

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CAMPUS PATOS DE MINAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

YASMIN DA SILVA XIMENES

DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR PARA O
FELJOEIRO COMUM ASSOCIADO A RESISTÊNCIA A *Meloidogyne*
incognita

PATOS DE MINAS
NOVEMBRO DE 2024

YASMIN DA SILVA XIMENES

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR PARA O
FEIJOEIRO COMUM ASSOCIADO A RESISTÊNCIA A *Meloidogyne*
*incognita***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Terezinha Aparecida Teixeira.

**PATOS DE MINAS
NOVEMBRO DE 2024**

YASMIN DA SILVA XIMENES

Desenvolvimento de marcador molecular para o feijoeiro comum associado a resistência a *Meloidogyne incognita*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC – UFU
Presidente

Ms. Vanessa Aparecida Caetano Alves – IBTEC – UFU
Membro

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes – IBTEC – UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, MG, 07 de novembro de 2024.

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, com origem no continente americano. O grão é amplamente consumido em todo o mundo e seu cultivo apresenta grande importância nutricional, social e econômica. Nos programas de melhoramento genético do feijoeiro, com o intuito de obterem-se cultivares resistentes aos nematoides do gênero *Meloidogyne*, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) se mostra uma técnica promissora. Portanto, o objetivo no presente trabalho foi desenvolver marcador molecular SSR (*Simple Sequence Repeats*) para o feijoeiro comum (*P. vulgaris*) associado à resistência ao fitonematoide *M. incognita*. Para esse objetivo utilizou-se a população segregante F₂ oriunda do cruzamento entre as cultivares Aporé (genitor feminino e resistente) e Bolinha (genitor masculino e suscetível). Os genitores e as gerações F₁ e F₂ foram avaliados quanto à resistência ao nematoide, obtendo-se os dados fenotípicos. Os indivíduos avaliados tiveram o DNA extraído das folhas e esse foi utilizado para a obtenção de polimorfismos por meio de *primers* do tipo SSR, disponíveis na literatura. O DNA extraído foi de boa qualidade e quantidade, e das seis combinações de *primers* testadas com os parentais, dois foram selecionados para amplificar todas as amostras. Após a análise de segregação, utilizando o programa GENES, constatou-se que as bandas amplificadas pelos *primers* IFRT03 e IFRT15 seguiram o padrão mendeliano. Entretanto, essas bandas não estão ligadas, não possuem ligação com o gene de resistência ao nematoide das galhas e possivelmente os genes EREBP_m e Extensin 2 não estejam relacionados com a resistência presente na cultivar Aporé.

Palavras-chaves: *Phaseolus vulgaris*. SSR. Nematoide das galhas.

ABSTRACT

*The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume belonging to the Fabaceae family, originating on the American continent. The grain is widely consumed throughout the world and its cultivation has great nutritional, social and economic importance. In bean genetic improvement programs, with the aim of obtaining cultivars resistant to nematodes of the *Meloidogyne* genus, selection assisted by molecular markers (SAM) appears to be a promising technique. Therefore, the objective of the present work was to develop SSR (Simple Sequence Repeats) molecular marker for common bean (*P. vulgaris*) associated with resistance to the phytonematode *M. incognita*. For this objective, the F2 segregating population was used, resulting from the cross between the cultivars Aporé (female and resistant parent) and Bolinha (male and susceptible parent). The parents and the F1 and F2 generations were evaluated for resistance to the nematode, obtaining phenotypic data. The individuals evaluated had DNA extracted from the leaves and this was used to obtain polymorphisms using SSR-type primers, available in the literature. The extracted DNA was of good quality and quantity, and of the six primer combinations tested with the parents, two were selected to amplify all samples. After segregation analysis, using the GENES program, it was found that the bands amplified by primers IFRT03 and IFRT15 followed the Mendelian pattern. However, these bands are not linked, have no connection with the root-knot nematode resistance gene and possibly the EREBPm and Extensin 2 genes are not related to the resistance present in the Aporé cultivar.*

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. SSR. Root-knot nematode.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância
Cr.: Cromossomo
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNTP's: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EST: *Expressed Sequence Tag*
F1: Primeira geração filial
F2: Segunda geração filial
FR: Fator de recombinação
LAGEM: Laboratório de Genética Molecular
LOD: Logaritmo de ligação genica
NCBI: *National Center For Biotechnology Information*
ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PCR: Reação em cadeia da polimerase
QTL's: *Quantitative Trait Locus*
SAM: Seleção assistida por marcadores
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
spp.: Espécie
SSR: *Simple Sequence Repeats*
Temp.: Temperatura
UFLA: Universidade Federal de Lavras
UFU: Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 7 |
| 2 | OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 11 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 11 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 12 |
| 3.1 | Local | 12 |
| 3.2 | Material Biológico | 12 |
| 3.3 | Obtenção do Marcador Molecular | 14 |
| 3.3.1 | Liofilização das folhas | 14 |
| 3.3.2 | Extração do DNA | 14 |
| 3.3.3 | Obtenção do marcador SSR | 15 |
| 3.3.4 | Análises de segregação e ligação genética | 16 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 16 |
| 5 | CONCLUSÃO | 24 |
| | REFERÊNCIAS | 26 |

1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Fabacea, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa originária do continente americano, sendo amplamente consumida no mundo em decorrência do seu valor nutricional, importância econômica e social (Borém; Carneiro, 2015). Combinado com o arroz, o feijão está entre os principais componentes da dieta alimentar brasileira, sendo a principal fonte diária de vitaminas do complexo B, carboidratos, minerais e proteínas, para milhões de pessoas ao redor do mundo (Carvalho et al., 2018). O feijão é rico em lisina, um aminoácido essencial aos humanos, porém possui menores quantidades de metionina e cisteína, outros aminoácidos essenciais presentes em quantidades significativas no arroz (Souza; Santo; Oliveira, 1973). Tendo isso em vista, destaca-se que a dieta tradicional da população brasileira, apresenta riqueza em aminoácidos essenciais através de fontes vegetais com custo significativamente mais baixo que as fontes de origem animal.

O Brasil é o segundo maior produtor de feijão (Coêlho, 2023), com produção de 3,07 milhões de toneladas na safra 2022/23, segundo o levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023). Esses são os dados de produção total, ou seja, abrangendo desde o pequeno até aqueles com maiores investimentos, o que evidencia sua importância econômica e social (De Oliveira; Wander, 2023). A produção dessa leguminosa tem três períodos de safra anual, na qual os dois primeiros períodos estão envolvidos, basicamente, pequenos e médios produtores, que utilizam mão de obra familiar; enquanto no terceiro há o predomínio da participação de grandes produtores, que empregam maiores níveis tecnológicos em suas lavouras (Moura; Brito, 2015).

O feijão produzido no Brasil é destinado, em sua maioria, ao abastecimento do mercado interno devido à grande demanda e ao fato de que no comércio internacional o grão tem pouca expressão, visto que quase todos os países consumidores são também grandes produtores. No entanto, a maior parte da produção está concentrada nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, que possuem população com poder de compra relativamente maior quando comparado as regiões norte e nordeste (AGEITEC, 2023). Segundo os dados obtidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) durante os anos de 2017 e 2018, 81,2 % das famílias de menor poder aquisitivo consumiram feijão e arroz na sua alimentação diária (Agência de notícias IBGE, 2020). A partir desses dados, é perceptível a importância da ampla distribuição deste produto no país, bem como a sua vasta

disponibilidade a um custo acessível. No entanto, a cadeia de produção enfrenta problemas quanto ao controle de pragas e doenças que causam perdas consideráveis, prejudicando a disponibilidade do produto.

