

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES TIPO
MICROSSATÉLITES A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DE *Vigna unguiculata* (L.)
Walp.**

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

RECIFE

2019

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES TIPO
MICROSSATÉLITES A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DE *Vigna unguiculata* (L.)
Walp.**

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura Plena em Ciências
Biológicas/UFRPE como requisito parcial
para obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon

Co-orientadoras: Dr.^a Flávia Czekalski de Araújo

Ma. Mitalle Karen da Silva Matos

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48d Oliveira, Wilson Dias de.

Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares
tipo microssatélites a partir do transcriptoma de *Vigna unguiculata*
(L.) Walp. / Wilson Dias de Oliveira. – Recife, 2019.

65 f.: il.

Orientador(a) : Ana Maria Benko Iseppon.

Coorientador(a) : Flávia Czekalski de Araújo,

Mitalle Karen da Silva Matos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento em Ciências
Biológicas, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Bioinformática 2. Déficit hídrico 3. Estresse 4. Genética
5. Molecular 6. Vírus I. Iseppon, Ana Maria Benko, orient. II. Araújo,
Flávia Czekalski de, coorient. III. Matos, Mitalle Karen da Silva,
coorient. IV. Título

CDD 574

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES TIPO
MICROSSATÉLITES A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DE *Vigna unguiculata* (L.)
Walp.**

Comissão Avaliadora:

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon – UFPE
Orientadora

Dr.^a Carolline de Jesús Pires– UFPE
Titular

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto – UFPE
Titular

Ma. Artemisa Nazaré Costa Borges – UFPE
Suplente

RECIFE
2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha mãe **Luzimar Dias**, pelo apoio incondicional e por me fazer sentir que, mesmo enfrentando tantos problemas na vida, sempre teremos um lar para encontrar os melhores sentimentos e o progresso espiritual que precisamos.

Aos meus irmãos queridos, **João Guilherme**, **Wesley Victor** e **Wilka Dias**, pela certeza que temos aquilo que se chama de amor.

À minha Orientadora Prof.^a Dr.^a **Ana Maria Benko Iseppon**, que me acompanha desde meu primeiro contato com a pesquisa científica e merece todo o meu agradecimento, por me fortalecer durante todos esses anos. Serei eternamente grato pela compreensão, dedicação e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

As Professoras **Lidiane Amorim** e **Valesca Pandolfi**, por acreditarem no meu potencial e no ano de 2014, por terem proporcionado meu ingresso no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) da UFPE.

A todos que fazem parte do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - estudantes, mestrandos, doutorandos e professores. Por se tratar de uma equipe grande, é difícil citar nomes sem esquecer alguém que de alguma forma teve um papel importante nesta caminhada. Assim, o melhor é pular esta etapa de citação e guardar todos no coração, fazendo parte da minha memória e respeito. Atenção especial para os amigos queridos que fiz durante essa jornada: **Artemisa Borges**, **Ayug Lemos**, **Bruna Piereck**, **Bruna Rafaelle**, **Carolline Pires**, **Carlos André**, **Emanuelle Vasconcelos**, **Jéssica Barbara**, **João Pacífico**, **Lívia Vilela**, **Lívia do Vale**, **Marx Lima**, **Rodrigo César**, **Silvany Araujo**, **Paulo Vitor**, e **Geyse Santos**, por estarem sempre por perto quando precisei de ajuda.

Ao colega **Thialisson Caaci**, pela paciência, ajuda e conhecimentos compartilhados nos últimos anos.

Aos grandes amigos que fiz na graduação: **Amanda Maria**, **Daniele Oliveira** e **Eric Rocha**, pelo acolhimento durante meu período de adaptação após transferência de Universidade e pelos incríveis momentos de descontração e

felicidades nos finais de tarde na UFRPE, serei grato eternamente pelo carinho recebido.

Aos queridos amigos, **Elenilson Souza**, **Joelson Crispim** e **Ruana Carolina**, pelo companheirismo, apoio, conselhos e auxílios, me incentivando e não deixando o desânimo me tomar por completo. Pelas saídas memoráveis e pela certeza de que o que foi construído aqui, perdurará.

Às amigas **Vanessa Souza** e **Jaysa Araújo**, por estarem sempre presente nos momentos felizes e difíceis. A nossa aproximação ocorreu no meio desta caminhada, trazendo momentos de muito aprendizado e carinho.

A minha amiga **Any Caroliny**, por se preocupar, me apoiar e torcer por mim e que me acompanha desde a época do colégio.

Meu carinho, admiração e agradecimento a **Flávia Czekalski** e **Mitalle Matos**, que são as responsáveis direta pelo meu crescimento profissional e pessoal, que sempre acompanharam de perto todo o meu trabalho. Depois de tantos anos de convivência é natural saber que tivemos momentos de turbulência, porém o mais importante é sentir que elas sempre torceram por mim.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (**FACEPE**) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica durante os quatros anos da graduação.

A todos do Departamento de Genética, em especial à **Dona Zizi** e a **Romildo**, pessoas que batalham e dedicam-se muito pelo bem do próximo.

A todos, muito obrigado.

Dedicatória

A minha querida mãe, **Luzimar Correia Dias**,
pelo incentivo, força e admiração.

SUMÁRIO

1.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1.1. Família Fabaceae.....	16
1.2. A cultura do feijão-caupi.....	17
1.2.1. Importância socioeconômica do feijão-caupi	18
1.2.2. Estresses bióticos que acometem a cultura	19
1.2.3. Estresses abióticos que acometem a cultura	21
1.3. Programas de melhoramento genético do feijão-caupi.....	22
1.4. Desenvolvimento de marcadores moleculares.....	24
1.4.1. Tipos de marcadores moleculares	24
1.4.2. Marcadores microssatélites: importância e aplicação.....	25
1.5. Ferramentas de bioinformática no desenvolvimento de marcadores	28
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
3. INTRODUÇÃO.....	39
4. MATERIAIS E METODOS	40
4.1 Bioensaio dos estresses e obtenção dos transcriptomas.....	40
4.2 Análise e seleção dos microssatélites para o desenho dos <i>primers</i>	42
4.3 Obtenção de material vegetal e extração de DNA.....	42
4.4 Validação por PCR convencional	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Mineração dos Microssatélites	44
5.2 Seleção <i>in silico</i> dos microssatélites polimórficos.....	47
5.3 Validação dos microssatélites polimórficos.....	50
5.4 Transferibilidade dos microssatélites	51
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Relação dos iniciadores baseados nas sequências do transcriptoma do feijão-caupi. F: *Forward*; R: *Reverse*; GC: guanina/citosina.....45

Tabela suplementar 01: Relação dos transcritos que apresentam sequências de microsatelites formados por motivos do tipo dinucleotídio.....54

Tabela suplementar 02: Relação dos transcritos que apresentam sequências de microsatelites polimorficos , usados para o desenho dos *primers*.....65

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ilustração botânica de exsicata de feijão-caupi.....	15
Figura 02: Morfologia do feijão-caupi inoculado com CABMV.....	18
Figura 03: Acessos do feijão-caupi com 15 dias de idade. BR 14-Mulato (A) , IT 85F-2687 (B) , Pingo de Ouro (C) , Santo Inácio (D) , <i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> (E) e Feijão Mungo (F)	40
Figura 04: Integridade das amostras de DNA dos acessos BR 14-Mulato (01) , IT 85F-2687 (02) , Pingo de Ouro (03) , Santo Inácio (04) , <i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> (05) e Feijão Mungo (06)	41
Figura 05: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% dos marcadores microssatélites. M: marcador <i>ladder</i> de 100pb. Acessos: BR 14-Mulato (1) , IT 85F2687 (2) , Santo Inácio (3) e Pingo de Ouro (4)	47
Figura 06: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, dos marcadores desenvolvidos a partir do transcriptoma do feijão-caupi aplicados em <i>V. radiata</i> . M: Marcador ladder de 100pb.....	48
Figura 07: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, dos marcadores desenvolvidos a partir do transcriptoma do feijão-caupi aplicados em <i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> . M: Marcador molecular de 100pb.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de Busca por Alinhamento Local)
CABMV	<i>Cowpea Aphid-born Mosaic Virus</i> (Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos)
CGMV	<i>Golden Mosaic Virus of Cowpea</i> (Vírus do Mosaico Dourado do Feijão-caupi)
CMV	<i>Cucumis mosaic virus</i> (Vírus do Mosaico do Pepino)
CpGC	<i>Cowpea Genome Consortium</i> (Consórcio do Genoma do Caupi)
CPSMV	<i>Cowpea Severe Mosaic Virus</i> (Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiqueta de Sequência Expressa)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (Inter Sequências Simples)

Repetidas)

LGBV

Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal

MISA

MicroSATellite identification tool (Ferramenta de Identificação de Microssatélites)

pb

Pares de base

PCR

Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

QTL

Quantitative Trait Loci (Locos de Características Quantitativas)

RAPD

Random Amplified Polymorphic (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico)

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição)

RNA

Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RNA-Seq

RNA Sequencing (Sequenciamento de RNA)

SNP

Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples)

SSR

Single Sequence Repeats (Repetições de Sequência Simples)

STRs

Short Tandem Repeats (Repetições Curtas em *Tandem*)

SuperSAGE

Serial Analysis of Gene Expression (Análise Serial da Expressão Gênica)

Taq

Thermus aquaticus

TBE

Tris-base, EDTA

TE	Tris-EDTA
Te_DR	Transcriptoma do experimento de desidratação radicular
TeIV_CABMV	Transcriptoma do experimento de infecção viral pelo CABMV
TeIV_CPSMV	Transcriptoma do experimento de infecção viral pelo CPSMV

RESUMO

O melhoramento genético de plantas tem potencializado ganhos contínuos na produtividade de diversas culturas. Neste contexto, marcadores moleculares se destacam como uma ferramenta promissora, que possibilita o acesso direto ao genótipo do indivíduo, diferenciando-se, assim, dos marcadores morfológicos. Os microsatélites (SSR), são marcadores codominantes e figuram entre os mais utilizados para esta finalidade. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e validar marcadores SSR para uso em programas de melhoramento genético do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Para isso, foram analisados três transcriptomas da espécie, oriundos de experimentos por infecção pelo CPSMV (Cowpea Severe Mosaic Virus), CABMV (Cowpea Aphid-born Mosaic Virus) e desidratação radicular. Um *pipeline* computacional foi usado para identificação e anotação dos SSRs. A seleção dos candidatos para o desenvolvimento dos marcadores foi realizada considerando o polimorfismo de tamanho entre os motivos, seguindo para o desenho dos *primers* utilizando a ferramenta SnapGene. Foram identificadas 45.776 sequências contendo SSRs, dentre os quais prevaleceram os motivos di- e trinucleotídeos, representando conjuntamente um total de 60% das sequências identificadas. Destas, 3.493 sequências estiveram presentes nos três transcriptomas analisados, onde 160 foram selecionadas com base na diferença de tamanho mais significativa (12-42) entre os motivos, seguindo para o desenho de 30 marcadores SSRs. Na etapa de PCR convencional, foi observado que 73% dos marcadores confirmaram polimorfismo entre os acessos BR 14-Mulato e IT85F-2687, enquanto que 57% foram polimórficos entre Pingo de Ouro e Santo Inácio. Um total de 23 marcadores foram transferíveis para a *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e 16 para *V. radiata* (L.). Por fim, a análise permitiu a identificação dos SSRs nos transcriptomas do feijão-caupi, submetido a estresses bióticos e abióticos, revelando polimorfismos entre diferentes acessos. Os dados identificados, analisados e validados irão contribuir com estudos de diversidade genética e pré-melhoramento, visando ampliar a base genética disponível do feijão-caupi.

Palavras-chave: Bioinformática; Estresse; Genética; Molecular; Vírus.

ABSTRACT

Genetic improvement of plants has potentiated continuous gains in the productivity of several crops. In this context, molecular markers stand out as a promising tool, which allows direct access to the genotype of the individual, thus differentiating it self from the morphological markers. Microsatellites (SSR) are codominant markers and are among the most used for this purpose. Thus, the present work aimed to develop and validate SSR markers for use in genetic improvement programs of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. For this, three transcripts of the species, from experiments by CPSPV (Cowpea Severe Mosaic Virus), CABMV (Cowpea Aphid-born Mosaic Virus) and root dehydration were analyzed. A computational pipeline was used to identify and annotate SSRs. The selection of the candidates for the development of the markers was performed considering the polymorphism of size between the motifs, followed for the design of the primers using the SnapGene tool. 45,776 sequences containing SSRs were identified, among which the di- and trinucleotide motifs prevailed, together representing a total of 60% of the sequences identified. Of these, 3,493 sequences were present in the three transcripts analyzed, where 160 were selected based on the most significant difference in size (12-42) among the motifs, followed by the design of 30 SSRs. In the conventional PCR step, it was observed that 73% of the markers confirmed polymorphism between the BR 14-Mulato and IT85F-2687 accessions, while 57% were polymorphic between Pingo de Ouro and Santo Inácio. A total of 23 markers were transferable to *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* and 16 for *V. radiata* (L.). Finally, the analysis allowed the identification of SSRs in the transcriptomes of cowpea, submitted to biotic and abiotic stresses, revealing polymorphisms between different accessions. The data identified, analyzed and validated will contribute to studies of genetic diversity and pre-breeding, aiming to broaden the available genetic base of cowpea.

Keywords: Bioinformatics; Stress; Genetics; Molecular; Virus.

1.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Família Fabaceae

A família Fabaceae, também conhecida popularmente como leguminosa, destaca-se entre os grupos vegetais por figurar como a terceira maior família entre as fanerógamas, em números de representantes, ficando atrás apenas das Orchidaceae e Asteraceae (COWPEA GENOMICS, 2008). Na atualidade são reconhecidos 727 gêneros, além de um total de 19.325 espécies (LPWG, 2017). Sendo um dos grupos mais diversificados da flora mundial, com distribuição cosmopolita e espécies nativas em todos os continentes, à exceção da Antártida (LEWIS et al., 2005). As espécies pertencentes a família Fabaceae são distribuídas em seis subfamílias: Faboideae, Duparquetioideae, Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae e Dialioideae (LPWG, 2017). Essa classificação é atribuída a diferenças morfológicas entre as espécies da família (JUDD et al., 2008).

No Brasil, a família apresenta-se como o grupo vegetal mais rico em diversidade de espécies. São registrados cerca de 211 gêneros e aproximadamente 2.700 espécies de leguminosas, distribuídas em todos os domínios fitogeográficos do país (LPWG, 2017). Estima-se que o Cerrado seja o bioma que abriga a maior diversidade de espécies já descritas (28,68%), seguido pela Amazônia (27,57%), Mata Atlântica (23,25%), Caatinga (15,28%), Pampa (2,69%) e Pantanal (2,54%) (LIMA et al., 2012). Os representantes desta família botânica possuem diversos hábitos de crescimento, sendo árvores de pequeno, médio e grande porte, ervas anuais ou perenes, arbustos e lianas, entre outros (SOUZA; LORENZI, 2005; SOUZA; SOUZA, 2011). A maioria das espécies desse grupo são bem adaptadas à primeira colonização e exploração de ambientes abertos e perturbados, devido suas associações com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*, que possuem o mecanismo de converter nitrogênio atmosférico em amônia, sendo tais leguminosas extremamente valiosas como fornecedoras de adubos naturais (ESPINDOLA et al., 2005).

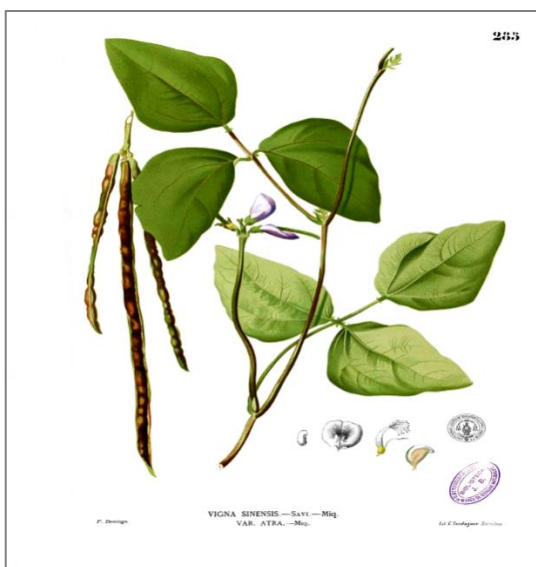
O cultivo das leguminosas proporciona grandes benefícios ao sistema de produção, pois contribui com a diversificação das pastagens e possibilita o cultivo,

mesmo em solos mais pobres (GAMA, 2013). Entre as espécies mais utilizadas com a finalidade de adubação verde, deve-se mencionar as da família Fabaceae. Uma das importâncias no emprego das leguminosas está relacionado ao fato de que, eventualmente, os grãos e a parte aérea servem, respectivamente, para a alimentação humana e animal (BEVILAQUA et al., 2016).

1.2. A cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], também conhecido como feijão verde, feijão de corda ou feijão macassar, é um vegetal da ordem Fabales, subfamília Faboidea, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna*, seção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* e subespécie *unguiculata* (VERDCOURT, 1970; MARÉCHAL, MACHERPA, STAINER, 1978) (Figura 01).

Figura 01: Ilustração botânica de exsicata de feijão-caupi (DULTRA et al., 2007).



A espécie *V. unguiculata* foi dividida em quatro cultigrupos, sendo eles, *unguiculata*, *sesquipedalis*, *biflora* e *textilis* (PADULOSI e NG, 1997). Dentro do cultigrupo *unguiculata*, o Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) detém a maior coleção mundial e possui mais de 15 mil acessos de feijão-caupi coletados em mais de 80 países, dentro dos quais 12 mil já foram caracterizados (MAHALAKSHMI, LAWSON e ORTIZ, 2007). No Brasil, apenas os cultigrupos *unguiculata* e *sesquipedalis* são cultivados, porém, damos destaques para o

unguiculata, que representa quase a totalidade das cultivares tradicionais e melhoradas no nosso país (FREIRE FILHO et al., 2011).

