O segundo envolve *crossing over* desigual entre cromossomos homólogos. Tais mecanismos geram novos microssatélites ou aumentam o polimorfismo dos pré-existentes. TÓTH et al. (2000) acreditam que a geração de novos SSRs seja determinada pela interação entre vários fatores, dos quais os mais importantes seriam o tipo de repetição, a posição genômica do microssatélite e as condições genético-bioquímicas da célula.

### **3.2. Ocorrência dos microssatélites**

Estima-se que, em humanos, um microssatélite seja encontrado a cada 6 kb, principalmente nos braços cromossômicos (BECKMANN e WEBER, 1992).

Em plantas, MORGANTE e OLIVIERI (1993) examinaram seqüências de DNA publicadas para repetições de dinucleotídeos e trinucleotídeos em 34 espécies e encontraram uma freqüência de um microssatélite a cada 50 kb. WANG et al. (1994) realizaram uma pesquisa similar para todos os microssatélites possíveis nas seqüências disponíveis nos bancos de dados GenBank e EMBL e identificaram 130 microssatélites em 54 espécies de plantas. Espécies do gênero *Lycopersicon* foram analisadas por SMULDERS et al. (1997) que identificaram 220 microssatélites em cerca de 2000 seqüências de DNA. MAUGHAN et al. (1995) observaram um microssatélite, em média, a cada 64 kb em monocotiledôneas e um a cada 21 kb para dicotiledôneas.

Em uma pesquisa realizada no GenBank, YU et al. (1999) examinaram 326 seqüências de DNA de feijoeiro comum encontrando 61 (18,7%) seqüências candidatas a microssatélites entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*. Ao contrário do esperado, um microssatélite a cada 21 kb para dicotiledôneas, os autores identificaram um microssatélite potencial a cada 7 kb de DNA em média.

### **3.3. Distribuição dos microssatélites**

Os microssatélites são ubíquos, sendo encontrados em procariotos e eucariotos, presentes até mesmo nos menores genomas bacterianos (FIELD e WILLS, 1996; HANCOCK, 1996)

Microssatélites podem ser encontrados em qualquer região do genoma, tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras (TÓTH et al., 2000). Segundo YOU-CHUN LI et al. (2002) os microssatélites são mais abundantes em regiões não codificadoras. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em regiões promotoras, o comprimento do microssatélite pode influenciar a atividade transcricional (KASHI et al. 1997; YOU-CHUN LI et al., 2002). Em regiões de *exons* as alterações nos comprimentos dos microssatélites podem alterar a atividade gênica. O tamanho do genoma do organismo está correlacionado com o conteúdo global de microssatélites (HANCOCK, 1996a). Segundo WAUGH et al. (2000) o tipo de microssatélite e a sua frequência diferem entre espécies e também entre regiões de *exons*, *introns* e DNA intergênico.

### **3.4. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites**

Segundo ZANE et al. (2002) três metodologias são úteis na obtenção de *primers* microssatélites para o desenvolvimento de tais marcadores. A primeira delas é a identificação das seqüências simples repetidas em biblioteca de DNA genômico por meio da técnica de hibridização de colônias ou Hibridização *Southern* (RASSMANN et al., 1991). A segunda metodologia envolve o mecanismo de Extensão do *Primer* que utiliza o DNA genômico do fago M13 *helper* para a clonagem de fragmentos de DNA da espécie de interesse (PAETKAU, 1999; OSTRANDER et al., 1992). A terceira metodologia é a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para determinadas repetições (HAMILTON et al., 1999).

Muitos dos estudos iniciais em plantas utilizando microssatélites identificaram as repetições por meio de pesquisas em banco de dados de seqüências, como o EMBL ou o GenBank. Vários marcadores foram desenvolvidos por este método em sorgo (BROWN et al, 1996), milho (SENIOR et al, 1996), trigo

(DEVOS et al, 1995) e batata (PROVAN, et al, 1996). Entretanto, a pequena quantidade de seqüências disponíveis, mesmo para as espécies mais intensivamente estudadas, limita o número de marcadores que podem ser obtidos.

### **3.5. Desenvolvimento de *primers* microssatélites para o feijoeiro-comum**

YU et al. (1999) testaram 11 *primers* microssatélites em 12 linhagens de feijoeiro-comum que representavam uma diversidade de germoplasmas. Estes autores constataram que 7 dos 11 *primers* microssatélites foram polimórficos e amplificaram entre 2 e 10 alelos. YU et al. (2000) testaram 37 *primers* microssatélites em 12 linhagens endogâmicas de feijoeiro-comum. Dos 37, 24 se mostraram polimórficos amplificaram entre 2 e 10 alelos. CAIXETA et al. (2003a), a partir de 4 clones BAC, utilizaram 890 colônias para hibridização com as sondas (AT)<sub>15</sub>, (CT)<sub>15</sub> e (ATT)<sub>10</sub>. Trezentos e setenta e cinco colônias foram hibridizadas positivamente na primeira seleção e, destas, 72 foram positivas na segunda seleção, o que corresponde a 8% do total de colônias analisadas. Foram desenhados 29 pares de *primers* dos quais 21 amplificaram bandas únicas e bem definidas, sendo que 15 apresentaram bandas polimórficas e 6 monomórficas. Os pares de *primers* que se mostraram polimórficos amplificaram de 2 a 6 alelos. Segundo WEBER (1990) o número de alelos originados a partir de um microssatélite está normalmente correlacionado com o número de repetições que este apresenta, ou seja, maiores números de repetições em geral levam a maior polimorfismo. Por outro lado, CAIXETA et al. (2003a) descreveram *primers* que flanqueiam microssatélites com repetições de 12 pb e que amplificaram 2 alelos e *primers* que flanqueiam repetições de 22, 16 e 15 pb que se mostraram monomórficos.

GAITÁN-SOLÍS et al. (2002) utilizaram diferentes linhagens andinas de *Phaseolus vulgaris* para a construção de 3 bibliotecas enriquecidas. Os pesquisadores obtiveram um total de 4.682 clones positivos considerando as 3 bibliotecas. Deste total, apenas 856 foram seqüenciados. Foi possível o desenho de *primers* apenas para 213 clones seqüenciados. Os 213 pares de *primers* foram testados por PCR utilizando como molde os plasmídeos dos quais eles foram

obtidos. Apenas 68 pares destes testados, geraram fortes produtos de amplificação. O nível de conservação destes 68 pares de *primers*, no gênero *Phaseolus*, foi examinado pela avaliação deles em 4 outras espécies do gênero. As espécies testadas foram *P. coccineus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*. Foi observado que 33 pares geraram produtos de amplificação em todas as amostras, com algumas apresentando variações de comprimento de fragmentos entre espécies. Isto indica que um considerável nível de conservação existe nas regiões que flanqueiam as SSR. Os 68 pares foram usados para investigar o polimorfismo entre 21 variedades de *P. vulgaris*. Quatorze locos foram monomórficos e 54 polimórficos no material testado.

BLAIR et al. (2003) utilizaram um total de 150 marcadores microssatélites desenvolvidos para o feijoeiro comum para posicionar 100 locos genéticos em um mapa genético integrado da espécie. Nesse trabalho, os pesquisadores utilizaram três grupos de marcadores: marcadores desenvolvidos por meio de bibliotecas enriquecidas por GAITÁN-SOLÍS et al. (2002), marcadores microssatélites gênicos desenvolvidos por YU et al. (1999, 2000) e microssatélites adicionais em regiões codificadoras e não codificadoras obtidas por meio de busca de seqüências depositadas no banco de dados Genbank. Os marcadores microssatélites gênicos mostraram-se menos polimórficos (com uma taxa de 46,3% de polimorfismo) que os marcadores microssatélites genômicos (64,3%). Para a realização do posicionamento dos 100 locos no mapa integrado, foram utilizadas duas populações de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) de *Phaseolus vulgaris* descendentes, respectivamente, do cruzamento entre DOR364 e G19833, e BAT93 e JaloEEP558. DOR364 e BAT93 são linhagens mesoamericanas e G19833 e JaloEEP558 são andinas.