Essa problemática de distribuição e disponibilidade comercial interna do feijão está relacionada a diversos fatores capazes de interferir na produtividade do feijoeiro, como por exemplo, as condições climáticas, o tipo de cultivar utilizada, assim como doenças causadas por diversos patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides (Jones et al., 2013). Entre os nematoides, destacam-se os do gênero *Meloidogyne*, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento de galhas nas raízes das plantas atacadas.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* causam galhas nas raízes das espécies vegetais infestadas, devido às deformações provocadas nesses órgãos, sendo conhecidos como nematoides das galhas. Atraídos por exsudatos radiculares das plantas, esses parasitas penetram nas radículas, geralmente pelas pontas, e estabelecem o parasitismo. Através do estilete bucal, injetam secreções nas células dessa região, o que as tornam hipertrofiadas. Essas regiões então, tornam-se essenciais à alimentação e ao desenvolvimento dos nematoides, pois passam a ser seus bolsões alimentadores. Concomitantemente, essas substâncias se irradiam para a região cortical, onde ocorre também o aumento do tamanho e número das células. Como consequência, o córtex entumece e as raízes engrossam, formando a galha (Ferraz; Brown, 2016).

Assim, a partir de uma análise visual é possível identificar a formação das galhas que têm seu tamanho e formato variados de acordo com o nível de infestação, bem como da espécie de nematoide e o grau de suscetibilidade da planta. A presença dessas estruturas afeta diretamente a eficiência de absorção de nutrientes e de água pelas raízes. Nesse sentido, os sintomas reflexos, que são aqueles visualizados na parte aérea das plantas, consistem no tamanho desigual das plantas, deficiência nutricional, murcha e queda primária das folhas, além de diminuição da produtividade (AGEITEC, 2021).

Esses patógenos possuem ampla distribuição geográfica no Brasil. Segundo dados obtidos do estudo realizado pela parceria entre a Syngenta, Agroconsult e Sociedade Brasileira de Nematologia (SYNGENTA, 2022), foram identificadas populações expressivas em áreas naturais e cultivadas em regiões de Mata Atlântica e de Cerrado brasileiras. De acordo com Machado e Castro (2017), o maior problema relacionado aos nematoides está no Cerrado, em decorrência do clima favorável para o ciclo de vida desses organismos. Porém, nenhuma região, solo, clima ou cultura está livre da incidência desse patógeno. A adoção de estratégias que visem à redução populacional desses patógenos é fundamental para diminuir os danos à cultura do feijão.

Diversas práticas têm sido relatadas para essa finalidade, como por exemplo, a rotação de culturas, alqueive, uso de plantas antagonistas, eliminação de restos culturais e plantas daninhas, solarização, controle biológico, uso de cultivares resistentes e controle químico. Entretanto, devido a crescente necessidade de adoção de técnicas sustentáveis para o controle de doenças, o melhor método para o controle de nematoides em feijoeiro é o uso de cultivares resistentes. Essa prática evita, por exemplo, a aplicação de nematicidas que são tóxicos para os aplicadores e deixam resíduos no ambiente (Pinheiro; Macêdo; Carvalho, 2017). Tendo isso em vista, é de grande importância o desenvolvimento de estudos que visem identificar fontes de resistência a esses patógenos, para que essa seja incorporada a novas cultivares.

Estudos têm apontado algumas cultivares comerciais que podem ser utilizadas em programas de melhoramento do feijoeiro por serem possíveis fontes. Porém, no caso do feijoeiro comum, ainda não há uma cultivar disponível no mercado, que apresente nível de resistência satisfatório. Alguns pesquisadores têm trabalhado na identificação de genótipos passíveis de utilização em programas de melhoramento que visam a resistência a *Meloidogyne* spp. e já foram identificadas algumas cultivares com esse potencial. Entre essas, destaca-se a 'Aporé', que apresentou bom desempenho em alguns estudos, como os de Ferreira et al. (2010) e Dias et al. (2023).

Para condução de programas de melhoramento que visam à resistência aos nematoides, é necessária a infestação do solo ou do substrato onde se encontram as plantas a serem avaliadas, para que haja a infecção das raízes. A manutenção de patógenos tem que ser *in vivo*, geralmente em plantas de tomate da cultivar Santa Clara, que é suscetível ao nematoide das galhas. Além disso, os métodos de avaliação mais eficientes e seguros são destrutivos, pois necessitam a avaliação da infecção nas raízes, o que normalmente não permite a seleção e preservação das plantas resistentes.

Para se evitar todo esse processo de inoculação, avaliação e seleção, com a intenção de reduzir o tempo gasto e ter maior segurança e rapidez no trabalho, a alternativa mais viável é a utilização de marcadores moleculares, o que permite a seleção precoce de plantas resistentes e sua manutenção para colheita de sementes. Porém, até o momento, ainda são poucos os trabalhos encontrados na literatura com referência a estudos relacionados a marcadores moleculares para resistência aos nematoides em feijoeiro.

Desde que os marcadores moleculares começaram a ser utilizados na década de 1980, já foram desenvolvidas diversas técnicas que diferem pela tecnologia utilizada para mostrar variabilidade ao nível de DNA. Essas também variam segundo o custo, consistência, facilidade de uso, repetibilidade e habilidade de detectar diferenças entre os indivíduos (Alvarenga et al.,

2011).

Existem diferentes tecnologias de marcadores de DNA, um exemplo são microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*). Consistem em pequenas sequências de nucleotídeos repetidas *em tandem*, de forma abundante e aleatoriamente situados dentro do genoma, demonstrando alto nível de polimorfismo (Carvalho et al., 2018). Os SSR's são codominantes por natureza, pois, distinguem os indivíduos homozigotos dos heterozigotos. Eles têm sido extensivamente aplicados nos programas de melhoramento de feijão, tanto na caracterização genética quanto na seleção assistida (Carvalho et al., 2018). Dessa forma, o progresso recente no sequenciamento completo de genomas e bancos de dados de sequências expressas mais proeminentes de diferentes espécies simplificaram o trabalho de pesquisa de analogia genética entre espécies para espécies que são próximas de uma perspectiva filogenética (Carvalho et al., 2018).

Esses marcadores podem ser associados a uma infinidade de informações sobre o organismo estudado. Essas podem ser utilizadas em estratégias de conservação de recursos genéticos, complementar conhecimentos ecológicos, direcionar o enriquecimento da base genética, analisar a diversidade e a pureza genética dentro de uma mesma espécie, facilitar o planejamento de cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético (Faleiro, 2007).