Quanto à origem e domesticação do feijão-caupi, estes dois pontos ainda são grandes fontes de divergência entre os pesquisadores. Ng e Maréchal (1985), descreveram a África Ocidental sendo o ponto de origem da espécie em questão, precisamente das regiões semiáridas da Nigéria, Sul do Níger, Burkina Faso, Norte do Benim, Togo e Norte de Camarões. Essa mesma afirmação também foi defendida por Padulosi e Ng (1997), através de estudos arqueológicos e tendo como base a datação realizada com o carbono-14 no feijão-caupi. Acredita-se que o exato local de origem e domesticação da espécie ainda não tenha sido totalmente elucidado, em razão do seu limitado *pool* gênico, apesar de exibir uma ampla gama de fenótipos entre as cultivares (EHLERS; HALL, 1997).

No Brasil, há fortes evidências que a introdução do feijão-caupi foi realizada pelos colonizadores portugueses, muito provavelmente no estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). A partir de então, foi estabelecido o processo de cultivo e melhoramento daqueles genótipos mais adaptados e mais aceitos nas diferentes regiões brasileiras, sempre acompanhando a colonização (NEVES et al., 2011).

1.2.1. Importância socioeconômica do feijão-caupi

A literatura mostra que o teor de proteína desta leguminosa varia de 22% a 25%, a depender da cultivar (SANTOS et al., 2012). A grande maioria dessas proteínas é representada por globulinas (65% a 80%) e albuminas (4% a 12%), do total encontrado na semente (NUGDALLAH; TINAY, 1997). A espécie apresenta quase todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), minerais e vitaminas, além da sua grande quantidade de fibras e baixos teores de gordura, desempenhando assim um papel importante na nutrição humana (ANDRADE JÚNIOR et al., 2002). Além disso, este vegetal possui altos teores de ácido fólico e vitamina B, que são necessários durante a gestação das mulheres para prevenir defeitos na calota craniana, bem como na coluna vertebral do feto (OGUNMODEDE e OYENUGA, 1970).

A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* ou Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) estima que

aproximadamente cinco milhões de toneladas de feijão-caupi são produzidas anualmente, em 10 milhões de hectares em todo mundo (FAO, 2019). Desta produção, 70% encontra-se em zonas secas da África Ocidental e Central. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi, respondendo por aproximadamente 586,2 mil toneladas (CONAB, 2016), atrás da Nigéria, com 2,1 milhões de toneladas, e Níger, com 1,6 milhões de toneladas (FAO, 2019).

No Brasil, o feijão-caupi é cultivado principalmente nas regiões semiáridas do Norte (4,4 mil hectares) e Nordeste (425,5 mil hectares) e atualmente está em expansão para a região Centro-Oeste, afim de atender três segmentos de grande relevância do mercado, que são: grãos secos, feijão verde (vagem e grãos) e sementes. A região Nordeste, responsável por abrigar a maior área de cultivo do feijão-caupi, tem uma participação pouco expressiva na produção da espécie, quando comparado com a região Centro-Oeste, o que certamente está atrelado à baixa produtividade na região - cerca de 374 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016). As condições edafoclimática nas regiões Norte e Nordeste, na maioria das vezes não são satisfatórias para o cultivo desta espécie, entretanto, constitui uma das principais fontes de renda na agricultura familiar (TEÓFILO et al., 2008). Dessa forma, o cultivo do feijão-caupi tem se expandindo dos ecossistemas de Caatinga para as áreas de Cerrado das regiões Centro-Oeste e Centro-Sul, como nova opção de cultura de entressafra a ser explorada em uma grande diversidade de sistemas de produção e níveis tecnológicos (FREIRE FILHO et al., 2011). Nessas regiões, são registradas médias de produtividade de até 1.430 kg.h⁻¹. Esse elevado nível, é reflexo da introdução de genótipos já melhorados geneticamente, além da mão de obra mecanizada (CONAB, 2016).

1.2.2. Estresses bióticos que acometem a cultura

Dentre os principais vírus que infectam o feijão-caupi no Brasil, destacam-se o CABMV (*Cowpea Aphanizomenon Borne Mosaic Virus* ou Vírus do Mosaico do Feijão-caupi transmitido por afídeos) e o CPSMV (*Cowpea Severe Mosaic Virus* ou Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi) (BASTOS, 2016). O CABMV pertence à família Potyviridae e ao gênero *Potyvirus*, que reúne mais de 100 espécies virais capazes de infectar inúmeros vegetais (LIMA et al., 2005).

Quando infectadas com o CABMV, as plantas passam a desenvolver pequenas lesões necróticas (Figura 02), que podem surgir nos ramos afetados, ocasionando a morte das folhas. Já os frutos afetados não se desenvolvem adequadamente, ou seja, ficam pequenos, deformados e muitas vezes apresentam o endurecimento do pericarpo, provocado pela lignificação das paredes internas. Além disso, devido a redução do espaço interno do fruto, ocorre a redução da quantidade de polpa (VIANA, 2007).

Figura 02: Morfologia do feijão-caupi inoculada com CABMV (BORBOZA, 2012).



A sua transmissão ocorre rapidamente (em torno de segundos) e os vetores são, em sua maioria, pulgões (*Aphis craccivora* e *Myzus persicae*) e afídeos, que transmitem através de “picadas de prova” - transmissão não persistente – ou em alguns casos por meio das sementes (PIRONE, 1991; GRAY, 1996; BASTOS, 2016).

O CPSMV pertence à família Comoviridae, gênero *Comovirus* e apresenta uma forma isométrica, de aproximadamente 28 nm de diâmetro, comum genoma bipartido, apresentando um total de 9,73 kb. Seu surgimento no Brasil é datado em meados da década de 40 (PIO-RIBEIRO et al., 2005) e, atualmente, encontra-se em praticamente todas as regiões produtoras do país. O vírus do CPSMV abrange também os Estados Unidos, Trinidad e Tobago, Porto Rico, El Salvador, Venezuela, Costa Rica, Suriname e Peru (PIO-RIBEIRO et al., 2005).

Ao serem infectadas com o CPSMV, as plantas apresentam intenso nanismo, ainda no início do ciclo, ocasionando perdas significativas na produção, que podem chegar à aproximadamente 80% de toda colheita, variando de acordo com a idade em que a planta foi infectada (BASTOS, 2016).

Para enfrentar tais desafios, o melhoramento genético conta com novas descobertas e tecnologias, que maximizam o uso eficiente dos recursos naturais, bem como o lançamento de cultivares tolerantes ao estresse biótico (ABDELRAHMAN et al., 2018). A busca por novas cultivares, que reúnam o maior número de características de interesse agrônomo e sejam mais tolerantes às situações de estresse, são fundamentais para evitar perdas na produção. A obtenção de variedades com ciclo de maturação mais precoce, porte ereto da planta, grãos mais adequados às exigências do mercado (cor, textura e tempo de cozimento, etc.), resistência a doenças (CPSMV e CABMV, por exemplo), maior produtividade, adaptabilidade e a estabilidade da produção, estão entre os principais caracteres de interesse no melhoramento genético do feijão-caupi (FREIRE-FILHO, 2011; ROCHA et al., 2013).

Uma maior compreensão das respostas moleculares das plantas, sob condições de estresse, é essencial para a melhoria das espécies e lançamento de novas cultivares cada vez mais adaptadas (NONGPIURET al., 2016; JOSHIET al., 2018).

1.2.3. Estresses abióticos que acometem a cultura

O estresse abiótico é definido como condições ambientais que reduzem o crescimento e a produção de culturas abaixo dos níveis ótimos (CRAMER et al., 2011). Quando tais estresses abióticos ocorrem, várias respostas bioquímicas e fisiológicas são induzidas nas plantas, de forma a propiciar a tolerância ou aumentar as chances de sobrevivência às condições adversas (BENKO-ISEPPON et al., 2011). Alterações climáticas afetam diretamente no desenvolvimento e sobrevivência dos vegetais, neste sentido estudos que envolvem condições de estresse são utilizados para testar o potencial de resposta das plantas em relação a esses fatores estressantes, como variação termal, falta de água e seu excesso. No ambiente, onde muitas vezes a seca apresenta-se durante o período de crescimento

da planta, os indivíduos adaptados conseguem sobreviver e completar seu ciclo de crescimento (WALTER et al., 2013).

Como organismos sésseis, as plantas estão mais vulneráveis a uma série de estresses abióticos, tais como: variações de temperatura, intensidade da luz, inundações, seca, salinidade e presença de metais pesados no solo (RODRIGUES, 2018). Dentre os fatores ambientais, a água é o recurso fundamental para crescimento e desenvolvimento vegetal. A diminuição da disponibilidade de água no solo leva ao déficit hídrico. Segundo Ferreira (2017), este déficit pode causar desbalanço nutricional, redução do potencial hídrico, da absorção de água do solo e da fotossíntese. Este elemento compõe a maior proporção do volume celular nas plantas, além de representar um fator fundamental na produção vegetal (BITTENCOURT; SILVA, 2018). Segundo Bittencourt e Silva (2018), uma diminuição da disponibilidade hídrica tem um efeito deletério no crescimento da planta, influenciando seu ciclo de vida e, por consequência, com efeitos evidentes em todos os estágios fenológicos de crescimento.

Algumas plantas desenvolveram mecanismos capazes de diminuir os efeitos da falta de água no solo, tais como: aumento do sistema radicular, redução da área foliar, ajuste osmótico e fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2009). A tolerância à seca é uma resultante de várias características que se expressam, dependendo da severidade e da taxa de imposição do déficit hídrico, da idade e das condições nutricionais da planta, do tipo e da profundidade do solo, da carga pendente de frutos, da demanda evaporativa e da face de exposição do terreno (MATOS et al., 2014).

Quando exposta a baixa disponibilidade de água, um dos primeiros eventos que ocorre na planta é o fechamento estomático, o que provoca uma redução na disponibilidade de dióxido de carbono (CO_2) para as folhas, inibindo a fixação de carbono, com consequente redução das taxas fotossintéticas (LISAR et al., 2012; OSAKABE et al., 2014).

1.3. Programas de melhoramento genético do feijão-caupi

Os programas de melhoramento genético do feijão-caupi têm avançado para beneficiar a sustentabilidade da sua produção, uma vez que os benefícios da

relação simbiótica entre as leguminosas e bactérias se estendem para outros vegetais, promovendo o crescimento e aumentando a produtividade de outras plantas em consórcio ou em cultivos seguintes (YANNI e ABD EL-FATTAH, 1999). Devido a isso, a habilidade de fixar N_2 tem recebido merecida importância, especialmente pelo baixo custo, redução dos danos ambientais e uma crescente demanda da qualidade nutricional do feijão-caupi (DAKORA et al., 2015).

O programa de melhoramento da Embrapa Meio-Norte atualmente é conduzido em rede, envolvendo 15 unidades da Embrapa, 16 universidades, quatro empresas estaduais de pesquisa, um centro tecnológico de ensino, empresas de sementes e agricultores. Ele está estruturado em quatro planos de ação: gestão da rede de melhoramento, pré-melhoramento, melhoramento, pós-melhoramento e validação e transferência de cultivares (ROCHA, et al 2013).

Durante 30 anos, o programa de melhoramento genético do feijão-caupi da Embrapa lançou, em parceria com outras instituições de pesquisa, 71 cultivares de vários tipos comerciais (branco liso, branco rugoso, fradinho, marrom tipo sempre verde, marrom tipo mulato, marrom tipo canapu, manteiga e verde) (FREIRE FILHO et al., 2011). Os maiores ganhos obtidos pelo melhoramento genético foram para: ciclo de maturação mais precoce; resistência ao CPSMV, CABMV, CMV (*Cucumis mosaic virus* ou Vírus do Mosaico do Pepino) e CGMV (*Golden Mosaic Virus of Cowpea* ou Vírus do Mosaico Dourado do Feijão-caupi); arquitetura de planta mais moderna (porte semiereto a ereto); grãos mais adequados às exigências do mercado atual; produtividades de grãos secos acima de 1.000 kg.ha^{-1} , em condições de sequeiro, e 1.500 kg.ha^{-1} em condições irrigadas, com ampla adaptabilidade e alta estabilidade a diversos ambientes de cultivo e; obtenção de genótipos mais adequados ao mercado de vagens e grãos imaturos (ROCHA, et al 2013).

Segundo Singh et al. (2002) e Freire Filho et al. (2011), o feijão-caupi por sua plasticidade, adaptação à uma ampla faixa de ambientes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, alto valor nutritivo, por ser um alimento básico em mais de 65 países, e ainda diante das mudanças climáticas e da necessidade de alimento em todo o mundo, é uma cultura de grande potencial atual e estratégico, com excelente perspectiva no mercado internacional.

1.4. Desenvolvimento de marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são utilizados com o objetivo de detectar variações no genoma, auxiliando assim na análise genética e, conseqüentemente, permitindo a seleção de caracteres desejáveis em programas de melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). Um marcador molecular pode ser denominado de marcador genético, uma vez que seu comportamento esteja de acordo com as leis básicas da herança mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A detecção e o rastreamento das variações alélicas dentro de um genoma podem ser realizados por diferentes tipos de marcadores genéticos (LATEEF, 2015). A aplicação desses marcadores tem sido impulsionada principalmente pelo método de produção, custo de detecção, bem como pelo seu bom nível de reprodutibilidade (LUCAS et al., 2011). De acordo com o método de detecção e rendimento, os marcadores moleculares podem ser divididos em três grupos principais: (I) marcadores baseados na hibridação, de baixo rendimento, tais como Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLPs – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*); (II) marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou *Reação da Polimerase em Cadeia*), de médio rendimento, que englobam a Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD – *Random Amplified Polymorphic*), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*), Repetições de Sequência Simples (SSR - *Single Sequence Repeats*), e; (III) baseado em sequência de marcadores: Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNP-*Single Nucleotide Polymorphisms*) (BERNARDO, 2008). Podemos afirmar que essas técnicas moleculares facilitaram as análises das estruturas do genoma das plantas e sua evolução, incluindo as relações entre as leguminosas, como o feijão-caupi (CHOI et al., 2004; YAN et al., 2004; GEPTS et al., 2005).

1.4.1. Tipos de marcadores moleculares

Os marcadores RFLPs foram os mais utilizados na genética molecular vegetal, devido a sua alta reprodutibilidade e codominância (TANKSLEY et al., 1989). Porém, devido à detecção desse tipo de marcador molecular ser um processo demorado, trabalhoso, caro e principalmente por não serem passíveis de

automação, esses marcadores se tornaram obsoletos. Com a descoberta da tecnologia da PCR, a nova geração de marcadores RAPD, AFLP e SSR passou a ser mais empregada no estudo de vários vegetais (BUSO et al., 2003).

Os marcadores RAPDs possuem a capacidade de detectar simultaneamente locos polimórficos em várias regiões de um mesmo genoma (DHANASEKAR; DHUMAL e REDDY, 2009). No entanto, eles são aleatórios, o que torna o nível de sua reprodutibilidade muito baixo, devido à ligação não específica de *primers*. Embora os marcadores AFLPs também sejam aleatórios, esses apresentam um nível de reprodutibilidade e sensibilidade muito alto, tornando-se populares na pesquisa com genética molecular em culturas com pouca ou nenhuma referência, principalmente em que a sequência do genoma não está disponível (RIDOUT e DONINI, 1999; ZHANG et al., 2011). Porém, os marcadores AFLPs não apresentam aplicação generalizada, devido ao método empregado de detecção ser longo e laborioso, e também por não ser passível de automação, com exceção dos AFLPs fluorescentes semiautomáticos (CHERIYEDATH et al., 2018).

Os marcadores SSR, também conhecidos como microssatélites, eliminaram alguns dos inconvenientes das tecnologias dos marcadores de DNA acima mencionados. Eles são altamente reprodutíveis, apresentam bons níveis de polimorfismo, além de serem acessíveis à automação. Apesar do custo de detecção permanecer alto, os marcadores SSR ainda são utilizados em todas as áreas de genética molecular, principalmente em vegetais (LIU e CORDES, 2004).

Inicialmente encontrado no genoma humano, o SNP provou ser universal, bem como as formas mais abundantes das variações genéticas entre indivíduos da mesma espécie (GHOSH et al., 2002). Os SNPs são marcadores menos polimórficos do que os marcadores SSR, devido à sua natureza bialélica (AA, Aa, aa), eles compensam facilmente esse problema por sua alta frequência, facilidade de automação e estabilidade do loco SNP comparado com o loco SSR (GUPTA e PRASAD, 2001).

1.4.2. Marcadores microssatélites: importância e aplicação

Os microssatélites são conhecidos como SSR ou Repetições Curtas em Tandem (STRs - *Short Tandem Repeats*). Esses marcadores representam uma

classe de sequências repetitivas amplamente distribuídos em todos os genomas. Os microssatélites são constituídos de sequências curtas, de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em linha (*tandem*) que são, respectivamente, designados como repetições de mono, di, tri, treta, penta ou hexanucleotídeo (GROVER; SHARMA, 2014). Os SSRs possuem distribuição ao longo de todo o genoma, principalmente na eucromatina de organismos eucariotos e no DNA organelar, tanto na região codificantes como nas regiões não codificantes (PHUMICHAJ et al., 2015).

No geral, pode-se afirmar que a ocorrência de sequências microssatélites seja menor nas regiões codificadoras, por possuírem uma taxa de mutação muito elevada, a qual pode comprometer a expressão gênica (CAIXETA et al., 2009). Pesquisas indicam que em regiões codificantes podem ser observada uma predominância de microssatélites com motivos do tipo tri e hexanucleotídico, os quais são resultados da pressão de seleção que alteram o quadro de leitura (ZHANG et al., 2004; XU et al., 2013). A distribuição preferencial dos microssatélites nas regiões não codificadoras protege-os da ação da seleção natural, tornando-os seletivamente neutros e bastante úteis para estudos de genética de populações (EISEN, 1999).

Os polimorfismos – para os marcadores genéticos refere-se a mais de uma forma que um alelo pode apresentar – observados a partir dos microssatélites, são decorrentes de um mecanismo de mutação causado pelo deslizamento da DNA polimerase, chamado de *slippage*, durante a replicação do DNA ou até mesmo por erros de recombinação (*crossing-over*). Este processo, causado pelo pareamento errôneo destas sequências durante os eventos de quiasma, resulta na geração de novos alelos com números diferentes de unidades repetitivas, seja tanto pelo aumento como pela diminuição de tais unidades. Os microssatélites apresentam alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração (EISEN, 1991). Quanto maior a repetição, maior será a frequência de mutação e, por consequência, repetições mais curtas terá uma menor frequência de mutação (WEBER; MAY, 1989; VIEIRA et al., 2016).