GUERRA-SANZ (2004), a partir de análise de seqüências de base de dados públicos, identificou e desenhou 20 pares de *primers* SSR flanqueando motivos microssatélites. Os *primers* foram testados em 10 linhagens de *P. vulgaris* para a presença de polimorfismo. Destes, 18 se mostraram polimórficos.

### **3.6. Mapeamento genético do feijoeiro-comum utilizando marcadores SSR**

YU et al. (2000) desenvolveram 37 pares de *primers* microssatélites, dos quais 16 mostraram-se polimórficos entre os parentais BAT93 e Jalo EEP558. Dos 16 polimórficos, 15 foram posicionados em um mapa integrado da espécie (FREYRE et al., 1998).

BLAIR et al. (2003) posicionaram novos 100 locos SSR neste mapa integrado. Estes locos foram integrados com os 15 marcadores microssatélites previamente mapeados por YU et al. (2000). Neste estudo, um total de 115 marcadores microssatélites foram posicionados no mapa genético integrado da espécie.

SILVA et al. (2003) identificaram um marcador SSR associado a um gene de resistência à mancha-angular. Cento e vinte famílias  $F_{2:3}$ , oriundas do cruzamento entre o cultivar ESAL 550 (resistente) e o Carioca MG (suscetível) foram avaliadas. Trinta e dois pares de *primers* SSR (YU et al., 2000) foram testados e o par PV- atct 001 foi localizado a 7,6 cM do gene de resistência.

YU (2004) localizou um marcador SSR (PV- tttc 001), desenvolvido pelo próprio pesquisador em 2000, na região do terceiro intron do gene NR (nitrito redutase) que confere resistência ao crestamento bacteriano, doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phasoli* (Xap). Foi verificado que indivíduos resistentes à doença, apresentavam a banda de 161 pares de base.

Para saturar o mapa genético da espécie, é de grande utilidade a criação de novos *primers* SSR.

### **3.7. Programa de melhoramento genético do feijoeiro do BIOAGRO/UFV**

No melhoramento genético do feijoeiro do BIOAGRO/UFV, os marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990, WELSH e McCLELLAND, 1990) e SCAR (PARAN e MICHELMORE, 1993) representam as principais classes de marcadores utilizados. Tais marcadores têm sido extremamente úteis para identificar e selecionar genótipos com importantes genes de resistência a vários patógenos. No Quadro 1, adaptado de QUEIROZ (2004), encontram-se os principais marcadores



RAPD e SCAR utilizados nos programas de melhoramento genético do feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Quadro 1. Marcadores RAPD e SCAR ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador	Distância (cM) e orientação*	Gene de resistência	Doença**	Fonte de resistência	Referência
OPQ04 <sub>1440</sub>	5,5 – acop.	<i>Co-2</i>	antracnose	Cornell 49242	YOUNG e KELLY (1996)
OPH18 <sub>830</sub>	9,2 – acop.	<i>Co-4<sup>2</sup></i>	antracnose	G 2333	ALZATE-MARIN et al. (1999)
OPY20 <sub>830</sub>	sem rec.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPJ01 <sub>1380</sub>	18,1 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPI16 <sub>850</sub>	14,3 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPC08 <sub>900</sub>	9,7 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPA18 <sub>830</sub>	17,4 – rep.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPB03 <sub>1800</sub>	3,7 – rep.	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ARRUDA et al. (2000)
OPF10 <sub>970</sub>	2,1 – acop.	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OPI19 <sub>460</sub>	sem rec.	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OPAC20 <sub>490</sub>	sem rec.	<i>Ur-11</i>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OPAE19 <sub>890</sub>	6,2 – rep.	<i>Ur-11</i>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OPH13 <sub>490</sub>	5,5 – acop.	<i>Phg-1</i>	man. ang.	AND277	CARVALHO et al. (1998)
OPN02 <sub>890</sub>	5,9 – acop.	<i>Phg-2</i>	man. ang.	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999)
OPAC14 <sub>2400</sub>	6,6 – acop.	<i>Phg-2</i>	man. ang.	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999)
SCARY20	1,2 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	Rudá	QUEIROZ et al. (2004)
SCARC08	7,8 – acop.	<i>Co-4</i>	antracnose	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004)
SCARAZ20	7,1 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	Rudá	QUEIROZ et al. (2004)
SCARZ04	2,9 – acop.	<i>Co-6</i>	antracnose	Michelite	QUEIROZ et al. (2004)
SCARAA19	10,1 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARBA16	7,1 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARM02	5,3 – acop.	<i>Phg-ON</i>	man. ang.	Ouro Negro	QUEIROZ et al. (2004a)
SCARH13	5,6 – acop.	<i>Phg-1</i>	man. ang.	AND277	QUEIROZ et al. (2004a)

\* acop. = acoplamento; rep. = repulsão; sem rec. = sem recombinantes; \*\* man. ang. = mancha-angular;

Foram desenvolvidos marcadores microssatélites para diferentes aplicações em culturas anuais como a soja, arroz, trigo e algodão (AKKAYA et al., 1992; ZHAO e KOCHERT, 1993; RONGWEN et al., 1995; RODER et al., 1995; REDDY et al., 2001), culturas perenes como o *Lolium perenne* L., uva e pêssigo (FORSTER et al., 2001; THOMAS et al., 1998; TESTOLIN et al., 2000). Portanto, devido às limitações dos marcadores RAPD é também cada vez mais notável a necessidade do desenvolvimento de marcadores microssatélites para auxiliarem programas de melhoramento como o do feijoeiro-comum.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material genético e extração de DNA

A partir do DNA genômico do cultivar TO, foram construídas as bibliotecas enriquecidas. Cerca de 6 g de folhas de plantas do cultivar TO foram trituradas na presença de nitrogênio líquido. O pó resultante foi transferido para tubos de polipropileno. Em cada tubo, foram adicionados 25 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; NaCl 1,4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)). O processo de extração foi continuado, conforme descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

### 4.2. Digestão do DNA genômico, separação e purificação dos fragmentos

As enzimas *HaeIII*, *RsaI*, *AluI*, *EcoRI* e *NheI* foram utilizadas para a digestão do DNA do cultivar TO. A mistura da reação de restrição (200  $\mu$ L) continha 50 U de cada enzima, tampão NEB 2 1X, 100  $\mu$ g/mL de BSA (albumina sérica bovina), 50  $\mu$ g de DNA genômico (~330 ng/ $\mu$ L) e água deionizada. O conteúdo da reação foi mantido a 37 °C por 14 horas. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel preparativo de agarose 2% em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM) por 3 horas a 90 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado, utilizando-se o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados com o kit Gel Extraction (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Uma vez que a capacidade máxima de retenção da matriz de cada coluna (QIAquick spin column) é de 10  $\mu$ g de DNA, foram utilizadas 5 colunas para purificação dos fragmentos de DNA a partir do gel. Os fragmentos de DNA foram eluídos de cada coluna, com 50  $\mu$ L de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). A eficiência da reação de digestão foi confirmada por análise eletroforética de uma alíquota de 3  $\mu$ L de amostra, em gel de agarose (1,2%).

