



RAFAEL NOVAIS DE MIRANDA

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR cDNA-RAPD
ENTRE CULTIVARES DE FEIJÃO INOCULADAS POR
*Sclerotinia sclerotiorum***

**LAVRAS - MG
2019**

RAFAEL NOVAIS DE MIRANDA

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR cDNA-RAPD ENTRE CULTIVARES
DE FEIJÃO INOCULADAS POR *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Miranda, Rafael Novais de.

Expressão Gênica Diferencial por cDNA-RAPD entre
Cultivares de Feijão Inoculadas por *Sclerotinia sclerotiorum* /
Rafael Novais de Miranda. - 2019.

79 p.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Sclerotinia sclerotiorum. 3. Diferencial
de expressão. I. Pereira, Welison Andrade. II. Título.

RAFAEL NOVAIS DE MIRANDA

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR cDNA-RAPD ENTRE CULTIVARES
DE FEIJÃO INOCULADAS POR *Sclerotinia sclerotiorum***

**DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION BY cDNA-RAPD BETWEEN BEE
CULTIVARS INOCULATED BY *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2019.

Dr. Evandro Novaes UFLA

Dra. Monik Evelin Leite IFCE

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

*A toda a minha família, que de forma direta e indireta, participou e apoiou esta minha etapa,
e que em momento algum, mediu esforços para que eu chegasse até onde cheguei. Foram
exemplos de amor e persistência na vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço especialmente a Deus, pela sua presença em minha vida, sempre me orientando e me auxiliando em momentos difíceis. A minha família, por todo amor, carinho, compreensão, apoio e ajuda em todos os momentos de minha vida, especialmente nesses últimos anos de mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos em Genética e melhoramento de Plantas e obter o título de Mestre. Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado.

Aos órgãos de fomento ao estudo e pesquisa, dentre eles FAPEMIG e CAPES, que nos auxiliou de forma direta e indireta, no financiamento de todas as pesquisas no laboratório.

Ao professor e orientador Welison Andrade Pereira, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, confiança, orientação e disponibilidade durante o curso. Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todos os ensinamentos e experiência transmitidos, dentre eles prof. Dr. Magno Ramalho Patto, prof. Dr. César Augusto Brasil, prof. Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves, prof. Dra. Elaine Aparecida de Souza, prof. Dr. João Cândido de Souza, prof. Dr. Evandro Novaes e prof. Dr. José Airton Rodrigues Nunes.

Aos amigos do laboratório de genética molecular, sempre dispostos a ajudar, dentre eles Antônio Carlos Porto, Fernanda Lopes, Luciana Miguel, Caroline Silva e Hugo Novaes, e em especial, ao Lamartine e à Gisele. Aos integrantes e técnicos dos laboratórios de Fisiologia Vegetal, Citogenética e Resistência de Plantas, que me auxiliaram e me orientaram nesses anos.

A todos os funcionários do DBI que me auxiliaram direta ou indiretamente, na realização do meu trabalho, dentre eles, Cléber, Lilian, Zélia, Rafaela, Iron e Patrícia. Ao Grupo de Estudos em Genética GEN, sempre presente e disposto a contribuir para o crescimento acadêmico dos discentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos amigos adquiridos da cidade de Lavras e a todos os amigos de minha cidade natal. A todos os meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)

RESUMO

O conhecimento do perfil transcricional de genótipos sob tratamentos específicos tem sido considerado como ferramenta de grande relevância para a compreensão molecular dos patossistemas, visando o conhecimento da resistência. O feijão é uma das culturas mais importantes da economia brasileira e suscetíveis a patógenos. O mofo branco é uma doença fúngica causada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e possui capacidade de reduzir drasticamente a produtividade do cultivo e, em condições favoráveis, essas perdas podem ser irreversíveis. Por isso, este trabalho tentou compreender de forma direta e indiretamente a ação do patógeno frente a cultura do feijão, e teve como objetivos: (i) avaliar ajustes de diferentes protocolos de kits comerciais de extração de RNA Total utilizando hastes de feijão inoculados com o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e, (ii) verificar, pela técnica cDNA-RAPD, a existência de variabilidade de expressão, e obter informações acerca do transcriptoma de cultivares suscetíveis e resistentes ao mofo branco, quando inoculadas pelo agente patogênico. A utilização da técnica RAPD em material expresso, utilizando 57 *primers* decâmeros, permitiu a visualização de amplificação de 255 locos, sendo que cerca de 136 destes, polimórficos, comprovando assim, a existência de variabilidade de expressão gênica com a identificação de putativos locos de interesse, através das diferenças qualitativas e quantitativas observadas entre os tratamentos inoculados e não inoculados, de ambas as linhagens.

Palavras-chave: cDNA-RAPD. PCR. *Sclerotinia sclerotiorum*. Diferencial de expressão. *Phaseolus vulgaris*.

GENERAL ABSTRACT

The knowledge of the transcriptional profile of genotypes under specific treatments has been considered as a tool of great relevance for the molecular understanding of the patossystems, aiming the knowledge of the resistance. Beans are one of the most important crops of the Brazilian economy and susceptible to pathogens. White mold, a fungal disease caused by the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, has the ability to drastically reduce crop yields, under favorable conditions these losses may be irreversible. Therefore, this work tried to understand directly and indirectly the action of the pathogen against the bean culture. Therefore, this study aimed to: (i) evaluate adjustments of different protocols of commercial Total RNA extraction kits using bean stems inoculated with the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* and, (ii) verify, by the cDNA-RAPD technique, the existence of variability of expression, and to obtain information about the transcriptome of susceptible and white mold resistant cultivars when inoculated by the pathogen. The use of the RAPD technique in express material using 57 decamer primers allowed the visualization of amplification of 255 loci, with about 136 of these polymorphic, thus proving the existence of variability of genetic expression, with the identification of putative loci of interest, through the qualitative and quantitative differences observed between the inoculated and uninoculated treatments of both strains.

Keywords: cDNA-RAPD. PCR. *Sclerotinia sclerotiorum*. Differential expression. *Phaseolus vulgaris*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO..... 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 16
2.1	Taxonomia e sintomatologia do mofo branco 16
2.2	Aspectos gerais da cultura do feijoeiro e da produção de grãos no brasil 18
2.3	Resistência genética do feijoeiro visando a resistência ao mofo branco 21
2.4	Marcadores moleculares do tipo rapd 23
2.5	Técnica de cDNA - RAPD 25
2.6	A importância do rna com alta integridade 26
	REFERÊNCIAS..... 28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS* 36
	ARTIGO 1 – PROTOCOL ADJUSTMENT IMPROVES THE EXTRACTION OF HIGH-QUALITY TOTAL RNA FROM COMMON BEAN STEMS INFECTED BY <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i> 37
	ARTIGO 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR CDNA-RAPD ENTRE CULTIVARES DE FEIJÃO INOCULADAS POR <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i>..... 57
1	INTRODUÇÃO..... 58
2	MATERIAL E MÉTODOS 59
2.1	Locais de ensaio..... 59
2.2	Materiais genéticos, condições experimentais e inoculações..... 60
2.3	Delineamento experimental e avaliação fenotípica..... 61
2.4	Coleta das hastes de feijoeiro 62
2.5	Extração de RNA total em hastes de feijoeiro e síntese de cDNA 62
2.6	Amplificação de PCR-RAPD 63
2.7	Análise dos fragmentos diferencialmente expressos..... 65
2.8	Análise estatística..... 65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 66
3.1	Validação do procedimento de inoculação 66
3.2	Quantificação e qualificação do RNA extraído..... 67
3.3	Análises cDNA-RAPD 69

5	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre as culturas de maior importância econômica e social para o Brasil, sendo que o estado de Minas Gerais se destaca entre os maiores produtores do país. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), a safra de 2019 está estimada em 238 milhões de toneladas, tendo um aumento médio de 4,6% em relação à safra anterior. Do ponto de vista de área produzida, observa-se um acréscimo de 1,2% em relação à área da safra anterior.

Nutricionalmente, o feijão está entre as principais fontes de proteína na alimentação dos brasileiros se destacando por ser fonte de ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (complexo B), carboidratos e fibras (MESQUITA et al., 2007).

Dada a relevância nutricional do feijão e, por consequência, sua importância econômica e social para a agricultura brasileira, tornou-se imperativo para o produtor enfrentar os desafios bióticos e abióticos responsáveis pela quebra da produtividade da cultura. Dentre eles, ressalta-se a ocorrência de doenças na lavoura. *Phaseolus vulgaris* L. é uma cultura sensível a diversos patógenos, que afetam o desenvolvimento e até mesmo a sobrevivência das plantas e, conseqüentemente, sua produção na lavoura.

Dentre as doenças mais relevantes do feijoeiro no Brasil pode-se destacar o mofo branco, causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (BOLTON et al., 2006). Este patógeno tem causado reduções substanciais em sua produtividade, assim como em outras culturas. No total, são mais de 400 espécies hospedeiras, sendo muitas delas espécies cultivadas, como a canola, alface, cenoura, girassol, dentre outras (BOLAND; HALL, 1994). Aparentemente, todas as plantas de folhas largas e de porte herbáceo podem ser hospedeiras do fungo, inclusive plantas daninhas (JUNIOR; NASSER, 2005).

Dentre os fatores que favorecem a incidência de *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary tem-se a alta densidade de plantio, períodos prolongados de precipitação, elevada umidade do ar, temperaturas amenas e plantio de cultivares suscetíveis (PURDY, 1979). Por estes requerimentos, pode-se afirmar que o período mais favorável para o desenvolvimento do fungo no estado de Minas Gerais acontece entre os meses de junho e setembro, quando a temperatura média é de 20 °C e as lavouras, implantadas em locais de irrigação, já atingiram o estágio reprodutivo (SARTORATO; RAVA, 1994).

O fungo *S. sclerotiorum* apresenta a capacidade de permanecer no solo na forma de escleródios e, a partir destes, reproduzir-se por germinação carpogênica ou miceliogênica (PURDY, 1979), sendo que a primeira germinação citada causa o desenvolvimento do

patógeno na parte aérea, e a segunda, o tombamento de pré e pós-emergência. O escleródio é uma forma de resistência que permite ao fungo permanecer inerte no solo por vários anos e germinar apenas quando as condições ambientais favoreçam seu desenvolvimento. Essa forma de resistência é um dos principais fatores que dificultam o controle da doença no campo (JUNIOR; NASSER, 2005).

Há diferentes estratégias para o controle de doenças fúngicas e de seus sintomas, sendo a maioria baseada em práticas culturais e aplicação de fungicidas. No entanto, a medida mais eficiente reside na utilização de linhagens ou cultivares geneticamente resistentes ao patógeno (SARTORATO; RAVA, 1994). A resistência genética vai de encontro a redução de custos e danos ambientais associados às demais atuações preventivas ou corretivas. O grande desafio no patossistema feijoeiro-mofo branco é a ausência de resistência completa entre as cultivares da espécie *Phaseolus vulgaris*, residindo em outras espécies do gênero, a expectativa de obtenção de genótipos com maiores níveis de resistência a *S. sclerotiorum* (MIKLAS et al., 2004). Por enquanto, a resistência parcial de alguns genótipos do feijão comum consiste no recurso genético mais próximo deste objetivo de melhoramento.

Acredita-se que o conhecimento sobre as bases moleculares da interação planta-patógeno possa ser de grande impacto para o melhoramento genético. Isto porque gera a possibilidade de sua aplicação direta como critério de seleção sobre populações segregantes. Mecanismos moleculares das vias de sinalização das plantas em resposta à infecção por patógenos são induzidos pelo estresse, os quais diferem entre várias perturbações, como ataque por patógenos, frio, calor, seca e salinidade do solo. Dentre vários mecanismos, estariam os fatores de modificações epigenômica, os quais seriam incitados por exposições sustentadas a agentes patogênicos, que resultam em característica estável de resistência ou tolerância. A regulação epigenômica, a qual inclui metilações e acetilações nas histonas e cromatinas, podem modular as respostas ao estresse, ativando ou reprimindo a transcrição, tendo papel significativo no controle de expressão gênica em plantas, afetando uma grande proporção de genes responsivos ao estresse, incluindo proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP, do inglês Pathogenesis related) e também genes envolvidos no fluxo de íons e morte celular (AYYAPPAN et al., 2015). Além desses, outros fatores também podem ser responsáveis pelas respostas de resistência ou suscetibilidade, como por exemplo, fatores associados aos fitohormônios.

Para estudos de diversidade genética, o DNA é o foco das atenções, por permitir a análise do genótipo por completo. Já o RNA, responsável por desempenhar papéis na codificação, decodificação, regulação e expressão gênica, torna-se a molécula primordial para

a investigação de como o genótipo se comporta diante de algum desafio ambiental, como por exemplo, dos estudos da família PGIIP (proteínas inibidores de poligalacturonases), os quais essas possuem papel fundamental na inibição da enzima Endopolygalacturonases (PGs) sintetizados por fungos durante a infecção na parede celular (OLIVEIRA et al., 2015). O estudo do RNA traz consigo desafios, principalmente por tratar de uma molécula instável e facilmente degradável, seja durante o processo de extração ou manipulação posterior, em estudos de expressão de genes. Neste sentido, o controle das condições de trabalho com o RNA é fundamental para preservar sua qualidade (LI et al., 2018).

A despeito dos desafios de se utilizar o RNA, análises transcricionais são importantes para se desvendar mecanismos de resistência às doenças, os quais, por sua vez, são responsáveis pela resistência mais ampla e robusta em plantas hospedeiras. Ao mesmo tempo, estes estudos fornecem uma compreensão mais vasta da resistência das plantas ao patógeno (AYYAPPAN et al., 2015).