Os marcadores do tipo microssatélites podem ser classificados de acordo com o motivo presente, como: (I) perfeito, se for composto apenas de repetições de um único motivo; (II) imperfeito, se conter um par de bases não pertencente ao

motivo entre repetições; (III) interrompido, se uma sequência de alguns pares de bases é inserida no motivo, ou; (IV) composto, se formado por múltiplos motivos adjacentes repetitivos (OLIVEIRA et al., 2006; MASON, 2015).

Os microssatélites são considerados os marcadores moleculares ideais para estudos em plantas, por possuírem diversas características desejáveis, tais como: abundância em genomas vegetais, fáceis de serem utilizados, universais, codominantes, *loci* multialélicos, resultados confiáveis e reprodutíveis, entre outros. Os padrões de polimorfismo exibidos pelos marcadores microssatélites são considerados maiores do que em qualquer outro sistema de marcador já desenvolvido (GROVER; SHARMA, 2014).

O desenvolvimento dos marcadores do tipo microssatélites proporcionou uma elevada demanda do uso consistente de marcadores moleculares, pelo fato de apresentarem elevado conteúdo informativo por *loco* gênico dentro de todas as outras classes de marcadores (FOSTER et al., 2010). Os microssatélites podem ser avaliados rapidamente em um grande número de indivíduos para um grande número de *loci* em pouco tempo (WU; TANKSLEY, 1993; NAZARENO et al., 2011). Os marcadores microssatélites são facilmente reprodutíveis através da técnica de PCR, uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre centros de pesquisas (NAZARENO et al., 2009).

Eles são ideais para estudos de genética de populações, constituindo, assim, uma ferramenta indispensável na análise populacional, de paternidade, construção de mapas genéticos, fluxo gênico, estudos ecológicos e biologia da conservação (BRESSAN et al., 2012). Em particular, os marcadores microssatélites são úteis para estudos em espécies selvagens, visando identificar a diversidade genética, estimar o fluxo de genes e taxas de cruzamento, e também em estudos evolutivos (KALIA et al., 2011). Por outro lado, não se pode esquecer que para plantas cultivadas, os microssatélites são usados para mapeamento de *loci* envolvidos em Traços Quantitativos (QTL – *Quantitative Trait Loci* ou *locus* de características quantitativas), estimativa do grau de parentesco entre genótipos e na MAS (*Marker Assisted Selection* ou Seleção Assistida por Marcadores) (JONAH et al., 2011).

Nas últimas décadas, a utilidade prática dos microssatélites foi revisada por vários autores (JARNE; LAGODA, 1996; SCHLÖTTERER, 1998; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006; GUICHOUX et al., 2011; GEMAYEL ET AL., 2012; SENAN et al 2014; MASON, 2015). De acordo com uma pesquisa feita por Vieira e colaboradores (2016), este tipo de marcador molecular continua a ser utilizado com alta relevância, na análise genética de plantas. Por outro lado, os marcadores SNPs chegam muito perto dos microssatélites em trabalhos desta natureza. Entretanto, seu destaque, quando comparado com os marcadores existentes, os microssatélites ainda deverão ser aplicáveis em futuros estudos genéticos de plantas.

1.5. Ferramentas de bioinformática no desenvolvimento de marcadores

A bioinformática refere-se a um campo totalmente interdisciplinar da ciência que trata do desenvolvimento e aplicação de novas abordagens e ferramentas computacionais, objetivando facilitar a análise e principalmente a interpretação e processamento dos diversos dados biológicos gerados por diferentes grupos de pesquisas (LESK, 2008). Esta campo pode ser dividido em suas grandes vertentes, sendo a primeira: Bioinformática clássica – a qual aborda diversas questões relacionadas a sequências de nucleotídeos e aminoácidos; e a segunda: Bioinformática estrutural – que abrange questões biológicas do ponto de vista tridimensional, utilizando técnicas apoiadas pela química computacional ou até mesmo pela modelagem molecular (VERLI et al., 2014).

A combinação de várias áreas do conhecimento associada a ferramentas computacionais tem possibilitado avanços significativos em estudos relacionados à construção de programas analíticos e sistemas direcionados para o entendimento e exploração das informações genéticas, bem como para a manipulação e armazenamento de dados genéticos. Neste campo, também pode-se citar a construção de marcadores moleculares, os quais estão sendo empregados nos programas de melhoramento genético, estudos de diversidade e outros campos da pesquisa genética em vegetais (CATTLEY e ARTHUR, 2007; ARAÚJO et al., 2008; LESK, 2008).

O emprego de estratégias computacionais no estudo de características genéticas se deu principalmente com o desenvolvimento dos projetos de

sequenciamento de genomas e transcriptomas de diferentes organismos, que geraram um volume robusto de sequências, cujas relações evolutivas e funcionais precisariam ser elucidadas (ARAÚJO et al., 2008; VERLI et al., 2014). Com isso, o uso da bioinformática se tornou fundamental para ordenar os resultados gerados por essas iniciativas, além de abrir novas fronteiras para a aplicação de suas inúmeras ferramentas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, M. et al. Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. **Plant, cell & environment**, v. 41, n. 9, p. 1972-1983, 2018.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S. de et al. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: Embrapa: CPAMN, (Embrapa- CPAMN. Sistemas de Produção 2), 2002.
- ARAÚJO, N. et al. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Estudos de Biologia**, v.30, n. 70, p.143-148, 2008.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- BASTOS, E. A. **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí, 2016, 71 p.
- BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.
- BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1649–1664, 2008.
- BEVILAQUA, G. A. P.; PINHEIRO, R. A.; ANTUNES, I. F. **Leguminosas na alimentação humana e animal**. In: WOLFF, L. F.; MEDEIROS, C. A. B. (ed.)

Alternativas para a Diversificação da Agricultura Familiar de Base Ecológica – 2016. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, p.19-26. 2016

BITTENCOURT, P. P.; SILVA, L. N. N. S. **Estresse hídrico em plantas: aspectos morfofisiológicos, adaptações e mecanismos de resposta.** In: VIII Botânica no Inverno 2018 / Org. Aline Possamai Della [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2018. 275 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares.** 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Brasília, DF: Embrapa Café, 2009.

BRESSAN, E. A.; SCOTTON, D. C.; FERREIRA, R. R. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 6, p. 237–239, 2012.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

BUSO, G. S. C. et al. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, Brasília, p. 13, 2003.

CAIXETA, E. T.; BORÉM, A.; KELLY, J. D. Development of microsatellite markers based on BAC common bean clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 125-133, 2005.

CATTLEY, S.; ARTHUR, J. Bio Manager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training. **Briefings in bioinformatics**, v.8, n.6, p.457-465, 2007.

CHERIYEDATH, S. et al. Técnica do polimorfismo de comprimento de fragmento (RFLP) de restrição. **Medical Life Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1-5, 2018.

CHOI, H. K. et al. **Estimating genome conservation between crop and model legume species.** Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.101, p.15289–15294, 2004.

- CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 4- Safra 2015/16 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-154, jan. 2016.
- Cowpea Genomics (2008), <http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/> (04 de julho de 2019).
- CRAMER, G. R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 148-163.
- DAKORA, F. D. et al. Food Grain Legumes: Their Contribution to Soil Fertility, Food Security, and Human Nutrition/Health in Africa. *In*: BRUIJIN, F. J. editor, **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2, p.1063-1070, 2015.
- DHANASEKAR, P.; DHUMAL, K. N.; REDDY, K. S. Identification of RAPD markers linked to plant type gene in pigeonpea. **Indian Journal of Biotechnology**, v.9, p. 58-63, 2009.
- DUTRA, A. S. et al. Physiological quality of cowpea seeds in four regions of the State of Ceará. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 5, n. 2, p. 125-133, 2007.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Field Crops Research**, n.53, p.187-204, 1997.
- EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. *In*: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 34-48, 1999.
- ESPINDOLA, J. A. A. Et al. **Adubação verde com leguminosas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.49, 2005.
- FAO. FAOSTAT. Crops. Cow peas, dry. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 9 de julho de 2019.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA, p. 220,1998,

- FERREIRA, P. M. **Ecofisiologia e perfil de pequenos RNAs em *Setaria viridis* sob déficit hídrico**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2017.
- FOSTER, J. T. et al. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biotechnology**, v.10, n. 7, 2010.
- FREIRE FILHO, et al. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 80, 2011.
- FREIRE FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi**. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, p. 26-46, 1988.
- FROTA, A. B.; PEREIRA, P. R. Caracterização da produção de feijão-caupi na região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio Norte do Brasil, Teresina: Embrapa Meio-Norte, (Embrapa Meio-Norte**. Circular Técnica, p. 9-25, 2000.
- GAMA, T. C. et al. Recuperação de pasto de capim-braquiária com correção e adubação de solo e estabelecimento de leguminosas. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 14, n. 4, p. 635-647, 2013.
- GEMAYEL, R. et al. Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v. 3, p. 461-480, 2012.
- GEPTS, P. et al. Legumes as a model plant family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1228–1235, 2005.
- GHOSH, S. et al. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 329–333, 2002.
- GRAY, S. M. Plant virus protein involved in natural vector transmission. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 259-264, 1996.

- GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. 2, p. 1-13, 2014.
- GUPTA, P. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphism: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v.80, p.524-535, 2001.
- JONAH, P. M.; BELLO, L. L.; LUCKY, O. Review: The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. **Global Journal of Science Frontier Research**, v. 11, n. 5, 2011.
- JOSHI, R.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Engineering abiotic stress response in plants for biomass production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 7, p. 87-96, 2018.
- JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3. Ed. Porto alegre: Artmed, p. 612, 2008.
- KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309–334, 2011.
- LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67- 82, 2004.
- LATEEF, D. D. DNA Marker Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 3, p. 7-18, 2015.
- LESK, A. **Introdução à Bioinformática**. Tradução da 2ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2008.
- LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. **Royal Botanical Gardens**, 2005, Kew. 592p.
- LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. **Kew: Royal Botanic Gardens**. 1987. 369 p.
- LIMA, H. C. Et al. **Fabaceae** In: FORZZA, R. C. et al. (orgs) Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

- LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. **Diagnoses e Estratégias de Controle de Doenças Ocasionadas por Vírus. Melhoramento Genético.** In: Freire-Filho F. R., Ribeiro V. Q., Lima J. A. A., Silva P. H. S. Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos. P. 405-459, 2005.
- LISAR, S. Y. S. et al. **Water stress in plants: causes, effects and responses Seyed.** In: RAHMAN, I. M. M.; HASEGAWA, H. Water stress. Croatia: Intech, cap. 1, p. 1-14, 2012.
- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p.1-37, 2004.
- LUCAS, M. R. et al. Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. **The Plant Genome**, v. 4, n. 3, p. 218-225, 2011.
- MAHALAKSHMI, V. N. G.; LAWSON, M.; ORTIZ, R. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) core collection defined by geographical, agronomical and botanical descriptors. **Plant Genetic Resource**, v. 5, n.3, p. 113-119, 2007.
- MARÉCHAL, R.; MACHERPA, J. M.; STAINER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, v. 28, p.1- 273, 1978.
- MASON, A. S. **SSR genotyping.** Methods in Molecular Biology, v. 1245, p. 77-89, 2015.
- MATOS, F. S. et al. Estratégia morfofisiológica de tolerância ao déficit hídrico de mudas de pinhão manso. **Magistra**, v. 26 n.1 p. 19-27, 2014.
- NAZARENO, A. G. et al. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 568-571, 2009.
- NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriopatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic

- Rainforest of Brazil. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. e198-200, 2011.
- NEVES, A. C. das et al. **Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, p.1 (Curricular Técnica 51), 2011.
- NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. **Cowpea taxonomy, origin and germplasm**. In: SINGH, S. R.; RACHIE, K. O. (eds) Cowpea Research, Production and Utilization. p. 11-21, 1985.
- NONGPIUR, R. C.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Genomics approaches for improving salinity stress tolerance in crop plants. **Current Genomics**, v. 1, n. 7, p. 31-35, 2016.
- NUGDALLAH, G. A.; EL TINAY, A. H. Effect of cooking on cowpea protein fractions. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 51, n.3, p. 277-282, 1997.
- OGUNMODEDE, B. K.; OYENUGA, V. A. Vitamin B content of cowpeas (*Vigna unguiculata* Walp.) II. – Pyridoxine, pantothenic acid, biotin and folic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.21, n.2, p. 87-91, 1970.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 86, p. 1-8, 2014.
- PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B., MOHAN RAJ, D. R., DASHIELL, K., JACKAI, L. E. N. (eds.). **Advances in Cowpea Research. Publication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Centre for Agricultural Sciences (JIRCAS)**, IITA, Ibadan, Nigeria. p. 1-12, 1997.
- PHUMICHA, C.; PHUMICHA, T.; WONGKAEW, A. Novel Chloroplast Microsatellite (cpSSR) Markers for Genetic Diversity Assessment of Cultivated and Wild *Hevea rubber*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 5, p. 1486-1498, 2015.

- PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; ASSIS, F. F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata*). In: Kimati H, Amorim L, Bergamim Filho A, Camargo LEA e Rezende J.A.M. (eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo, **Agronômica Ceres**, v. 2, n. 1, p. 215-222, 2005.
- PIRONE, T. P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, v. 2, n. 1, p. 81-87, 1991.
- RIDOUT, C.; DONINI, P. Use of AFLP in cereals research. **Trends in Plant Science**, v.4, p.76-79, 1999.
- ROCHA, M. D. M. Et al. **Melhoramento genético do feijão-caupi no Brasil**. In: Embrapa Meio-Norte: Jornada Tecnológica Internacional Sobre elFrijol-Caupí, Monteria, Colômbia. Universidade de Córdoba, p. 1-8, 2013.
- ROCHA, M. de M. et al. **Melhoramento genético do feijão-caupi no Brasil**. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, n. 7, 2013.
- RODRIGUES, N. F. **Edição de RNA plastidial em *Glycine max*: caracterização de sítios de edição, componentes do editossomo e efeitos de estresse abiótico**. Tese (Doutorado em Ciências – Genética e Biologia Molecular) – Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2018.
- SANTOS, C. A. F. et al. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses. **Crop Science**, v. 52, p. 2501-2506, 2012.
- SCHLÖTTERER, C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? **Current Biology**, v. 8, p. 132-134, 1998.
- SENAN, S. et al. Methods for development of microsatellite markers: an overview. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, p. 1-13, 2014.
- SINGH, B. B. et al. **Progress in cowpea breeding**. In: FATOCUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMÓ, M.(ed.). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan: IITA, 2002. P.22-40.

- SOUZA, N. M.; SOUZA, L. A. G. **Levantamento do potencial de aproveitamento das leguminosas no distrito da Barreira do Andirá, Barreirinha, AM.** Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 7, n.12, 2011.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Plantarum, Nova Odessa, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.
- TANKSLEY, S. D. et al. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Nature**, v.7, p. 257-264, 1989.
- TEÓFILO, E. M et al. Potencial fisiológico de sementes de feijão-caupi produzidas em duas regiões do estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 3, p. 443-448, 2008.
- TREVISAN, F. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba. São Paulo, 2005.
- VERDCOURT, B. Studies in the Legminosue-Papilionoideae for the Flora of Tropical East Africa. IV. **KewBulletin**, v. 24, n. 2, p. 507-569, 1970.
- VERLI, H. **O que é Bioinformática?** In: VERLI H. (Org). Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular. 1ª edição. Porto Alegre, Brasil. p.282, 2014.
- VIANA, C. A. dos S. **Resistência de genótipos de maracujá-azedo á bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* PV. *Passiflorae*) e a virose do endurecimento do fruto (Cowpea ahip-borne mosaic virus).** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2007 CORREIA, A. (2018). Propagação e avaliação de passifloráceas submetidas a estresses bióticos e abióticos.
- VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

- WALTER, J. et al. Do plants remember drought Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, n. 4, p.34-40, 2013.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. **Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction**. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 44, p. 388-396, 1989.
- WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 241, p. 225-235, 1993.
- XU, J.; LIU, L.; XU, Y. Development and Characterization of Simple Sequence Repeat Markers Providing Genome-Wide Coverage and High Resolution in Maize. **DNA Research**, v. 20, n. 5, p. 497-509, 2013.
- YAN, H. H. et al. Comparative physical mapping reveals features of microsynteny between *Glycine max*, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. **Genome**, v. 47, p.141–155, 2004.
- YANNI, Y. G.; ABD EL FATTAH, F. K. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile Delta. **Symbiosis**, v. 27, p. 319 331, 1999.
- ZHANG, L.; YUAN, D.; YU, S. Preference of simple sequence repeats in coding and noncoding regions of *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v. 20, n. 7, p. 1081-1086, 2004.
- ZHANG, Z. et al. Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2825–2832, 2011.

3. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] esteve por muito tempo concentrada nas regiões Norte e Nordeste, porém na última década tem se estabelecido na região Centro-Oeste e se expandido para a região Sul (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017). Sua produção representa, aproximadamente, 18% do feijão que é produzido no Brasil (CEPA/EPAGRI, 2011), exibindo-se como um dos principais componentes na dieta da população, além de configurar como uma boa fonte geradora de empregos e renda (RAMOS, 2011). Os grãos dessa leguminosa possuem bons teores de proteínas, carboidratos, fibras, aminoácidos essenciais e vitaminas, além de possuírem baixa quantidade de gordura e não conter colesterol (NEVES; XAVIER, 2010).

Apesar do feijão-caupi possuir uma boa adaptação em solos pobres em nutrientes e com baixa disponibilidade hídrica, as condições ambientais desfavoráveis podem afetar seu desenvolvimento e sobrevivência (MUCHERO et al., 2009). Além disso, a planta ainda pode sofrer interferências no seu ciclo de vida e afetar diretamente o rendimento produtivo da espécie (VALDEZ et al., 2012). No âmbito regional, podemos destacar o déficit hídrico como o fator abiótico que mais influencia na perda da produtividade do feijão-caupi (RIBEIRO, 2015), enquanto que as viroses [Vírus do Mosaico Severo do Feijão-Caupi – *CowpeaSevereMosaicVirus* (CPSMV) e Vírus do Mosaico Transmitido por Afídeos – *CowpeaAphib Borne MosaicVirus* (CABMV)] destacam-se entre os estresses bióticos que mais influenciam negativamente a espécie no Brasil (BASHIR et al., 2002; BOOKER et al., 2005).