### **4.3. Remoção das extremidades coesivas e desfosforilação dos fragmentos**

A reação para remover as extremidades coesivas foi realizada com 240 µL dos fragmentos de DNA da reação de restrição, 15 U da enzima MBN (*Mung Bean Nuclease*), tampão MBN 1X e água deionizada para completar 270 µL. Os reagentes foram transferidos para um microtubo, que foi mantido a 30 °C por 40 minutos. Os fragmentos de DNA com extremidades abruptas foram purificados com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Para purificação dos fragmentos, foram utilizadas 2 colunas (QIAquick spin column). Os fragmentos de DNA foram eluídos, adicionando-se 50 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) a cada coluna.

A reação de desfosforilação foi realizada com 100 µL dos fragmentos de DNA com extremidades abruptas, 30 U da enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*), tampão NEB 3 1X e água deionizada para completar 120 µL. A mistura de reação permaneceu por 4 horas, a 37 °C. Os fragmentos de DNA desfosforilados foram purificados com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. A purificação dos fragmentos foi efetuada, utilizando-se 2 colunas (QIAquick spin column). A eluição dos fragmentos a partir de cada coluna foi realizada com 30 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

### **4.4. Ligação do adaptador universal SNX aos fragmentos de DNA**

A reação de ligação do adaptador aos fragmentos de DNA foi realizada com 10 µL dos fragmentos desfosforilados, adaptador SNX fita dupla 1,7 µM, tampão NEB 2 1X, ATP 1 mM, 100 µg/mL de BSA (albumina sérico bovina), 20 U da enzima *XmnI* e 15 unidades Weiss de T<sub>4</sub> DNA ligase. A mistura de ligação foi transferida para um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 19 ciclos a 16 °C por 30 minutos e 37 °C por 10 minutos. Uma etapa final a 65 °C por 20 minutos foi realizada, para inativar as enzimas *XmnI*

e T<sub>4</sub> DNA ligase. O conteúdo da reação permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, foi armazenado a – 20 °C.

#### 4.5. Confirmação da eficiência da reação de ligação

A eficiência da reação de ligação foi confirmada por PCR, utilizando o oligonucleotídeo SNX<sub>forward</sub> (SNX<sub>f</sub>) como *primer*. A reação de amplificação foi feita com 1 µL da mistura de ligação, tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1,5 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. A eficiência da reação de ligação foi confirmada por eletroforese dos produtos da reação em minigel de agarose (1,2%). A eletroforese foi realizada a 90 volts por 1 hora.

#### 4.6. Reação de *nick-ligation*

O conteúdo da reação de ligação foi dividido em alíquotas de 3µL. Para cada alíquota, foi realizada a reação de *nick-ligation* com tampão *Taq* DNA polimerase 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 25 µg/mL de BSA (albumina sérico bovina), 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA). As reações foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 72 °C por 30 minutos. O conteúdo de todas as reações foi reunido e purificado com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os produtos da reação de *nick-ligation* foram eluídos, a partir da coluna com 30 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

#### **4.7. Reação pós *nick-ligation***

O conteúdo da reação de *nick-ligation* foi dividido em alíquotas de 10µL. Para cada alíquota, foi realizada a reação pós *nick-ligation* com tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 2 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da reação pós *nick-ligation* foram, diretamente, utilizados na etapa de hibridização seletiva sem nenhum processo de purificação.

#### **4.8. Hibridização dos fragmentos pós *Nick-ligation* com oligonucleotídeos contendo microssatélites**

Nesta etapa, foram utilizados 2 pmols de cada um dos seguintes oligonucleotídeos biotinizados: (AT)<sub>15</sub>, (TC)<sub>15</sub>, (CCA)<sub>10</sub>, (CTT)<sub>10</sub> e (GGC)<sub>10</sub>. Os oligonucleotídeos foram utilizados, separadamente, no processo de hibridização dos fragmentos de DNA. Cada oligonucleotídeo foi transferido para um microtubo, contendo 17 µL dos produtos da reação pós *nick-ligation*, 50 µL da solução de hibridização (SSC 12 X; SDS 0,1%) e 31 µL de água deionizada. A mistura foi aquecida a 95 °C por 15 minutos. Em seguida, cada microtubo foi incubado a uma temperatura específica, durante 14 horas. O microtubo contendo o oligonucleotídeo com as repetições AT foi incubado a 45 °C e os microtubos, contendo os demais oligonucleotídeos, a 65 °C.

#### **4.9. Preparação das partículas magnéticas**

A solução contendo as partículas Dynabeads M-270<sup>®</sup> (DynaLabs, Lake Success, NY, EUA) foi cuidadosamente agitada, a fim de obter uma suspensão

homogênea. O volume de 20  $\mu\text{L}$  da solução contendo as partículas (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. O microtubo foi mantido próximo a um magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi removido. Ao mesmo microtubo, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; NaCl 1 M). Em seguida, o microtubo foi afastado do magneto e as partículas foram cuidadosamente ressuspensas. O microtubo foi novamente aproximado do magneto e, após 2 minutos, o tampão de lavagem foi novamente removido. Este procedimento de lavagem das partículas foi repetido por 3 vezes. As partículas ressuspensas foram divididas em alíquotas de 6  $\mu\text{L}$  antes da última etapa de remoção do sobrenadante. Essas alíquotas foram transferidas para 5 microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram aproximados do magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante foi removido. A quantidade de partícula magnética coberta com estreptoavidina transferida para cada microtubo foi de 200  $\mu\text{g}$ .

#### **4.10. Captura dos fragmentos de DNA hibridizados**

O volume de 100  $\mu\text{L}$  dos fragmentos de DNA hibridizados com os oligonucleotídeos biotinizados foi transferido para cada microtubo, contendo as partículas magnéticas. Os microtubos foram incubados a 37 °C por 4 horas, sendo cuidadosamente agitados a cada 20 minutos. Em seguida, os microtubos foram aproximados de um magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi descartado. Inicialmente, o conteúdo de todos os microtubos foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  de SSC 2X e SDS 0,1%, em temperatura ambiente. Posteriormente, as partículas presentes no tubo contendo as repetições AT foram lavadas a 45 °C com 200  $\mu\text{L}$  de SSC 1X e SDS 0,1%. As partículas dos tubos, contendo as demais repetições, também foram lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de SSC 1X e SDS 0,1%. Entretanto, as etapas de lavagem foram realizadas à temperatura de 60 °C. Todos os processos de lavagem foram realizados por 2 vezes, durante 5 minutos. No final de cada etapa de lavagem, o microtubo foi aproximado do magneto e, após 2 minutos, o sobrenadante da mistura foi removido. Após a remoção do sobrenadante da última etapa, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de tampão TE<sub>0,1</sub> (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM) pré-

aquecido em todos os microtubos. Os microtubos contendo os fragmentos de interesse e o tampão TE<sub>0,1</sub> foram acoplados ao magneto. O magneto e os microtubos foram imersos em uma caixa de isopor, contendo água na temperatura de 95 °C. Após 10 minutos, cada sobrenadante foi transferido para um microtubo e armazenado a – 20 °C.