Dessa forma, tornou-se de grande importância solucionar as seguintes questões: É possível desenvolver marcador(es) molecular(es) associado(s) ao(s) loco(s) de resistência ao nematoide das galhas a partir da cultivar Aporé de feijoeiro comum? E quais metodologias devem ser adotadas? A hipótese proposta no presente estudo foi que havia a possibilidade de desenvolver marcadores moleculares associados à característica de interesse, e que era possível a utilização da técnica *Simple Sequence Repeats* (SSR) para sua obtenção e mapeamento de possíveis *Quantitative Trait Locus* (QTL's). Sendo assim, o principal objetivo do trabalho foi realizar o mapeamento de QTL's do feijoeiro comum associados à resistência ao fitonematoide *M. incognita*, e de forma específica, analisar a associação da resistência ao(s) loco(s) do genoma do *Phaseolus vulgaris* e desenvolver marcadores moleculares SSR,

Os resultados do presente estudo mostrarão potencial para utilização em programas de seleção assistida por marcadores (SAM), com o intuito de desenvolver novas cultivares comerciais de feijoeiro resistentes ao nematoide das galhas. Vale ressaltar que a utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas pode reduzir o tempo de obtenção de cultivares resistentes, bem como o custo do processo e a importância da produção de alimentos cada vez mais saudáveis, tendo em vista a redução do uso de compostos tóxicos para o controle

de pragas, promovendo o ganho de produtividade e sustentabilidade, assim contribuindo no cumprimento do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2 (ODS 2), proposto pela Organização das Nações Unidas na “Agenda 2030”.

A Agenda 2030 é um plano de ação que tem como proposta melhorar as condições de vida de forma globalizada, incluindo metas para resolução de diversas problemáticas nos âmbitos social, ambiental e econômico, a fim de promover a sustentabilidade global (ONU, 2015). Esse documento prevê 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável sendo eles integrados e indivisíveis entre si, buscando concretizar os direitos humanos de todos (ONU, 2015).

O ODS 2 está relacionado a promoção da fome zero e agricultura sustentável, a fim de acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promoção da agricultura sustentável (ONU, 2015). Para realização desse objetivo, a ONU descreve entre as metas a duplicação da produtividade agrícola, implementação de práticas resilientes na agricultura para manutenção de ecossistemas, entre outras (ONU, 2015). Tendo isso em vista, o presente trabalho auxilia na produção de plantas de feijoeiro resistentes ao *M. incógnita* contribuindo para a redução da utilização de reagentes químicos tóxicos para o solo, animais e responsáveis pela redução da segurança alimentar. Esses tipos de cultivares resistentes também contribuem para o aumento da produção, em decorrência da redução das perdas provocadas pelos nematoides.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver marcador molecular SSR (*Simple Sequence Repeats*) para o feijoeiro comum (*P. vulgaris*) associado à resistência ao fitonematoide *M. incógnita*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a eficiência do protocolo de extração de DNA para análises moleculares do feijoeiro comum;

- Analisar a associação entre as marcas produzidas por *primers* SSR e a resistência ao nematoide das galhas em *P. vulgaris*;
- Validar *primers* SSR como marcadores moleculares para o gene de resistência ao nematoide das galhas em *P. vulgaris*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi realizado em duas etapas: obtenção do material biológico e desenvolvimento do marcador molecular. A primeira etapa foi desenvolvida em casa de vegetação e em laboratório, no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Fazenda Palmital, localizada no município de Ijaci-MG. A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular-LAGEM, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus de Patos de Minas.

3.2 Material Biológico

Nesta etapa foram realizados os cruzamentos entre a cultivar Aporé (genitor feminino e resistente ao nematoide) e a cultivar Bolinha (genitor masculino e suscetível ao nematoide), obtendo a geração F₁. Em seguida, por meio da autofecundação natural de uma planta da geração F₁, foi obtida a geração F₂.

A caracterização da resistência das plantas F₂ ao *M. incognita* se deu mediante um experimento, no qual procedeu-se à avaliação dos genitores e das gerações F₁ (P1 x P2) e F₂ (P1 x P2). Para diminuir os efeitos do ambiente, foi adotado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. As sementes foram semeadas em copos de isopor de 120 ml, contendo areia de granulometria média, lavada e peneirada. Em cada recipiente foi colocado 1 g de adubo de liberação lenta 15:09:12 (N:P:K), além de fertirrigações semanais. Para realização da avaliação de resistência foram utilizados vinte copos de isopor de 120 ml para cada um dos genitores e para a geração F₁ (P1 x P2), além de 300 copos de isopor de 120 ml para a geração F₂ (P1 x P2). Em cada copo foram colocadas duas sementes, das quais, após a

germinação e emergência, se necessário, foi desbastada uma planta, deixando apenas uma planta por recipiente. Foram utilizadas também plantas de tomate cultivar Santa Clara, como testemunha suscetível para confirmar a viabilidade do inóculo. Quinze dias após a sementeira, quando as plantas já apresentavam sistema radicular desenvolvido, foi realizada a inoculação com ovos de *M. incognita*. Os inóculos foram obtidos a partir de plantas de tomate Santa Clara infestados com o isolado da espécie em estudo e mantidos em vasos de 10 L, em ambiente protegido, no setor de Olericultura da Universidade Federal de Lavras. A extração dos ovos de nematoides foi realizada conforme a técnica proposta por Hussey (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981). Foram utilizados 1600 ovos por recipiente, para cada planta, inoculados com o auxílio de uma pipeta automática. Para verificar a porcentagem de ovos viáveis foram montadas três câmaras de eclosão, em placas de Petri. Sob cada câmara de eclosão foram adicionados 2 ml de suspensão contendo 1600 ovos do nematoide das galhas, sendo essa a mesma quantidade inoculada no teste realizado em copos em casa de vegetação. As placas foram levadas à incubadora à temperatura de 25 °C. A quantificação dos J2 eclodidos foi realizada diariamente, através da contagem em microscópio estereoscópio, até que não fosse mais verificada eclosão, sendo constatado a média de 365 ovos viáveis.

Quando foi verificada a formação de galhas e massas de ovos nas raízes das plantas de tomate, foi realizada avaliação da reprodução dos nematoides em todos os genótipos. As plantas, previamente identificadas, foram retiradas dos recipientes e suas raízes foram cuidadosamente lavadas para retirada de todo o substrato. Posteriormente as plantas foram colocadas sobre papel absorvente para absorção da umidade livre e, em seguida, foram pesadas em balança de precisão para obtenção da massa fresca das raízes. Os ovos foram extraídos conforme a técnica proposta por Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981). Os ovos obtidos em cada extração foram armazenados em BOD a 10°C e, posteriormente, contados com o auxílio de um microscópio de luz. Dessa forma, obteve-se o número de ovos total por planta de feijão (NO), o número de ovos por grama de raiz (NOGR), o índice de reprodução total (IRT) e o índice de reprodução por grama de raiz (IRGR). O índice de reprodução foi calculado por meio da razão entre o número de ovos no sistema radicular da planta e o número médio de ovos no sistema radicular do feijão Bolinha (Genitor suscetível) multiplicado por 100 ($IR = NO/NOB \times 100$). O fator de reprodução (FR), o qual corresponde à razão entre a população final e inicial de nematoides ($FR = Pf/Pi$) foi calculado com base na média de ovos viáveis obtidos por meio da câmara de eclosão. A avaliação foi feita para cada planta individualmente e, baseado nestes índices utilizados, cada planta foi caracterizada como resistente, suscetível e segregante.

A classificação baseada na redução do fator de reprodução (RFR) foi obtida pela fórmula:

$$RFR = \{(FRp - FRc) / FRp\} \times 100$$

Onde FRp corresponde à média do fator de reprodução (FR) da cultivar suscetível padrão (cv. Bolinha) e FRc corresponde ao fator de reprodução de cada material avaliado (Moura; Regis, 1987).