Neste contexto, a obtenção de RNA com alta qualidade consiste na etapa definitiva para o sucesso ou fracasso de estudos de expressão gênica. São comumente relatadas na literatura, estratégias adaptadas para a extração de RNA de diferentes tecidos vegetais, nas quais se verificam as modificações necessárias para um processo efetivo. O mofo branco é uma doença que pode ser estudada pelo método de inoculação conhecido por *Straw test*, pelo qual a haste da planta de feijão é cortada, cerca de 3 cm da gema apical, e neste local é colocada uma ponteira contendo ágar e micélios do fungo, uniformizando o contato do micélio com a lesão vegetal. A partir deste ponto de inoculação, o progresso dos sintomas é avaliado (ARKWAZEE; MYERS, 2017). Uma vez que a haste é o local de inoculação, questionou-se se a expressão gênica nesta região traria algumas respostas no que se refere à suscetibilidade e resistência das cultivares ao patógeno. Logo, extrair RNA da haste da planta de feijão, consistiu na primeira etapa deste projeto. Uma vez que algumas tentativas de extração falharam em fornecer RNA em quantidade e qualidade adequadas, tornou-se objeto de estudo o ajuste de metodologias para extração de RNA de hastes de feijão inoculadas por isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*;

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo identificar Expressed Sequence Tags (ESTs) e comparar perfis transcricionais em hastes de feijão de cultivares suscetíveis e parcialmente resistentes ao mofo branco, quando inoculadas pelo patógeno. Para este fim, esta dissertação foi organizada em dois artigos, sendo o primeiro referente ao ajuste de protocolos para maior eficiência na extração de RNA total e, o segundo, alusivo à

aplicação de primers do tipo RAPD sobre bibliotecas de cDNAs para identificação de possíveis ESTs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia e sintomatologia do mofo branco

Dentro do gênero *Sclerotinia*, são citadas três espécies, a saber: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Sclerotinia minor* Jagger e *Sclerotinia trifoliorum* Eriks (KOHN et al., 1988; BOLTON et al., 2006). Das espécies citadas *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, pode ser considerada a mais devastadora, abrangente e importante (BOLTON et al., 2006). Este patógeno está amplamente distribuído em culturas de grãos secos e verdes nos países americanos, tanto na América do Norte quanto na América do Sul, incluindo os Estados Unidos, Canadá, Argentina e Brasil (SCHWARTZ; SINGH, 2013). No Brasil, a doença encontra-se mais concentrada e disseminada em regiões do Sul e Sudeste, as quais apresentam clima mais ameno. No entanto, áreas com altitudes mais elevadas do Centro-Oeste e Nordeste também apresentam disseminação do patógeno, devido as suas temperaturas noturnas mais baixas, propiciando o ambiente mais favorável ao patógeno (CASSETARI NETO; SILVA; MACHADO, 2010; JULIATTI; JULIATTI, 2010).

De acordo com Bolton et al. (2006), *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia*. Conforme os autores supracitados, os indivíduos desta espécie são hialinos, septados, ramificados e multinucleados. Produzem conídios, formas assexuadas de reprodução, além de escleródios, estruturas escuras e endurecidas com funções de promoção da sobrevivência do fungo na ausência de plantas hospedeiras. O nome ‘mofo branco’ é a denominação popular mais comum a doença, porém, mais de 60 nomes diferentes já foram utilizados para se referir a este patógeno, como podridão branca da haste, podridão da cabeça, podridão aquosa e podridão da haste (PURDY, 1979). A primeira denominação da espécie remete a 1837, como *Peziza sclerotiorum*, sendo alterada, posteriormente, para *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em 1979, por PURDY (1979), em homenagem ao pesquisador Bary, que utilizou o nome *S. sclerotiorum* pela primeira vez em 1884, quase um século antes (BOLTON et al., 2006).

Este fungo possui ampla diversidade de hospedeiros, sendo composta por mais de 400 espécies de plantas, dentre as quais destacam-se batata, tomate, soja, feijão, girassol, alface, dentre outras (PURDY, 1979; BOLAND; HALL, 1994; BOLTON et al., 2006). Para o feijoeiro, as quebras de safra devido a proliferação de *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary são em média de 30%, mas, podem chegar aos 100% em condições climáticas favoráveis ao

desenvolvimento da doença, e quando medidas preventivas não são tomadas em áreas contaminadas (OLIVEIRA et al., 2005; ANTONIO et al., 2008; LEITE et al., 2017). No caso de áreas contaminadas, a infecção pode se espalhar para outras plantas por meio do contato planta a planta (BOLTON et al., 2006). Garcia et al. (2012) relataram que o patógeno do mofo branco apresenta dois tipos de germinação, nomeadas miceliogênica e carpogênica. No primeiro tipo, o escleródio germina nos tecidos colonizados, produzindo o micélio e causando danos para a planta. No segundo tipo, formam-se apotécios, os quais emergem na superfície do solo e liberam ascósporos infectando diretamente a planta. Esses corpos miceliais densos e endurecidos podem permanecer no solo por até oito anos (ADAMS, 1979), aguardando as condições adequadas para sua germinação (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989). A persistência de inóculos no solo, em combinação com ampla gama de hospedeiros, contribui para o alto potencial de epidemias da doença na maioria dos campos de produção onde culturas suscetíveis são cultivadas (MIKLAS et al., 2013). De acordo com Leite (2005), os sinais apresentados pelo patógeno nos órgãos vegetais são visíveis tanto nas folhas, hastes e vagens, caracterizados por lesões encharcadas, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco, cobrindo porções dos tecidos.

Existem três estágios de desenvolvimento dos escleródios. O primeiro consiste na fase de iniciação (agregação de hifas para formar uma massa branca com aspecto cotonoso); o segundo envolve o desenvolvimento (crescimento de hifas e aumento de tamanho) e; o último, seria o de maturação (delimitação da superfície, deposição de melanina em células periféricas da casca e consolidação interna). Existem fatores ambientais e nutricionais que influenciam o desenvolvimento dos escleródios, como o nutriente do substrato, a idade do escleródio, umidade, temperatura, pH do solo, aeração, tipo de solo, dentre outros fatores (BOLTON et al., 2006).

Os mecanismos de transmissão e a dinâmica com que os patógenos acessam as plantas emergidas sob condições favoráveis para a sua atuação em campo de cultivo, são variáveis de acordo com a natureza do parasitismo de cada organismo (ARAÚJO, 2008). Os apotécios são as maiores fontes de inóculo do fungo, os quais produzem milhões de ascósporos, podendo ser transportados pelo vento por um raio que pode variar de 50 a 100 metros da fonte produtora (STEADMAN, 1983). Para que as germinações dos escleródios aconteçam, deve haver luz suficiente e temperatura entre 10-25°C (PHILLIPS, 1987).

Geralmente, o controle do mofo branco é realizado por práticas culturais, como rotação de cultura, aumento de espaçamento, prevenção de irrigação excessiva, e também pelo controle químico, o que engloba o fungicida. Essas práticas culturais reduzem a severidade da

doença, mas também contribuem para rendimentos mais baixos na ausência de pressão severa da doença (SOULE et al., 2011). As práticas químicas também possuem seus empecilhos, pois, além de serem onerosas, o modo e o tempo de aplicação são pontos críticos para o controle efetivo (MIKLAS et al., 2004). Dito isto, Soule et al. (2011) citaram que, o uso de cultivares parcialmente resistentes, em conjunto com práticas culturais e químicas adequadas, têm sido reconhecidos como a abordagem mais eficaz para reduzir a incidência do mofo branco na lavoura. Portanto, o meio mais eficiente e, conseqüentemente, econômico, de buscar resistência ao patógeno *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é o melhoramento genético de plantas. Esta alternativa é bastante complexa, devido ao fato da resistência contra esse patógeno ser uma característica poligênica ou quantitativa (HUANG et al., 2003; SOULE et al., 2011).

Acredita-se que a busca por genes associados à resposta da planta ao patógeno possa aumentar o nível de conhecimento e, portanto, propiciar condições favoráveis para a seleção de linhagens mais resistentes ao mofo branco, o que seria de grande importância para o melhoramento genético do feijoeiro.

2.2 Aspectos gerais da cultura do feijoeiro e da produção de grãos no Brasil

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais 5 são cultivadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A., Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greemman (DEBOUCK; TOHME, 1989).

A espécie *Phaseolus vulgaris* ($2n = 2x = 22$), popularmente conhecida por feijão comum, é a mais cultivada e, conseqüentemente, mais importante, devido ao seu valor nutricional para a alimentação humana, sendo uma das principais fontes de nutrientes e proteínas, principalmente em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (BROUGHTON et al., 2003; BARBOSA; GONZAGA, 2012; CORTÉS et al., 2012). Cultivares desta espécie são cultivadas em todos os continentes, com exceção da Antártica. Na América Latina, os feijões são plantados em regiões onde a temperatura média varia entre 17,5-25 °C, sendo que a grande maioria se encontra em locais com temperatura média de 21 °C. Essa grande adaptabilidade ao clima do continente americano se deve ao período de domesticação da cultura, quando o feijão se adaptou fortemente a temperaturas mais altas e fotoperíodos de duração mais longa (GEPTS, 1998). Além disso, as características agrônomicas e culturais credenciam a cultura do feijoeiro como excelente alternativa de

exploração agrícola para pequenas propriedades (BARBOSA; GONZAGA, 2012), contribuindo assim, para a aceitabilidade e disseminação da cultura no Brasil.

Existem 4 tipos de classificações da planta de feijoeiro que levam em consideração 3 características, que são, hábito de crescimento, hábito de comprimento dos internódios e capacidade ou não de emitir guias. As plantas do tipo 1 são classificadas pelo hábito de crescimento determinado, arbustivo, com ramificações eretas e fechadas, além de possuírem internódios mais curtos. Plantas do tipo 2 possuem hábito de crescimento indeterminado, arbustivo, com caules eretos e ramificações mais fechadas, e apenas algumas apresentam guias mais curtas. Plantas do tipo 3 têm hábito de crescimento indeterminado, prostrado ou semi-prostrado, com ramificações bem desenvolvidas e guias longas e, finalmente, as plantas do tipo 4 possuem hábito de crescimento indeterminado, com grande capacidade trepadeira e forte dominância apical (VIEIRA et al., 2001).

De acordo com Gepts (1998), anteriormente à domesticação da espécie *P. vulgaris*, havia dois centros de origem do gênero *Phaseolus*, baseados em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Cada um possuía características específicas de distribuição geográfica. O primeiro pool gênico foi nomeado de mesoamericano (México, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Venezuela) e o segundo de Andino (Sul do Peru, Bolívia e Argentina). Para essas determinações, o autor se baseou em características como faseolina (proteína de reserva, a qual originou o nome científico) bem como no tamanho das sementes. Atualmente, o feijão comum é geralmente cultivado em áreas com chuvas suficientes, mas também se estende a regiões onde a seca é endêmica e a irrigação suplementar é escassa, como no nordeste do Brasil, litoral peruano, terras altas do norte e México, em altitudes mais baixas da África Oriental (SINGH, 2005; CORTÉS et al., 2012), bem como nas planícies ocidentais dos Estados Unidos e Canadá (MUÑOZ et al., 2004; CORTÉS et al., 2012).

Entrando no mérito de aspectos gerais da cultura no Brasil, a estimativa da produção de grãos na safra de 2018/2019 é de 238 milhões de toneladas, e caso se confirme, haverá um crescimento de 4,6%, o que significa 10,5 milhões de toneladas em relação à safra anterior. A área plantada prevista para o ano de 2019 é de 62,5 milhões de hectares, representando um crescimento previsto de 1,2% se comparado à safra de 2017/2018. Porém, haverá uma redução de 8,8% na área plantada com o feijoeiro, estimando-se uma área de 960 mil hectares e produção um pouco mais que um milhão de toneladas (CONAB, 2019).

Os principais estados produtores de feijão no Brasil são Minas Gerais, Paraná, Bahia, São Paulo e Goiás, porém, todos os estados da Federação são produtores. A produção

apresenta certa sazonalidade, que se traduz em três safras não muito bem definidas no tempo (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Analisando de forma mais regional, o estado de Minas Gerais é dividido em 12 mesorregiões (Noroeste de Minas, Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Central Mineira, Metropolitana de Belo Horizonte, Vale do Rio Doce, Oeste de Minas, Sul/Sudoeste de Minas, Campo das Vertentes e Zona da Mata). Entre elas, aquela que mais se destacou em todos os aspectos analisados pelo último relatório do IBGE (2017), foi a Noroeste de Minas, que obteve porcentagem máxima em área plantada, área colhida, quantidade em toneladas por hectare produzido, e valor total de produção em toneladas, seguida pelo Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de área plantada em hectares, área colhida em hectares, quantidade produzida em toneladas e valor da produção das mesorregiões produtoras de feijão em Minas Gerais.

Mesorregiões MG	Área plantada (Hectares)	Área colhida (Hectares)	Quantidade produzida (Toneladas)	Valor da produção (Mil reais)
Minas Gerais (Valor total)	305.099(100%)	291.665(100%)	498.441(100%)	1.130.282(100%)
Noroeste de Minas	99.680(32,67%)	99.680(34,18%)	243.509(48,85%)	520.752(46,07%)
Norte de Minas	38.381(12,58%)	28.675(9,83%)	19.867(3,99%)	55.892(4,94%)
Jequitinhonha	380(0,12%)	210(0,07%)	105(0,02%)	272(0,02%)
Vale do Mucuri	3.138(1,03%)	2.856(0,98%)	1.779(0,36%)	5.350(0,47%)
Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba	36.008(11,80%)	36.008(12,35%)	80.264(16,10%)	172.841(15,29%)
Central Mineira	4.155(1,36%)	4.099(1,41%)	7.442(1,49%)	16.857(1,49%)
Metropolitana de Belo Horizonte	6.935(2,27%)	6.847(2,35%)	6.656(1,34%)	18.942(1,68%)
Vale do Rio Doce	9.148(3,00%)	8.921(3,06%)	5.191(1,04%)	15.183(1,34%)
Oeste de Minas	12.622(4,14%)	12.622(4,33%)	19.786(3,97%)	43.273(3,83%)
Sul/Sudoeste de Minas	34.193(11,21%)	34.168(11,71%)	48.682(9,77%)	106.431(9,42%)
Campo das Vertentes	25.750(8,44%)	25.750(8,83%)	44.660(8,96%)	117.483(10,39%)
Zona da Mata	22.286(7,30%)	22.256(7,63%)	16.688(3,35%)	45.156(4,00%)

Fonte: IBGE (2007).

2.3 Resistência genética do feijoeiro visando a resistência ao mofo branco

O melhoramento genético possui como objetivo aperfeiçoar a qualidade das plantas em varios aspectos. Um deles seria o aumento de resistência das principais culturas contra patógenos, possibilitando a estabilidade da produtividade, qualidade dos frutos e sementes, valores nutricionais, dentre outros fatores. Esta busca por resistência pode ser adquirida pelo melhoramento genético tradicional, via seleção recorrente, por combinações alélicas favoráveis, e também por melhorias nas condições ambientais de indivíduos e populações. Vale ressaltar o fato de que o caráter de resistência interfere imediatamente em todos os outros comumente abordados no melhoramento. A maioria das espécies apresenta grande diversidade genética, possibilitando seleção e recombinação de genes, de melhores qualidades e eficiência, visando características almejadas (CRUZ, 2005).