#### **4.11. Síntese de fragmentos de DNA fita dupla**

Os oligonucleotídeos contendo microssatélites capturaram, por hibridização, fragmentos de DNA fita simples enriquecidos com microssatélites. A reação de conversão dos fragmentos de DNA fita simples em fita dupla continha 15,0 µL dos fragmentos capturados, tampão Platinum 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, SNX<sub>f</sub> 0,8 µM, 150 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 U da enzima *Taq* Platinum (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo, SP) e água deionizada para completar 50µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para: uma etapa a 96 °C por 5 minutos; e outra de 40 ciclos a 96 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. A eficiência da reação de amplificação foi confirmada por meio de análise eletroforética de uma alíquota de 12 µL de amostra em minigel de agarose (1,2%). Os fragmentos de DNA fita dupla foram purificados com o kit PCR purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. A concentração dos fragmentos de DNA foi estimada, utilizando-se um fluorômetro.

#### **4.12. Preparação dos fragmentos de DNA e do plasmídeo**

A quantidade de 400 ng dos fragmentos de DNA foi tratada com 1 U de *NheI* em tampão NEB 2 1X. Os fragmentos de DNA enriquecidos com os diferentes tipos de microssatélites foram digeridos, separadamente, por 14 horas a 37 °C. A reação de digestão de 3 µg do plasmídeo pBluescript SK (+) foi realizada com 6 U de *XbaI*

em tampão NEB 2 1X. A mistura de reação também permaneceu, por 14 horas, a 37 °C. O conteúdo de todas as reações foi purificado com o kit PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, o plasmídeo foi desfosforilado com 10 U da enzima CIP em tampão NEB 3 1X a 37 °C, por 10 horas. Após a reação, o plasmídeo foi purificado, conforme descrito anteriormente. O plasmídeo desfosforilado foi ressuscitado em tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) na concentração de 100 ng/μL. A eficiência da reação de digestão do plasmídeo foi confirmada por meio de análise eletroforética de uma alíquota de 3 μL de amostra em minigel de agarose (1,2%).

#### **4.13. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor e transformação de células competentes**

A reação de ligação foi realizada com 15 μL dos fragmentos de DNA digeridos (~ 200 ng), tampão NEB 2 1X, ATP 0,8 mM, 100 μg/mL de BSA (albumina sérica bovina), 150 ng do plasmídeo pBluescript SK (+) digerido e desfosforilado, 7 U de *NheI* e 6 unidades Weiss de T<sub>4</sub> DNA ligase. A reação de ligação foi realizada em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para 19 ciclos a 16 °C, por 30 minutos, e 37 °C por 10 minutos. Uma etapa final a 65 °C por 20 minutos foi realizada, para inativar as enzimas *Xmn* I e T<sub>4</sub> DNA ligase. O conteúdo da reação permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, foi utilizado para transformação de células competentes da cepa DH5 de *Escherichia coli*. A transformação foi realizada por meio de choque térmico, de acordo com protocolo-padrão descrito por AUSUBEL (1998).

#### **4.14. Seqüenciamento, análise dos fragmentos de DNA e desenho dos *primers* microssatélites**

Após a transformação por choque térmico, foi feita a seleção e o diagnóstico de colônias brancas, utilizando-se a técnica de PCR e os *primers* T3 e T7. O DNA



plasmidial das colônias de interesse foi extraído, quantificado e seqüenciado pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (SANGER et al., 1997). A determinação da seqüência dos fragmentos de DNA foi realizada com auxílio do seqüenciador automático ABI Prism 377 (PE Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos fragmentos foram analisadas, utilizando-se os programas SeqMan 3.57 (DNASTAR, Madison, WI, EUA) e SSRIT (<http://www.gramene.org/>). Este foi usado para selecionar todas as repetições de di, tri, tetra e pentanucleotídeos possíveis. Já o programa SeqMan foi utilizado para discriminar apenas as regiões de fragmentos do genoma do feijoeiro. CAIXETA et al. (2003a) demonstraram que *primers* microssatélites polimórficos podem ser obtidos a partir de seqüências de DNA, contendo microssatélites com repetições como (TAAA)<sub>3</sub>. Sendo assim, o critério mínimo utilizado para a definição de um potencial microssatélite foi: A) (NN)<sub>6</sub> – 6 repetições de dinucleotídeos; B) (NNN)<sub>4</sub> - 4 repetições de trinucleotídeos e C) (NNNN)<sub>3</sub> – 3 repetições de tetranucleotídeos.

Os *primers* microssatélites foram desenhados com auxílio dos programas Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Os *primers* foram sintetizados pela IMPRINT GENETIX (São Paulo, SP, Brasil). Para o desenho dos *primers* foram seguidos os critérios recomendados por YU et al. (1999): A) *Tamanho dos primers*: inferior a 30 pb; B) *Tm*: superior a 46°C (entre 48 e 52°C); C) *Concentração de sal*: 50 mM; D) *Produtos de amplificação*: entre 100 – 360 pb.

#### **4.15. Determinação das condições de amplificação dos *primers* SSR**

As condições de amplificação dos *primers* SSR que foram desenvolvidos foram testadas em amostras de DNA de cultivares utilizados pelo Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro BIOAGRO/UFV. Os cultivares utilizados foram ON e AND 277. As reações de amplificação foram realizadas em volume de 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 120 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer forward* 0,2 µM, *primer reverse* 0,2 µM, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen) e e 30 ng de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA) utilizando o procedimento de *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu de 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos, seguido de 20 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 65 a 46 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos. Terminados os 20 ciclos, procederam-se 20 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 46 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos e uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL, por aproximadamente 4 horas a 100 volts. Após a eletroforese, o gel foi fotodigitalizado utilizando o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

#### 4.16. Validação dos *primers* SSR

Os *primers* SSR que originaram produtos de amplificação foram utilizados para amplificar amostras de DNA de diferentes cultivares andinos e mesoamericanos (Quadro 2).

Quadro 2 – Linhagens andinas e mesoamericanas utilizadas para a validação dos *primers* SSR

	<b>Cultivar</b>	<b>Centro de Origem<sup>a</sup></b>		<b>Cultivar</b>	<b>Centro de Origem</b>
01	Kaboon	A	15	Pinto Villa	MA
02	Jalo EEP	A	16	Pérola	MA
03	Diacol Calimã	A	17	Ouro Negro	MA
04	Cal 143	A	18	Jamapa	MA
05	Brown B	A	19	Ica Pijão	MA
06	Antioquia 8	A	20	Emgopa Ouro	MA
07	AND 277	A	21	Cornell	MA
08	Bat 332	MA	22	Equador 299	MA
09	Bambuí	MA	23	Nunãs	A
10	Pompadour	A	24	Bat 93	MA
11	Perry Marrow	A	25	Rudá	MA
12	Mineiro Precoce	A	26	Rio Tibagi	MA
13	MDRK	A	27	Porriho sintético	MA
14	Manteigão Fosco	A	28	Sel 1308	MA

<sup>a</sup>A – Andina; MA – Mesoamericana.