De posse destes resultados confirmou-se a resistência do genitor Aporé, a suscetibilidade do genitor Bolinha e a reação de dominância parcial na geração F₁, bem como caracterizou-se cada planta F₂ como resistente, suscetível ou segregante.

Amostras de folhas de cada planta F₂, identificando a reação de cada uma à infecção pelo *M. incognita*, foram armazenadas em ultra freezer (-80°C) juntamente com as amostras dos genitores e da planta F₁, previamente armazenadas. Posteriormente as amostras foram enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da UFU em Patos de Minas.

Amostras de folhas de cada planta F₂, parentais e F₁, identificadas para a reação de cada uma à infecção pelo *M. incognita*, foram armazenadas em ultra freezer (-80°C) juntamente com as amostras dos genitores e da planta F₁, previamente armazenadas. Posteriormente as amostras foram enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da UFU em Patos de Minas.

3.3 Obtenção do Marcador Molecular

3.3.1 Liofilização das folhas

Assim que as amostras de folhas chegaram ao Laboratório de Genética Molecular em Patos de Minas foram armazenadas em ultra freezer (-80 °C) e, em sequência, liofilizadas por 72 horas. Em seguida, as amostras liofilizadas foram trituradas, o pó resultante acondicionado em microtubo de 2 mL, devidamente identificado, e guardado em ambiente seco para posterior extração do DNA e obtenção do marcador molecular. Foram obtidas 205 amostras F₂ para avaliação.

3.3.2 Extração do DNA

O DNA de cada amostra foi extraído separadamente, seguindo o protocolo descrito por Souza e Teixeira (2019), e apenas as amostras que apresentaram material genético de boa

qualidade e quantidade foram utilizadas. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume (L-Quant[®], Loccus Biotecnologia), nas faixas de 260 e 280 nm. Em seguida, 4 µL de cada amostra de DNA foram utilizados para a qualificação, sendo preparados com a adição de 2 µL de azul de bromofenol e 2 µL do corante GelRed (Uniscience do Brasil Ltda). As amostras de DNA preparadas e o marcador de peso molecular de 1 Kb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % e corrida a 80 volts por 60 minutos. Os resultados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados em fotodocumentador (L.PIX, Loccus Biotecnologia).

Após a quantificação e a qualificação, cada amostra foi diluída para a concentração de 50 ng/µL e, em sequência, foi feita a segunda diluição para 10 ng/µL, que foi a concentração utilizada nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

3.3.3 Obtenção do marcador SSR

Para a obtenção do marcador molecular do tipo SSR foram realizadas buscas bibliográficas do NCBI e Google Acadêmico para a escolha dos melhores *primers* a serem utilizados nas reações de PCR.

Os *primers* selecionados foram utilizados para a amplificação do DNA dos parentais resistente (cultivar Aporé) e suscetível (cultivar Bolinha). Nessa etapa realizou-se a preparação do mix para a PCR com os seguintes reagentes e concentrações: *primers* 0,9 mM, dNTPs 10 mM, tampão da Taq DNA polimerase 10 X, MgCl₂ 50 mM, água ultrapura e, adicionada ao final, a Taq DNA polimerase 5 U/µL. Posteriormente, em dois microtubos de 200 µL, foram adicionados 10 µL do mix acima descrito e 2µL do DNA de cada um dos parentais (10 ng/µL) separadamente. As amostras foram levadas ao termociclador, com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos com três etapas (94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com cada *primer* por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto) e um ciclo de finalização de 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados e o marcador de peso molecular de 1 Kb foram avaliados em eletroforese com gel de agarose 2,5% e corrida de 80 volts por 240 minutos.

Os *primers* que apresentaram polimorfismos entre os parentais foram utilizados para a amplificação do DNA das plantas da geração F₂, seguindo o mesmo padrão de preparo das amostras.

3.3.4 Análises de segregação e ligação genética

As bandas obtidas, por meio da amplificação das amostras da geração F₂, foram avaliadas e codificadas de acordo com a posição, tendo como base a avaliação dos parentais o que resultou em uma matriz para a análise no programa GENES (Cruz, 2017). Nessa matriz, as amostras receberam códigos, sendo as que apresentaram bandas iguais ao parental suscetível codificadas como 0, as que apresentaram bandas de ambos parentais codificadas como 1 e as que apresentaram bandas iguais ao parental resistente codificadas como 2.

Também foi construída uma matriz de análise incluindo os dados fenotípicos, na qual as amostras foram classificadas com atribuição de notas, sendo 5 para resistência, 6 para heterozigoto e 7 para susceptibilidade.

Em seguida, realizou-se o teste de qui-quadrado (χ^2) com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2017). O objetivo do teste do qui-quadrado foi eliminar bandas que não apresentaram a segregação 1:2:1. Utilizando os parâmetros do logaritmo de ligação gênica (LOD) ≥ 3 e Fator de Recombinação (FR) $< 0,3$, foram feitas as análises dos escores de recombinação e a transformação em distâncias genéticas usando a função Kosambi (1943).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA foliar foi realizada para cada um dos parentais (Aporé e Bolinha), uma amostra da geração F₁ e 202 amostras em F₂. Como resultado da quantificação, a menor concentração obtida foi de 100,40 ng/ μ L e a maior de 1.821,80 ng/ μ L, com média geral de 611,31 ng/ μ L. Tendo em vista que a concentração necessária para as etapas de amplificação realizadas no presente estudo foram de 10 ng/ μ L, a quantidade de DNA obtida na extração foi bem-sucedida para as análises moleculares.

Em relação à qualificação, por meio da leitura de absorbância, a maioria das amostras, incluindo os parentais e F₁, ficaram dentro da faixa de leitura considerada de alta pureza. A Tabela 1 apresenta a quantidade de amostras quantificadas, suas respectivas relações DNA/proteína (A_{260}/A_{280}) e a classificação baseada no nível de pureza apresentado, sendo alta pureza a faixa entre 1,7 e 2,0 (Lipay et al., 2015), contaminação potencialmente proteica para aquelas com absorbância menor que 1,7, e contaminação por RNA para os valores acima de 2,0 (Matínez et al., 2017).

O desvio padrão obtido para os valores de absorbância (A_{260}/A_{280}), em todas as classes,

foi baixo. Isso indica que o método utilizado permite a obtenção de material genético de boa qualidade.