A resistência da planta a um determinado patógeno é definida sob o aspecto genético funcional, como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada, ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (ATHAYDE et al., 2005; NOJOSA et al., 2005). De maneira geral, esse processo é altamente dinâmico, coordenado e dependente da existência de um conjunto de mecanismos ou barreiras pré ou pós-formados. Por esta razão, é importante conhecer as bases moleculares do fitopatógeno e sua interação com a planta, para a elaboração de estratégias alternativas de melhoramento genético (VLEESHOUWERS; OLIVER, 2014). A ativação dos genes responsáveis pela indução de sistemas de defesa, no momento, local e magnitude adequados, após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, constitui-se num sistema de múltiplos componentes (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Entre os eventos celulares que caracterizam a resistência está a indução da expressão de genes de defesa do hospedeiro, frequentemente manifestada como resposta de hipersensibilidade, envolvendo morte celular programada no local da infecção. Esses genes são conhecidos como genes de resistência ou R-genes (DE WIT, 1995).

O mofo branco é uma doença, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* que pode ocasionar perdas expressivas na produtividade do feijoeiro, especialmente sob temperaturas amenas e condições úmidas, resultantes de chuvas ou irrigação excessiva, principalmente no estágio de floração e enchimento do grão (MIKLAS et al., 2006). Para vários autores, o uso de cultivares com resistência parcial é considerado o método de controle mais eficiente, seguro e de baixo custo, ficando mais acessível aos produtores, uma vez que não se tem cultivares lançadas no mercado que sejam resistentes (ALOISIO, 2000; MAHUKU et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005, BARBOSA; GONZAGA, 2012). Porém, a estratégia da

utilização de cultivares resistentes é, às vezes, difícil de ser empregada pelos pesquisadores, já que faltam fontes de resistência integral ou parcial (MIKLAS, 2007), porém, pesquisas estão em andamento tanto para detecção fisiológica de resistência quanto citológica, buscando transcritos que possam lucidar a resistência do ecossistema do mofo branco no feijão (OLIVEIRA et al., 2015).

É bem estabelecido que o conhecimento das bases moleculares da interação planta-patógeno é essencial para a elaboração de estratégias alternativas para o melhoramento genético (VLEESHOUWERS; OLIVER, 2014). O mofo branco, em sua colonização, produz um grande número de moléculas que degradam as paredes celulares das plantas, muitas delas enzimas, que representam um forte fator de patogenicidade (VASCONCELLOS et al., 2016). De acordo com Oliveira et al. (2005), todas as cultivares disponíveis no Brasil são altamente suscetíveis ao fungo, ao contrário das cultivares exóticas, as quais possuem resistência genética superior. Porém, mesmo estas, apresentam baixo grau de resistência ao mofo branco, devido a baixa adaptabilidade ao clima brasileiro (SINGH et al., 2007; ANTONIO et al., 2008). A resistência ao mofo branco é complexa e altamente influenciada pelo ambiente (KOLKMAN; KELLY, 2002), uma vez que essa característica é quantitativa. Assim, a transferência de um ou alguns alelos para um determinado genótipo não é suficiente para obtenção da resistência a doença, uma vez que as cultivares precisam ser superiores em vários caracteres agrônômicos (AIDAIR, 2003).

Marcadores moleculares são ferramentas de grande importância para o melhoramento genético, podendo ser usados no auxílio da seleção de indivíduos que carregam genes de interesse. No caso específico abordado, é crucial que os marcadores estejam ligados a genes de resistência (OLIVEIRA et al., 2005). Para a finalidade de melhoramento genético do feijoeiro resistente ao mofo branco no Brasil, deve-se identificar fontes de resistência em pool gênico mesoamericano, visto que, estes genótipos, são mais adaptados às condições edafoclimáticas brasileiras. Além disso, são mais aceitos comercialmente. No entanto, de um ponto de vista mais amplo do melhoramento, as fontes mais conhecidas de resistência ao mofo branco são de origem andina, as quais não possuem boa adaptabilidade ao ambiente brasileiro (VASCONCELLOS et al., 2016).

Para alguns autores, o controle genético da resistência ao mofo branco é complexo, com a participação de resistência fisiológica e de mecanismos de escape como o hábito de crescimento mais ereto, que permite maior penetração da luz no dossel e a maturidade precoce (ENDER; KELLY, 2005; ANTONIO et al., 2008; SOULE et al., 2011; MIKLAS et al., 2013; LEITE et al., 2014). O tipo de arquitetura da planta afeta características do microclima no

qual as plantas estão inseridas, como umidade, luminosidade, deposição de água e influência dos ventos, sendo outros fatores também limitantes, como solo, disponibilidade de nutrientes e fatores bióticos próximos a planta (MIKLAS et al., 2013). Estas características podem favorecer ou prejudicar o desenvolvimento e propagação de patógenos como o mofo branco. Para Kolkman e Kelly (2002), além das características morfológicas, o manejo agrícola também possui influência nos caracteres de resistência ao mofo branco.

Entre os mecanismos envolvidos na resistência do feijoeiro ao mofo branco, é possível observar tanto elementos genéticos quanto fisiológicos das plantas. Genes relacionados à resistência fisiológica podem ter efeitos relativos, minimizando o dano causado pelo patógeno, impedindo o progresso do patógeno nos tecidos das plantas (LEITE et al., 2014). De modo geral, a quantificação dos danos é um ponto chave na definição de qualquer estratégia de controle de doenças (BOECHAT et al., 2014). Progresso neste aspecto tem sido buscado através da seleção assistida por marcadores para obter genótipos resistentes a patógenos (SCHWARTZ; SINGH, 2013). Devido ao fato da alta resistência ser encontrada apenas em fontes não adaptadas às condições brasileiras, quando introduzidas por aqui, apresentam sua resistência afetada. Vasconcellos et al. (2017) não verificaram em um estudo de mapeamento, QTLs que explicassem mais de 15% de resistência ao patógeno, mostrando que os QTLs envolvidos na resistência do feijoeiro são, em sua maioria, de pequenos efeitos, sendo esta característica quantitativa.

Devido ao fato da resistência parcial ao mofo branco ser quantitativa, com moderada a baixa herdabilidade, além da imprecisão na avaliação de cultivares, poucas linhagens comerciais com resistência parcial ao mofo branco são desenvolvidas em programas de melhoramento (MIKLAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010, 2015; LEITE et al., 2014). Portanto, é válido o estudo de genes relacionados a resistência parcial, pois mesmo que sutis, ainda são importantes, e a partir do entendimento dessa resistência, pode-se idealizar a resistência integral.

2.4 Marcadores moleculares do tipo rapd

Marcas moleculares gênicas são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA, que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (TOPPA; JADOSKI, 2013). Marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta auxiliar nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma e avaliação da diversidade até as etapas de seleção de plantas em populações

segregantes. O uso dos marcadores é altamente viável, uma vez que permite a detecção de polimorfismo em quaisquer estádios do desenvolvimento da planta (BELLON et al., 2014; FALEIRO, 2007). O número de marcadores moleculares de acordo com Hu e Quiros (1991) é superior ao número de marcas fenotípicas, o que amplia as possibilidades de estudo e de manipulação do material genético.

No que se refere às técnicas já utilizadas no campo da biologia molecular, algumas são mais, ou então, menos adotadas, em função de sua relação vantagem/desvantagem. Algumas chegam a receber críticas sobre o seu real benefício para elucidar problemas específicos. A existência de desvantagens não desqualifica uma técnica por completo, uma vez que bons resultados podem também ser obtidos com a mesma, como pode ser observado na literatura.

Entre os diversos tipos de marcadores moleculares já consagrados, o RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA; Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico) tem como característica a produção de fragmentos de DNA amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers curtos, em média de dez oligonucleotídeos, de uma certa sequência aleatória. Como principal vantagem de sua adoção, está a possibilidade de aplicação imediata sobre qualquer DNA genômico, uma vez que não requer conhecimento prévio de sequências do DNA para a construção dos primers utilizados. Adicionalmente, como resultados, apresenta extenso repertório de bandas, amplificando bastante as chances de se encontrar polimorfismos com baixo custo relativamente às novas tecnologias moleculares (FALEIRO, 2007). Como desvantagens do método, podem ser citados o caráter dominante, não diferenciando locos em heterozigose, e a baixa reprodutibilidade das marcas devido a sensibilidade da técnica a efeitos dificilmente controlados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), como temperatura de anelamento, concentração de magnésio, eficiência da polimerase, número de ciclos e concentração inicial do DNA. Apesar disto, adaptações em seu protocolo têm sido bem vistas, e nesta direção, a aplicação de primers RAPD sobre bibliotecas de DNA complementar (cDNA) surge como alternativa acessível e prática para os objetivos deste projeto.

Os autores Ferreira e Grattapaglia (1998) citam que, análises por meio de marcadores são interessantes, uma vez que representam um caráter genotípico, no qual o efeito ambiental está ausente. Na maioria das análises realizadas, cada marcador genético molecular representa um caráter fenótipo distinto e independente dos demais.

Amostragens em espécies diferentes e em ecossistemas semelhantes com a utilização de marcadores genéticos, podem permitir avanços no entendimento genético de diferenciação de espécies vegetais, bem como auxiliar na construção de indicadores para o monitoramento

em programas de melhoramentos (SILVA et al., 2005). Para Kumar et al. (2014), os estudos com a utilização de marcadores moleculares (RAPD, AFLP, SSR etc) têm sido importantes no papel de estudo de diversidade genética, sendo que, alguns deles, também vêm sendo aplicados em análise do diferencial de expressão.

Diferentes ferramentas vêm sendo utilizadas para comparar perfis de expressão gênica em organismos a partir de regiões gênicas de interesse, dentre as quais se destacam técnicas como RNA-seq, Differential Display (DDRT-PCR) e hibridização subtrativa. Essas técnicas têm se mostrado eficientes no que se refere ao rendimento, no entanto, necessitam de equipamentos sofisticados, técnicos altamente qualificados, kits específicos e relativamente caros. Por outro lado, são descritos na literatura, métodos alternativos que também têm se mostrado satisfatórios para estudos de expressão diferencial, incluindo a técnica cDNA-RAPD, método simples, menos oneroso e que apresenta resultados e informações bastante interessantes no que se refere a genes diferencialmente expressos (SAMUELSON; LARSSON, 1994; PAILLARD et al., 1996; SHUYE et al., 1999; JIANG et al., 2000; LIU et al., 2001; SCHÄFER et al., 2004; CHEN et al., 2005; NIMBALKAR et al., 2006; HSU et al., 2008; MIZUMOTO et al., 2009; WANG et al., 2010; PAGARIYA et al., 2011; GUO et al., 2011; PAGARIYA et al., 2012; PHANCHASRI et al., 2012; HU et al., 2012; BANDYOPADHYAY et al., 2013; GHAG et al., 2014; REN et al., 2016; KRISHNA et al., 2016; APARNA et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; YUAN et al., 2017; PATEL et al., 2018; WAKEKAR et al., 2018).

2.5 Técnica de cDNA - RAPD

Vários métodos podem ser adotados para investigar genes diferencialmente expressos durante a infecção por patógenos. Com a melhoria das técnicas moleculares, foram propostos diversos procedimentos para a obtenção de marcas de interesse, estando entre eles o RAPD. Trata-se de uma técnica que permite identificar variações do DNA genômico entre subespécies ou populações de uma dada espécie.

Métodos alternativos ao RAPD foram desenvolvidos, adaptando-se a utilização da técnica, tendo como base bibliotecas de cDNA ao invés de DNA genômico. Assim, não é avaliada a variabilidade genética, mas sim, detecta-se o que cada um expressa em determinada circunstância, correspondente à fração do que é transcrito pela RNA polimerase em moléculas de RNAm, em dado momento. Portanto, a análise dos mRNA's é útil para entender o diferencial de expressão entre dois genótipos diferentes, uma vez que a expressão entre eles

terão diferenças (SHUYE et al., 1999). Ao contrário do genoma nuclear, cuja composição e tamanho são essencialmente estáticos, o transcriptoma muda constantemente em função da fase do ciclo celular ou de desenvolvimento, órgão, exposição a patógenos e vários outros fatores. O conceito de transcriptoma gira em torno do conjunto completo de transcrições presentes em um determinado tipo de célula, tecido ou órgão, e engloba moléculas de RNA codificantes e não codificantes, embora seja de grande interesse a fração correspondente aos RNA's mensageiros, que auxiliam nos estudos de expressão gênica (ASSIS et al., 2014).

Método cDNA-RAPD são amplamente utilizados em estudos de expressão na detecção e avaliação em resposta ao estresse ambiental, com intuito de identificação de genes de resistência (REN et al., 2016). A técnica consiste basicamente da síntese de uma fita de DNA simples a partir do RNAm, com isto, permite que se tenha fitas de DNA dos genes expressos. Pelo fato de não haver conhecimento prévio do que compõe as fitas de cDNA, a técnica RAPD é importante para que se possa analisar o diferencial de expressão entre os genótipos avaliados, para futuro sequenciamento destes materiais.

Diante do exposto, é plausível supor, que estratégias como o cDNA-RAPD possam ser eficientes para identificar genes associados à resistência do feijoeiro ao mofo branco.

2.6 A importância do rna com alta integridade

O RNA extraído dos tecidos representa a transcrição para uma determinada amostra, e fornece informações precisas sobre as características e níveis de expressão dos transcritos. Mas para isso, é importante utilizar métodos de extração que mantenham a qualidade, alta integridade e pureza do RNA, sendo estes os pré-requisitos para análise de expressão gênica (PEREIRA et al., 2017). Pode-se afirmar que este é um dos problemas associados ao estudo da expressão gênica em hastes de feijão inoculado, pois não há um protocolo bem definido que possa ser usado para obtenção de RNA com qualidade deste material. Logo, a análise de expressão gênica pode ser prejudicada. O estabelecimento de tais procedimentos não é trivial, e os esforços para desenvolver protocolos de extração de RNA são conduzidos para diferentes espécies (CHRISTOU et al., 2014; MA et al., 2015).

Considerando a dificuldade inicial encontrada na extração de RNA de qualidade, a partir das hastes de feijão inoculadas pelo isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, assim como a ausência de protocolos de extração ajustados para este fim, procurou-se em estudo preliminar, avaliar protocolos de extração para obtenção de um RNA total de melhor qualidade. De modo geral, os protocolos mais utilizados e que fornecem os melhores resultados, de acordo com

literatura, para a extração de RNA a partir de folhas, raízes e sementes de feijão têm sido RNA TRIzol™ Reagents (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA) e PureLink® RNA Kit (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA)(PEREIRA et al., 2017). Para a haste de feijão os relatos são escassos.