As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito no item anterior. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 7%/TBE 1X. A eletroforese foi realizada por 3 horas a 300 Volts. Terminada a eletroforese, o gel foi exposto a uma solução contendo brometo de etídio 0,2 µg/mL por aproximadamente 20 minutos e em seguida fotodigitalizado, utilizando o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

#### **4.17. Nomenclatura dos *primers* microssatélites**

A nomenclatura dos *primers* foi a mesma utilizada por QUEIROZ (2004). As letras FC foram utilizadas para designar *primers* que foram desenvolvidos para o feijoeiro-comum. A sigla FC foi seguida pelo motivo que está se repetindo, em letras minúsculas. Um número arbitrário foi designado para cada motivo distinto. As letras F e R foram acrescentadas para indicar *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Seqüenciamento, análise e classificação dos fragmentos de DNA contendo microssatélites

No presente trabalho, fragmentos de bibliotecas enriquecidas para repetições AT e CCA, foram seqüenciados e analisados. Foram obtidos 50 e 172 clones positivos, para as bibliotecas AT e CCA, respectivamente. Para fragmentos com possíveis repetições AT, apenas 12 (24%) apresentaram diferentes microssatélites que variaram de 12 a 24 pb. As demais seqüências não apresentaram uma boa qualidade no seqüenciamento ou não apresentaram repetições SSR. Para os fragmentos com possíveis repetições CCA, apenas 26 (15%) dos 172 apresentaram microssatélites que variaram de 12 a 18 pb. Nove fragmentos da biblioteca GGC desenvolvida por QUEIROZ (2004) foram seqüenciados, analisados e tiveram seus *primers* desenhados e testados nas 28 variedades do feijoeiro-comum representados no Quadro 2. Todos esses 9 pares se mostraram monomórficos (QUEIROZ, 2004). No presente trabalho, novos pares de *primers* foram desenhados para as mesmas seqüências, flanqueando, portanto, as mesmas repetições, porém, sob novas condições de temperatura de pareamento do *primer*. Os demais fragmentos da biblioteca GGC foram seqüenciados e analisados por QUEIROZ (2004), porém não tiveram seus *primers* desenhados. Foram, ao todo, 79 clones positivos para a biblioteca GGC. O Quadro 3 representa todas as seqüências portadoras de microssatélites obtidas a partir do seqüenciamento e analisadas no atual trabalho.

Quadro 3. Diferentes motivos SSR obtidos na análise de seqüências de fragmentos de DNA genômico, capturados com os oligonucleotídeos AT, CCA e GGC

Colônia/*Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
AT/01	213 pb	(GGA) <sub>2</sub> (GGC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
AT/02	158 pb	(CTC) <sub>3</sub> (CAT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	15 pb
AT/03	432 pb	(ACC) <sub>5</sub>	Simples Perfeita	15 pb
AT/12	214 pb	(TTCG) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
AT/13	201 pb	(TTC) <sub>2</sub> (AAT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
		(CTTT) <sub>2</sub> (TTTC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	18 pb
AT/14	290 pb	(CT) <sub>2</sub> (TTAT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
		(GGT) <sub>5</sub>	Simples Perfeita	15 pb

Colônia/*Nº	Tamanho do fragmento	Motivo SSR	Classificação da repetição	Tamanho da repetição
AT/21	330 pb	(TA) <sub>3</sub> (CTC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
AT/26	192 pb	(CCA) <sub>6</sub>	Simples Perfeita	18 pb
AT/28	181 pb	(TGG) <sub>5</sub>	Simples Perfeita	15 pb
AT/53	189 pb	(ACC) <sub>5</sub>	Simples Perfeita	15 pb
AT/57	270 pb	(CAT) <sub>3</sub> (CAC) <sub>5</sub>	Composta Perfeita	24 pb
AT/58	316 pb	(TGG) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
CCA/02	402 pb	(TGA) <sub>2</sub> (TGT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/09	199 pb	(CTT) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/12	210 pb	(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub> (GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita Composta Perfeita	12 pb 12 pb
CCA/27	251 pb	(CT) <sub>3</sub> (GCC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/34	252 pb	(GGT) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/35	235 pb	(GTT) <sub>2</sub> (AC) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/36	203 pb	(ACG) <sub>2</sub> (ACC) <sub>2</sub> (CAC) <sub>4</sub>	Composta Perfeita Simples Perfeita	12 pb 12 pb
CCA/44	210 pb	(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/46	205 pb	(TA) <sub>2</sub> (GTTT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/47	205 pb	(GT) <sub>3</sub> (AAC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/59	296 pb	(TTTCG) <sub>3</sub>	Simples Perfeita	12 pb
CCA/60	288 pb	(TGGT) <sub>2</sub> n(GTG) <sub>3</sub>	Composta Imperfeita	14 pb
CCA/64	211pb	(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/65	212 pb	(TC) <sub>2</sub> n(TGCC) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	13 pb
CCA/72	591 pb	(TTC) <sub>3</sub> (CT) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	13pb
CCA/77	276 pb	(CT) <sub>2</sub> n(TGC) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	11 pb
CCA/81	429 pb	(CG) <sub>2</sub> (TGA) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	10 pb
CCA/88	237 pb	(GT) <sub>2</sub> n(TCCC) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	13 pb
CCA/92	185 pb	(GA) <sub>2</sub> n(ACCC) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	13 pb
CCA/97	249 pb	(AG) <sub>2</sub> n(GAT) <sub>2</sub> n(GGT) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	18 pb
CCA/116	440 pb	(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/117	251 pb	(GGC) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/120	213 pb	(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
CCA/123	251 pb	(ATC) <sub>2</sub> n(ATG) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	13 pb
CCA/157	273 pb	(GGC) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub> (GGT) <sub>2</sub> n(CAG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita Composta Imperfeita	12 pb 13 pb
CCA/162	260 pb	(TTCCG) <sub>2</sub> n(AG) <sub>2</sub>	Composta Imperfeita	15 pb
GGC/01**	281 pb	(CTC) <sub>3</sub> n(CCG) <sub>4</sub>	Composta Imperfeita	21 pb
GGC/02**	319 pb	(CGG) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/03**	227 pb	(CCG) <sub>5</sub>	Simples Perfeita	15 pb
GGC/04**	141 pb	(CCG) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/05**	208 pb	(CTT) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/06**	252 pb	(CCA) <sub>4</sub> (CCT) <sub>3</sub> (CCA) <sub>3</sub> e (CCT) <sub>4</sub>	Simples Perfeita Composta Perfeita Simples Perfeita	12 pb 18 pb 12 pb
GGC/07**	289 pb	(GCC) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/08**	172 pb	(GCA) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/09**	236 pb	(CTT) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb
GGC/28	126 pb	(CGG) <sub>4</sub> (CGA) <sub>3</sub>	Composta Perfeita	21 pb
GGC/28 A	171 pb	(AT) <sub>3</sub> (TAG) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	12 pb
GGC/170	260 pb	(GCATT) <sub>2</sub> (TGC) <sub>2</sub>	Composta Perfeita	16 pb
GGC/179	188 pb	(CA) <sub>2</sub> (TCCC) <sub>2</sub> (CCG) <sub>4</sub>	Composta Perfeita Simples Perfeita	12 pb 12 pb
GGC/198	218 pb	(CGC) <sub>4</sub> (CG) <sub>2</sub> (CAC) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Simples Perfeita Composta Perfeita	12 pb 14 pb
GGC/249	274 pb	(CGG) <sub>4</sub> (CAA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub> (GC) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	Simples Perfeita Composta Perfeita	12 pb 24 pb
GGC/260	196 pb	(GCA) <sub>4</sub>	Simples Perfeita	12 pb

\* - número; \*\* - fragmentos de DNA para os quais foram previamente desenhados e testados *primers* (QUEIROZ, 2004). A classificação utilizada para as repetições SSR dos fragmentos foi proposta por REDDY et al. (2001).

De um total de 222 clones positivos, considerando as bibliotecas AT e CCA, 38 fragmentos (17,18%) apresentaram repetições microssatélites. Pode-se afirmar que o nível de enriquecimento das bibliotecas, para fragmentos contendo microssatélites, foi satisfatório. CAIXETA et al. (2003a) analisaram 890 colônias, das quais 375 foram hibridizadas positivamente na primeira seleção e, destas, 72 foram positivas na segunda seleção, o que corresponde a 8% do total de colônias analisadas. GAITÁN-SOLÍS et al. (2002) construíram 3 bibliotecas enriquecidas, utilizando diferentes linhagens andinas de feijoeiro-comum. Do total de 4.682 clones positivos, identificados entre as bibliotecas, 856 foram seqüenciados. Os autores constataram que o desenho de *primers* microssatélite foi possível para 213 (25%) dos clones seqüenciados.