O avanço do desenvolvimento biotecnológico tem auxiliado no aumento da produtividade dos organismos através da aplicação de novas ferramentas, de modo a garantir que o crescimento alimentar siga o ritmo do crescimento populacional. O surgimento de técnicas usando marcadores moleculares ajudou acelerar os métodos convencionais de melhoramento, como a seleção assistida por marcadores (SAM) e o mapeamento genético, diminuindo o tempo de liberação de materiais, o tamanho da população analisada e os custos para avaliação (DULTRA FILHO et al., 2013).

O desenvolvimento de marcadores do tipo SSR ou microssatélites, por muitas vezes, é a melhor opção para investigar polimorfismos de populações (FOSTER et al., 2010). Esse tipo de marcador molecular é bastante útil em estudos de diversidade e mapeamento genético, pois não geram apenas *loci* específicos, mas também um grande número de alelos por *locus*, além de apresentar um caráter codominante e possibilitar a distinção entre genótipos proximamente relacionados, permitindo assim uma maior eficiência e orientação em futuros cruzamentos, estudos genéticos e na SAM (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular têm alcançado destaque no melhoramento de plantas, bem como na conservação e uso dos recursos genéticos vegetais (JANGARELLI et al., 2010). Neste contexto, o uso de marcadores moleculares (associado às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA) representa um avanço no acúmulo de informações, especialmente sobre a estrutura do genoma do feijão-caupi, devido à precisão e a rapidez na manipulação da variabilidade genética (FALEIRO, 2007). Os marcadores moleculares apresentam algumas vantagens quando comparados com os marcadores morfológicos, uma vez que são neutros fenotipicamente, podendo ser utilizados em qualquer fase do desenvolvimento da planta e gerar uma grande quantidade de dados, além de serem isentos de influência do meio ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

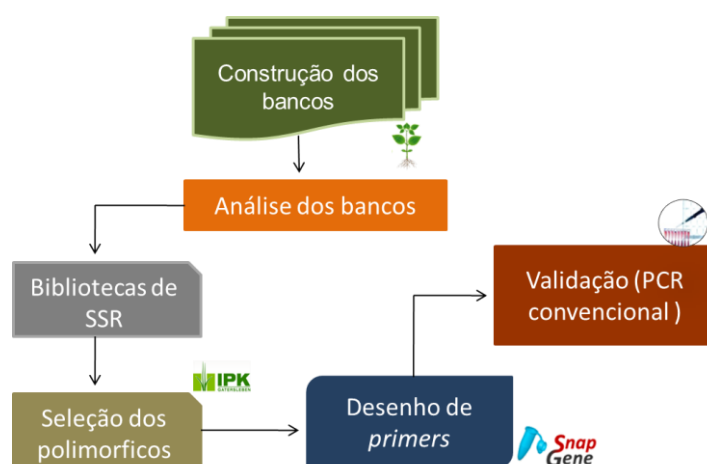
Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores microssatélites do tipo gênico a partir de transcriptoma do feijão-caupi, colaborando para a otimização dos programas de melhoramento.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 Bioensaio dos estresses e obtenção dos transcriptomas

O conjunto de dados analisado foi proveniente de dois experimentos referentes aos estresses biótico (infecção viral) e abiótico (desidratação radicular). No primeiro experimento, dois acessos do feijão-caupi (BR 14-Mulato e IT85F-2687) foram expostos às infecções pelo CPSMV e pelo CABMV, respectivamente. O acesso IT85F-2687 apresenta suscetibilidade à infecção pelo CPSMV e imunidade ao CABMV, enquanto o acesso BR 14-mulato apresenta suscetibilidade à infecção

pelo CABMV e resistência moderada ao CPSMV. As folhas foram coletadas após 60 minutos e 16 horas da inoculação, bem como seus respectivos controles. Para o segundo experimento, foi utilizado um acesso do feijão-caupi (Pingo de ouro) com características de tolerância à desidratação radicular. As plantas foram submetidas à desidratação radicular e tiveram suas raízes coletadas após 75 e 150 minutos do início do estresse, assim como o controle. Os tecidos coletados em cada experimento seguiram para extração do RNA total, separação do RNA mensageiro (RNAm) pela cauda poli-A e sequenciamento pela tecnologia de RNA-Seq, utilizando o sequenciador Illumina Hi-seq 2500, pelo método *paired-end*. A montagem foi realizada por uma abordagem de novo, utilizando o software Trinity. Por fim, foram obtidos três transcriptomas da espécie submetidos à infecções virais e desidratação radicular, onde os dois primeiros contêm apenas as sequências provenientes do experimento de estresse biótico (TeIV_CABMV – Transcriptoma do experimento de infecção viral pelo CABMV; TeIV_CPSMV – Transcriptoma do experimento de infecção viral pelo CPSMV) e o segundo transcriptoma contendo as sequências do experimento de desidratação radicular (Te_DR – Transcriptoma do experimento de desidratação radicular) (Fluxograma 01).



Fluxograma 01: Esquema metodológico das etapas seguidas pelo presente trabalho.

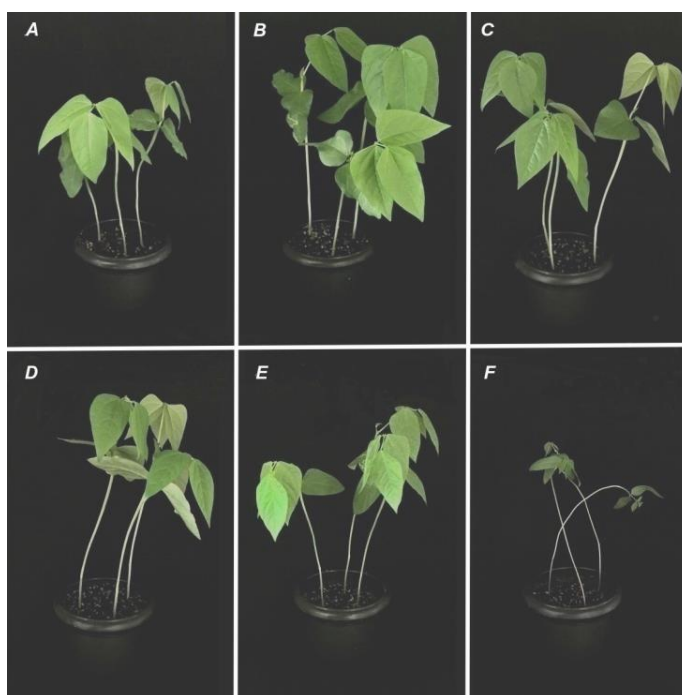
4.2 Análise e seleção dos microssatélites para o desenho dos *primers*

De posse dos dados referentes aos transcriptomas da espécie, a identificação dos microssatélites gênicos foi realizada com o programa MISA (*MicroSAtellite identification tool*; Ferramenta de Identificação de Microssatélites), um *script* escrito em PERL, o qual foi utilizado contra as sequências de cada transcriptoma gerado e depositado no banco de dados do CpGC (*Cowpea Genome Consortium*; Consórcio do Genoma do Caupi), de uso exclusivo do nosso grupo de pesquisa (Fluxograma 01). Os microssatélites minerados foram analisados quanto a sua classificação e tamanho nas sequências identificadas em cada transcriptoma. Foram selecionadas as sequências contendo SSR's constituídos por motivos di e trinucleotídeos para a construção das três bibliotecas de SSR's (SSR_CABMV; SSR_CPSMV e SSR_DR), uma vez que estes são os motivos que apresentam uma maior tendência a serem polimórficos nos vegetais (GALVÃO et al., 2015). Posteriormente, foi realizado um BLASTn local (*Basic Local Alignment Search Tool* ou Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) usando a ferramenta BioEdit (HALL, 1999), a fim de se obter similaridade entre cada transcrito de acordo com as três bibliotecas. As sequências análogas foram verificadas quanto ao tipo do motivo e tamanho do microssatélite presente, a fim de identificar os possíveis polimorfismos. Os microssatélites polimórficos identificados *in silico* seguiram para o desenho de *primers*, baseando-se nas regiões que flanqueiam tais sequências. Para tal finalidade, foi utilizado a ferramenta SnapGene1.1.3, seguindo os parâmetros pré-determinados pelo programa, exceto: Tm: Temperatura de *melting* estabelecida com mínimo de 50 °C, ótimo de 60 °C e máximo de 62 °C. Para as concentrações de CG: Mínimo de 40%, ótimo de 50% e máximo de 60%.

4.3 Obtenção de material vegetal e extração de DNA

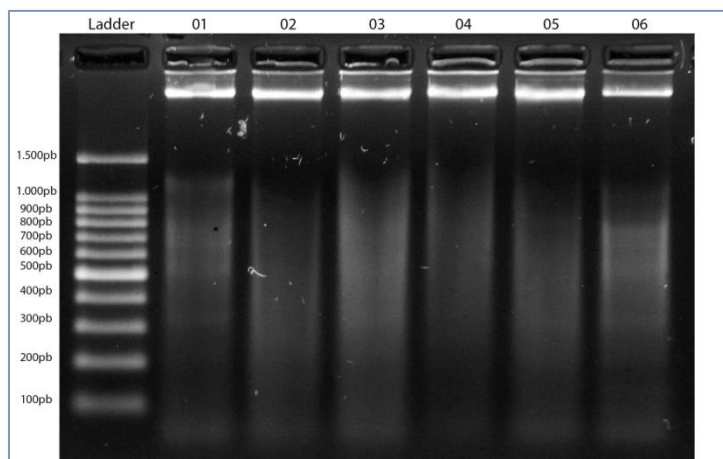
Para esta etapa, foram utilizados cinco genótipos de feijão-caupi, sendo os acessos BR 14-Mulato, IT85F-2687, Pingo de Ouro, Santo Inácio (sensível à seca) e as espécies *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). As sementes de todos os acessos foram disponibilizadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Região Norte do Brasil - EMBRAPA Meio-Norte. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do LGBV - Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (Figura 03).

Figura 03: Acessos do feijão-caupi com 15 dias de idade. BR 14-Mulato **(A)**, IT 85F-2687 **(B)**, Pingo de Ouro **(C)**, Santo Inácio **(D)**, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* **(E)** e Feijão-mungo **(F)**.



Para obtenção do material genético foi realizado a extração de DNA, partindo da etapa de coleta das amostras e seleção das folhas mais jovens e livres de qualquer comprometimento à saúde do vegetal. Após coletadas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para conservar a integridade do DNA genômico, seguindo o método de Weising et al., (1995). O DNA extraído foi então ressuspenso em 500 μ L de solução TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA, pH 8,0). As concentrações do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando quantidades conhecidas de λ -DNA como referencial. A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose a 1,5% (Figura 04).

Figura 04: Integridade das amostras de DNA dos acessos BR 14-Mulato **(01)**, IT 85F-2687 **(02)**, Pingo de Ouro **(03)**, Santo Inácio **(04)**, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* **(05)** e Feijão-mungo **(06)**.



4.4 Validação por PCR convencional

Para as reações de PCR foram utilizados 30 ng de DNA genômico, 200 μ M de dNTP-mix; 2,5 μ M $MgCl_2$; 0,1 U de DNA polimerase e 10 μ M de cada *primer* (direto e reverso), completando com água Milli-q ultrapura para o volume final de 20 μ L. Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 3 min para desnaturação inicial, seguido de 36 ciclos de 94 °C por 20 s, 30 s, a 50-60 °C para anelamento, 40 s a 72 °C e 5 min a 72 °C para a extensão final. Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, corados com nitrato de prata (Ceste et al., 2001). O polimorfismo foi detectado por análise comparativa do tamanho dos fragmentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mineração dos Microsatélites

No geral, foram analisadas 390.303 sequências oriundas do banco CpGC, onde 97.673 pertenciam ao banco TeIV_CABMV, 98.987 ao TeIV_CPSMV e 193.643 ao Te_DR (Gráfico 01). Destas, 45.762 sequências foram identificados com regiões contendo SSR. Zhangying e colaboradores (2011), relataram a identificação de 8.294 SSR de EST (*Expressed Sequence Tags* ou Etiquetas de Sequência Expressa) ao investigar 181.615 sequências gênicas de *Ipomoea batatas* (L.). O sucesso da obtenção de altos valores de sequências contendo regiões de SSR apresentado pelo presente estudo pode estar relacionado à alta eficiência e sensibilidade da técnica de RNA-Seq aqui utilizada (JI et al., 2013).

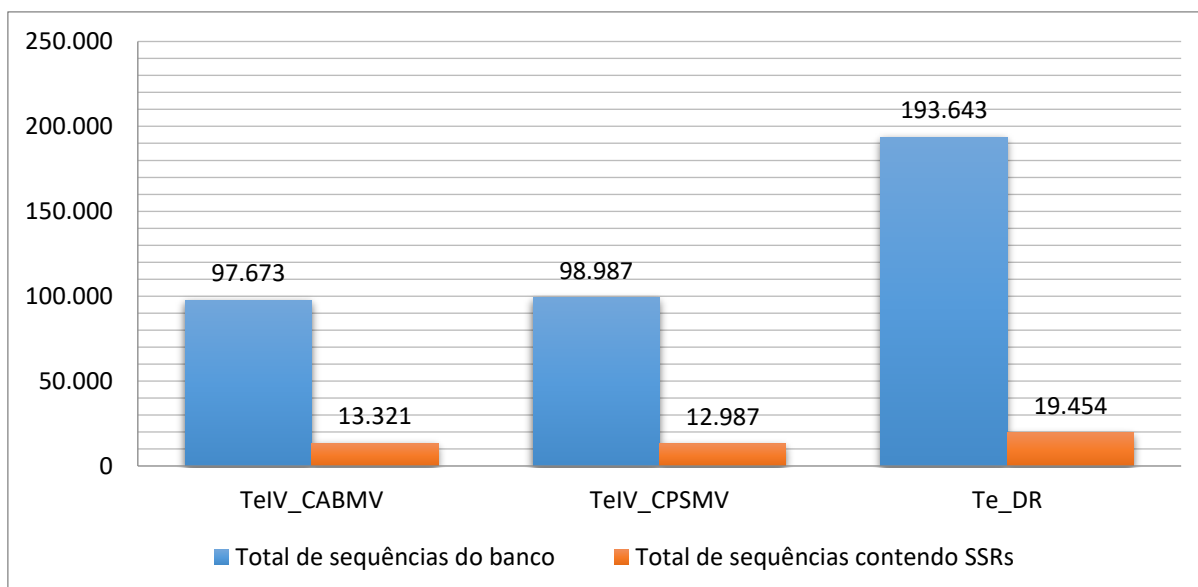


Gráfico 01: Relação quantitativa do número de sequências analisadas e o valor de SSR encontrados em casa banco.

Foram mineradas 13.321 e 12.987 sequências contendo SSR nos bancos TeIV_CABMV e TeIV_CPSMV, respectivamente, para a formação das bibliotecas SSR_CABMV e SSR_CPSMV, correspondendo a 13,4% do total de sequências expressas no feijão-caupi, sob infecção viral. Deste total, foi observado que os SSRs formados pelos motivos di e trinucleotídeos mostraram-se como os mais abundantes, correspondendo a 5.070 (38%) e 5.978 (45%) dos transcritos para a biblioteca SSR_CABMV e, 4.853 (37,4%) e 5.895 (45,4%) para SSR_CPSMV, respectivamente. Por outro lado, os motivos tetra, penta e hexanucleotídeos foram os menos frequentes nas sequências mineradas e analisadas, que, em conjunto, representaram apenas 17% (SSR_CABMV) e 17,2% (SSR_CPSMV) dos SSR identificados (Gráfico 02).

Em contrapartida, o banco do Te_DR foi apresentado um total de 19.454 sequências com regiões de microssatélites, que foram depositadas na biblioteca SSR_DR. Os SSRs formados pelos motivos di e trinucleotídeos também se mostraram como os mais prevalentes, assim como observado nas bibliotecas já descritas. Tais motivos representam 82,1% das sequências encontradas, sendo 7.352 (37,8%) e 8.628 (44,3%) correspondentes às sequências di e trinucleotídicas, respectivamente. Da mesma forma, os tetra, penta e hexanucleotídeos foram os

motivos menos frequentes nas sequências mineradas e analisadas, representando 17,9% dos microssatélites obtidos (Gráfico 02).

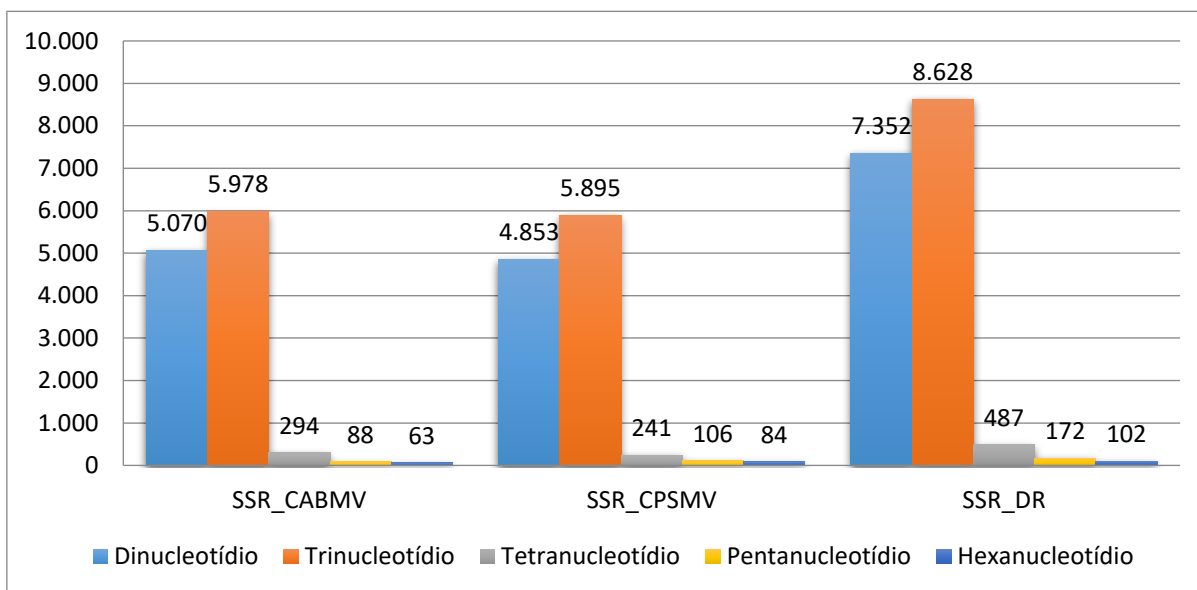


Gráfico 02: Relação quantitativa dos microssatélites encontrados nas bibliotecas oriundas dos dados do transcriptoma do feijão-caupi, submetido à infecções virais e desidratação radicular.