A idéia básica por trás da extração de RNA é relativamente simples, mas tem sido difícil obter quantidade e pureza de RNAs suficientes para análises moleculares de um tecido sub-explorado, como no caso da haste de feijão. Seus tecidos contêm altos níveis de polissacarídeos e lipídios, dificultando o processo de extração de RNA com alta qualidade. Desta forma, faz-se necessário avaliar diferentes protocolos para diferentes tecidos e espécies (MORNKHAM et al., 2013). Sabe-se que os polifenóis são facilmente oxidados para formar quinonas, que por sua vez, podem interagir irremediavelmente com proteínas e ácidos nucleicos para formar complexos de peso molecular elevado, que impedem o isolamento de RNA de boa qualidade (JAPELAGHI et al., 2011).

A extração de RNA de alta qualidade é necessária para construção de bibliotecas de cDNA e investigação de perfis de expressão gênica por RT-PCR. Vários métodos são comumente usados para isolamento de RNA total, sendo que esses métodos podem ser modificados para que sejam aplicáveis a uma determinada espécie de planta (GEHRIG et al., 2000). Porém, em alguns protocolos existentes, o DNA cromossômico ou genômico pode não ser eliminado por completo durante o isolamento do RNA. Desta forma, falsos positivos no estudo de expressão gênica podem ocorrer, afetando a interpretação dos resultados (DASH, 2013), e para contornar essa situação é utilizado DNase.

Muitos protocolos, juntamente com suas modificações, foram publicados ao longo dos anos, para o isolamento de ácidos nucleicos de plantas. No entanto, a maioria apresenta limitações aos pesquisadores, uma vez que podem ser demorados, específicos para tecidos ou tecnicamente complexos.

Diante do exposto, o primeiro artigo desta dissertação consiste no ajuste de metodologias para a extração de RNA com alta qualidade, a partir de hastes de feijão inoculadas pelo fungo causador do mofo branco. Uma vez estabelecido o protocolo mais adequado, os estudos progrediram para o estudo da expressão gênica diferencial em hastes de feijão inoculadas de duas cultivares, sendo uma suscetível, e a outra parcialmente resistente a *Sclerotinia sclerotiorum*. E para este último estudo, utilizou-se a técnica do cDNA-RAPD.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. B. Ecology of Sclerotinia Species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 896, 1979.
- AIDAIR H. Cultivo do Feijoeiro Comum. Sistemas de Produção, 2003.
- DAR, H. (Ed.). **Cultivo do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2003. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de produção, 2).
- ALOISIO, S. Pathogenic Variability in *Phaeoisariopsis griseola* from Brasil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 146-147, 2000.
- ANTONIO, R. P.; SANTOS, J. B.; SOUZA, T. P.; CARNEIRO, F. F. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 733-740, 2008.
- APARNA, E.; AMARAVATHI, Y.; ESWARA REDDY, N. P.; VASANTHI, R. P.; NIRMAL KUMAR, A. R. Transcriptome profiling and identification of differentially expressed transcripts in response to mid season drought in groundnut *Arachis hypogaea* L. **Canadian Journal of Biotechnology**, v. 1, n. Special Issue, p. 197-197, 5 out. 2017.
- ARAÚJO, D. V. de. Patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro. 2008. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2008.
- ARKWAZEE, H.; MYERS, J. R. Seedling straw test: a rapid and resource-efficient method for evaluating white mold resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 60, p. 39-40, 2017.
- ASSIS, A. F.; OLIVEIRA, E. H.; DONATE, P. B.; GIULIATTI, S.; NGUYEN, C.; PASSOS, G. A. What Is the Transcriptome and How it is Evaluated? **Transcriptomics in Health and Disease**, p. 3-48, 2014.
- AYYAPPAN, V.; KALAVACHARLA, V.; THIMMAPURAM, J.; BHIDE, K. P.; SRIPATHI, V. R.; SMOLINSKI, T. G.; MANOHARAN, M.; THURSTON, Y.; TODD, A.; KINGHAM, B.; MANTOVANI, R. Genome-wide profiling of histone modifications (H3K9me2 and H4K12ac) and gene expression in rust (*Uromyces appendiculatus*) inoculated common bean (*Phaseolus vulgaris* L. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-29, 2015.
- BANDYOPADHYAY, S.; NANDAGOPAL, K.; JHA, T. B. Characterization of RAM to SAM transitions in *Selaginella microphylla* grown in vitro. **Biologia Plantarum**, v. 57, n. 3, p. 597-600, 10 set. 2013.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FUHRMANN, E. Variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro, obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores RAPD. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1692-1697, 2014.

BOECHAT, L. T.; PINTO, F. de A. de C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; QUEIROZ, D. M.; TEIXEIRA, H. Detecção do mofo-branco no feijoeiro, utilizando características espectrais. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 907-915, dez. 2014.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, jun. 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, jan. 2006.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, maio 2003.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q.; SILVA, R. A. da. **Manual de doenças da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil, 2010. 57 p.

CHEN, Y. H.; TSAI, Y. J.; HUANG, J. Z.; CHEN, F. C. Transcription analysis of peloric mutants of *Phalaenopsis* orchids derived from tissue culture. **Cell Research**, v. 15, n. 8, p. 639-657, ago. 2005.

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BENCHIMOL, L. L.; CHIAVEGATO, M. B.; DIAS, L. A. dos S.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 3, p. 256-262, jun. 2007.

CHRISTOU, A.; GEORGIADOU, E. C.; FILIPPOU, P.; MANGANARIS, G. A.; FOTOPOULOS, V. Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. **Gene**, v. 537, n. 1, p. 169-173, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - safra 2019/18**. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2019.

CORTÉS, A. J.; CHAVARRO, M. C.; MADRIÑÁN, S.; THIS, D.; BLAIR, M. W. Molecular ecology and selection in the drought-related *Asr* gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genetics**, v. 13, 2012.

CRUZ, C. D. **Princípios de Genética Quantitativa**. Viçosa: UFV, 2005. p. 394.

DASH, P. K. High quality RNA isolation from ployphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). **3 Biotech**, v. 3, n. 2, p. 109-114, 24 abr. 2013.

- DE WIT, P. J. G. M. Fungal Avirulence Genes and Plant Resistance Genes: Unraveling the Molecular Basis of Gene-for-gene Interactions. In: **Advances in Botanical Research**, v. 21, p. 147-185, 1995.
- DEBOUCK, D. G.; TOHME, J. M. Implications for bean breeders of studies on the origins of common beans, *Phaseolus vulgaris*. **International Bean Breeding Workshop**, p. 3-43, 1989.
- ENDER, M.; KELLY, J. D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, v. 45, n. 6, p. 2482-2490, 2005.
- FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p. 102.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 220.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Production of sclerotia on sclerotinia sclerotiorum (LIB.) De Bary in culture media. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2012.
- GEPTS, P. Origin and Evolution of Common Bean: Past Events and Recent Trends. **Hortscience**, v. 33, n. 7, p. 1124-1130, 1998.
- GEHRIG, H. H. et al. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant molecular biology reporter**, v. 18, n. 4, p. 369-376, 2000.
- GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Characterization of Fusarium wilt resistant somaclonal variants of banana cv. Rasthali by cDNA-RAPD. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 12, p. 7929-7935, 27 dez. 2014.
- GUO, S.; TIAN, R.; FENG, Z.; ZHAO, C. Cloning and Expression Analysis of the Smooth-Edge Seed Gene GSE-1 from Cucurbita pepo L. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n. 2, p. 498-504, 22 jun. 2011.
- HSU, T.W.; TSAI, W. C.; WANG, D. P.; LIN, S.; HSIAO, Y. Y.; CHEN, W.H.; CHEN, H.H. Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of Phalaenopsis Hsiang Fei cv. H. F. and its somaclonal variant. **Plant Science**, v. 175, n. 3, p. 415-422, set. 2008.
- HU, J.; QUIROS, C. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reports**, v. 10, n. 10, p. 432-436, dez. 1991.
- HU, T.; ZHENG, Y.; ZHANG, Y.; LI, G.; QIU, W.; YU, J.; CUI, Q.; WANG, Y.; ZHANG, C.; ZHOU, X.; FENG, Z.; ZHOU, W.; FAN, Q.; ZHANG, F. Identification of a novel Getah virus by Virus-Discovery-cDNA random amplified polymorphic DNA (RAPD). **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.
- HUANG, H. C.; MÜNDEL, H.-H.; ERICKSON, R. S. Effect of physiological resistance and plant architecture on yield of dry bean under disease pressure of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Plant Prot. Bull**, v. 45, p. 169-176, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal - PAM**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

JAPELAGHI, R. H.; HADDAD, R.; GAROOSI, G. A. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. **Molecular Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 129-137, 2011.

JIANG, S.; CHEN, Q.; FANG, X. Identifying and mapping cDNA fragments related to rice photoperiod sensitive genic male sterility. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 6, p. 536-540, mar. 2000.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F.C. **Podridão Branca da haste de soja: Manejo e Uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção**. Uberlândia: Composer, 2010.

JUNIOR, M. L.; NASSER, L. C. B. Mofo Branco pode Limitar o agronegócio da soja, feijão e girassol em áreas infestadas. **Informativo Agromen**, v. 20, p. 4, 2005.

KOHN, L. M.; PETSCHKE, D. M.; BAILEY, S. R.; NOVAK, L. A.; ANDERSON, J. B. Restriction Fragment Length Polymorphisms in Nuclear and Mitochondrial DNA of *Sclerotinia* Species. **Phytopathology**, v. 78, n. 8, p. 1047, 1988.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 42, n. 3, p. 693-699, 2002.

KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 13 jun. 2016.

KUMAR, A.; SINGH, P. K.; RAI, N.; BHASKAR, G. P.; DATTA, D. Genetic diversity of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes on the basis of morphological traits and molecular markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. April, p. 207–213, 2014.

LEITE, M. E.; DOS SANTOS, J. B.; RIBEIRO, P. M.; DE SOUZA, D. A.; DE CASTRO LARA, L. A.; DE RESENDE, M. L. V. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, n. 2, p. 391-404, 2014.

LEITE, M. E.; FIGUEIREDO, I. C. R. de; DIAS, J. A.; ALVES, F. C.; SANTOS, J. B. dos. Reaction of common bean lines derived from recurrent selection for white mold resistance and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Bioscience Journal**, p. 1177-1187, 2017.

LEITE, R. M. V. B. D. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Embrapa Soja**, p. 1-3, 2005.

- LI, C.; PULIN, Z.; WEI, L.; WEI, D.; JIA, O.; CHANG, C.-C. Molecular biological methods in environmental engineering. **Water Environment Research**, v. 90, n. 10, p. 1371-1391, 2018.
- LIU, M. Y.; ZHU, X. P.; XU, K. C.; LU, Q.; BOIREAU, P. Biological and genetic characteristics of two trichinella isolates in China; comparison with European species. **Parasite**, v. 8, n. August 2000, p. S34–S38, 18 jun. 2001.
- MA, Z.; HUANG, B.; XU, S.; CHEN, Y.; LI, S.; LIN, S. Isolation of High-Quality Total RNA from Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130234, 17 jun. 2015.
- MAHUKU, G.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUNÓZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular Markers Dispute the Existence of the Afro-Andean Group of the Bean Angular Leaf Spot Pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, v. 92, n. 6, p. 580-589, 2002.
- MESQUITA, R.; CORRÊA, A.; CELESTE, M.; LIMA, R.; ABREU, A. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007.
- MIKLAS, P. N.; HAUF, D. C.; HENSON, R. A.; GRAFTON, K. F. Inheritance of ICA bursi-derived resistance to white mold in a navy x pinto bean cross. **Crop Science**, v. 44, n. 5, p. 1584–1588, 2004.
- MIKLAS, P. N.; GRAFTON, K. F.; HAUF, D.; KELLY, J. D. Registration of Partial White Mold Resistant Pinto Bean Germplasm Line USPT-WM-1. **Crop Science**, v. 46, n. 5, p. 2339, 2006.
- MIKLAS, P. N. Marker-assisted backcrossing QTL for partial resistance to *Sclerotinia* white mold in dry bean. **Crop science**, v.47, n. 3, p. 935-942, 2007.
- MIKLAS, P. N.; PORTER, L. D.; KELLY, J. D.; MYERS, J. R. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 3, p. 525-543, 2013.
- MIZUMOTO, K.; HATANO, H.; HIRABAYASHI, C.; MURAI, K.; TAKUMI, S. Altered expression of wheat AINTEGUMENTA homolog, WANT-1, in pistil and pistil-like transformed stamen of an alloplasmic line with *Aegilops crassa* cytoplasm. **Development Genes and Evolution**, v. 219, n. 4, p. 175-187, 3 abr. 2009.
- MORNKHAM, T.; WANGSOMNUK, P.; FU, Y.-B.; WANGSOMNUK, P.; JOGLOY, S.; PATANOTHAI, A. Extractions of High Quality RNA from the Seeds of Jerusalem Artichoke and Other Plant Species with High Levels of Starch and Lipid. **Plants**, v. 2, n. 2, p. 302-316, 2013.
- MUÑOZ, L. C.; BLAIR, M. W.; DUQUE, M. C.; TOHME, J.; ROCA, W. Introgression in Common Bean × Tepary Bean Interspecific Congruity-Backcross Lines as Measured by AFLP Markers. **Crop Science**, v. 44, n. 2, p. 637, 2004.

- NIMBALKAR, S. B.; HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; FRANCESCHI, V.; GUPTA, V. S. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4-6, p. 176-188, abr. 2006.
- OLIVEIRA, E. J.; ALZATE-MARIN, A. L.; BORÉM, A.; DE AZEREDO FAGUNDES, S.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Molecular marker-assisted selection for development of common bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding**, v. 124, n. 6, p. 572-575, 2005.
- OLIVEIRA, M. B.; NASCIMENTO, L. B.; JUNIOR, M. L.; PETROFEZA, S. Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae) infection. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 994-1004, 2010.
- OLIVEIRA, M. B.; DE ANDRADE, R. V.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; PETROFEZA, S. Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum*–*Phaseolus vulgaris* interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1-14, 26 out. 2015.
- PAGARIYA, M. C.; HARIKRISHNAN, M.; KULKARNI, P. A.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G. Physio-biochemical analysis and transcript profiling of *Saccharum officinarum* L. submitted to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1411--1424, 29 jul. 2011.
- PAGARIYA, M. C.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane. **Plant Science**, v. 184, p. 1-13, mar. 2012.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1-2, p. 41-47, 1996.
- PASCHOALATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1995. v. 1. p. 417-453.
- PATEL, P.; RAJKUMAR, B. K.; PARMAR, P.; SHAH, R.; KRISHNAMURTHY, R. Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 153-159, jun. 2018.
- PEREIRA, W. J.; BASSINELLO, P. Z.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. An improved method for RNA extraction from common bean seeds and validation of reference genes for qPCR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 150-158, jun. 2017.
- PHANCHAISRI, B.; SAMSANG, N.; YU, L.; SINGKARAT, S.; ANUNTALABHOCHAI, S. Expression of OsSPY and 14-3-3 genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 734, n. 1-2, p. 56-61, jun. 2012.

PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic Germination of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. **Journal of Phytopathology**, v. 19, n. 10, p. 279-283, 1987.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

REN, W.; ZHAO, H.; SHAO, W.; MA, W.; WANG, J.; ZHOU, M.; CHEN, C. Identification of a novel phenamacril-resistance-related gene by the cDNA-RAPD method in *Fusarium asiaticum*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 8, p. 1558-1565, ago. 2016.

SAMUELSON, M. E.; LARSSON, C. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. **Plant Science**, v. 93, n. 93, p. 77-84, 1994.

SARTORATO, A.; RAVA, C. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; CUNHA DORNELLES, A. L. Identificação de plântulas zigóticas de trifoliata com o uso de marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 167-172, 2004.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. **White mold**. Bean production problems in the tropics. 2. ed. Colômbia. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1989. p. 211-230.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: A review. **Crop Science**, v. 53, n. 5, p. 1832-1844, 2013.

SHUYE, J.; QIFENG, C.; XUANJUN, F. Identification of differentially expressed genes in photo-period sensitive genic male sterile rice by randomly amplified cDNAs using RAPD primers. **Chinese Science Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 2-5, 1999.

SILVA, M. P. Da; AMARAL JÚNIOR, A. T. do; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 3, p. 531-539, 11 abr. 2005.

SINGH, S. P. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. **Grain Legumes**, v. 1, 2005.

SINGH, S. P.; TERÁN, H.; LEMA, M.; SCHWARTZ, H. F.; MIKLAS, P. N. Registration of White Mold Resistant Dry Bean Germplasm Line A 195. **Journal of Plant Registrations**, v. 1, n. 1, p. 62, 2007.

SOULE, M.; PORTER, L.; MEDINA, J.; SANTANA, G. P.; BLAIR, M. W.; MIKLAS, P. N. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, v. 51, n. 1, p. 123-139, 2011.

STEADMAN, J. R. White Mold - A Serious Yield-Limiting Disease of Bean. **Plant Disease**, 67, p. 346-350, 1983.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 30 mar. 2013.

VASCONCELLOS, R. C. C.; LIMA, T. F. C.; FERNANDES-BRUM, C. N.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; SANTOS, J. B. Expression and validation of PvPGIP genes for resistance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

VASCONCELLOS, R. C. C.; ORAGUZIE, O. B.; SOLER, A.; ARKWAZEE, H.; MYERS, J. R.; FERREIRA, J. J.; SONG, Q.; MCCLEAN, P.; MIKLAS, P. N. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-22, 2017.

VIEIRA, R. F.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; PERES, Â. P.; MACHADO, J. D. C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 770-773, dez. 2001.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; OLIVER, R. P. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 3, p. 196-206, mar. 2014.

WAKEKAR, R. S.; JADHAV, P. V.; KALE, P. B.; MOHARIL, M. P.; NANDANWAR, R. S.; MANE, S. S.; DESHMUKH, A. G.; MANJAYA, J.; DANI, R. G. Pollen Dysfunction Causes 'Floral Bud Distortion' in Indian Soybean (*Glycine max*). **Agricultural Research**, v. 7, n. 1, p. 10-24, 5 mar. 2018.

WANG, D.-L.; YE, W.-W.; WANG, J.-J.; SONG, L.-Y.; FAN, W.-L.; CUI, Y.-P. Constructing SSH Library of Cotton Under Drought Stress and Analysis of Drought Associated Genes. **Acta Agronomica Sinica**, v. 36, n. 12, p. 2035-2044, dez. 2010.

YUAN, L.; SU, Y.; ZHOU, S.; FENG, Y.; GUO, W.; WANG, X. A RACK1-like protein regulates hyphal morphogenesis, root entry and in vivo virulence in *Verticillium dahliae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 99, p. 52-61, fev. 2017.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS*

ARTIGO 1 – PROTOCOL ADJUSTMENT IMPROVES THE EXTRACTION OF HIGH-QUALITY TOTAL RNA FROM COMMON BEAN STEMS INFECTED BY *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

AJUSTE DE PROTOCOLOS MELHORA A EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE ALTA QUALIDADE DE HASTES DE FEIJÃO INFECTADAS POR *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

ABSTRACT

The Straw Test is an assay developed to evaluate the resistance of common bean to white mold, in which the plant stems are inoculated and the symptoms of the disease are monitored. It is plausible to admit that investigating gene expression in pathogen infected tissues may be strategically interesting. However, obtaining a quality RNA is a basic requirement for this purpose. Therefore, the objective of this study was to evaluate adjustments in protocols of commercial kits in the expectation of improving the quality of RNA obtained from bean stems. For this, plants of two cultivars were inoculated and the stems pathogen-infected were collected 72 hours after. For RNA extraction, two commercial reagents were used following the manufacturer's recommendations and then following adaptations in these protocols. In particular, the proposed modifications relate to volumes of supernatant recovered in purification steps, step purification by chloroform additional and extended time for nucleic acids precipitation. The obtained RNA was analyzed by spectrophotometer, electrophoresis and bioanalyzer, then converted into cDNA and subsequently submitted to PCR. From the results analyzed, it was observed that the PureLink protocol with adaptations presented the best results and that when the indicative values of RNA quality are guaranteed, the subsequent reactions are more pure, precise and representative.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, RNA isolation, White Mold, Plant-Pathogen Interaction.

RESUMO

O Straw Test é um ensaio desenvolvido para avaliar a resistência do feijoeiro ao mofo branco, no qual os caules da planta são inoculados e os sintomas da doença são monitorados. É plausível admitir que a investigação da expressão gênica em tecidos infectados por patógenos possa ser estrategicamente interessante. No entanto, obter um RNA de qualidade é um requisito básico para essa finalidade. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar ajustes em protocolos de kits comerciais na expectativa de melhorar a qualidade do RNA obtido a partir de hastes de feijão. Para tanto, plantas de duas cultivares foram inoculadas e as hastes infectadas pelo patógeno foram coletadas após 72 horas. Para extração de RNA, dois reagentes comerciais foram utilizados inicialmente seguindo as recomendações do fabricante e seguindo as adaptações desses protocolos. Em especial, as modificações propostas referem-se aos volumes de sobrenadante recuperados nos passos de purificação, etapa de purificação por clorofórmio adicionada e tempo estendido para a precipitação dos ácidos nucleicos. O RNA obtido foi analisado por espectrofotômetro, eletroforese e bioanalyzer, posteriormente convertido em cDNA e, por fim, submetido à PCR. A partir dos resultados analisados, observou-se que o protocolo PureLink com adaptações apresentou os melhores resultados e que, quando os valores indicativos de qualidade do RNA são garantidos, as reações subsequentes são mais puras, precisas e representativas.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, Isolamento de RNA, Mofo Branco, Interação Planta-Patógeno.

INTRODUCTION

Although bean production is prominent in Brazil, with an estimated production of 3.184 million tons (Conab, 2018), its productivity is affected by diseases (Oliveira et al., 2015). Among them is the white mold caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, which can lead to 100% loss of crop (Vasconcellos et al., 2016). Contrasting with this scenario, obtaining genotypes with high levels of resistance to the pathogen, combined with other traits desirable for the crop, has demanded great effort from the bean breeders (Schwartz; Singh, 2013).

It is well known that knowledge about the molecular basis of plant-pathogen interaction is essential for the elaboration of alternative strategies for genetic breeding

(Vleeshouwers; Oliver, 2014), however, for diseases such as white mold, literature is limited (Oliveira et al., 2015). Progress in this aspect has been sought through marker-assisted selection to obtain pathogen-resistant genotypes (Schwartz; Singh, 2013). The challenge is that, in some cases, the results are equivalent to phenotypic selection (Torga et al., 2010).

To improve this scenario, it has become relevant to analyze the transcriptional profiles of genotypes submitted to specific experimental conditions. There are several possibilities, such as the study of individual genes by RT-PCR and qPCR (Ma et al., 2015; Vasconcelos et al., 2016), isolation, cloning and expression of specific genes in model organisms, followed for functional studies (Wang et al., 2013), transcriptomes of a given genotype (Jain et al., 2016), or analyzes of the transcriptional profiles of host and pathogen, simultaneously (Westermann; Gorski; Vogel, 2012). Regardless of the chosen strategy, isolation of highquality total RNA consists of a critical stage of the research (Ahmed et al., 2017).

RNA is a delicate molecule to be studied. The presence of a 2'OH in ribose enables RNA as nucleophile, making it vulnerable to enzymatic degradation (Lavoie; Elela, 2008). RNA also has a high degree of susceptibility to secondary metabolites (Jordon-Thaden et al., 2015) and, sometimes, co-precipitated inhibitory molecules during the RNA extraction process may interfere with subsequent enzymatic reactions (Kolossova et al., 2004; Ma et al., 2015).

Given the importance of RNA quality for research on gene expression, several studies are conducted to adjust RNA extraction methods (Ma et al., 2015; Pereira et al., 2017). In the case of beans, there are investigated protocols for the extraction of RNA from leaves, roots and seeds (Borges et al., 2012; Pereira et al., 2017), but few reports have been found for the stem, organ in which the symptoms of the white mold occur. It is believed that plant genes induced by *S. sclerotiorum* can be found in the transcriptome of these tissues (Oliveira et al., 2015).

It is important to highlight that the chemical composition of the tissue can affect the quality of the extracted RNA (Gehrig et al., 2000). In the case of the bean plant challenged by white mold, there is lignification and accumulation of phenolic compounds in the plant tissues (Oliveira et al., 2010). So, RNA extraction methods need to be investigated and adapted if necessary (Ahmed et al., 2017), since low quality RNA samples necessarily compromise all subsequent analyzes, representing loss of time and research resources.

In this study, simple adaptations performed according to previous experiments resulted in high-quality RNA, contaminants free and suitable for subsequent enzymatic reactions.

MATERIAL AND METHODS

Genotypes

Two cultivars were selected for this study, since they have been used in parallel in differential gene expression assays. One susceptible and other partially resistant to White mold, Beryl and Cornell 605, respectively (Griffiths, 2009; Lehner et al., 2015). Their seeds were sown in pots with 2 kg of soil fertilized with NPK (04-14-08, 1g / kg soil), and kept in greenhouse in the period from November to December 2017 under controlled temperature and humidity, at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$, respectively. Each experimental plot consisted of 3 plants per pot. At 35 days after emergence, the plants were inoculated, and 72 hours after inoculation (HAI), the stems were collected and frozen immediately in liquid nitrogen. Padder et al. (2016) selected 0, 24, 72 and 96 hours after inoculation to study the transcriptome of the bean inoculated by *Colletotrichum lindemuthianum*, becoming a parallel reference, given the lack of information about beans inoculated by *Sclerotinia sclerotiorum*.

In parallel, a similar assay was conducted, except for the collection of the stems for RNA extraction, in order to investigate the incidence of differential symptoms in the two cultivars, validating the inoculation process. The procedure used to evaluate the reaction of the genotypes to *S. sclerotiorum* followed the Straw Test method, described by Petzoldt and Dickson (1996) and modified by Terán et al. (2006).

Sclerotinia sclerotiorum isolate and inoculation

The pathogen used to inoculate the cultivars Beryl and Cornell 605 was an isolate of *S. sclerotiorum* UFLA 27, originary from Lambari, Minas Gerais State (Silva et al., 2014), kept in collection of the Mycological Laboratory of the Department of Biology, Federal University of Lavras, MG. Initially, the sclerotia were subjected to asepsis and cultured on Petri dishes containing PDA (Potato-Dextrose-Agar) medium for 5 days at 20°C under 12h photoperiod. So, the mycelium was obtained and a 0.5 to 0.7 mm diameter punch device was used to chop it up. The new Petri dishes with PDA were used for multiplying the mycelium disks in an incubation chamber for 72 h.

Inoculation procedure Straw Test, conducted at 35 days after germination (35 DAG), consists of cutting the stem apex at about 2.5 cm from the node, where a P200 micropipette tip was inserted, with a PDA disk containing agar in the control group, or agar + mycelium of *S. sclerotiorum* in the treatment with inoculums (Silva et al., 2014).

Total RNA extraction from stems

Initially, fragments of 5 cm from the stem were collected 72 hours after inoculation (HAI) and immediately frozen in liquid nitrogen. It is important to highlight that before extraction of the total RNA from bean stems, we followed the symptoms of the white mold, as a necessary condition for both the validation of the inoculation procedure and confirmation of susceptibility and partial resistance to *S. sclerotiorum* of the cultivars Beryl and Cornell 605. The symptoms were evaluated three times (3, 7 and 11 DAI) by the method proposed by Singh et al. (2014), using grades from 1 to 9 to quantify the severity of the symptoms in the inoculated stem. Additionally, the advancement of symptoms in affected tissues was measured by millimeter ruler. For statistical analysis, the measurements of 4 replicates per treatment were taken and these data were submitted to variance analysis and Tukey test at 5% of probability.

Two commercial reagents were used for total RNA extraction, the PureLink® RNA Kit and RNATRIzol® Isolation Reagent (Invitrogen™). The manufacturer's recommendations were used, however, some modifications have been necessary to improve the RNA quality. As Gasic, Hernandez and Korban (2004) related difficulties to isolate total RNA from apple tissues with enough quality and quantity for cDNA library construction using these reagents, we also decided to evaluate the modifications in the protocols based on methods previously used by our laboratory in occasions of difficult extraction.

The grinding consists of a critical stage of the whole process of RNA extraction, both with respect to the thickness of the macerate and the maintenance of the low temperature of the sample to avoid degradation (Ma et al., 2015). Thus, the plant stems were carefully macerated in liquid nitrogen to the powder consistency and portion equivalent to 100 mg of tissue was transferred to 1.5 ml microtube. From this point on, procedures were applied according to the manufacturer's recommendations for each kit and the adaptations performed are described between parentheses.