## **5.2. Desenho dos *primers* microssatélites**

De todos os 54 fragmentos que apresentaram repetições SSR (Quadro 3) , 34 possibilitaram o desenho dos *primers* sob as condições estabelecidas (item 4.14). Dos 34 pares de *primers* desenhados, 25 mostraram-se viáveis quando analisados pelo programa PrimerSelect 3.1 (DNASTAR, Madison, WI, EUA) e sintetizados pela IMPRINT GENETIX (São Paulo, SP, Brasil). A seqüência dos 25 pares de *primers* microssatélites que foram testados, os valores de  $T_m$  e a repetição que estes flanqueiam, encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4. Sequência dos pares de *primers* microssatélites candidatos, valores de T<sub>m</sub>, tipo de repetição e tamanho esperado para os fragmentos amplificados

Repetição	Primer	Sequência dos primers F e R (5' 3')	T <sub>m</sub> (°C)*	T.frag. (pb)**
(CTC) <sub>3</sub> N (CCG) <sub>4</sub>	FCctc002F	CTAATGCTCCAACACCAC	52,07	210
	FCctc002R	AAGAAAAGAATGAAGCAGAA	52,00	
(CGG) <sub>4</sub>	FCcgg001F	TAGTGATAGTGTACGGCTTG	51,45	219
	FCcgg001R	GCTACGTTTAACTCTCTCCT	50,63	
(CCG) <sub>5</sub>	FCccg003F	CTAGGGTTAGGGTTCTTTC	47,37	189
	FCccg003R	CTTAACGGACGAAGTGAC	50,00	
(CTT) <sub>4</sub>	FCctt003F	TGTAAGAGGGTAAGTAAAA	50,10	160
	FCctt003R	GTTGAAAAGCGTATGGTAT	50,27	
(CTT) <sub>4</sub>	FCctt004F	CTGTCTTCTCTCGTCTTGG	51,38	211
	FCctt004R	GTCAGGCTTCTCCCTACT	51,56	
(ACC) <sub>5</sub>	FCacc001F	GTCAGATTACCCATTATGAA	49,94	167
	FCacc001R	GTTGATCAGTGAAGATGTGT	50,36	
(TTCG) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	FCttcg001F	CACACGATTTTCATTTAGC	49,67	170
	FCttcg001R	CTCAGTTTGTTCCCATTT	50,63	
(TA) <sub>3</sub> (CTC) <sub>2</sub>	FCta001F	GCAAAGCTAAGTCTAAAAATG	49,93	227
	FCta001R	TTGAAAAACGATCCACTAC	51,00	
(CAT) <sub>3</sub> (CAC) <sub>5</sub>	FCcat001F	TCTCAAATGGTGACATAGAT	50,19	179
	FCcat001R	TAGTTCCTCAAGTGACATTC	49,98	
(TGG) <sub>4</sub>	FCtgg001F	TACCCTAAATTGCATAAAAA	50,57	217
	FCtgg001R	CACTACGACTACCACCAC	48,92	
(CTT) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	FCctt003F	CGAAGTAACAGAAAAGAAAAG	49,68	157
	FCctt003R	AGAAAGAAGAACTCATCCTC	50,04	
(GGT) <sub>2</sub> (AG) <sub>3</sub>	FCggt001F	ACGTCAGCATCAGAGAAC	51,53	167
	FCggt001R	ACTCTGGATGAACTGTCC	49,98	
(ACG) <sub>2</sub> (ACC) <sub>2</sub> (CAC) <sub>4</sub>	FCacg001F	ATACCACACCGAGTCATAC	50,30	109
	FCacg001R	GTCCGTGTAGGTTGATAGT	49,63	
(TA) <sub>2</sub> (GTTT) <sub>2</sub>	FCta002F	CATTTATAGTTTGTGTTGATGG	50,19	168
	FCta002R	GATCCGACGAGTTATCAT	50,36	
(TTCG) <sub>3</sub>	FCttcg002F	CCTTTACTTCTTCTGCTGAT	51,41	182
	FCttcg002R	GTGAAAGAAGGATGAAAAA	50,17	
(TGGT) <sub>2</sub> N(GTG) <sub>3</sub>	FCtgg001F	GTGTTTTCACAGTGGTTG	49,90	214
	FCtgg001R	TAAACACACAATCAAAAATG	49,53	
(AT) <sub>3</sub> (TAG) <sub>2</sub>	FCat001F	GGAAAGAGTCACAATGATAG	49,54	160
	FCat001R	CACTGCAGATTAGTTCAT	48,68	
(GCATT) <sub>2</sub> (TGC) <sub>2</sub>	FCgcatt001F	TTTTTAGCAGTCTTCATTG	48,94	150
	FCgcatt001R	GGTCAGTGGAGAAAAGATA	49,83	
(GGCA) <sub>2</sub> (AG) <sub>2</sub>	FCggca001F	GAGTTGAAAATAAGCGTAGA	50,03	111
	FCggca001R	CTAAGATGTTTCAGTTCACC	49,68	
(TC) <sub>2</sub> N(TGCC) <sub>2</sub>	FCtc001F	TCTGGCTACTAAGATGTTTC	49,65	120
	FCtc001R	GAGTTGAAAATAAGCGTAGA	50,03	
(TTC) <sub>3</sub> (CT) <sub>2</sub>	FCttc001F	CTTCGTTACAATGAACCTT	50,21	235
	FCttc001R	CACTAGTTTTTAGCAGAAGC	49,88	
(CT) <sub>2</sub> N(TGC) <sub>2</sub>	FCct001F	GATCACCCTCTGGATACTC	51,68	193
	FCct001R	GTCATCGGTAGTCAATGG	51,74	
(CG) <sub>2</sub> (TGA) <sub>2</sub>	FCcg001F	AAGAGGTTTTTAAGGATGAC	50,26	172
	FCcg001R	TCTACGCTTATTTTCAACTC	50,03	
(GT) <sub>2</sub> N(TCCC) <sub>2</sub>	FCgt001F	CCCTTATTGACTTTGTGTAA	50,42	156
	FCgt001R	CTACGAGAAGATGCTTGAG	50,97	

Repetição	Primer	Seqüência dos primers F e R (5' 3')	T <sub>m</sub> (°C)*	T.frag. (pb)**
(GTA) <sub>2</sub> (GCG) <sub>2</sub>	FCgta001F	GGTGAAGCTGAAACATCTTAG	49,68	158
	FCgta001R	TCTACGCTTATTTCAACTC	50,03	

Esses 25 pares de *primers* foram testados nas variedades Ouro Negro e AND 277, segundo as condições de amplificação descritas no item 4.15. Aqueles que geraram produtos de amplificação, foram selecionados para amplificar o DNA dos 28 cultivares mencionados no Quadro 2.

### 5.3. Validação dos *primers* microssatélites em cultivares geneticamente divergentes

Com o objetivo de validação, os *primers* FCctc002, FCccg003, FCctt004, FCacc001, FCttcg001, FCta001, FCcat001, FCtgg001, FCctt003, FCggt001, FCta002, FCttcg002, FCat001, FCgcatt001, FCggca001, FCtc001, FCgt001, que geraram produtos de amplificação nas variedades Ouro Negro e AND 277, foram selecionados para a localização de locos polimórficos utilizando as 28 variedades geneticamente divergentes representadas no Quadro 2.