Tabela 1 – Absorbância 260/280 do DNA foliar extraído, com a média e desvio padrão amostral.

| Classe | Observadas | A260/280 (λ)nm ^a |
|---------------------------|------------|---------------------------------------|
| Contaminação por proteína | 76 | 1,53±0,0842 |
| Alta pureza | 124 | 1,85±0,0937 |
| Contaminação por RNA | 5 | 2,03±0,0152 |
| Geral | 205 | 1,74±0,1812 |

^a Média±desvio padrão

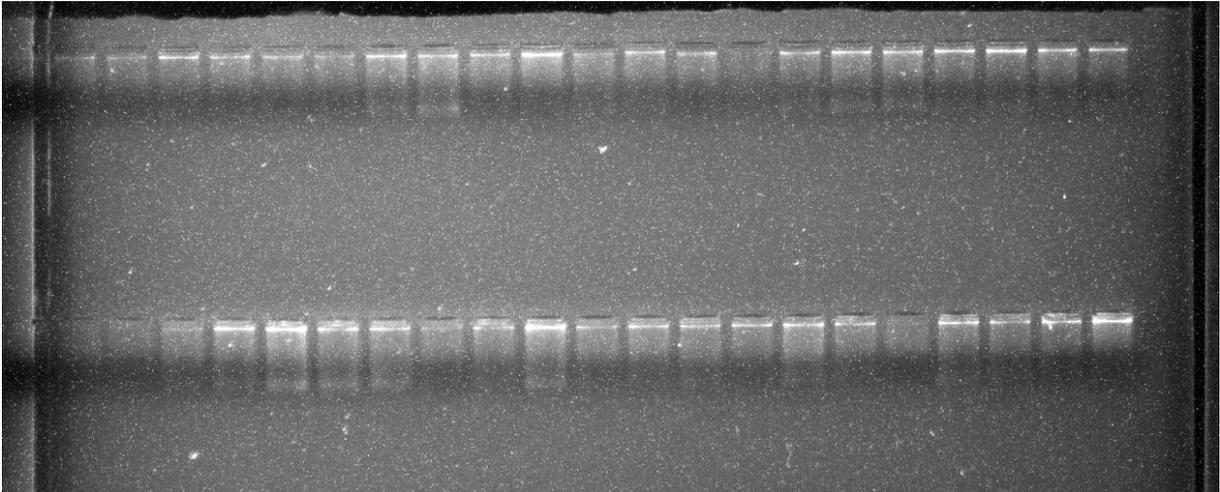
O método de obtenção do DNA, que utiliza Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Triton – 100X descrito por Souza e Teixeira (2019), foi utilizado para plantas do Cerrado como um método promissor para extração de material genético, de forma mais rápida, pura e com menor custo. No presente estudo, essa metodologia também se mostrou eficiente quando aplicado para extração do DNA de feijoeiro comum, resultando na obtenção de material genético de alta pureza para a maioria das amostras.

Outro fator observado foi em relação a integridade do DNA, que por meio da qualificação baseada na absorbância não é possível determinar. Como resultado, após a realização da diluição de padronização das amostras em 50 ng/ μ L, obteve-se imagens do material genético extraído com leve sinal de “arraste”, confirmando assim que o material genético extraído apresentou boa taxa de integridade e uniformidade (Figura 1).

Das amostras quantificadas e qualificadas, apenas aquelas que apresentaram o material genético com alto nível de pureza (Tabela 1) foram utilizadas nas reações de amplificação com os *primers*, ressaltando que os parentais e F₁ estão entre essas amostras. Logo utilizou-se uma amostra de cada parental, uma da geração F₁ e 121 amostras de F₂.

A partir das buscas bibliográficas no NCBI e no Google Acadêmico chegou-se ao trabalho de Furlan (2020), que tinha como objetivo caracterizar os polimorfismos de marcadores SSR candidatos em *P. vulgaris* associados a genes que conferem resistência a *M. incognita*, o qual concluiu que para as 26 cultivares avaliadas, seis (Tabela 2) dos *primers* testados seriam candidatos a marcadores moleculares para a resistência ao nematoide.

Figura 1 – Gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade do DNA diluído para 50 ng/μL.



Fonte: Próprio autor.

Nesse trabalho (Furlan, 2020), dos nove conjuntos de *primers* utilizados para avaliar polimorfismos no feijoeiro e seis foram selecionados em decorrência da apresentação de caracter polimórfico e possuir repetições de trinucleotídeos (Tabela 2). Segundo Carvalho et al. (2018), repetições de trinucleotídeos são, em sua maioria, SSRs perfeitos, cuja sequência de motivo de repetição não passa por interrupção.

Esses *primers* foram desenvolvidos a partir de regiões alvo de cinco genes (EREBP, Ext1, Ext2, Rhg4, Rmi1) de resistência ao nematoide na soja (*Glycine max*) (Luzzi et al., 1994; Concibido et al., 2004; Pham et al., 2013), que apresentam mais de 70% de homologia com as regiões alvos do feijão comum (Vieira et al., 2016). Esses cinco genes são responsáveis por processos de regulação do processo transcricional, organização e estrutura da parede celular, atividade das proteínas quinases, componentes de membrana e formação de órgãos florais (Carvalho et al., 2018).

Segundo os trabalhos de Viera et al. (2016) e Carvalho (2018), que realizaram o desenvolvimento e caracterização *in silício* dos *primers*, outra característica importante apresentada por essas sequências está relacionada ao tamanho das repetições, di e trinucleotídica (Tabela 2). Essas repetições em *tandem* são descritas com distribuição ampla no genoma das plantas, principalmente nas regiões transcritas e não traduzidas (UTR's) e nas trincas da matriz de leitura (ORF's) (Vieira et al., 2016).

As regiões UTR e ORF possuem baixa taxa de mutação, sob consequência da ocorrência de mudança brusca no produto gênico negativamente, trazendo prejuízos ao desenvolvimento do indivíduo (Carvalho, 2018). Tendo isso em vista, percebe-se que o tamanho reduzido está relacionado a preservação da estrutura transcrita, que consequentemente é repassada para as

próximas gerações (Vieira et al., 2016). Partindo dessa premissa inferimos que a presença de marcadores associados à resistência e ligados a essas regiões apresenta maior taxa de preservação no genoma e transferência dessa característica, resultando em índices de fixação elevados e redução do carácter polimórfico.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* e suas respectivas temperaturas de anelamento dos *primers*.

| <i>Primer</i> | Gene | Cr. | Temp. de anelamento (°C) | Sequência do <i>primer</i> (5'-3') | Repetições |
|---------------|--------|-----|--------------------------|--|---|
| IFRT02 | EREBPm | 9 | 50,5 | F: GGGTGGTAACCTCACCTTCA R: GGCGAGGAAAACAGACACTC | (ATT) ₃ (ATT) ₃ |
| IFRT03 | EREBPm | 9 | 59 | F: TCGTTCATGGAGTTCATAGCA R: AATCCACAGAGCCATCCTTG | (CTT) ₄ |
| IFRT06 | Ext. 1 | 3 | 52,2 | F: CACCTCCTTCCACCACAAAC R: TCTGGGGTAGTTTCCATTGC | (CGG) ₃ (CTA) ₃ (CCG) ₄ (CTA) ₃ |
| IFRT15 | Ext. 2 | 8 | 58 | F: GTCGCTTATCCTCACCTCA R: GTCGAAGCATCAGCATCAGA | (ATT) ₅ |
| IFRT25 | Rhg4 | 1 | 53,4 | F: AACCTACCAAAGGCCAGAT R: TGCAGGAATGCTTGATTGAG | (GAA) ₄ |
| IFRT26 | Rmi | 2 | 59 | F: AAAATCCCATTGTCCTCTCCT R: GAAACAACCTTTTGGCTTTGGTG | (CGA) ₄ |