PureLink and (PureLink Adaptation)

1. The ground stems were transferred to 1.5 mL tubes, then 500 µL of PureLink reagent (600 µL) were added and the samples were homogenized by vortexing (Time set at 1').
2. Microtube was kept horizontal at room temperature for 5' (10'), in order to maximize contact between sample and reagent.
3. The samples were centrifuged at 12.000 g for 2' at 4°C and the supernatant (450 µl of supernatant collected) was transferred to new tubes containing 100 µL 5M NaCl.

4. It was added 300 μL of chloroform and the homogenization was made by inversions (vortex 1').
5. The samples were centrifuged for 10'.
6. (Now, 430 μL supernatant was collected and transferred to a tube containing 100 μL of 5M NaCl, to which were added 300 μL of chloroform. The mixture was vortexed at 1' and then centrifuged for 10' at 4°C).
7. The sample was centrifuged to separate the phases e the upper, aqueous phase was transferred to a clean RNase-free tube (400 μL) with equal volume of isopropanol (400 μL), and homogenized gently by slow inversions of the tube (20 inversions).
8. The tubes were kept horizontally for 10' at room temperature (maintenance of tubes vertically at -20°C for 16h).
9. After this precipitation period of the nucleic acids, the samples were centrifuged for 10' at 4°C (Centrifugation for 25').
10. Thereafter, the supernatant was discarded, 1 mL of 75% RNase-free ethanol was added to wash the pellet obtained (700 μL) and the microtubes were centrifuged for 1' at room temperature (centrifugation for 10' at 4 ° C).
11. After discarding the alcohol, a brief centrifugation was performed, followed by the removal of the residual alcohol with the aid of a micropipette. Finally, upon drying of the pellet in the hood, the RNA was resuspended in 20 μL of autoclaved Milli-Q-DEPC water and stored in a freezer -80°C.

TRIzol and (TRIzol Adaptation)

1. The ground stems were transferred to 1.5 mL tubes, where 1 mL of TRIzol was added, followed by incubation at room temperature for dissolution of the cell complex.
2. Were added 200 μl of chloroform and the samples were incubated for an additional 3'. 3. The sample was centrifuged at 11.400 rpm for 15' at 4°C.
4. Then, supernatant was transferred to a new microtube, to which 500 μl of isopropanol was added.
5. The samples were left on ice for 10' and thereafter, were centrifuged at 11.400 rpm for 10' at 4°C.
6. The supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 1 mL of 75% ethanol RNase free and homogenized by vortexing.
7. In sequence, the tubes were centrifuged at 11.400 rpm for 5' at 4°C, and this time, the supernatant was discarded and the pellet set to dry for 10' under room temperature.

8. Finally, the pellet was resuspended with 35 μ l of autoclaved Milli-Q-DEPC water, and the microtube was subjected to 55°C for 10 minutes in a water bath (As adaptation, the same procedure reported above, except for the final incubation step at 55°C for 10 minutes).

RNA Quality and cDNA libraries

To verify the quality and quantity of the RNA samples obtained, they were submitted at NanoVue™ Plus Spectrophotometer (General Electric Company, GE), taking into account the absorbances ratios 260/280 and 260/230 nm, and the RNA integrity number (RIN) was verified with Agilent 2100 Bioanalyzer (General Electric Company, GE). For the DNase treatment, the Turbo DNA Free Kit was used, following the manufacturer's recommendations. Again, the samples were subjected to the NanoVue™ Plus Spectrophotometer, providing both the total RNA concentration and the absorbances 230, 260 and 280 nm. Finally, for visual quality certification of the RNA, the samples were submitted to 1% agarose gel electrophoresis, taking into account the integrity of the bands corresponding to rRNAs 28 and 18S.

The synthesis of the cDNA libraries was performed from 500 ng mRNA using the SuperScript® IV Reverse Transcriptase Kit, following the manufacturer's recommendations.

According to Pereira et al. (2017), it was used descriptive statistics to analyze these data, with emphasis on mean and standard deviation.

PCR

The quality certification of a cDNA library can be observed from the results of subsequent enzymatic reactions (Gehrig et al., 2000; Ma et al., 2015). Among the various possibilities, PCR is one of the most practical. Thus, PCRs were performed using two primer pairs, being the first designed for Actin (F-CCTTCACCACCTCAGCAGAG and R-GAACTGGTCCTGGCTGTCTC), and the second for PvFBOX gene (FACGACGGAGAATGGCTACAC and R-GCCAGAAGTTCAAGGTCCT G). The reactions were made by using 5 ng of DNA, 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (1.5 mM MgCl₂), 0.4 μ M of each forward primer and reverse, 0.8 mM dNTP mix and 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase (5u/ μ L), completing with H₂O nuclease free the reaction to 25 μ L. The PCR cycles were programmed as follow: an initial cycle of 2' at 94°C for denaturation, followed by 35 cycles of 94°C for 30", 60°C for 30", and 72°C for 30", ending with one step of additional extension at 72°C for 7' and subsequent incubation at 4°C until the moment of application of the samples to 1% agarose gel electrophoresis to qualitative evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the inoculation procedure

In order to certify the bean inoculation procedure by *S. sclerotiorum*, the progress of white mold symptoms in plants was monitored. The data of the control treatment were not presented, since they did not present any symptoms (Figure 1). The Beryl cultivar showed a more pronounced susceptibility to the pathogen than the Cornell 605, both at 7 and 14 DAI, thus corroborating the previous knowledge of partial resistance and susceptibility of the cultivars Cornell 605 and Beryl to *S. sclerotiorum*, respectively (Griffiths, 2009; Silva et al., 2014).

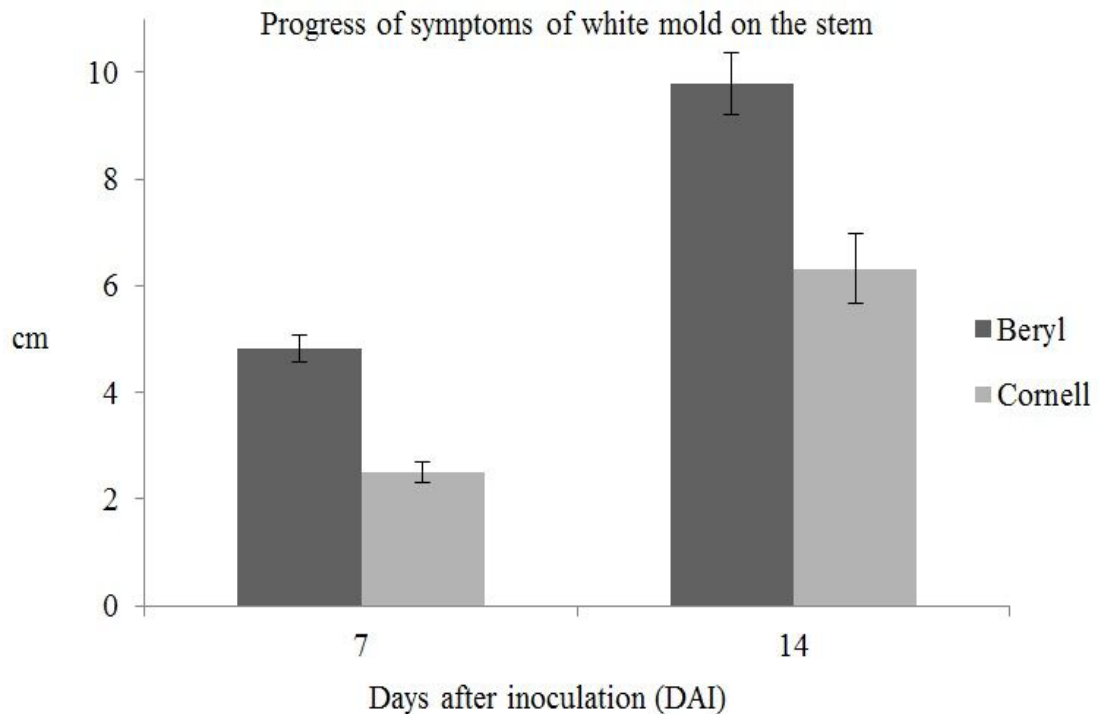


Figure 1. Responses of Beryl and Cornell 605 cultivars to inoculation by *Sclerotinia sclerotiorum* at 7 and 14 days after inoculation, measured by symptom progression in centimeters on inoculated stems.

Quantification and quality of extracted RNA

Regarding the RNA extraction from the stems, it is important to highlight some difficulties inherent to the morphological characteristics of the tissue under study. The stems are composed of plant support tissues, incorporated by secondary metabolites that provide tissue stiffness and, consequently, resistance to the maceration procedure. In addition, the literature reports the influence of these metabolites on the quality of extracted RNA (Jordon-

Thaden et al., 2015; Ma et al., 2015). After RNA extraction from the samples, the total RNA quantification consists of the first diagnosis about the quality of the procedure. Spectrophotometer quantification is an important indicator of RNA quality (Desjardins; Conklin, 2011), considering that they inform both the RNA concentration obtained and the presence of contaminating substances in the sample.

Based on the absorbance readings, the four protocols investigated provided satisfactory amounts of nucleic acids. The mean yield of the PureLink kit of total RNA ranged from 882.67 to 2743.67 ng/ μ L, while Modified PureLink showed more regular results, ranging from 1129.30 to 1580.75 ng/ μ L. For TRIzol protocols the amplitudes of variation were higher, 1191.75 and 3019.5 for the original protocol, and 614.6-1459.65 for the Modified TRIzol (Table 1). Pereira et al. (2017) also observed high amplitude of variation in the quantifications of the bean seed RNA.

Table 1. Quantification (ng / μ L) and absorbance ratios (260/280 and 260/230 nm) of RNA samples before and after treatment with DNase measured by spectrophotometer, followed by the corresponding standard deviation.

Extraction Method	Cultivar	Treatment	Total RNA before DNase			Total RNA after DNase		
			[ng/ μ L]	260/280	260/230	[ng/ μ L]	260/280	260/230
PureLink®	Beryl	Mock	896,67	2,04 ± 0,022	2,45 ± 0,07	164,67	1,81 ± 0,02	1,71 ± 0,06
			± 121,42			± 12,33		
	Inoculated	2313,0	2,08 ± 0,003	2,00 ± 0,10	137,47	1,78 ± 0,02	1,90 ± 0,36	
		0 ± 412,57			± 2,72			
	Cornell 605	Mock	882,67	2,03 ± 0,010	2,26 ± 0,28	140,80	1,83 ± 0,01	1,90 ± 0,15
			± 69,33			± 7,38		
Inoculated	2743,6	2,06 ± 0,011	1,81 ± 0,04	134,40	1,89 ± 0,16	1,61 ± 0,09		
	7 ± 115,17			± 16,55				
PureLink® (Modified)	Beryl	Mock	1404,5	2,10 ± 0,01	2,30 ± 0,12	152,80	1,79 ± 0,15	1,54 ± 0,65
			0 ± 167,00			± 49,15		
	Inoculated	1576,2	2,13 ± 0,005	2,37 ± 0,09	167,50	1,94 ± 0,02	1,99 ± 0,57	
		5 ± 427,55			± 8,21			
	Cornell 605	Mock	1129,3	2,12 ± 0,01	2,15 ± 0,03	145,90	1,94 ± 0,03	1,97 ± 0,38
			0 ± 206,52			± 21,56		
Inoculated	1580,7	2,12 ± 0,002	2,41 ± 0,12	144,16	1,93 ± 0,05	2,06 ± 0,55		
	5 ± 476,41			0 ± 17,10				
RNATRIZOL® Isolation Reagents	Beryl	Mock	1677,5	1,81 ± 0,05	1,08 ± 0,25	145,60	1,90 ± 0,06	1,21 ± 0,41
			0 ± 508,93			± 39,61		
	Inoculated	3019,5	1,93 ± 0,02	1,75 ± 0,12	146,55	1,91 ± 0,07	1,99 ± 0,16	
		0 ± 957,19			± 24,38			
	Cornell 605	Mock	1191,7	1,77 ± 0,09	1,02 ± 0,11	145,00	1,78 ± 0,11	1,29 ± 0,30
			5 ± 597,13			± 72,94		
Inoculated	2320,7	1,90 ± 0,07	1,72 ± 0,16	151,60	1,92 ± 0,04	1,66 ± 0,23		
	5 ± 454,78			± 37,29				
RNATRIZOL® Isolation Reagents (Modified)	Beryl	Mock	614,60	1,98 ± 0,01	1,14 ± 0,24	139,30	1,81 ± 0,08	1,00 ± 0,30
			± 96,95			± 27,58		
	Inoculated	1459,6	2,01 ± 0,02	1,91 ± 0,08	143,70	1,86 ± 0,07	1,90 ± 0,15	
		5 ± 624,99			± 10,93			
	Cornell 605	Mock	629,50	1,89 ± 0,09	1,14 ± 0,14	128,40	1,76 ± 0,10	1,08 ± 0,13
			± 302,73			± 13,56		
Inoculated	1336,7	1,98 ± 0,02	1,89 ± 0,18	135,30	1,82 ± 0,03	1,66 ± 0,17		
	5 ± 298,22			± 14,68				

In absolute values, the original TRIzol Protocol produced more RNA, but, admitting the standard deviation as criteria, the Modified PureLink protocol provided more stable results (Figure 2). It is possible to observe that before treatment with DNase, all the treatments presented differences of yield among their repeats, except for Modified PureLink Protocol. Indeed, regularity can be considered more interesting than quantity due the inconsistencies of some samples.