A predominância de sequências dinucleotídicas é comum em vegetais e também foi relatada em *Zeamays* (L.), perfazendo 60% das sequências (2.019.602) analisadas (VETTORAZZI, 2015). Em pesquisa realizada com leguminosas, foram comparadas as regiões codificantes e não codificantes quanto à presença dos SSRs, observando-se que as frequências de di e trinucleotídeos tendem a se duplicar nas regiões codificantes, possivelmente como resultado de pressão de seleção (SANTOS et al., 2013). Isso pode explicar a predominância desses tipos de motivos identificadas no presente trabalho, uma vez que se trata de sequências expressas no feijão-caupi sob condições ambientais adversas. No presente estudo, os motivos dinucleotídicos foram os que apresentaram a maior quantidade de repetições, variando de seis a 23 vezes (Tabela suplementar 01). Para o desenho de iniciadores, esta informação é de grande valia, pois quanto maior a variação de repetições, maior será o potencial polimórfico do iniciadores desenvolvidos (GALVÃO et al., 2015).

O elevado número de motivos do tipo di e trinucleotídeo encontrado e analisado pelo presente estudo, possibilitou um universo maior de sequências candidatas ao desenho dos *primers*, o que facilitou a seleção das sequências que

apresentavam bons níveis de polimorfismo, considerando o número de repetições dos motivos. É interessante destacar a importância do desenvolvimento desse tipo de marcador (oriundo de regiões gênicas), uma vez que podem estar associados a características de interesses agrônômicos, tanto para estresse abiótico quanto biótico.

5.2 Seleção *in silico* dos microsatélites polimórficos

Após a construção das bibliotecas SSR_CABMV, SSR_CPSMV e SSR_DR, foram removidas as sequências redundantes presentes em cada biblioteca, e obteve-se, ao final, um universo de 37.776 transcritos, dos quais 11.048, 10.748 e 15.980 pertenciam às bibliotecas SSR_CABMV, SSR_CPSMV e SSR_DR, respectivamente, e 3.493 (9,2%) sequências foram comuns às três bibliotecas (Diagrama 01).

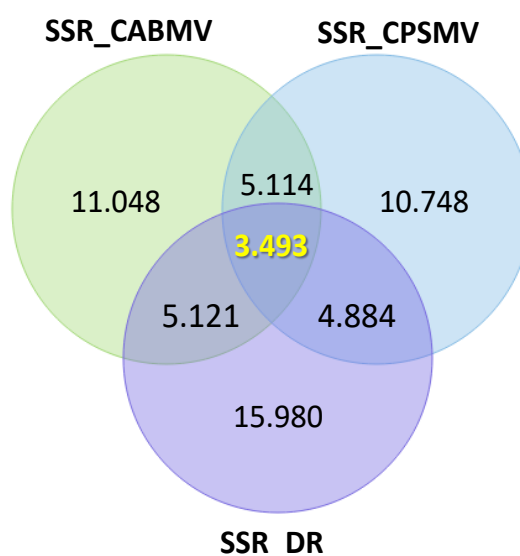


Diagrama 01: Diagrama de Venn mostrando o quantitativo de microsatélites com motivos di e trinucleotídeos nos três transcriptoma, e o quantitativo de sequências compartilhadas nas três bibliotecas (SSR_CABMV, SSR_CPSMV e SSR_DR).

As 3.493 sequências de microsatélites comuns entre as bibliotecas foram analisadas quanto ao tamanho das repetições di e trinucleotídicas. Assim, foi selecionado um conjunto de 160 sequências com diferenças entre os tamanhos das repetições, sendo 90 referentes aos motivos dinucleotídicos e 70 aos

trinucleotídicos. Para o desenho dos iniciadores foram selecionadas 30 sequências com base na maior diferença de tamanho entre os motivos (Tabela Suplementar 02).

A percentagem média de GC dos *primers* desenhados (Tabela 01) foi de 52,2%. Esse resultado foi superior ao encontrado por Santos e colaboradores (2013) que, em 41 pares de iniciadores SSR, também para a espécie *Vigna unguiculata* (L.), obtiveram iniciadores com porcentagem média de GC de 47,56%. As altas porcentagens de guanina e citosina caracterizam regiões mais conservadas, o que consequentemente favorecerá o desenvolvimento de iniciadores específicos (LIU et al., 2015).

Tabela 01:Relação dos iniciadores baseados nas sequências do transcriptoma do feijão-caupi. **F:**Forward; **R:** Reverse; **GC:** Guanina/citosina.

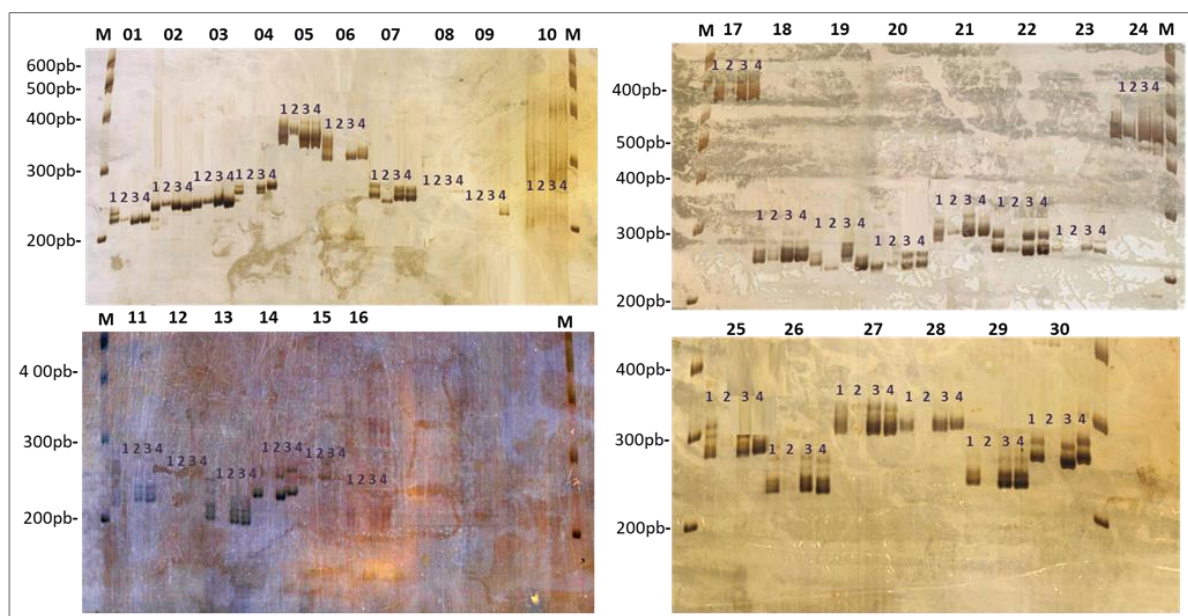
Nome	Sequência 5'-3'	Tamanho (Primer F)	Tamanho (Primer R)	Motivo	GC (%)	Amplicon (pb)
VuSSR-1	F:ACCCCTTTCTTCATCATTCCT R:AAGCCAGTATGGCATCCT	21	18	CTT	46	219
VuSSR-2	F:AAGAAGGACACAATGAAGGG R:GGGAGTATGTAGAAGATGGAGA	20	22	TCA	45	226
VuSSR-3	F:AACTTCCCACAGTTCTCAACA R:CACAACAACATCATGACCCAATC	21	22	GAT	44	226
VuSSR-4	F:CTGGAGAAGAATCGGAAGATG R:TTTTCTGCTTGAACATTTACC	21	22	TGA	42	220
VuSSR-5	F:CGCTGCCACATTCCATCACT R:ACCCAGTTGGTGCATCGTTC	20	20	TGA	55	270
VuSSR-6	F:GTGAGTAGCTGAAGGATACTTG R:CCTCTTAAACAGACCACATCAT	22	22	GAA	43	309
VuSSR-7	F:GAATCTCGCTGTAGTGGTT R:ACGAAGAAGCTGCCTATGG	20	19	TC	51	223
VuSSR-8	F:AAAACCACCTCAGAACTCCG R:ATGCACCTGGAGGAAGAGTA	20	20	TC	50	228
VuSSR-9	F:CCAGGACACACTAAGTCTTCAT R:TGGTTTAAGGTGAATTGAGGTGA	22	23	AG	42	230
VuSSR-10	F:CTATCACCTTCTCTCTCTCCC R:AGGCCATGTAGCTGAGAG	22	18	CT	53	217
VuSSR-11	F:GGTGGATGGTGAAACAAAGAAA R:GAGAGAGGGATTGAGAGAGAGA	22	22	CT	45	245
VuSSR-12	F:AAATGCCAACACAACCAC R:GAAGAAGTTCTTTCTCATCGG	18	22	CT	42	268
VuSSR-13	F:TCTTTTCAGTTCCAATTGCAAC	22	20	TC	40,5	213

	TGAAGCGAGTAAGAAGGTTTC					
VuSSR-14	F:AAAATTGAAAACGTCACCTTC R:CGAAAGGAACAAATTGAGATATAC	21	24	TC	33	230
VuSSR-15	F:AAAATTGAAAACGTCACCTTCT R:GGGTTTTTAGAGCGAAGC	22	18	TC	41	289
VuSSR-16	F:GAGAAGAAGTAAGAGAAACGGCAA R:CCTCTCCGGCAGAAACAAAA	24	20	TC	46	244
VuSSR-17	F:ACCGACTGAACCCTTCAC R:CTTTCCAAACATGCGCATACA	18	21	TA	49	236
VuSSR-18	F:GACATAATCTATTGGGTGACAC R:ACTTAGAAAACCCCAAGTGT	22	20	CT	40	279
VuSSR-19	F:GAAAACCCTTCTAAGTTAATCC R:TCTTCAAATCTGGCTAGC	22	18	AT	40	256
VuSSR-20	F:GGGTCCTCTTCACTGATTAC R:TGTTAGTGAAGAAGTGGTGG	20	20	TA	47	247
VuSSR-21	F:CAGCAGTGTGAGCCATGAAATG R:CGAGAAAGATCGCGTCGGAA	22	20	TC	52	226
VuSSR-22	F:CTGTGTTATGTTATGCACGTG R:AATTCTAACTTCCCAACTCTCTG	21	23	CT	41	205
VuSSR-23	F:CCCTGTCATACCAAATCTGG R:GACTGAATTACGTTCTGCTC	21	21	TA	48	220
VuSSR_24	F:GCACCCAGTTCAGGATGA R:ATTTGCGAACTTGTTTCATGTGGG	20	23	CT	49	223
VuSSR-25	F:GCCGTCAACACATAAAACCTC R:CCTAGAGGATAAATGTCACCGTAG	21	24	TC	47	236
VuSSR-26	F:CGACCCTGGAACTTTTGACC R:CATCTCGGATTCGGAACACG	21	20	AT	51	257
VuSSR-27	F:ATGAAGGCCTCATTGGTTGC R:GTCCTCAGCTGTTCAACATGTG	20	22	AT	50	230
VuSSR-28	F:GGTATGCTCTGATCCAGTAATT R:CCCAAAAGGAAGATGGAAGA	22	20	AT	43	224
VuSSR-29	F:TTGACTTCAAGCCGGCAATG R:CCGTTACCTCTCTCCCTCAC	20	21	AG	53	235
VuSSR-30	F: GCGTCAAGTTGCAAAAGG R:GGGTGCAGGATTCAGGTTTT	18	20	GT	53	232

5.3 Validação dos microssatélites polimórficos

O polimorfismo de tamanho dos marcadores SSR foi analisado entre acessos contrastantes para os estresses de natureza biótica (conforme descrito na sessão materiais e métodos) e abiótica (Pingo de ouro – tolerante, e Santo Inácio – sensível, à seca). Para os genótipos contrastantes ao estresse biótico, foi possível observar que, dos 30 marcadores moleculares avaliados, 22 (73%) foram capazes de detectar polimorfismo entre os acessos de BR 14-Mulato e IT85F2687. Em paralelo, 17 (57%) do total de marcadores avaliados, mostraram-se polimórficos entre os acessos Pingo de Ouro e Santo Inácio, contrastantes ao estresse de natureza abiótica. (Figura 05).

Figura 05: Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) dos 30 marcadores microssatélites gênicos. M: marcador *ladder* de 100pb. Acessos BR 14-Mulato (1), IT 85F2687 (2), Santo Inácio (3) e Pingo de Ouro (4).



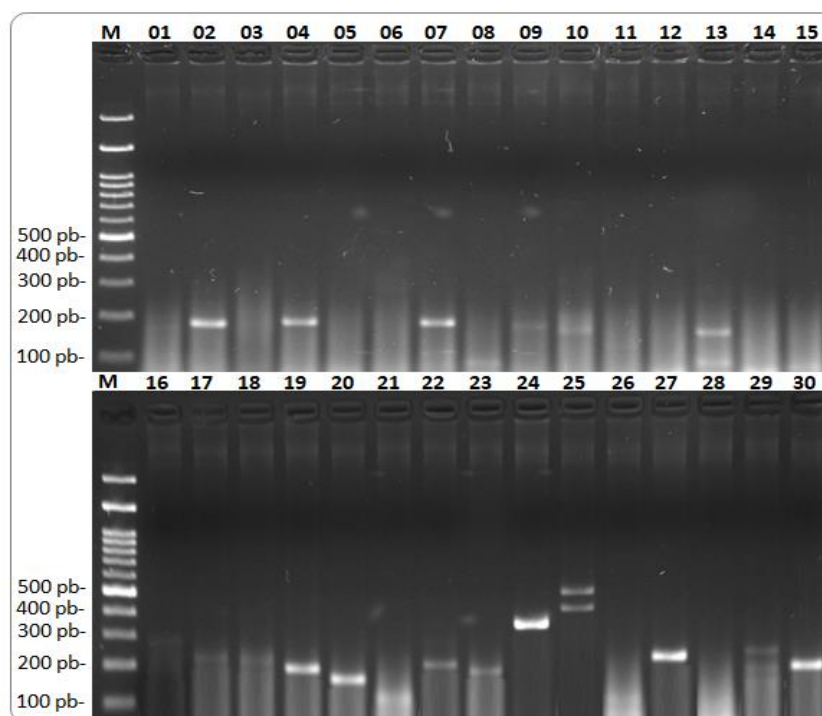
Sousa e colaboradores (2013), ao realizarem um estudo onde foram avaliados 34 marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* ou Inter Sequências Simples Repetidas) oriundos de regiões não codificantes do DNA, analisou seu polimorfismo entre 20 acessos de feijão-caupi e observaram que 24 (70,59%) marcadores detectaram polimorfismo entre os genótipos avaliados. Nosso ultimo resultado mostram-se inferior quando comparado com os dados encontrados por Sousa e colaboradores (2013). Esta diferença existente entre a taxa aqui relatada, pode ser entendida quando consideramos a origem dos marcadores aqui

utilizados, tendo em vista que são regiões codificantes e tendem a ser mais conservadas (CASTRO et al., 2011). É importante ressaltar que os marcadores microsatélites do tipo gênico, apresentam um valor agregado mais elevado para os programas de melhoramento genético de plantas, uma vez que podem estar relacionados a características de interesse agrônomo (CAMARGO et al., 2017).

5.4 Transferibilidade dos microsatélites

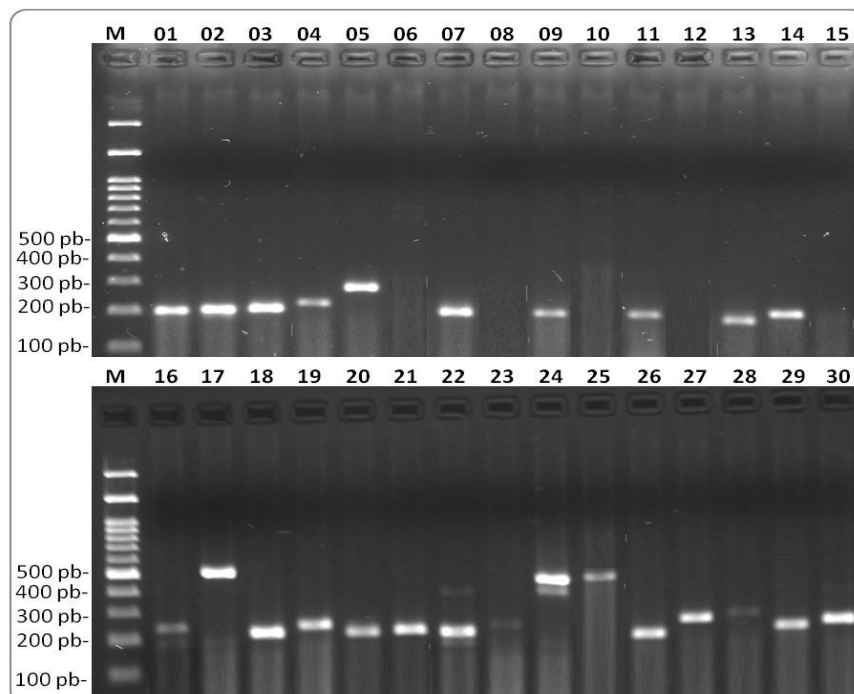
Entende-se por transferibilidade a capacidade que os iniciadores (*primers*) desenvolvidos para uma espécie têm em, também, amplificar segmentos de DNA em outras espécies (CHAGNE et al., 2018). Todos os *primers* aqui testados foram avaliados quanto à sua capacidade de amplificar produtos em espécies próximas, caracterizando sua transferibilidade. Verificamos que dos 30 marcadores que foram desenhados para *V. unguiculata*, 13 (43,3%) apresentaram produto de amplificação em acesso de *V. radiata* (Figura 06).

Figura 06: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, dos 30 marcadores desenvolvidos a partir do transcriptoma do feijão-caupi aplicados na espécie *V. radiata*. M: Marcador *ladder* de 100pb.



Em paralelo, 23 (77%) dos marcadores foram transferíveis para *V. unguiculata* subs *p. sesquipedalis* (Figura 07).