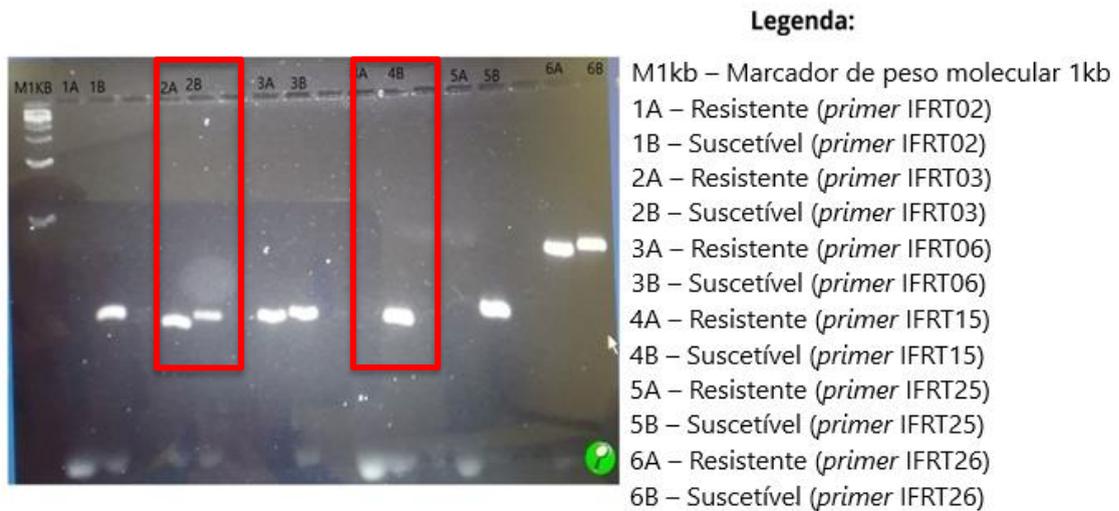
Fonte: Vieira et al., 2016; Carvalho, 2018; Furlan, 2020.

Os seis conjuntos de *primers*, descritos no estudo de Furlan (2020), foram utilizados para amplificar o DNA dos parentais (Figura 2), sendo selecionados dois (IFRT03 e IFRT15), que apresentaram maior diferença de peso molecular entre as bandas que diferenciavam o parental resistente e o suscetível.

A seleção desses dois *primers* foi realizada com base na diferença entre o peso molecular da banda obtida entre o parental resistente (Aporé) e o suscetível (Bolinha), ressalvando que essas cultivares não foram contempladas no estudo realizado por Furlan (2020) e Carvalho (2018). Houve uma diferença bem visível entre os tamanhos dos fragmentos gerados com a amplificação utilizando os *primers* IFRT03 e IFRT15. Na Figura 2, os resultados das ampliações com o *primer* IFRT03 está representado como 2A (Teste com parental Aporé) e 2B (Teste com parental Bolinha), e com o *primer* IFRT15 está representado como 4A (Teste com parental Aporé) e 4B (Teste com parental Bolinha). Como a banda da amplificação com o *primer* IFRT15 para o parental Bolinha (Figura 2) não ficou nítida, foi feita nova amplificação

(Figura 3) utilizando os parentais e a planta F₁.

Figura 2 – Padrão de amplificação com seis conjuntos de *primers* com os parentais Aporé (Resistente) e Bolinha (Suscetível), resolvido em gel de agarose 2,5 %.



Fonte: Próprio autor.

Figura 3 – Padrão de amplificação com o *primer* IFRT15 com parental resistente (PR), o parental suscetível (PS) e a planta F₁, resolvido em gel de agarose 2,5 %.



Fonte: Próprio autor.

Com as avaliações das bandas polimórficas observadas nas análises dos géis, com as amostras da geração F₂, constatou-se que os dois *primers* testados seguiram a segregação mendeliana 1:2:1, com 5 % de significância (Tabela 3).

Segundo a primeira lei de Mendel, no processo de meiose, os pares de alelos são segregados igualmente entre os gametas sexuais, assim cada indivíduo da geração filial recebe um alelo de cada parental (Griffiths et al., 2022). Sendo assim, a proporção fenotípica esperada na geração F₂, para genes co-dominantes é de 1:2:1 (Griffiths et al., 2022). Assim, conclui-se que a segregação apresentada para as bandas avaliadas comprova que essas marcas são repassadas para a prole seguindo as leis de mendelianas.

Tabela 3 – Análise de segregação das marcas obtidas a partir da amplificação do DNA dos indivíduos da geração F₂ com os *primers* IFRT03 e IFRT15.

| Marcas | Classes | | | Hipótese | Qui-quadrado |
|--------|---------|----|----|----------|--------------|
| | 0 | 1 | 2 | | |
| IFRT03 | 31 | 60 | 28 | 1:2:1 | 0,16 |
| IFRT15 | 31 | 65 | 28 | 1:2:1 | 0,435 |

Fonte: GENES (Cruz, 2017).

Partindo da avaliação de segregação, é necessária a identificação da existência de ligação entre as marcas avaliadas (IFRT03 e IFRT15), para conseguir determinar se o gene ao qual os *primers* se ligam estão presentes em um mesmo cromossomo e se estão relacionados a característica avaliada.

Na avaliação de ligação entre as marcas, utilizando o estimador de verossimilhança (Tabela 4), foi possível obter a equação de predição da frequência de recombinação: $76 - 384r + 682r^2 - 464r^3$.

O escore de recombinação entre as marcas foi de 0,432, que é superior a 0,3, e tendo em vista que, quanto mais próximo r for de 0,5, menor é a possibilidade de ligação entre os genes (Cruz, 1998), conclui-se que as marcas analisadas não estão ligadas.

Outro parâmetro avaliado que apontou que as marcas não possuem ligação foi o logaritmo de base 10 (LOD score), que consiste na razão entre a verossimilhança, considerando o valor de recombinação (r) estimada pela função de máxima verossimilhança, e o valor padrão de r = 0,5 que verifica ausência de ligação. Esse logaritmo é utilizado, pois geralmente os resultados obtidos em ambas funções de verossimilhança são pequenos, dificultando a visualização de superioridade do valor de probabilidade encontrado para o r estimado pela máxima verossimilhança e o valor de r = 0,5. Essa razão entre as probabilidades fornece um indicativo da existência ou não da ligação fatorial (Cruz e Silva, 2006). O LOD obtido foi de 0,421752, sendo que o LOD_{mín} é igual a 3 para determinação da existência de

ligação entre as marcas (Bhering e Cruz, 2008). Para considerar a existência de ligação, o LOD calculado deve ser superior a 3, logo, foi confirmada a ausência de ligação entre as marcas.

Tabela 4 - Estimador de máxima verossimilhança pelo método analítico.

| Fenótipos | Observado | Esperado |
|---|-----------|-------------------------|
| AABB | 11 | $1/4(1-r)^2$ |
| AABb | 17 | $1/2r(1-r)$ |
| AAbb | 3 | $1/4(r^2)$ |
| AaBB | 8 | $1/2r(1-r)$ |
| AaBb | 33 | $1/2(1-r)^2 + 1/2(r^2)$ |
| Aabb | 17 | $1/2r(1-r)$ |
| AaBB | 8 | $1/4(r^2)$ |
| AaBb | 12 | $1/2r(1-r)$ |
| Aabb | 7 | $1/4(1-r)^2$ |
| <hr/> Frequência de recombinação (r): 0,432 <hr/> | | |

Portanto, verificou-se que as marcas não se encontram no mesmo cromossomo, confirmando as análises *in silico* apresentadas nos trabalhos de Vieira et al. (2016), Carvalho (2018) e Furlan (2020), em que o *primer* IFRT03 se encontra no cromossomo 9, enquanto o IFRT15 está no 8 (Tabela 2).