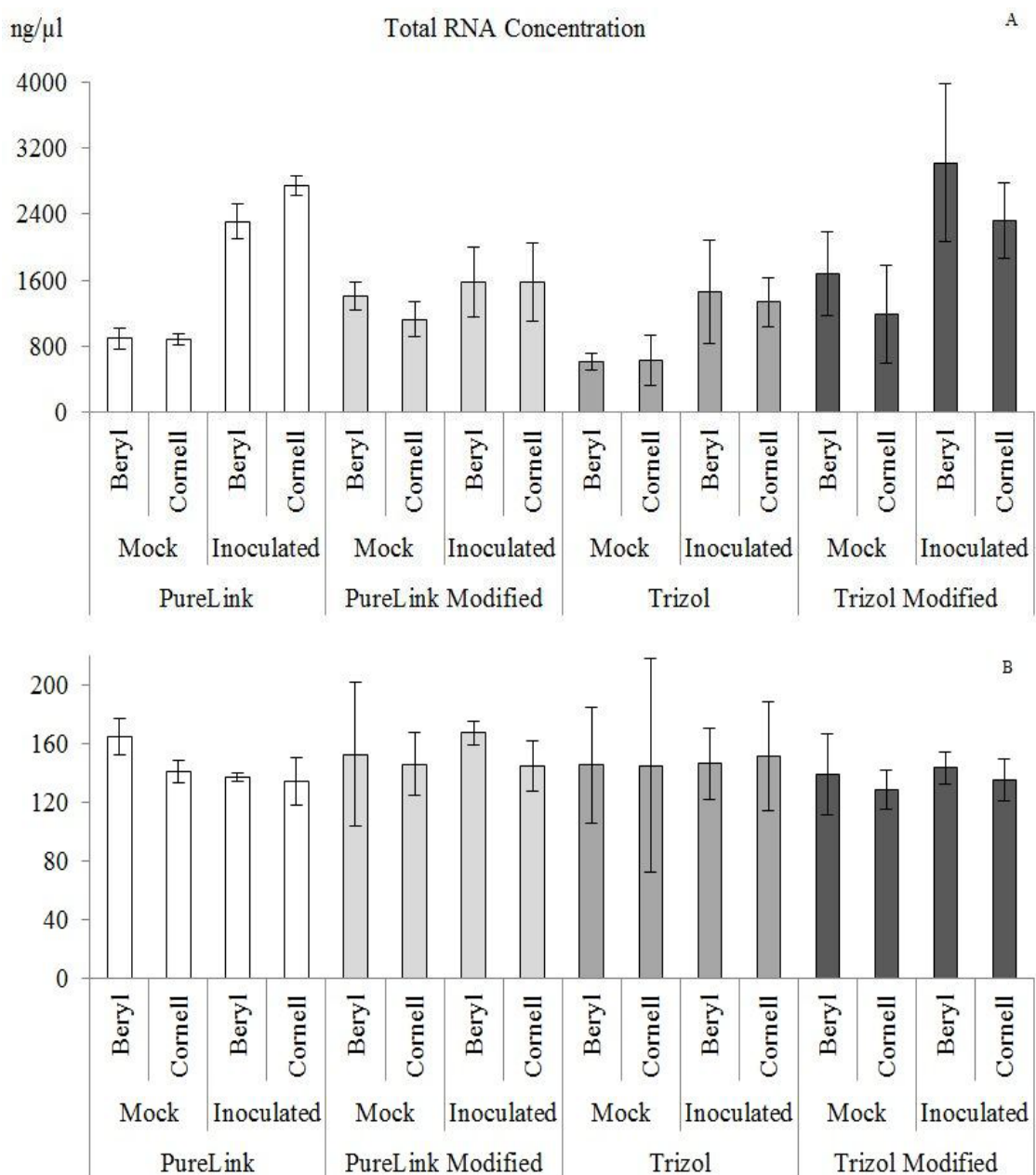


Figure 2. Quantification of the RNA in ng / μ L before (A) and after (B) the DNase treatment, and its respective bar of standard deviation.

Regarding absorbance ratios, superiority was observed for the Modified PureLink Method, considering that these samples showed 260/280 ratio between 2.1 and 2.13, which is in fact desirable for RNA samples (Jazi; Rajaei; Seyedi, 2015; Ma et al., 2015). For the other protocols, PureLink, TRIzol and Modified TRIzol, the ratios obtained were generally below 2.08 but above 1.77, which does not indicate lack of quality, but possible presence of more DNA in the sample or protein (Djami-Tchatchou; Straker, 2012). It is important to note that RNA samples with high quality have values close to 2.0, since the uracil absorbance is greater than thymine. In turn, DNA tends to have a ratio of 260/280 nm around 1.8.

The most prominent differences between the protocols were observed for the 260/230 nm ratio. In general, the 260/230 values for pure nucleic acid are higher than 260/280 values. Samples obtained with the PureLink protocols presented mean values between 1.81 and 2.45. Dash (2013) associated absorbance A260/A280 ratio of 1.9 and A260/A230 ratio of 2.7 with RNA of high purity. With the TRIzol protocols, the relationships obtained in the samples oscillated more drastically, varying from 1.02 to 1.91. From these data, it is plausible to assume that the PureLink procedures were cleaner and of better quality, since some samples of the TRIzol-based protocols presented low values for the 230/260 nm ratio (1.02, 1.08 and 1.14), indicating the presence of contaminants that absorb at 230 nm, such as carbohydrates and phenol (Djami-Tchatchou; Straker, 2012). Among the adaptations performed, the reduction of the volume of supernatant collected seems to have been responsible for the best result of the PureLink Protocol. The recovery of less supernatant from the sample was equivalent to reducing the risk of catching contaminants.

After the DNase treatment, the samples were again subjected to the spectrophotometer. This time, all protocols showed satisfactory values, considering that the concentrations fluctuated within expected range (Table 1). However, it was notable that samples from the Modified TRIzol protocol produced less RNA than the others.

Regarding the absorbances ratio 260/280 nm, the protocols gave mean values within the range of 1.8 to 2.0, except for some treatments. For the 260/230 nm ratio, one treatment of the Modified PureLink method, two of the PureLink, three of the TRIzol and three of the Modified TRIzol showed values below 1.8, showing that the PureLink Modified Protocol was more stable. The RIN values ranged from 6.7 to 9.3, indicating RNA high quality (Figure 3), as also observed for Pereira et al. (2017).

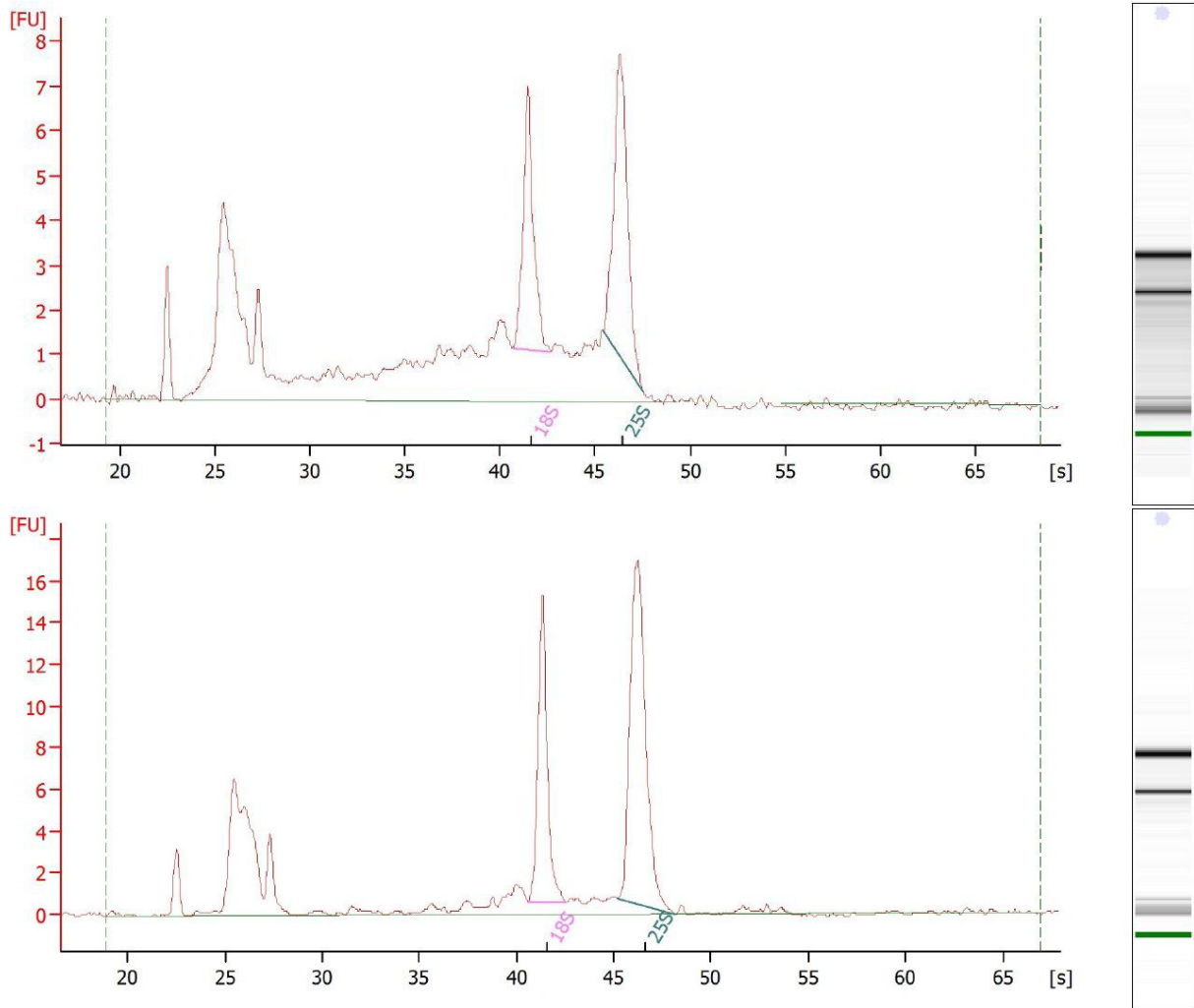


Figure 3. Electropherogram and electrophoresis of representative samples of RNA (6.7 and 9.3 RIN) analysed with the Agilent 2100 bioanalyser system with the RNA 6000 Nano™ kits.

The success in the RNA extraction process should be measured as a function of the quantity, quality and integrity of the RNA extracted (Ma et al., 2015). It is acceptable that the visualization of aliquots in agarose gels submitted to electrophoresis is fundamental for certification of the sample integrity (Ahmed et al., 2017; Djami-Tchatchou; Straker, 2012). Thus, all samples of RNA treated with DNase were submitted to 1% agarose gel electrophoresis. By this procedure, it was observed that the protocols presented similar results, according to the patterns of bands visualized in the agarose gel (Figures 4A, B, C, D).

However, the similarity found by electrophoresis does not corroborate the differences observed by the spectrophotometer. Although absorbance rates are important to indicate the quality of a nucleic acid sample, its downstream application is best for this function (Desjardins; Conklin, 2011). Thus, to verify the application of RNA extracted by different methods in a downstream enzymatic reaction, the samples were converted into cDNA libraries (Djami-Tchatchou; Straker, 2012) and submitted to PCR using primers for two

genes: the first of endogenous expression (actin) and the second of inducible expression (PvFBOX). For the Actin gene, the PCR product profile was strong and regular for 3 and 4 samples obtained with PureLink and Modified PureLink, respectively. For samples extracted with both TRIzol and Modified TRIzol, although amplification occurred, it was weak and uneven when compared to those obtained with PureLink protocols (Figure 4E).

In the case of the inducible gene (PvFBOX), again the samples obtained with Modified PureLink showed a relatively stronger amplification profile than the samples extracted with TRIzol (Figure 4F). Suzuki, Makino and Mae (2001) questioned whether the difference in expression between samples could be attributed to quality of extracted RNA. In fact, our research leads to this perception. The very weak amplification of this gene in the samples from the PureLink Protocol is intriguing. While corroborating the potential for modifications made in the protocol, this observation either indicates near absence of transcripts of this gene in the cDNA library or the inhibition of the PCRs for genes with lower expression levels. Anyway, RNAs with better quality are more adequate for gene expression studies (Ma et al., 2015; Pereira et al., 2017).

To explain this result, it should be noted that the most important modifications in the Modified PureLink method were the reduction of the volume of rescued supernatant at some stages, as well as the repetition of the extract purification procedure, which may have contributed to avoid inhibitory contaminants in the samples. As known, secondary metabolites affect quality, yield and downstream reactions (Ahmad et al., 2017).

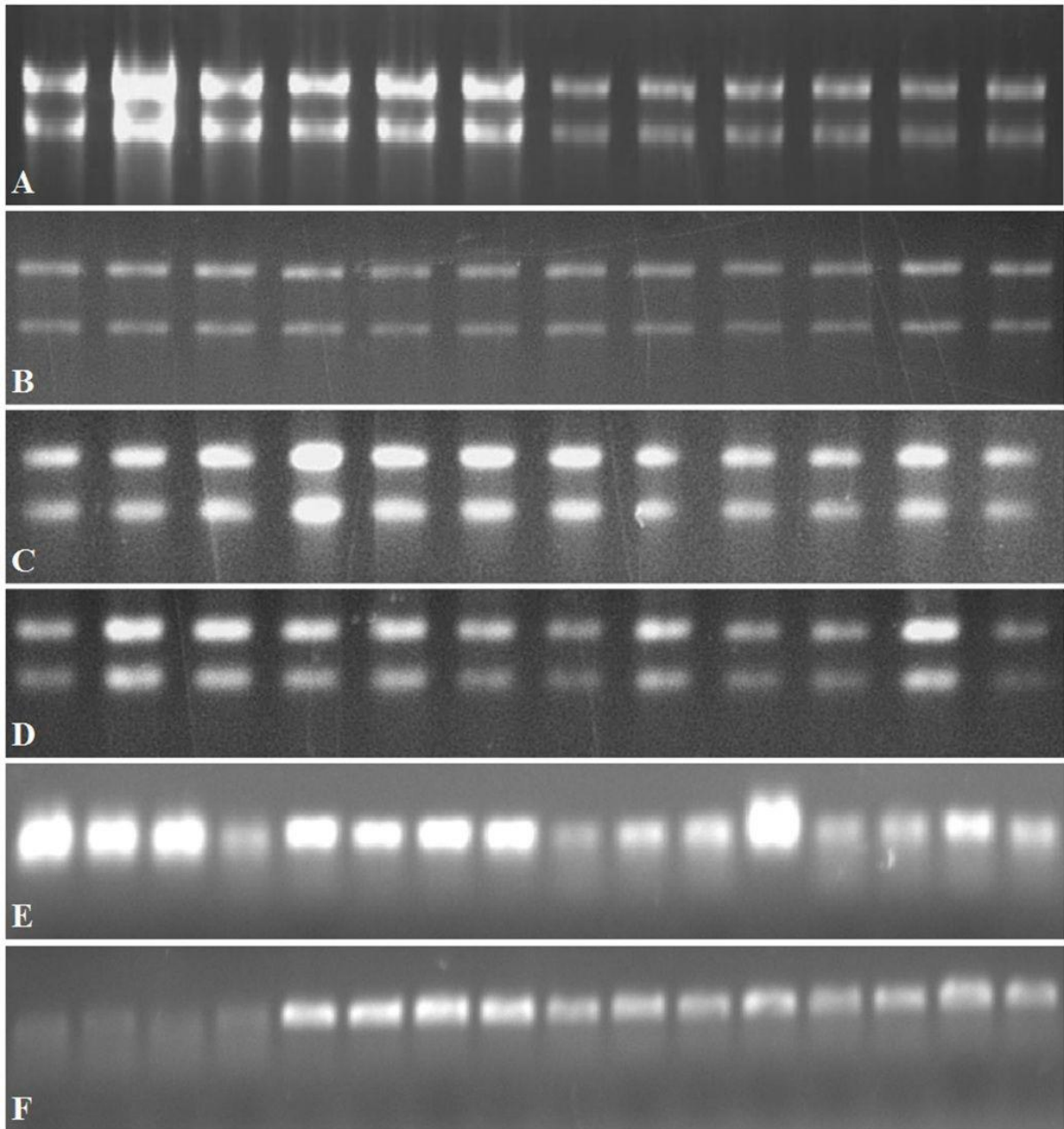


Figure 4. Total RNA extracted by methods of RNA isolation, PureLink (A), Modified PureLink (B), TRIzol (C) and Modified TRIzol (D). Aliquots (2 μ L) of RNA samples were loaded on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g mL⁻¹). The order of application of the samples on the gel was as follows: 1, 2, 3 (Mock Beryl), 4, 5, 6 (Mock Cornell 605), 7, 8, 9 (inoculated Beryl), 10, 11 and 12 Cornell 605 inoculated). PCR amplification products targeted by the primers for Actin (E) and PvFBox (F). The samples were distributed on the agarose gel following both the order of the protocols and libraries, respectively: PureLink (1 to 4), Modified PureLink (5 to 8), TRIzol (9 to 12), Modified TRIzol (13 to 16); Inoculated Beryl (1, 5, 9 and 13), Cornell 605 Inoculated (2, 6, 10 and 14), Mock Beryl (3, 7, 11 and 15) and Mock Cornell 605 (4, 8, 12 e 16).