Figura 07: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, dos 30 marcadores desenvolvidos a partir do transcrito do feijão-caupi aplicados na subespécie *sesquipedalis*. M: Marcador ladder de 100pb.



Avaliando a transferibilidade de 48 marcadores microssatélites não gênicos de soja (*G. max*) para o feijão-caupi, Nascimento e colaboradores (2013) relataram uma taxa de transferência de 41,6% dos marcadores. Taxa essa inferior a encontrada no presente trabalho. Em outro estudo realizado com o cacau (*Theobroma cacao* L.), um total de 181 marcadores moleculares do tipo microssatélites de regiões não codificantes foram avaliados quanto à sua amplificação em outra espécie pertencente ao mesmo gênero (*Theobroma grandiflorum* L.). Esses resultados apontaram uma taxa de transferabilidade de 43,09% dos marcadores avaliados (NASCIMENTO et al., 2016). Nossos dados apontam uma maior eficiência na transferabilidade dos marcadores SSR entre feijão-caupi, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e feijão-mungo, do que o reportado pelos autores supracitados. As altas taxas de transferência dos marcadores encontradas no presente trabalho são explicadas pelo alto nível de conservação que tem as regiões flanqueadoras dos marcadores moleculares, permitindo assim o anelamento dos iniciadores e possibilitando uma possível amplificação.

6. CONCLUSÕES

A análise *in silico* permitiu a identificação dos motivos SSR nos transcriptomas do feijão-caupi, submetido a estresses bióticos e abióticos, revelando significativas sequências com potencial polimórfico entre diferentes acessos do feijão-caupi.

A tecnologia do RNA-Seq proporcionou uma identificação eficiente das sequências contendo regiões de SSR, facilitando a identificação de possíveis polimorfismos entre os acessos avaliados.

A validação biológica dos marcadores polimórficos identificados *in silico* contribuirá para a saturação do mapa genético do feijão-caupi, o qual será de grande valia quando finalizado e disponibilizado aos programas de melhoramento genético da espécie.

Os marcadores que foram transferíveis, poderão ser utilizados para aplicação em estudos de diversidade, bem como na seleção de acessos dessas culturas, visando ao mapeamento genético, especialmente aqueles com alto poder discriminatório para o feijão-caupi.

Por fim, os nossos dados de identificação, análise e validação de marcadores de tipo SSR poderá vir a contribuir em estudos de diversidade genética e pré-melhoramento, visando ampliar a base genética disponível do feijão-caupi.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFOR, A. Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: a review. **International Journal of Pest Management**, n. 4, v. 8, p. 155-168, 2002.
- BOOKER, H. M.; UMAHARAN, P.; MCDAVID, C. R. Effect of Cowpea severe mosaic virus on Crop Growth Characteristics and Yield of Cowpea. **Plant Disease**, n. 8, v. 9, p. 515-520, 2005.
- CAMARGO, N. G. et al. Caracterização de marcadores microssatélites em plantas nativas do Cerrado brasileiro. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 6, p. 41-47, 2017.

- CEPA/EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2009/2010**. Florianópolis/SC. Disponível em: http://www.epagri.sc.gov.br/page_id=7473. Acessado em 04 Fev.2019. EPAGRI/CEPA, p. 315, 2011.
- CHAGNÉ, D. et al. Simple sequence repeat (SSR) markers for New Zealand mānuka (*Leptospermum scoparium*) and transferability to kānuka (*Kunzea spp.*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 45, n. 3, p. 216-222, 2017.
- DULTRA FILHO, J. A. et al. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, n. 44, v. 1, p. 141-149, 2013.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2016): área, produção e rendimento**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2017. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em 04 de Fev. de 2019.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Ed. Brasília: **Embrapa/CENARGEN**, n. 1, v. 2. 3, p. 220-232, 1998.
- FOSTER, J.T. et al. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biology**, n.10, v. 7, 2010.
- GALVÃO, K. S. C. et al. Functional molecular markers (EST-SSR) in the full-sib reciprocal recurrent selection program of maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Research**, n. 14, p. 7344-7355, 2015.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

- JANGARELLI, M. et al. Análise de agrupamento de diferentes densidades de marcadores no mapeamento genético por varredura genômica. **Revista Ceres**, n. 2, v. 57, p. 695-705, 2010.
- JI, H. et al. Transcriptional analysis through RNA sequencing of giant cells induced by *Meloidogyne graminicola* in rice roots. **Journal of Experimental Botany**, n. 12, v. 64, p. 3885-3898, 2013.
- LIU, J. et al. The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China. **Diversity and Distributions**, n. 2, v. 21, p. 188-199, 2015.
- MUCHERO, W. et al. Mapping QTL for drought stress induced premature senescence and maturity in cowpea. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 118, v. 5, p. 849-863, 2009.
- NASCIMENTO, A. S. et al. Transferibilidade e Mapeamento in silico de Marcadores Microssatélites Entre *Theobromacacao* e *T. grandiflorum*. **Anais XXI Engene**, v. 1, n. 21, p. 132, 2016.
- NASCIMENTO, A. T. B. et al. Transferibilidade de marcadores moleculares de soja para aplicação no melhoramento do feijão caupi. **Anais XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão**, v. 1, n. 13, 2013.
- NEVES JÚNIOR, E. S.; AVIER, F. L. **Avaliação do desenvolvimento do feijão (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivado em três texturas de solo na região de Imperatriz no estado do Maranhão. 2010.** Monografia de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade de Ensino Superior do Sul do Maranhã, Imperatriz.
- RAMOS, H. M. M. **Características produtivas, fisiológicas e econômicas do feijão caupi para grãos verdes sob diferentes regimes hídricos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

- RIBEIRO, C. A. G. **Identificação de regiões genômicas relacionadas à seca e à deficiência de fósforo via análise de ligação e mapeamento associativo em milho tropical**. Viçosa, MG, 2015.
- SANTOS, R. et al. Mineração de motivos SSR em sequências expressas de feijão-caupi contendo TAGS SuperSAGE diferencialmente expressas sob desidratação radicular. **III CONAC**, Recife, p. 459-464, 2013.
- VALDEZ, V. et al. Adaptation of grain legumes to climatic change: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, n. 32, v. 1, p. 31-44, 2012.
- VETTORAZZI, J. C. F. **Seleção recorrente recíproca em milho (*Zea mays* L.) monitorada por marcadores SSR-EST's associados à produtividade**. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, Rio de Janeiro. 2015.
- ZHANGYING, W. et al. Caracterização e desenvolvimento de marcadores SSR derivados de EST em batata-doce cultivada. **BMC PlantBiology**, n. 11, v. 1, p. 139-148, 2011.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 01: Relação dos transcritos que apresentam sequências de microssatélites formados por motivos do tipo dinucleotídeo.

TRANSCRITO (SSR CABMV)	SSR	TAMANHO (pb)	TRANSCRITO (SSR CPSMV)	SSR	TAMANHO (pb)	TRANSCRITO (SSR DR)	SSR	TAMANHO (pb)
VuCPSMV_DN921_c1_g1_i3	(AC)6	12	VuPOTY_DN11034_c0_g1_i1	(AC)6	12	VuSECA_DN1837_c0_g2_i4	(AC)6	12
VuCPSMV_DN10832_c0_g2_i1	(AC)6	12	VuPOTY_DN11977_c0_g1_i2	(AC)6	12	VuSECA_DN5486_c0_g1_i5	(AC)6	12
VuCPSMV_DN38866_c0_g1_i1	(AC)6	12	VuPOTY_DN17062_c0_g1_i1	(AC)6	12	VuSECA_DN150928_c0_g1_i1	(AC)6	12
VuCPSMV_DN5375_c0_g1_i10	(AC)6	12	VuPOTY_DN3066_c2_g1_i1	(AC)6	12	VuSECA_DN51856_c0_g1_i1	(AC)6	12
VuCPSMV_DN18939_c0_g1_i1	(AC)6	12	VuPOTY_DN5893_c0_g1_i2	(AC)6	12	VuSECA_DN8359_c0_g1_i2	(AC)6	12
VuCPSMV_DN332_c0_g1_i2	(AG)6	12	VuPOTY_DN16478_c0_g1_i3	(AG)6	12	VuSECA_DN14539_c0_g1_i8	(AG)6	12
VuCPSMV_DN332_c0_g1_i3	(AG)6	12	VuPOTY_DN16478_c0_g1_i7	(AG)6	12	VuSECA_DN14539_c0_g1_i7	(AG)6	12
VuCPSMV_DN10598_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN18492_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN36306_c0_g1_i5	(AG)6	12
VuCPSMV_DN16479_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN20594_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN36793_c0_g1_i2	(AG)6	12
VuCPSMV_DN1768_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN2536_c1_g1_i2	(AG)6	12	VuSECA_DN18688_c0_g1_i1	(AG)6	12
VuCPSMV_DN1155_c0_g1_i4	(AG)6	12	VuPOTY_DN2831_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN2090_c0_g1_i1	(AG)6	12
VuCPSMV_DN1155_c0_g1_i2	(AG)6	12	VuPOTY_DN2831_c0_g1_i3	(AG)6	12	VuSECA_DN2090_c0_g1_i2	(AG)6	12
VuCPSMV_DN2161_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN2908_c0_g1_i5	(AG)6	12	VuSECA_DN4636_c0_g1_i2	(AG)6	12
VuCPSMV_DN2161_c0_g1_i8	(AG)6	12	VuPOTY_DN2908_c0_g1_i7	(AG)6	12	VuSECA_DN4636_c0_g1_i1	(AG)6	12
VuCPSMV_DN4751_c0_g1_i4	(AG)6	12	VuPOTY_DN3199_c0_g1_i5	(AG)6	12	VuSECA_DN3804_c0_g1_i6	(AG)6	12
VuCPSMV_DN39718_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN39585_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN11575_c3_g1_i1	(AG)6	12
VuCPSMV_DN24082_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN51621_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN101026_c0_g1_i1	(AG)6	12
VuCPSMV_DN599_c0_g1_i12	(AG)6	12	VuPOTY_DN526_c0_g1_i5	(AG)6	12	VuSECA_DN6882_c0_g1_i4	(AG)6	12
VuCPSMV_DN8165_c0_g1_i2	(AG)6	12	VuPOTY_DN7519_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN22697_c0_g1_i4	(AG)6	12
VuCPSMV_DN463_c0_g1_i1	(AG)6	12	VuPOTY_DN816_c0_g2_i1	(AG)6	12	VuSECA_DN1954_c0_g1_i4	(AG)6	12
VuCPSMV_DN7011_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuPOTY_DN11152_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN5886_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8425_c0_g1_i8	(AT)6	12	VuPOTY_DN11232_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN10817_c0_g1_i19	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8425_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuPOTY_DN11232_c0_g1_i10	(AT)6	12	VuSECA_DN10817_c0_g1_i15	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8425_c0_g1_i11	(AT)6	12	VuPOTY_DN11232_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN10817_c0_g1_i8	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8425_c0_g1_i9	(AT)6	12	VuPOTY_DN11232_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuSECA_DN10817_c0_g1_i4	(AT)6	12
VuCPSMV_DN9902_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuPOTY_DN12857_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN23951_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN9902_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN12857_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN23951_c0_g1_i3	(AT)6	12
VuCPSMV_DN14957_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuPOTY_DN12963_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN7136_c0_g1_i4	(AT)6	12
VuCPSMV_DN1368_c0_g2_i2	(AT)6	12	VuPOTY_DN1310_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN7726_c0_g1_i13	(AT)6	12
VuCPSMV_DN7778_c1_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN1478_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN4493_c0_g1_i4	(AT)6	12
VuCPSMV_DN18152_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuPOTY_DN15205_c1_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN29714_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8916_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN16704_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN7743_c0_g1_i3	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8916_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuPOTY_DN16704_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN7743_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN14838_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN16816_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN17913_c0_g1_i1	(AT)6	12

Continuação tabela suplementar 01

								12
VuCPSMV_DN13741_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN17507_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN51072_c0_g1_i1	(AT)6	
VuCPSMV_DN26414_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN21001_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN47427_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8000_c0_g1_i11	(AT)6	12	VuPOTY_DN2602_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN2870_c0_g1_i9	(AT)6	12
VuCPSMV_DN20995_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN26175_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN108097_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN7275_c0_g1_i9	(AT)6	12	VuPOTY_DN3769_c0_g1_i10	(AT)6	12	VuSECA_DN5795_c0_g1_i12	(AT)6	12
VuCPSMV_DN7275_c0_g1_i25	(AT)6	12	VuPOTY_DN3769_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuSECA_DN5795_c0_g1_i21	(AT)6	12
VuCPSMV_DN15266_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN37917_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN22727_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN53544_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN37980_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN153302_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN3385_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN4011_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN7768_c0_g1_i2	(AT)6	12
VuCPSMV_DN3385_c0_g1_i6	(AT)6	12	VuPOTY_DN4011_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN7768_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN11755_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN4771_c1_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN23871_c0_g1_i10	(AT)6	12
VuCPSMV_DN2850_c0_g1_i3	(AT)6	12	VuPOTY_DN4873_c0_g1_i3	(AT)6	12	VuSECA_DN6712_c0_g1_i8	(AT)6	12
VuCPSMV_DN2850_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuPOTY_DN4873_c0_g1_i5	(AT)6	12	VuSECA_DN6712_c0_g1_i6	(AT)6	12
VuCPSMV_DN52332_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN51961_c0_g1_i2	(AT)7	14	VuSECA_DN14450_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN48182_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN55609_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN86183_c0_g1_i1	(AT)6	12
VuCPSMV_DN7050_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuPOTY_DN6492_c1_g1_i6	(AT)7	14	VuSECA_DN1584_c1_g1_i1	(AT)8	16
VuCPSMV_DN8444_c0_g1_i5	(AT)6	12	VuPOTY_DN8252_c0_g1_i2	(AT)6	12	VuSECA_DN9719_c0_g1_i2	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8444_c0_g1_i7	(AT)6	12	VuPOTY_DN8252_c0_g1_i4	(AT)6	12	VuSECA_DN9719_c0_g1_i4	(AT)6	12
VuCPSMV_DN8444_c0_g1_i8	(AT)6	12	VuPOTY_DN8252_c0_g1_i5	(AT)6	12	VuSECA_DN9719_c0_g1_i6	(AT)6	12
VuCPSMV_DN50898_c0_g1_i1	(CA)6	12	VuPOTY_DN346_c1_g1_i1	(CA)6	12	VuSECA_DN120747_c0_g1_i1	(CA)6	12
VuCPSMV_DN17281_c0_g1_i1	(CA)6	12	VuPOTY_DN40504_c0_g1_i1	(CA)6	12	VuSECA_DN24125_c0_g1_i1	(CA)6	12
VuCPSMV_DN11243_c0_g1_i3	(CA)6	12	VuPOTY_DN5612_c0_g1_i1	(CA)6	12	VuSECA_DN5962_c0_g1_i2	(CA)6	12
VuCPSMV_DN11243_c0_g1_i2	(CA)6	12	VuPOTY_DN5612_c0_g1_i3	(CA)6	12	VuSECA_DN5962_c0_g1_i4	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i3	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i10	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i24	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i5	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i12	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i2	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i4	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i14	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i7	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i6	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i15	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i11	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i8	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i2	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i8	(CA)6	12
VuCPSMV_DN4269_c0_g1_i2	(CA)6	12	VuPOTY_DN6201_c0_g1_i4	(CA)6	12	VuSECA_DN5040_c0_g1_i17	(CA)6	12
VuCPSMV_DN10541_c1_g1_i1	(CA)6	12	VuPOTY_DN778_c3_g1_i1	(CA)6	12	VuSECA_DN168_c0_g1_i3	(CA)7	14
VuCPSMV_DN10541_c1_g1_i10	(CA)6	12	VuPOTY_DN778_c3_g1_i2	(CA)6	12	VuSECA_DN168_c0_g1_i18	(CA)7	14
VuCPSMV_DN2014_c0_g1_i1	(CA)6	12	VuPOTY_DN7894_c0_g1_i3	(CA)7	14	VuSECA_DN6618_c0_g1_i5	(CA)6	12
VuCPSMV_DN2686_c0_g1_i3	(CG)6	12	VuPOTY_DN7839_c0_g1_i3	(CG)6	12	VuSECA_DN8330_c0_g1_i1	(CG)6	12
VuCPSMV_DN760_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN10617_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN10000_c0_g1_i7	(CT)7	14
VuCPSMV_DN7145_c0_g4_i3	(CT)6	12	VuPOTY_DN11390_c0_g2_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN484_c0_g1_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN7145_c0_g4_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN11390_c0_g2_i3	(CT)6	12	VuSECA_DN484_c0_g1_i4	(CT)6	12
VuCPSMV_DN11871_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN13844_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN23370_c0_g1_i4	(CT)6	12
VuCPSMV_DN3572_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN14433_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuSECA_DN20780_c0_g1_i2	(CT)6	12
VuCPSMV_DN38283_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN15645_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN29758_c1_g1_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN30632_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN1717_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN21519_c0_g1_i5	(CT)6	12
VuCPSMV_DN2747_c2_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN17906_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN84775_c0_g1_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN43737_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN37855_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN8480_c0_g1_i5	(CT)6	12