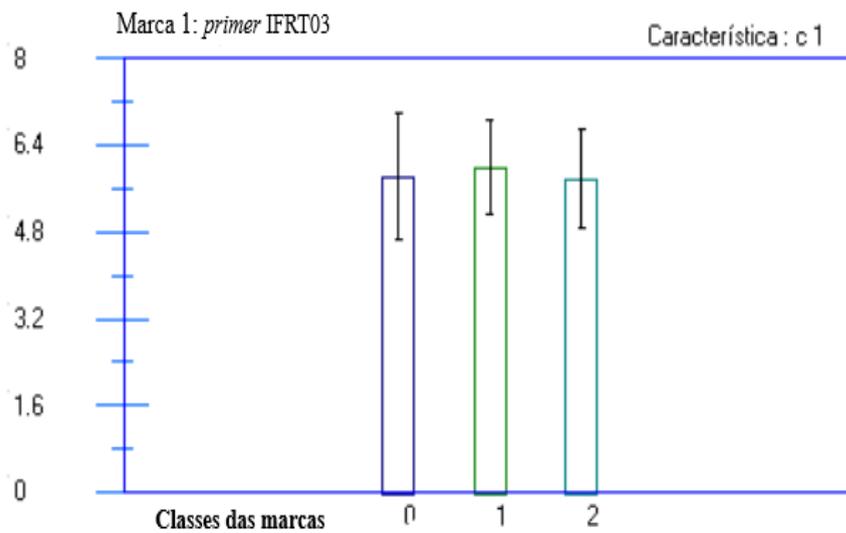
Segundo Carvalho (2018), o entendimento do estudo *in silico* permitiu avanços para o desenvolvimento de marcas SSR's funcionais, de forma mais fácil e de baixo custo, fornecendo uma boa base de dados com sequências de marcadores microssatélites funcionais nos estudos de associação à resistência de cultivares ao nematoide das galhas. A partir das análises de variâncias (ANOVA), para ambas as marcas, os valores do teste F foram inferiores a um, também servindo como indicativo da possibilidade de não estarem no mesmo cromossomo que a característica de resistência.

Os escores de recombinação obtidos, para verificar a relação entre a resistência e as marcas selecionadas foram de 0,4383 para o *primer* IFRT03 e de 0,4264 para o IFRT15, valores superiores a 0,3, indicando a inexistência da ligação entre as marcas e a característica avaliada.

Na representação gráfica (Figuras 4 e 5), em que no eixo X estão representadas as classes

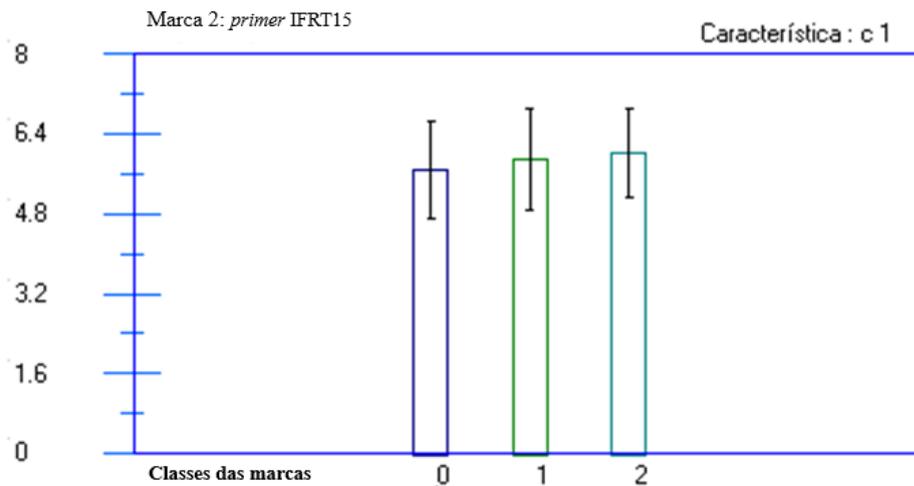
referentes às marcas moleculares e no eixo Y estão os dados de avaliação fenotípica para a resistência ao nematoide, é possível notar que não há associação significativa entre as notas para a resistência e as bandas. A representação das notas genotípicas foi realizada sendo 0 para amostras com bandas iguais ao parental susceptível, 1 para as amostras com as duas bandas e 2 para as amostras com bandas iguais ao parental resistente, e para as fenotípicas determinou-se como sendo 5 para resistência, 6 para heterozigoto e 7 para susceptibilidade.

Figura 4 – Representação gráfica da ANOVA para a marca obtida com o *primer* IFRT03: eixo x apresenta as marcas analisadas e eixo y as notas fenotípicas.



Fonte: GENES (Cruz, 2017).

Figura 5 - Representação gráfica da ANOVA para a marca obtida com o *primer* IFRT15: eixo x apresenta as marcas analisadas e eixo y as notas fenotípicas.



Fonte: GENES (Cruz, 2017).

O gene EREBP_m, amplificado pelo *primer* IFRT03 (Tabela 2), tem como produto gênico o fator de transcrição responsivo ao etil rap2-12, participando do processo de regulação transcricional (Viera et al., 2016). Esses fatores transicionais são responsáveis pelo controle de genes específicos promovendo ativação ou repressão específica (Griffiths et al., 2022). Esse *primer* foi desenvolvido utilizando sequências alvo homólogas às do feijoeiro comum e já descritos como sequências de expressão de resistência da soja ao nematoide das galhas (Carvalho et al., 2018). A partir dessa base teórica, testou-se a marca para avaliar e validar sua utilização como possível marcador para a resistência na cultivar Aporé. No entanto, a partir da ANOVA e da representação gráfica (Figura 4), verificou-se não haver associação entre a marca e a resistência.

O *primer* IFRT15 está relacionado ao gene Extensin 2 (Tabela 2), que é responsável pela produção de uma das proteínas da estrutura e organização da parede celular da soja e do feijoeiro comum, sendo assim um ótimo candidato a marcador SSR para a resistência a *M. incognita* (Vieira et al., 2016). Mas, neste trabalho não foi verificada a ligação entre esse gene e a resistência.

Ainda que os *primers* selecionados não tenham apresentado ligação com a resistência, aqueles que ainda não foram avaliados possuem características interessantes para a continuidade dos estudos, principalmente o IFRT25, que está relacionado ao gene que codifica um componente integral de membrana celular, e o IFTR06, que produz uma proteína extensa e rica em leucina 6, a qual ainda não possui função definida (Carvalho et al., 2018). Outro ponto importante para considerar a realização da validação dos demais *primers* é que estudos apontam que os locos SSR de trinucleotídeos possuem maior conteúdo de informação polimórfica (Furlan, 2020), ou seja, características como a resistência a patógenos têm maior probabilidade de serem encontrada nessas regiões.

5 CONCLUSÕES

O método de extração utilizado se apresentou eficiente, proporcionando a obtenção de material genético com qualidade e quantidade suficientes para as análises moleculares em DNA de feijoeiro comum.