Os microssatélites FCccg003, FCacc001 e FCtgg001 mostraram-se polimórficos entre as diferentes linhagens como mostra a Figura 1.



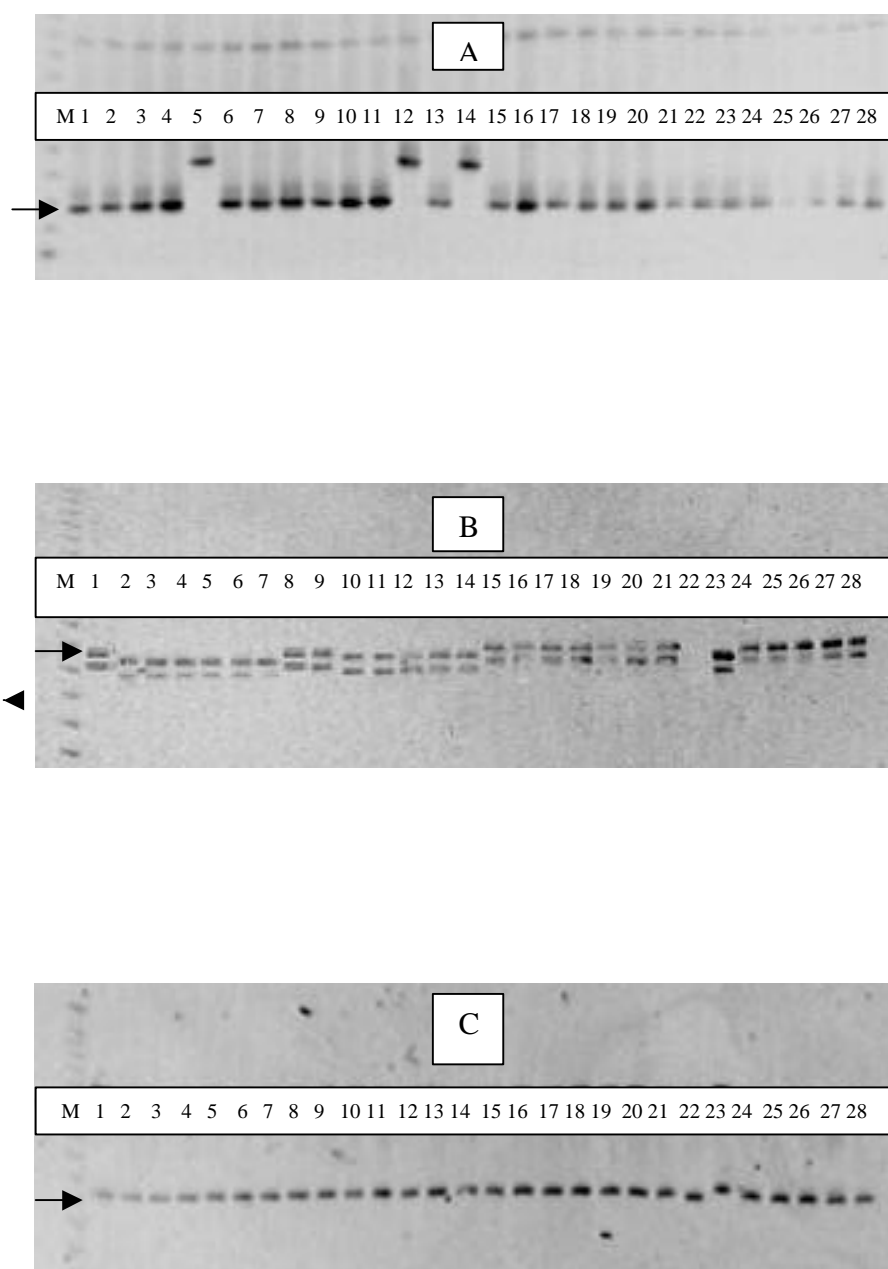


Figura 1- Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do DNA dos cultivares relacionados no Quadro 2 em gel desnaturante de poliacrilamida 7,0%. (A) *primer* FCccg003. A seta indica o fragmento de cerca de 189 pb. (B) *primer* FCacc001. A seta indica o fragmento de cerca de 167 pb. (C) *primer* FCtgg001. A seta indica o fragmento de cerca de 217 pb. M- Marcador de tamanho molecular de 10 pb.

#### 5.4. Cálculo do Índice de Informação de Polimorfismo (*PIC*)

O índice de informação de polimorfismo foi calculado com base no seguinte algoritmo:

$$PIC = 2 \sum_{i=2}^l \sum_{j=l}^{i-1} [p_i p_j (1 - p_i p_j)]$$

A expressão entre colchetes é calculada com base na combinação entre as frequências de todos os alelos de um determinado loco microssatélite tomados dois a dois. Fixa-se um alelo *i* e o cálculo é realizado utilizando todos os alelos *j* individualmente. Posteriormente, somam-se todos os valores encontrados pela expressão em colchetes e o *PIC* é calculado com base no somatório dos somatórios de todas as combinações.

O quadro 5 mostra os valores de *PIC* para os três pares de *primers* polimórficos desenvolvidos neste trabalho.

Quadro 5- Índice de Informação de Polimorfismo (*PIC*) dos três pares de *primers* polimórficos.

<i>PRIMER</i>	<i>PIC</i>
FCccg003 ( $p_i=0,1071; p_j=0,8928$ )	$2[0,1071 \times 0,8928(1 - 0,1071 \times 0,8928) = \mathbf{0,172952}$
FCacc001 ( $p_i=0,5357; p_j=0,4286$ )	$2[0,5357 \times 0,4286(1 - 0,5357 \times 0,4286) = \mathbf{0,353769}$
FCtgg001 ( $p_i=0,036; p_j=0,9643$ )	$2[0,036 \times 0,9643(1 - 0,036 \times 0,9643) = \mathbf{0,066481}$

No presente estudo, cada um dos três pares de *primers* polimórficos apresentaram dois alelos e o índice de informação de polimorfismo é calculado conforme demonstrado no quadro 5.

Por este algoritmo fica evidente que o índice de polimorfismo de um loco microssatélite é diretamente proporcional ao número de alelos que ele possui e à frequência de tais alelos.

Considerando as três bibliotecas, foram analisados, 301 clones positivos a partir dos quais foram obtidos 54 (18%) fragmentos que apresentaram repetições SSR. Desses 54 fragmentos, foram obtidos 25 (8,3%) pares de *primers* viáveis, dos quais 3 (1%) mostraram-se polimórficos entre as variedades testadas.

GAITÁN-SOLÍS et al. (2002), a partir de 4682 clones positivos obtidos de três bibliotecas, obtiveram apenas 54(1,15%) pares de *primers* polimórficos para a espécie.

CAIXETA et al. (2003), a partir de 890 colônias utilizadas, obtiveram apenas 15(1,68%) pares de *primers* polimórficos. Analisando os dados acima, nota-se que os resultados obtidos no presente trabalho enquadram-se dentro do esperado.

## 6. CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites oferecem algumas vantagens como a co-dominância, o multialelismo e o fato de serem muito informativos e reprodutíveis. Uma vez disponíveis os *primers* SSR, o marcador microssatélite é tecnicamente tão simples quanto os marcadores RAPD e SCAR, porém ele é capaz de nos fornecer mais informação. O número limitado de *primers* SSR para o feijoeiro-comum, faz com que os marcadores RAPD e SCAR sejam mais utilizados em programas de melhoramento apesar das características favoráveis dos microssatélites.

O presente trabalho objetivou a construção de novos marcadores SSR a partir de fragmentos de bibliotecas enriquecidas para SSR. A partir de 301 clones positivos, foram obtidos 3 pares de *primers* polimórficos.