Continuação tabela suplementar 01

								12
VuCPSMV_DN9398_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN4337_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN3126_c0_g2_i2	(CT)6	
VuCPSMV_DN9398_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN4337_c0_g1_i3	(CT)6	12	VuSECA_DN3126_c0_g2_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN6974_c0_g1_i5	(CT)6	12	VuPOTY_DN4898_c0_g1_i34	(CT)6	12	VuSECA_DN7416_c0_g2_i3	(CT)6	12
VuCPSMV_DN6974_c0_g1_i12	(CT)6	12	VuPOTY_DN4898_c0_g1_i37	(CT)6	12	VuSECA_DN7416_c0_g2_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN6974_c0_g1_i11	(CT)6	12	VuPOTY_DN4898_c0_g1_i43	(CT)6	12	VuSECA_DN7416_c0_g2_i4	(CT)6	12
VuCPSMV_DN31061_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN51792_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN65544_c0_g1_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN7712_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuPOTY_DN5289_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuSECA_DN21951_c0_g1_i8	(CT)6	12
VuCPSMV_DN7712_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN5289_c0_g1_i3	(CT)6	12	VuSECA_DN21951_c0_g1_i9	(CT)6	12
VuCPSMV_DN8510_c1_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN53811_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN22434_c0_g1_i3	(CT)6	12
VuCPSMV_DN4149_c0_g1_i9	(CT)6	12	VuPOTY_DN6042_c0_g1_i13	(CT)6	12	VuSECA_DN4243_c0_g1_i7	(CT)6	12
VuCPSMV_DN4149_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuPOTY_DN6042_c0_g1_i5	(CT)6	12	VuSECA_DN4243_c0_g1_i2	(CT)6	12
VuCPSMV_DN12973_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuPOTY_DN6202_c0_g1_i1	(CT)6	12	VuSECA_DN15340_c0_g1_i1	(CT)6	12
VuCPSMV_DN12973_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuPOTY_DN6202_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuSECA_DN15340_c0_g1_i2	(CT)6	12
VuCPSMV_DN7047_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN642_c0_g1_i6	(CT)6	12	VuSECA_DN8386_c0_g1_i3	(CT)6	12
VuCPSMV_DN5197_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN6434_c0_g1_i10	(CT)6	12	VuSECA_DN5064_c0_g1_i6	(CT)6	12
VuCPSMV_DN5197_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuPOTY_DN6434_c0_g1_i7	(CT)6	12	VuSECA_DN5064_c0_g1_i2	(CT)6	12
VuCPSMV_DN4375_c0_g1_i2	(CT)6	12	VuPOTY_DN9351_c0_g1_i3	(CT)6	12	VuSECA_DN4814_c0_g1_i4	(CT)6	12
VuCPSMV_DN4375_c0_g1_i3	(CT)6	12	VuPOTY_DN9351_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuSECA_DN4814_c0_g1_i3	(CT)6	12
VuCPSMV_DN1733_c0_g1_i2	(GA)6	12	VuPOTY_DN12955_c0_g1_i2	(GA)6	12	VuSECA_DN121670_c0_g1_i2	(GA)6	12
VuCPSMV_DN2620_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN1494_c0_g2_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN3095_c0_g3_i17	(GA)6	12
VuCPSMV_DN5743_c0_g1_i11	(GA)6	12	VuPOTY_DN2232_c0_g1_i7	(GA)6	12	VuSECA_DN7466_c0_g1_i18	(GA)6	12
VuCPSMV_DN14808_c0_g1_i3	(GA)6	12	VuPOTY_DN23219_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN32836_c0_g1_i2	(GA)6	12
VuCPSMV_DN4877_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN24740_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN8268_c0_g1_i2	(GA)6	12
VuCPSMV_DN4877_c0_g1_i4	(GA)6	12	VuPOTY_DN24740_c0_g1_i2	(GA)6	12	VuSECA_DN8268_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN1201_c0_g1_i4	(GA)6	12	VuPOTY_DN2494_c0_g2_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN24420_c0_g1_i3	(GA)6	12
VuCPSMV_DN45985_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN25090_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN51366_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN43980_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN36951_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN71685_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN5369_c0_g1_i3	(GA)6	12	VuPOTY_DN3942_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN120749_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN3856_c1_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN428_c0_g2_i2	(GA)8	16	VuSECA_DN7839_c1_g1_i1	(GA)8	16
VuCPSMV_DN30563_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN43684_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN131094_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN23072_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN44065_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN3389_c1_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN17209_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN5015_c0_g1_i3	(GA)6	12	VuSECA_DN6829_c0_g2_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN2695_c0_g1_i14	(GA)6	12	VuPOTY_DN5455_c1_g1_i3	(GA)6	12	VuSECA_DN1199_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN2695_c0_g1_i16	(GA)6	12	VuPOTY_DN5455_c1_g1_i4	(GA)6	12	VuSECA_DN1199_c0_g1_i7	(GA)6	12
VuCPSMV_DN3772_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN6247_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN8567_c0_g1_i1	(GA)6	12
VuCPSMV_DN3772_c0_g1_i6	(GA)6	12	VuPOTY_DN6247_c0_g1_i2	(GA)6	12	VuSECA_DN8567_c0_g1_i4	(GA)6	12
VuCPSMV_DN3772_c0_g1_i4	(GA)6	12	VuPOTY_DN6247_c0_g1_i4	(GA)6	12	VuSECA_DN8567_c0_g1_i3	(GA)6	12
VuCPSMV_DN6803_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuPOTY_DN8105_c0_g1_i1	(GA)6	12	VuSECA_DN14176_c0_g1_i9	(GA)6	12
VuCPSMV_DN6338_c0_g1_i2	(GA)6	12	VuPOTY_DN8212_c0_g1_i7	(GA)6	12	VuSECA_DN6749_c0_g1_i7	(GA)6	12
VuCPSMV_DN23715_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuPOTY_DN11479_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuSECA_DN5385_c0_g1_i1	(GT)6	12
VuCPSMV_DN12833_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuPOTY_DN11876_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuSECA_DN11166_c0_g1_i3	(GT)6	12
VuCPSMV_DN12833_c0_g1_i2	(GT)6	12	VuPOTY_DN11876_c0_g1_i2	(GT)6	12	VuSECA_DN11166_c0_g1_i2	(GT)6	12

Continuação tabela suplementar 01

VuCPSMV_DN12634_c0_g1_i2	(GT)6	12	VuPOTY_DN12436_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuSECA_DN3106_c0_g1_i1	(GT)6	12
VuCPSMV_DN5244_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuPOTY_DN14052_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuSECA_DN8003_c0_g1_i5	(GT)6	12
VuCPSMV_DN1795_c0_g2_i8	(GT)6	12	VuPOTY_DN3036_c0_g1_i11	(GT)6	12	VuSECA_DN8807_c0_g1_i1	(GT)6	12
VuCPSMV_DN1612_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuPOTY_DN520_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuSECA_DN579_c0_g1_i1	(GT)6	12
VuCPSMV_DN1612_c0_g1_i4	(GT)6	12	VuPOTY_DN520_c0_g1_i2	(GT)6	12	VuSECA_DN579_c0_g1_i2	(GT)6	12
VuCPSMV_DN11149_c0_g1_i1	(GT)6	12	VuPOTY_DN6523_c0_g1_i2	(GT)7	14	VuSECA_DN38448_c0_g1_i1	(GT)6	12
VuCPSMV_DN18028_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN10086_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN3813_c0_g1_i23	(TA)6	12
VuCPSMV_DN4583_c0_g1_i5	(TA)6	12	VuPOTY_DN11156_c0_g2_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN2724_c0_g2_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN4583_c0_g1_i9	(TA)6	12	VuPOTY_DN11156_c0_g2_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN2724_c0_g2_i5	(TA)6	12
VuCPSMV_DN8430_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN11668_c0_g1_i3	(TA)6	12	VuSECA_DN18218_c0_g1_i3	(TA)6	12
VuCPSMV_DN12101_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN13776_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN4936_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN12101_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN13776_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN4936_c0_g1_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN3880_c0_g2_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN14564_c0_g1_i3	(TA)6	12	VuSECA_DN24324_c0_g1_i7	(TA)6	12
VuCPSMV_DN12271_c0_g1_i6	(TA)6	12	VuPOTY_DN1572_c0_g2_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN2209_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN14980_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN16803_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN18721_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN25637_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN18804_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN145371_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN15155_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN23534_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN17169_c0_g1_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN18401_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN28089_c0_g1_i2	(TA)7	14	VuSECA_DN30998_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN3235_c0_g1_i5	(TA)6	12	VuPOTY_DN2931_c0_g1_i8	(TA)6	12	VuSECA_DN6115_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN6304_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN3365_c0_g1_i3	(TA)6	12	VuSECA_DN7788_c0_g1_i3	(TA)6	12
VuCPSMV_DN11719_c0_g1_i5	(TA)6	12	VuPOTY_DN3703_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN16595_c0_g1_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN9027_c0_g1_i3	(TA)6	12	VuPOTY_DN4008_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN10937_c0_g1_i2	(TA)8	16
VuCPSMV_DN9027_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN4008_c0_g1_i6	(TA)7	14	VuSECA_DN10937_c0_g1_i1	(TA)8	16
VuCPSMV_DN1287_c0_g2_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN4112_c0_g1_i10	(TA)6	12	VuSECA_DN698_c0_g2_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN17502_c0_g1_i6	(TA)6	12	VuPOTY_DN4198_c0_g1_i7	(TA)6	12	VuSECA_DN2627_c0_g1_i3	(TA)6	12
VuCPSMV_DN5015_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN4227_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN3582_c0_g1_i4	(TA)6	12
VuCPSMV_DN1682_c0_g1_i7	(TA)6	12	VuPOTY_DN4236_c0_g2_i5	(TA)6	12	VuSECA_DN10524_c0_g1_i11	(TA)6	12
VuCPSMV_DN2185_c0_g2_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN442_c0_g2_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN5580_c0_g1_i8	(TA)6	12
VuCPSMV_DN6180_c0_g1_i5	(TA)6	12	VuPOTY_DN4548_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuSECA_DN9275_c0_g2_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN51375_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN51151_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN125102_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN43887_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN51169_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN32683_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN7706_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN5476_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN6309_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN36907_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuPOTY_DN6506_c1_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN123737_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN15042_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN6557_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN5386_c1_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN5526_c0_g1_i9	(TA)6	12	VuPOTY_DN8437_c0_g1_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN9800_c0_g1_i3	(TA)6	12
VuCPSMV_DN3847_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN8686_c0_g2_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN10242_c0_g1_i1	(TA)6	12
VuCPSMV_DN9613_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN10482_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN4828_c1_g1_i2	(TC)6	12
VuCPSMV_DN9613_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN10482_c0_g1_i4	(TC)6	12	VuSECA_DN4828_c1_g1_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11415_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN10540_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN5564_c0_g1_i8	(TC)6	12
VuCPSMV_DN286_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN1297_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN534_c0_g1_i5	(TC)6	12
VuCPSMV_DN7935_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN15166_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN59068_c0_g1_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN15373_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN15409_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN28987_c0_g1_i2	(TC)6	12

Continuação tabela suplementar 01

								12
VuCPSMV_DN1094_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN222_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN1288_c1_g2_i1	(TC)6	
VuCPSMV_DN2147_c0_g1_i13	(TC)6	12	VuPOTY_DN2249_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN1279_c0_g2_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN3233_c0_g2_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN2709_c0_g1_i8	(TC)9	18	VuSECA_DN414_c0_g1_i10	(TC)9	18
VuCPSMV_DN1885_c0_g2_i6	(TC)6	12	VuPOTY_DN2779_c0_g2_i11	(TC)6	12	VuSECA_DN2151_c2_g1_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN15226_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN37529_c0_g1_i1	(TC)8	16	VuSECA_DN4826_c1_g1_i3	(TC)8	16
VuCPSMV_DN4186_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN4493_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN4031_c0_g1_i8	(TC)6	12
VuCPSMV_DN4186_c0_g1_i7	(TC)6	12	VuPOTY_DN4493_c0_g1_i6	(TC)6	12	VuSECA_DN4031_c0_g1_i9	(TC)6	12
VuCPSMV_DN4186_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN4493_c0_g1_i7	(TC)6	12	VuSECA_DN4031_c0_g1_i5	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11536_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN4746_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuSECA_DN9263_c0_g1_i2	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11536_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuPOTY_DN4746_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN9263_c0_g1_i3	(TC)6	12
VuCPSMV_DN5158_c0_g1_i6	(TC)6	12	VuPOTY_DN5281_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN17232_c0_g1_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN5158_c0_g1_i11	(TC)6	12	VuPOTY_DN5281_c0_g1_i4	(TC)6	12	VuSECA_DN17232_c0_g1_i2	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11995_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN6035_c0_g2_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN7882_c0_g1_i4	(TC)6	12
VuCPSMV_DN877_c0_g1_i4	(TC)6	12	VuPOTY_DN6314_c1_g5_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN3579_c0_g2_i3	(TC)7	14
VuCPSMV_DN1369_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuPOTY_DN639_c0_g2_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN5556_c0_g1_i3	(TC)6	12
VuCPSMV_DN4519_c0_g1_i9	(TC)6	12	VuPOTY_DN6574_c0_g1_i2	(TC)6	12	VuSECA_DN7887_c0_g1_i1	(TC)6	12
VuCPSMV_DN4519_c0_g1_i4	(TC)6	12	VuPOTY_DN6574_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuSECA_DN7887_c0_g1_i4	(TC)6	12
VuCPSMV_DN4519_c0_g1_i7	(TC)6	12	VuPOTY_DN6574_c0_g1_i5	(TC)6	12	VuSECA_DN7887_c0_g1_i3	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11890_c0_g1_i5	(TC)6	12	VuPOTY_DN8490_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuSECA_DN7614_c0_g1_i9	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11890_c0_g1_i3	(TC)6	12	VuPOTY_DN8490_c0_g1_i5	(TC)6	12	VuSECA_DN7614_c0_g1_i8	(TC)6	12
VuCPSMV_DN11890_c0_g1_i4	(TC)6	12	VuPOTY_DN8490_c0_g1_i6	(TC)6	12	VuSECA_DN7614_c0_g1_i18	(TC)6	12
VuCPSMV_DN14202_c0_g1_i1	(TG)6	12	VuPOTY_DN8244_c0_g1_i3	(TG)6	12	VuSECA_DN10340_c0_g1_i2	(TG)6	12
VuCPSMV_DN52300_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN10864_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN8372_c0_g1_i2	(AG)7	14
VuCPSMV_DN4976_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuPOTY_DN11027_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN21801_c0_g1_i4	(AG)7	14
VuCPSMV_DN4976_c0_g1_i5	(AG)7	14	VuPOTY_DN11027_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuSECA_DN21801_c0_g1_i3	(AG)7	14
VuCPSMV_DN3983_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN13000_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN10957_c0_g1_i7	(AG)7	14
VuCPSMV_DN3983_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN13000_c0_g1_i3	(AG)7	14	VuSECA_DN10957_c0_g1_i10	(AG)7	14
VuCPSMV_DN1002_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuPOTY_DN1376_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN4152_c1_g1_i1	(AG)7	14
VuCPSMV_DN16908_c2_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN23578_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN38957_c1_g1_i1	(AG)7	14
VuCPSMV_DN838_c0_g1_i7	(AG)7	14	VuPOTY_DN3724_c1_g2_i2	(AG)6	12	VuSECA_DN2345_c0_g1_i7	(AG)7	14
VuCPSMV_DN2894_c1_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN415_c2_g1_i2	(AG)7	14	VuSECA_DN3547_c0_g2_i2	(AG)7	14
VuCPSMV_DN6719_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN4430_c0_g1_i3	(AG)7	14	VuSECA_DN10417_c0_g1_i4	(AG)7	14
VuCPSMV_DN6719_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN4430_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuSECA_DN10417_c0_g1_i3	(AG)7	14
VuCPSMV_DN8600_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN4441_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN18955_c0_g1_i3	(AG)7	14
VuCPSMV_DN8600_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN4441_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuSECA_DN18955_c0_g1_i2	(AG)7	14
VuCPSMV_DN6216_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN5871_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN11516_c0_g1_i4	(AG)7	14
VuCPSMV_DN6216_c0_g1_i5	(AG)7	14	VuPOTY_DN5871_c0_g1_i3	(AG)7	14	VuSECA_DN11516_c0_g1_i3	(AG)7	14
VuCPSMV_DN6216_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN5871_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuSECA_DN11516_c0_g1_i6	(AG)7	14
VuCPSMV_DN1092_c0_g2_i1	(AG)7	14	VuPOTY_DN589_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN97_c0_g2_i2	(AG)6	12
VuCPSMV_DN5112_c0_g1_i3	(AG)7	14	VuPOTY_DN6491_c0_g1_i2	(AG)8	16	VuSECA_DN6525_c0_g1_i9	(AG)7	14
VuCPSMV_DN10657_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN7109_c0_g1_i5	(AG)7	14	VuSECA_DN34061_c0_g1_i1	(AG)7	14
VuCPSMV_DN417_c0_g1_i8	(AG)7	14	VuPOTY_DN9010_c0_g1_i1	(AG)7	14	VuSECA_DN16489_c0_g1_i2	(AG)7	14