As marcas moleculares produzidas pelos *primers* IFRT03 e IFRT15, apresentados na literatura como possíveis marcadores moleculares do tipo SSR para resistência ao nematoide *M. incognita*, não apresentaram associação com a característica analisada. Portanto, não foi

possível validar esses *primers* como marcadores para a resistência ao nematoide das galhas no feijoeiro comum.

Os genes EREBP_m e Extensin 2, descritos na literatura como responsáveis pela resistência ao nematoide das galhas na soja e com alta homologia com o genoma do feijoeiro comum, possivelmente não estejam relacionados com a resistência encontrada na cultivar Aporé.

É importante ressaltar que a pesquisa deve ter continuidade na tentativa de validar os demais *primers* polimórficos entre as cultivares Aporé e Bolinha, como possíveis marcadores moleculares para resistência ao nematoide das galhas, visando contribuir para o ODS 2, da “Agenda 2030”, que visa a fome zero e agricultura sustentável.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC. Estatística da Produção. **Portal EMBRAPA**, 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao/pre-producao/socioeconomia/estatistica-da-producao#:~:text=Osmira%20Fatima%20da%20Silva%20-%20Embrapa%20Arroz%20e>>. Acesso em: 29 set. 2024.
- AGEITEC. Nematóide de galhas (*Meloidogyne* spp.). **Portal EMBRAPA**, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/biotecnologia/nematoide-de-galhas-meloidogyne-spp.->> . Acesso em: 07 mar. 2024.
- AGÊNCIA DE NOTÍCIAS IBGE. POF 2017-2018: Brasileiro ainda mantém dieta à base de arroz e feijão, mas consumo de frutas e legumes é abaixo do esperado. **IBGE**, 2020. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/28646-pof-2017-2018-brasileiro-ainda-mantem-dieta-a-base-de-arroz-e-feijao-mas-consumo-de-frutas-e-legumes-e-abaixo-do-esperado>>. Acesso em: 28 out. 2024.
- ALVARENGA, S. M. **Caracterização de sequências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- BHERING, L. L.; CRUZ, C. D.; GOD, P. I. V. G.. Estimativa de frequência de recombinação no mapeamento genético de famílias de irmãos completos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 363–369, mar. 2008.
- BONETI, J.; FERRAZ, S. J. F. B. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Jornal Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, 1981.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. A Cultura. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Org.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015. cap. 1, p. 9-15.
- CARVALHO, S. A. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para regiões alvos de resistência à *Meloidogyne* ssp. Em *Phaseolus vulgaris***. 2018. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Goiano, Urutaí, 2018.
- COÊLHO, J. D. Feijão. **Caderno Setorial ETENE**, n.322, p.1-8, 2023. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1918/1/2023_CDS_322.pdf>. Acesso em: 24 de outubro de 2024.
- 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.
- CONAB. **Levantamento de Safra de Grãos - Conab**, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/fazenda/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/conjuntura-economica/agricola/2023/20230906_levantamento-de-safras_conab.pdf Acesso em: 24

outubro 2024.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e bioquímica**. Versão 2017.3.1. 2007. Disponível em: <www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm
<www.ufv.br/dbg/biodata.htm>. Acesso em: 18 maio 2023.

CRUZ, C. D. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 1998.

CRUZ, C. D.; SILVA, L. da C. Análise de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares. **Editora UFV**, 2006. p. 307 – 372

DE OLIVEIRA, G. M., WANDER. A. E. Mapeamento da cadeia produtiva do feijão-comum no Brasil. **Revista Economia Política do Desenvolvimento**, v.14, n.32, p. 96-122, Maceió, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.28998/2594-598X.2023v14n32p96-122>>. Acesso em 29 de setembro de 2024.

DIAS, W. P.; WENDLAND, A.; CARNEIRO, G. E. de S.; OLIVEIRA FILHO, F. G. de; LOPES, I. de O. N. Reação de genótipos de feijoeiro a nematoides de plantas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 53, p. e74717, Goiânia, 2023. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/pat/article/view/74717>>. Acesso em 12 de agosto de 2024.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrados, 2007.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016. 251 p.

FERREIRA, S. et al. Resistance of dry bean and snap bean cultivars to root-knot nematodes. **Hort Science**, v. 45, n. 2, p. 320-322, 2010.

FURLAM, J. C. **Polimorfismo de novos marcadores microssatélites de *Phaseolus vulgaris* desenvolvidos a partir de regiões alvos homólogos e ligados à genes de resistência a nematoide em *Glycine max***. 2020. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Goiano, Urutaí, 2020.

GRIFFITHS, Anthony J F.; DOEBLEY, João; PEICHEL, Catarina; et al. **Introdução à Genética**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022. ISBN 9788527738682.

HUSSEY, R. J. P. D. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Journal Article**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* Species, Including a New Technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 946–961, 2013.

KOSAMBI, D. D. **The estimation of map distance from recombination values**. *Annals of eugenics*, v. 12, p. 172-175, 1943.

- LIPAY, V.N. M; BIANCO. B. **Biologia Molecular: Métodos e interpretação**. Principais técnicas utilizadas em coletas e extração de ácidos nucleicos. Rio de Janeiro: Ed. Roca, 2015. cap. 3, p. 26.
- 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.
- MACHADO, A. C. Z.; CASTRO, J. M. C. Nematóide: a praga que contamina os diferentes solos brasileiros. **Revista Attalea Agronegócios**, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadeagronegocios.com.br/detalhes-artigo.php?id=316>>. Acesso em: 18 maio 2023.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C.R.; RAMÍREZ-MENDOZA, R.; JIMÉNEZ-RAMÍREZ, J.; GALLEGOS-VÁZQUEZ, C.; LUNA-VEJA, I. Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). **Plant Methods**, 13, 82, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>.
- MOURA, A. D.; BRITO, L. M. Aspectos socioeconômicos. In: CARNEIRO, J. E., PAULA JUNIOR, T. J., BORÉM, A. (Org.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015. cap. 2, p. 16-36.
- MOURA, R.; REGIS, E. J. N. B. Reações de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). v. 10, n. 1, 1987.
- ONU. **Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/91863-agenda-2030-para-o-desenvolvimento-sustent%C3%A1vel>>. Acesso em: 12 de novembro de 2024.
- 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 rootknot nematode in PI 96354. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1825-1838, 2013.
- PINHEIRO, J. B.; MACÊDO, A. G.; de CARVALHO, A. D. F. **Galhas agressivas**. 2017. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1067867/1/digitalizar0178.pdf>>. Acesso em: 19 maio. 2023.
- SOUZA, D.C; TEIXEIRA, T.A. A simple and effective method to obtain high DNA quality and quantity from Cerrado plant species. **Molecular Biology Reports**, v.46, ed.4, p.4611-4615, 2019.
- SOUZA, N.; SANTO, J. E.; OLIVEIRA, J. E. D. Clinical and Experimental studies on common beans. In: JAFFÉ, W. G. Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. **Proceedings of a Meeting held**, Ribeirão Preto. p. 241-248, 1973.
- SYNGENTA. **Pesquisa inédita revela mapa de crescimento e danos econômicos causados por nematoides e doenças iniciais nas principais culturas no Brasil**, 2022. Disponível em:

<<https://www.syngenta.com.br/press-release/institucional/pesquisa-inedita-revela-mapa-de-crescimento-e-danos-economicos-causados>>. Acesso em: 26 de junho de 2024.

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