Para a obtenção de um número relevante de *primers* microssatélites polimórficos, é necessário que um grande número de clones positivos seja desenvolvido. Pretende-se, em nova oportunidade, construir novas bibliotecas enriquecidas para a obtenção de novos *primers*. É de interesse do programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV a utilização de *primers* já desenvolvidos para a construção de mapas utilizando populações de RILs existentes.

## 7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, 18: 265-273, 1995.
- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. (1992). Length polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in soybean. **Genetics**, 134:1249-1260, 1992.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIN, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA-JUNIOR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 89:281-285, 1999.
- ARRUDA, M.C.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 genes to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 90: 758-761, 2000.
- AUSUBEL, F. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Tenton Data Systems, 1998.
- BALARDIN, R.S. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia em Santa Catarina, 1990. 252p.
- BECKMANN, J.S.; SOLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, 08: 930-932, 1990.
- BECKMANN, J.S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 12: 627-631, 1992.
- BIDICHANDANI, S.I.; ASHIZAWA, T.; PATEL, P.I. The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. **American Journal of Human Genetics**, 62: 111-121, 1998.

- BLAIR, M.W., PEDRAZA, F., BUENDIA, H.F., GAITÁN-SOLÍS, E., BEEBE, S.E., 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., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 32: 314-331, 1980.
- BROWN, S.M.; HOPKINS M.S.; MITCHELL, S.E.; SENIOR M.L.; WANG, T.Y.; DUNCAN R.R.; GONZALESCANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, 93 (1-2): 190-198, 1996.
- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., FAGUNDES, S.A., NIESTCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, 134: 297-303. 2003.
- CAIXETA, E.T., BORÉM, A., KELLY, J.D. Microsatellite Markers for Common Bean. **Annual Report of Bean Improvement**, 46:157-158, 2003a.
- CARVALHO, G.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligada ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, 23: 482-485, 1998.
- DEVOS, K.M.; BRYAN, G.J.; COLLINS, A.J.; STEPHENSON, P.; GALE, M.D. Application of 2 microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90(2): 247-252, 1995.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1990.
- 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.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: MA/ EMBRAPA-CENARGEM, 1998.pp. 220.
- FIELD, D., WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of the Royal Society of London**, 623: 209-215, 1996.
- FORSTER, J.W., JONES, E.S., DUPAL, M.P., KÖLLIKER, R., DRAYTON, M.C. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 405-415, 2001.
- 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.
- GACY, A.M.; GOELLNER, G.; JURANIC', N.; MACURA, S.; MacMURRAY, C.T. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. **Cell**, 81: 533-540, 1995.
- 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* spp. **Crop Science**, 42: 2128-2136, 2002.
- GUERRA-SANZ, J.M. New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. **Plant Breeding**, 123: 87-89, 2004.
- 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.
- HAMILTON, M.B., PINCUS, E.L., Di FIORE, A., FLEISCHER, R.C. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, 27:500-507, 1999.
- HANCOCK, J.M. Simple Sequences in a 'minimal' genome. **Nature Genetics**.14: 14-15, 1996.

- HANCOCK, J.M. Simple Sequences and the expanding genome. **BioEssays**, 18: 421-425, 1996a.
- IBGE. Área plantada, área colhida, quantidade, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras temporárias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br.2003>>. Acessado em janeiro de 2004.
- JOHNSON, E.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 659-664, 1995.
- KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genetics**. 13: 74-78, 1997.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44: 398-401, 1989.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI-MAROOF, M.A., BUSS, G.R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome**, 38: 715-723.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 03: 175-182, 1993.
- MULLIS, K., FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, 55: 335-350, 1987.
- OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 89: 3419-3423, 1992.
- PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. **Biotechniques**, 26: 690-697, 1999.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR- based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 985-993, 1993.
- QUEIROZ, V.T. de. **Obtenção de primers microssatélite e desenvolvimento, validação e mapeamento de marcadores SCAR em feijoeiro-comum**. Viçosa: UFV, 2004. 155p. (Tese de Doutorado).



- QUEIROZ, V.T. de; SOUSA, C. S. de; COSTA, M.R.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K. M.A.; SOUZA, T.L.P.O. de; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G. de; 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, 2004.
- QUEIROZ, V.T. de; SOUSA, C. S. de; COSTA, M.R.; SANGLARD, D.A.; ARRUDA, K. M.A.; SOUZA, T.L.P.O. de; RAGAGNIN, V.A.; BARROS, E.G. de; MOREIRA, M.A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47: 237–238, 2004a.
- PETES, T.D., GREENWELL, P.W., DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequence by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 146: 491-498, 1997.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). **Theoretical and Applied Genetics**, 92(8): 1078-1084, 1996.
- RASSMANN, K.; SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, 12:113-118, 1991.
- REDDY, O. U. K., PEPPER, A.E., ABDURAKHMONOV I., SAHA, S, JENKINS, J.N., BROOKS, T., BOLEK, Y., EL-ZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Journal of Cotton Science**, 05: 103-113, 2001.
- RICHARDS, R.I; SUTHERLAND, G.R. Simple Repeat DNA is not replicated simply. **Nature Genetics**, 06: 114-116, 1994.
- RODER, M.S.; PLASCHKE, J.; KONIG. S.U.; BORNER, A.; SORRELLS, M.A.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. **Mol. & Gen. Gen.**, 246: 327-333, 1995.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification, **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 43-48, 1995.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 74: 5463-5467, 1997.

- SARTORATO, A.; NIETSCHKE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 42: 21-22, 1999.
- SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENBANK database: Map construction. **Crop Science**, 36 (6): 1676-1683, 1996.
- SILVA, G.F. da; SANTOS, J.B. dos; RAMALHO, M.A.P. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology**, 26, 4, 459-463, 2003.
- SMULDERS, M.J.M., BREDEMEIJER, G., RUS-KORTEKAAS, W., ARENS, P., VOSMAN, B. Use of short microsatellites from data-base sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, 97: 264-272, 1997.
- TESTOLIN, R., MARRAZZO, T., CIPRIANI, G., QUARTA, R., VERDE, I., DETTORI, M.T., PANCALDI, M., SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivares. **Genome**, 43: 512-520, 2000.
- THOMAS, M.R., SCOTT, N.S., BOTTA, R., KIJAS, M.H. Sequence-tagged site markers in grapevine and citrus. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, 67: 1189-1192, 1998.
- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, 10: 967-981, 2000.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas no feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231p.
- VIEIRA, C; JUNIOR, T. J. P.; BORÈM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas**. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 1998. 596p.
- WANG, Z., WEBER, J.L., ZHONG, G., TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88: 01-06, 1994.
- WAUGH, R., CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D., MACAULAY, M., MARSHALL, D. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, 156: 847-854, 2000.

- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dGdT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, 07:524-530, 1990.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 24: 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RIFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 22: 6531-6535, 1990.
- YOU-CHUN LI; ABRAHAM B. KOROL; TZION FAHIMA; AVIGDOR BEILES and EVIATAR NEVO. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11: 2453-2465, 2002.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D. Characterisation of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemutianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, 80: 650-654, 1996.
- YU, K., PARK, S.J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, 42: 27-34, 1999.
- YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) Markers Into a molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, 91: 429-434, 2000.
- YU, K.; PARK, S.J.; ZHANG, B.; HAFFNER, M.; POYSA, V. An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. **Euphytica**, 138: 89-95, 2004.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11: 1-16, 2002.
- ZHAO, X.P.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of (GGC) (n) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, 21:607-614, 1993.