Continuação tabela suplementar 01

VuCPSMV_DN417_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuPOTY_DN9010_c0_g1_i2	(AG)7	14	VuSECA_DN16489_c0_g1_i1	(AG)7	14
VuCPSMV_DN417_c0_g1_i7	(AG)7	14	VuPOTY_DN9010_c0_g1_i4	(AG)7	14	VuSECA_DN16489_c0_g1_i3	(AG)7	14
VuCPSMV_DN16795_c0_g1_i2	(AT)7	14	VuPOTY_DN10691_c0_g1_i2	(AT)10	20	VuSECA_DN13621_c0_g1_i3	(AT)7	14
VuCPSMV_DN16795_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN10691_c0_g1_i4	(AT)10	20	VuSECA_DN13621_c0_g1_i2	(AT)7	14
VuCPSMV_DN4761_c0_g1_i10	(AT)7	14	VuPOTY_DN1263_c0_g1_i6	(AT)8	16	VuSECA_DN2080_c1_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN6874_c0_g1_i14	(AT)7	14	VuPOTY_DN12883_c0_g1_i1	(AT)10	20	VuSECA_DN2200_c0_g1_i4	(AT)10	20
VuCPSMV_DN6874_c0_g1_i5	(AT)7	14	VuPOTY_DN12883_c0_g1_i12	(AT)10	20	VuSECA_DN2200_c0_g1_i7	(AT)10	20
VuCPSMV_DN6874_c0_g1_i10	(AT)7	14	VuPOTY_DN12883_c0_g1_i2	(AT)10	20	VuSECA_DN2200_c0_g1_i5	(AT)10	20
VuCPSMV_DN6874_c0_g1_i12	(AT)7	14	VuPOTY_DN12883_c0_g1_i8	(AT)10	20	VuSECA_DN2200_c0_g1_i6	(AT)10	20
VuCPSMV_DN52111_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN19954_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN16648_c0_g1_i2	(AT)7	14
VuCPSMV_DN1093_c0_g2_i3	(AT)7	14	VuPOTY_DN245_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN11848_c0_g2_i4	(AT)7	14
VuCPSMV_DN1093_c0_g2_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN245_c0_g1_i2	(AT)7	14	VuSECA_DN11848_c0_g2_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN1093_c0_g2_i6	(AT)7	14	VuPOTY_DN245_c0_g1_i3	(AT)7	14	VuSECA_DN11848_c0_g2_i3	(AT)7	14
VuCPSMV_DN1093_c0_g2_i5	(AT)7	14	VuPOTY_DN245_c0_g1_i6	(AT)7	14	VuSECA_DN11848_c0_g2_i2	(AT)7	14
VuCPSMV_DN18347_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN39040_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN14901_c0_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN19126_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN43885_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN37129_c0_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN50978_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN50714_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN18780_c0_g1_i2	(AT)11	22
VuCPSMV_DN48617_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN50932_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN43520_c0_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN1355_c0_g1_i8	(AT)7	14	VuPOTY_DN820_c0_g2_i6	(AT)7	14	VuSECA_DN10396_c0_g1_i9	(AT)7	14
VuCPSMV_DN4517_c0_g1_i3	(AT)7	14	VuPOTY_DN9337_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuSECA_DN2829_c0_g1_i3	(AT)7	14
VuCPSMV_DN4517_c0_g1_i1	(AT)7	14	VuPOTY_DN9337_c0_g1_i6	(AT)7	14	VuSECA_DN2829_c0_g1_i4	(AT)7	14
VuCPSMV_DN7994_c0_g1_i3	(CA)7	14	VuPOTY_DN1143_c0_g1_i1	(CA)7	14	VuSECA_DN13343_c0_g1_i4	(CA)7	14
VuCPSMV_DN7994_c0_g1_i2	(CA)7	14	VuPOTY_DN1143_c0_g1_i2	(CA)7	14	VuSECA_DN13343_c0_g1_i1	(CA)7	14
VuCPSMV_DN7994_c0_g1_i1	(CA)7	14	VuPOTY_DN1143_c0_g1_i4	(CA)7	14	VuSECA_DN13343_c0_g1_i3	(CA)7	14
VuCPSMV_DN37427_c0_g1_i1	(CA)7	14	VuPOTY_DN23491_c0_g1_i1	(CA)10	20	VuSECA_DN21997_c0_g1_i2	(CA)7	14
VuCPSMV_DN26794_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN12447_c0_g1_i4	(CT)7	14	VuSECA_DN101003_c0_g1_i1	(CT)7	14
VuCPSMV_DN27004_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN21300_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuSECA_DN110775_c0_g1_i1	(CT)7	14
VuCPSMV_DN50454_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN29574_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuSECA_DN1103_c0_g1_i6	(CT)7	14
VuCPSMV_DN3410_c0_g1_i2	(CT)7	14	VuPOTY_DN3198_c0_g1_i4	(CT)6	12	VuSECA_DN736_c1_g1_i2	(CT)7	14
VuCPSMV_DN3630_c1_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN42053_c0_g1_i1	(CT)21	42	VuSECA_DN59680_c0_g1_i1	(CT)12	24
VuCPSMV_DN3321_c0_g1_i6	(CT)7	14	VuPOTY_DN4868_c0_g2_i1	(CT)7	14	VuSECA_DN15020_c0_g1_i7	(CT)7	14
VuCPSMV_DN7869_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN7082_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuSECA_DN5630_c0_g1_i1	(CT)7	14
VuCPSMV_DN7869_c0_g1_i2	(CT)7	14	VuPOTY_DN7082_c0_g1_i4	(CT)7	14	VuSECA_DN5630_c0_g1_i2	(CT)7	14
VuCPSMV_DN11401_c0_g1_i3	(CT)7	14	VuPOTY_DN7539_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuSECA_DN12761_c0_g1_i4	(CT)7	14
VuCPSMV_DN11477_c0_g1_i1	(CT)7	14	VuPOTY_DN9280_c0_g1_i2	(CT)7	14	VuSECA_DN16358_c0_g1_i1	(CT)7	14
VuCPSMV_DN1352_c1_g1_i5	(CT)7	14	VuPOTY_DN9708_c0_g1_i2	(CT)7	14	VuSECA_DN13896_c0_g1_i8	(CT)7	14
VuCPSMV_DN1352_c1_g1_i4	(CT)7	14	VuPOTY_DN9708_c0_g1_i7	(CT)7	14	VuSECA_DN13896_c0_g1_i2	(CT)7	14
VuCPSMV_DN10333_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuPOTY_DN10423_c0_g1_i1	(GA)8	16	VuSECA_DN3069_c0_g1_i2	(GA)8	16
VuCPSMV_DN10333_c0_g1_i2	(GA)7	14	VuPOTY_DN10423_c0_g1_i2	(GA)8	16	VuSECA_DN3069_c0_g1_i1	(GA)8	16
VuCPSMV_DN55599_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuPOTY_DN34464_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuSECA_DN76881_c0_g1_i1	(GA)7	14
VuCPSMV_DN792_c0_g1_i17	(GA)7	14	VuPOTY_DN4344_c0_g1_i10	(GA)7	14	VuSECA_DN15533_c0_g1_i1	(GA)7	14
VuCPSMV_DN792_c0_g1_i14	(GA)7	14	VuPOTY_DN4344_c0_g1_i12	(GA)7	14	VuSECA_DN15533_c0_g1_i7	(GA)7	14

Continuação tabela suplementar 01

								14
VuCPSMV_DN616_c0_g1_i3	(GA)7	14	VuPOTY_DN53553_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuSECA_DN148544_c0_g1_i1	(GA)7	14
VuCPSMV_DN11684_c0_g1_i20	(GA)7	14	VuPOTY_DN5769_c0_g1_i2	(GA)7	14	VuSECA_DN3554_c0_g1_i14	(GA)7	14
VuCPSMV_DN11684_c0_g1_i22	(GA)7	14	VuPOTY_DN5769_c0_g1_i4	(GA)7	14	VuSECA_DN3554_c0_g1_i3	(GA)7	14
VuCPSMV_DN6150_c0_g1_i2	(GA)7	14	VuPOTY_DN596_c0_g1_i2	(GA)8	16	VuSECA_DN11046_c0_g1_i3	(GA)8	16
VuCPSMV_DN5872_c0_g1_i2	(GA)7	14	VuPOTY_DN6017_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuSECA_DN13573_c0_g1_i6	(GA)9	18
VuCPSMV_DN5872_c0_g1_i4	(GA)7	14	VuPOTY_DN6017_c0_g1_i3	(GA)7	14	VuSECA_DN13573_c0_g1_i2	(GA)9	18
VuCPSMV_DN5872_c0_g1_i3	(GA)7	14	VuPOTY_DN6017_c0_g1_i5	(GA)7	14	VuSECA_DN13573_c0_g1_i1	(GA)9	18
VuCPSMV_DN5872_c0_g1_i1	(GA)7	14	VuPOTY_DN6017_c0_g1_i6	(GA)7	14	VuSECA_DN13573_c0_g1_i5	(GA)9	18
VuCPSMV_DN8087_c0_g1_i6	(GA)7	14	VuPOTY_DN9568_c0_g1_i2	(GA)7	14	VuSECA_DN4904_c0_g1_i6	(GA)7	14
VuCPSMV_DN8315_c0_g1_i2	(GT)7	14	VuPOTY_DN2870_c1_g1_i1	(GT)7	14	VuSECA_DN1646_c0_g1_i1	(GT)7	14
VuCPSMV_DN8315_c0_g1_i1	(GT)7	14	VuPOTY_DN2870_c1_g1_i2	(GT)7	14	VuSECA_DN1646_c0_g1_i3	(GT)7	14
VuCPSMV_DN8944_c0_g1_i1	(GT)7	14	VuPOTY_DN9221_c0_g1_i1	(GT)8	16	VuSECA_DN22339_c0_g1_i2	(GT)9	18
VuCPSMV_DN7823_c0_g1_i3	(TA)7	14	VuPOTY_DN11233_c0_g1_i4	(TA)7	14	VuSECA_DN99031_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN9921_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN11262_c0_g1_i2	(TA)7	14	VuSECA_DN12705_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN11146_c0_g1_i3	(TA)7	14	VuPOTY_DN14699_c0_g2_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN22540_c0_g1_i2	(TA)7	14
VuCPSMV_DN50619_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN15019_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN2163_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN10473_c1_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN15307_c0_g1_i2	(TA)11	22	VuSECA_DN13631_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN30940_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN26072_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN49253_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN23261_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN30224_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN53351_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN2998_c0_g1_i6	(TA)7	14	VuPOTY_DN3240_c0_g1_i4	(TA)7	14	VuSECA_DN4305_c0_g1_i5	(TA)11	22
VuCPSMV_DN2998_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN3240_c0_g1_i7	(TA)7	14	VuSECA_DN4305_c0_g1_i4	(TA)11	22
VuCPSMV_DN3093_c0_g1_i3	(TA)7	14	VuPOTY_DN3416_c0_g2_i1	(TA)6	12	VuSECA_DN2955_c0_g1_i6	(TA)6	12
VuCPSMV_DN4190_c0_g1_i4	(TA)7	14	VuPOTY_DN5290_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN18770_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN4190_c0_g1_i8	(TA)7	14	VuPOTY_DN5290_c0_g1_i3	(TA)7	14	VuSECA_DN18770_c0_g1_i2	(TA)7	14
VuCPSMV_DN4190_c0_g1_i5	(TA)7	14	VuPOTY_DN5290_c0_g1_i6	(TA)7	14	VuSECA_DN18770_c0_g1_i3	(TA)7	14
VuCPSMV_DN9988_c0_g1_i2	(TA)7	14	VuPOTY_DN5497_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN14833_c0_g1_i1	(TA)7	14
VuCPSMV_DN9988_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuPOTY_DN5497_c0_g1_i2	(TA)7	14	VuSECA_DN14833_c0_g1_i2	(TA)7	14
VuCPSMV_DN14295_c0_g1_i3	(TC)7	14	VuPOTY_DN10841_c0_g1_i2	(TC)7	14	VuSECA_DN6035_c0_g1_i2	(TC)7	14
VuCPSMV_DN5690_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN13243_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN124_c1_g1_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN10337_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN13608_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN3857_c1_g1_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN15152_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN14342_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN29289_c0_g1_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN15152_c0_g1_i2	(TC)7	14	VuPOTY_DN14342_c0_g1_i2	(TC)7	14	VuSECA_DN29289_c0_g1_i2	(TC)7	14
VuCPSMV_DN13209_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN16713_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN523_c1_g1_i5	(TC)9	18
VuCPSMV_DN1673_c0_g1_i4	(TC)7	14	VuPOTY_DN195_c0_g2_i2	(TC)9	18	VuSECA_DN27748_c0_g2_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN15025_c1_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN36549_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN12473_c0_g1_i4	(TC)7	14
VuCPSMV_DN1339_c2_g1_i2	(TC)7	14	VuPOTY_DN39409_c0_g1_i1	(TC)6	12	VuSECA_DN125525_c0_g1_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN46546_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuPOTY_DN5181_c0_g1_i2	(TC)7	14	VuSECA_DN4587_c0_g1_i2	(TC)7	14
VuCPSMV_DN4642_c0_g1_i7	(TC)7	14	VuPOTY_DN6832_c0_g1_i1	(TC)7	14	VuSECA_DN2088_c1_g1_i8	(TC)7	14
VuCPSMV_DN4642_c0_g1_i16	(TC)7	14	VuPOTY_DN6832_c0_g1_i10	(TC)7	14	VuSECA_DN2088_c1_g1_i1	(TC)7	14
VuCPSMV_DN4642_c0_g1_i14	(TC)7	14	VuPOTY_DN6832_c0_g1_i11	(TC)7	14	VuSECA_DN2088_c1_g1_i4	(TC)7	14
VuCPSMV_DN4642_c0_g1_i4	(TC)7	14	VuPOTY_DN6832_c0_g1_i3	(TC)7	14	VuSECA_DN2088_c1_g1_i9	(TC)7	14

Tabela suplementar 02: Relação dos transcritos que apresentam sequências de microssatélites polimorficos , usados para o desenho dos *primers*.

TRANSCRITO (SSR_CABMV)	SSR	TAMANHO (pb)	TRANSCRITO (SSR_CPSMV)	SSR	TAMANHO (pb)	TRANSCRITO (SSR_DR)	SSR	TAMANHO (pb)
VuCPSMV_DN377_c1_g1_i1	(CTT)7	21	VuPOTY_DN7529_c0_g1_i11	(CTT)6	18	VuSECA_DN3849_c1_g1_i2	(CTT)5	15
VuCPSMV_DN6728_c0_g1_i1	(TCA)5	15	VuPOTY_DN45419_c0_g1_i1	(TCA)6	18	VuSECA_DN59952_c0_g1_i1	(TCA)7	21
VuCPSMV_DN864_c0_g2_i2	(GAT)6	18	VuPOTY_DN1729_c0_g1_i2	(GAT)8	24	VuSECA_DN23411_c0_g2_i1	(GAT)7	21
VuCPSMV_DN1480_c0_g1_i1	(TGA)7	21	VuPOTY_DN18144_c0_g1_i1	(TGA)9	27	VuSECA_DN1176_c1_g1_i1	(TGA)8	24
VuCPSMV_DN18959_c0_g1_i2	(TGA)8	24	VuPOTY_DN5020_c1_g1_i1	(TGA)10	30	VuSECA_DN119560_c0_g1_i1	(TGA)11	33
VuCPSMV_DN8619_c0_g1_i6	(GAA)6	18	VuPOTY_DN5986_c0_g1_i2	(GAA)9	27	VuSECA_DN15423_c0_g1_i5	(GAA)8	24
VuCPSMV_DN16955_c0_g1_i1	(TC)20	40	VuPOTY_DN7122_c0_g2_i2	(TC)7	14	VuSECA_DN15440_c0_g1_i2	(TC)9	18
VuCPSMV_DN4247_c0_g1_i4	(TC)16	32	VuPOTY_DN2364_c0_g1_i2	(TC)9	18	VuSECA_DN2946_c0_g5_i1	(TC)13	26
VuCPSMV_DN11609_c0_g1_i1	(AG)19	38	VuPOTY_DN9913_c0_g1_i1	(AG)13	26	VuSECA_DN33675_c0_g1_i2	(AG)18	36
VuCPSMV_DN3170_c0_g1_i1	(CT)12	24	VuPOTY_DN2136_c0_g1_i15	(CT)7	14	VuSECA_DN8494_c0_g1_i3	(CT)15	30
VuCPSMV_DN7419_c0_g1_i1	(TC)13	26	VuPOTY_DN10355_c0_g1_i1	(TC)8	16	VuSECA_DN10018_c0_g1_i4	(TC)5	10
VuCPSMV_DN45006_c0_g1_i1	(CT)21	42	VuPOTY_DN31038_c0_g1_i1	(CT)18	36	VuSECA_DN109369_c0_g1_i1	(CT)3	6
VuCPSMV_DN17258_c0_g1_i1	(AG)20	40	VuPOTY_DN7147_c0_g1_i4	(AG)18	36	VuSECA_DN22024_c0_g1_i2	(AG)19	38
VuCPSMV_DN23908_c0_g1_i1	(AT)11	22	VuPOTY_DN22664_c1_g1_i1	(AT)9	18	VuSECA_DN86337_c0_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN44696_c0_g1_i1	(AT)8	16	VuPOTY_DN44589_c0_g1_i1	(AT)6	12	VuSECA_DN48047_c0_g1_i1	(AT)7	14
VuCPSMV_DN3965_c0_g1_i11	(AT)8	16	VuPOTY_DN7195_c0_g1_i12	(AT)6	12	VuSECA_DN27593_c0_g1_i2	(AT)9	18
VuCPSMV_DN2425_c1_g1_i1	(TC)11	22	VuPOTY_DN15001_c1_g1_i1	(TC)9	18	VuSECA_DN11538_c0_g1_i1	(TC)10	20
VuCPSMV_DN8944_c0_g1_i1	(GT)7	14	VuPOTY_DN9221_c0_g1_i1	(GT)8	16	VuSECA_DN22339_c0_g1_i2	(GT)9	18
VuCPSMV_DN8027_c0_g1_i1	(TA)11	22	VuPOTY_DN8728_c1_g1_i2	(TA)12	24	VuSECA_DN4378_c0_g1_i2	(TA)6	12
VuCPSMV_DN9027_c0_g1_i3	(TA)6	12	VuPOTY_DN4008_c0_g1_i1	(TA)7	14	VuSECA_DN10937_c0_g1_i2	(TA)8	16
VuCPSMV_DN9027_c0_g1_i2	(TA)6	12	VuPOTY_DN4008_c0_g1_i6	(TA)7	14	VuSECA_DN10937_c0_g1_i1	(TA)8	16
VuCPSMV_DN3564_c0_g2_i4	(AT)9	18	VuPOTY_DN10645_c0_g1_i3	(AT)11	22	VuSECA_DN26917_c0_g1_i1	(AT)10	20
VuCPSMV_DN46994_c0_g1_i1	(CT)10	20	VuPOTY_DN7098_c0_g1_i8	(CT)12	24	VuSECA_DN24221_c0_g1_i4	(CT)9	18
VuCPSMV_DN33324_c0_g1_i1	(TA)10	20	VuPOTY_DN40204_c0_g1_i1	(AT)12	24	VuSECA_DN126330_c0_g1_i1	(AT)6	12

VuCPSMV_DN9056_c0_g1_i2	(TC)12	24	VuPOTY_DN1068_c2_g1_i1	(TC)14	28	VuSECA_DN40544_c0_g1_i1	(TC)13	26
VuCPSMV_DN8343_c0_g1_i10	(TC)20	40	VuPOTY_DN3161_c1_g1_i10	(TC)22	44	VuSECA_DN5302_c0_g1_i12	(TC)19	38
VuCPSMV_DN8343_c0_g1_i4	(TC)20	40	VuPOTY_DN3161_c1_g1_i8	(TC)22	44	VuSECA_DN5302_c0_g1_i2	(TC)19	38
VuCPSMV_DN16734_c0_g1_i2	(TC)13	26	VuPOTY_DN50421_c0_g1_i1	(TC)18	36	VuSECA_DN24346_c0_g1_i2	(TC)19	38
VuCPSMV_DN16954_c0_g1_i1	(CT)12	24	VuPOTY_DN10456_c1_g1_i1	(CT)18	36	VuSECA_DN30978_c0_g1_i1	(CT)15	30
VuCPSMV_DN3630_c1_g1_i1	(CT)4	14	VuPOTY_DN42053_c0_g1_i1	(CT)21	42	VuSECA_DN59680_c0_g1_i1	(CT)12	24