These data can be interpreted as a function of the intensity and clarity of fragments amplified in the agarose gel. Based on this principle, the PCR products from Modified PureLink Method samples were more pronounced. Both the amplification intensity and the absence of nonspecific amplifications or gel drag were indicative of assertiveness. These

results are consistent with the 260/280 and 260/230 nm ratios, where the samples from the Modified PureLink protocol showed the values ~2.0, generally accepted as "pure" for RNA (Desjardins; Conklin, 2011).

In view of the above, it is reasonable to assume that the indicative values of RNA quality should not be neglected and must be strictly observed in order to guarantee the success of subsequent reactions. It is also plausible to assume that the absorbance ratios of some samples are outside the indicative quality range (1.8 to 2.2) is circumstantial. Therefore, since the protocols can be adapted according to species (Gehrig et al., 2000), tissue (Gasic; Hernandez; Korban, 2004) or stage of life (Pereira et al., 2017), it is important to apply the methods according to the manufacturer's recommendations, but checking the need for fine adjustments in the procedure. Gasic, Hernandez and Korban (2004) related that often modifications of the methods are required. This work helps to conclude that, once the indicative quality values of extracted RNA are observed, the subsequent results are more precise and representative.

CONCLUSIONS

This work allowed to verify that the adaptations carried out in the purification and precipitation steps of the nucleic acids improved the RNA quality indicators. In addition, since indicative values of RNA quality are observed (integrity of 28S and 18S rRNAs in electrophoresis, RNA integrity number - RIN, and absorbance ratios 260/280 and 260/230), the results of subsequent enzymatic reactions, such as PCR, are more accurate and representative.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the CAPES, CNPq and FAPEMIG.

REFERENCES

- AHMAD J. et al. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. **3Biotech**, 7(6):1-7, 2017.
- BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, 31(5):827-838, 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Indicadores da Agropecuária**, Brasília: Conab, 27(8):1-114, 2018.
- DASH, P. K. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide and- and proteinrich tissues of lentil (*Lens culinaris*). **3 Biotech**, 3(2):109-114, 2013.
- DESJARDINS, P. R.; CONKLIN, D. S. Microvolume quantitation of nucleic acids. **Current Protocols in Molecular Biology**, 93(1):1-16, 2011.
- DJAMI-TCHATCHOU, A. T.; STRAKER, C. J. The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). **South African Journal of Botany**, 78:44–46, 2012.
- GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, 22(4):437-437, 2004.
- GEHRIG, H. H. et al. An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, 18(4):369-376, 2000.
- GRIFFITHS, P. D. Release of Cornell 601-606: Common bean breeding lines with resistance to White Mold. **HortScience**, 44(2):463-465, 2009.
- JAIN, S. et al. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection. **PLoS ONE**, 11(7):1-21, 2016.

JAZI, M. M.; RAJAEI, S.; SEYEDI, S. M. Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 21(4):597-603, 2015.

JORDON-THADEN, I. E. et al. Modified CTAB and Trizol protocols improve RNA extraction from chemically complex embryophyta. **Applications in Plant Sciences**, 3(5):1-22, 2015.

KOLOSOVA, N. et al. Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. **BioTechniques**, 36(5):821-824, 2004.

LAVOIE, M.; ELELA, S. A. Yeast ribonuclease III uses a network of multiple hydrogen bonds for RNA binding and cleavage. **Biochemistry**, 47(33):8514-8526, 2008.

LEHNER, M. S. et al. Adaptation and resistance to diseases in Brazil of putative sources of common bean resistance to white mold. **Plant Disease**, 99(8):1098-1103, 2015.

OLIVEIRA, M. B. et al. Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum* – *Phaseolus vulgaris* interaction. **Frontiers in Microbiology**, 6(1162):1-14, 2015.

PADDER, B. A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PLoS ONE**, 11(11):1-26, 2016.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, 39:142-143, 1996.

PEREIRA, W. J. et al. An improved method for RNA extraction from common bean seeds and validation of reference genes for qPCR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 17(2):150-158, 2017.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: A review. **Crop Science**, 53(5):1832-1844, 2012.

SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic Molecular Research**, 13(4):9138-9151, 2014.

SUZUKI, Y.; MAKINO, A.; MAE, T. An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. **Journal of Experimental Botany**, 52(360): 1575-1579, 2001.

TERÁN, H. et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49:115-116, 2006.

TORGA, P. P. et al. Selection of common bean families based on grain type and yield, and QTLs information. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(1):95-100, 2010.

VASCONCELLOS, R. C. C. et. al. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. **PLoS One**, 12(2):1-22, 2017.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; OLIVER, R. P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 27(3):196-206, 2014.

WANG, X. et al. Cloning and functional analysis of three genes encoding polygalacturonaseinhibiting proteins from *Capsicum annuum* and transgenic CaPGIP1 in tobacco in relation to increased resistance to two fungal pathogens. **Plant Molecular Biology**, 81(4-5):379-400, 2013.

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL. J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews | Microbiology**, 10:618-630, 2012.

ARTIGO 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR CDNA-RAPD ENTRE CULTIVARES DE FEIJÃO INOCULADAS POR *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION BY CDNA-RAPD BETWEEN BEAN CULTIVARS INOCULATED BY *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

RESUMO

Mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das doenças que mais afetam o desenvolvimento e produtividade da cultura do feijoeiro. Resistência a patógenos não é uma característica simples, mas sim, um complexo de mecanismos que trabalham em conjunto ou isoladamente para amenizar ou eliminar o efeito do patógeno. A expressão gênica visando resistência devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas quando submetidas ao estresse do patógeno. Foram coletadas hastes inoculadas pelo patógeno, pelo método de duas cultivares de feijão, uma parcialmente resistente (Cornell 605) e outra susceptível (Beryll) utilizando-se o método de Straw teste. Posteriormente a essas coletas, foram realizadas as análises de cDNA-RAPD do material. 58 primers RAPD decâmeros foram utilizados para caracterização de diferencial de expressão. Após a confirmação desse diferencial de expressão e comparação das bandas, realizou-se o processo de isolamento das bandas. Os resultados foram confirmados via análise de expressão diferencial. Foi observado diferenças de expressão tanto em intensidade, quanto em presença e ausência de bandas entre as cultivares inoculadas e não inoculadas. Com esse resultado pode-se identificar bandas diferencialmente expressas que podem ser possíveis genes envolvidos no processo de resistência ao mofo branco. Com essas informações, o estudo desses genes pode ser aprofundado, visando a confirmação desses resultados e auxiliar no desenvolvimento de novos genótipos mais adaptados quando em presença com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. cDNA. RAPD. Mofo Branco. Interação Planta-Patógeno. Diferencial de Expressão.

ABSTRACT

White mold caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Of Bary is one of the diseases that most affect the development and productivity of the bean crop. Resistance to pathogens is not a simple feature, but rather a complex of mechanisms that work together or in isolation to ameliorate or eliminate the pathogen's effect. The gene expression aiming at resistance must present qualitative and quantitative differences when submitted to the stress of the pathogen. Twigs inoculated by the pathogen were collected by two bean cultivars, one partially resistant (Cornell 605) and another susceptible (Beryll) using the Straw test method. Subsequently to these collections were carried out the cDNA-RAPD analyzes of the material. 58 primers RAPD decamer were used for expression differential characterization. After confirming this differential of expression and comparison of the bands, the band isolation process was performed. The results were confirmed via differential expression analysis. Differences in expression were observed both in intensity and in the presence and absence of

bands between inoculated and noninoculated cultivars. With this result we can identify differentially expressed bands that may be possible genes involved in the process of resistance to white mold. With this information, the study of these genes can be deepened, aiming at the confirmation of these results and to help in the development of new genotypes more adapted when present with the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Of Bary.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. cDNA. RAPD. White Mold. Differential Expression. Pathogen Plant Interaction. Expression Differential.

1 INTRODUÇÃO

Plantas estão constantemente expostas a interação com potenciais patógenos no ambiente. Muitas destas interações são prejudiciais a produtividade agrícola das principais culturas do país, o que engloba a cultura do feijoeiro. As perdas podem ser enormes impactando na economia nacional. Como resposta, os produtores agrícolas aumentam a utilização de defensivos químicos e adoção de cultivares resistentes (CONAB, 2019). Em relação ao uso de produtos químicos, as populações de patógenos se adaptam e criam resistência em resposta à constante pressão de seleção e, como resultado, as plantas são infectadas com diferentes níveis de patogenicidade e severidade das doenças (NIMBALKAR et al., 2006). Assim, a seleção de plantas resistentes consiste em um método mais eficiente e econômico de controle de doença (SARTORATO; RAVA, 1994). Por esta razão, vários estudos são direcionados visando compreender os mecanismos de interação entre patógeno e hospedeiro, no intuito de propiciar estratégias mais promissoras de melhoramento genético (PATEL; WILLIAMSON, 2016; BARROS et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018). Durante as etapas de infecção, a planta responde rapidamente ao patógeno tentando isolá-lo do tecido vegetal não infectado. Para isto, dispense de inúmeros processos biológicos de defesa, envolvendo uma rede molecular complexa, dinâmica e interativa com diversos genes envolvidos no processo (NIMBALKAR et al., 2006).

Sclerotinia sclerotiorum possui mais de 400 espécies hospedeiras (BOLAND; HALL, 1994), sendo muitas dessas já cultivadas como: o feijão, alface, canola, cenoura, batata, soja, girassol e outras. A epidemia é favorecida em baixa temperatura (18-23 °C) e alta umidade. Nessas condições, o fungo pode causar até 80% de redução na produção e em condições desfavoráveis pode permanecer viável no solo por até 15 anos, por meio de estruturas de resistência chamadas de escleródios (LOBO JÚNIOR; NASSER, 2007).

Marcadores moleculares têm demonstrado grande potencial para análises de diversidade genética, identificação de genótipos e seleção assistida. Ao mesmo tempo, tem sido verificada a possibilidade de aplicação em estudos sobre expressão gênica diferencial; tudo isso, relativamente às limitações dos marcadores morfológicos e bioquímicos (WILLIAMS et al., 1990; SONG et al., 2003; JOSE et al., 2009). Em contraste com características morfológicas, marcadores moleculares podem revelar diferenças entre genótipos em nível de DNA, sendo uma ferramenta mais precisa e confiável (JOSE et al., 2009). Uma vez que sua utilidade sobre o genoma se estabeleceu como fato, sua aplicação sobre bibliotecas de cDNA passou a ser objeto de pesquisa.

Neste estudo, o marcador RAPD foi adotado devido a sua praticidade e custo relativamente reduzido. Trata-se de uma ferramenta que requer pequenas quantidades de DNA, dada sua sensibilidade alta, sendo relativamente simples em relação a outras técnicas (WILLIAMS et al., 1993). Com base na literatura, pode ser considerado um marcador muito útil para predição de diversidade genética uma vez que requer conhecimento prévio sobre o genoma do organismo estudado. Analisando a literatura disponível, estudos que avaliam diferencial de expressão neste patossistema são considerados escassos. Do ponto de vista da biologia molecular, ampliar o conteúdo informacional pode contribuir significativamente para reconhecimento de genes que possam ser interessantes visando algum fenótipo de interesse para o melhoramento de plantas na cultura do feijão. Com este trabalho, objetivou-se investigar os Expressed Sequence Tags (ESTs) na cultura do feijão, mais especificamente nas cultivares Beryl e Cornell 605, quando inoculadas com o mofo branco, utilizando o marcador RAPD sobre bibliotecas de cDNA buscando avaliar expressão gênica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de ensaio

Inicialmente, o experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições de temperatura e umidade controladas, onde os procedimentos de inoculação das plantas com discos de agar contendo micélio do patógeno, coleta das hastes das plantas e o acompanhamento da evolução dos sintomas foram realizados. Já as extrações do RNA total das hastes, síntese das bibliotecas de cDNAs e genotipagem das amostras por meio de RAPDs, foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da UFLA.

2.2 Materiais genéticos, condições experimentais e inoculações

Duas cultivares de feijoeiro comum, Beryl e Cornell 605, foram selecionadas para este estudo, com padrões de suscetibilidade e resistência ao mofo branco, respectivamente. A Cornell 605 possui grãos com coloração vermelho claro, porte ereto e crescimento determinado. De acordo com Griffiths et al. (2009), este germoplasma apresenta resistência parcial ao mofo branco em casas de vegetação. Devido a esta resistência, a cultivar Cornell 605 é geralmente utilizada como padrão de resistência em experimentos que utilizam escleródios de mofo branco. Por outro lado, a cultivar Beryl é altamente suscetível ao mofo branco e, por isso, tem sido utilizada como controle de suscetibilidade em trabalhos envolvendo este patossistema (GRIFFITH et al., 2012; LEHNER et al., 2015). Assim como Cornell 605, a cultivar Beryl apresenta porte ereto e crescimento determinado, com o diferencial de que os grãos possuem coloração bege.

As sementes destas cultivares foram semeadas em vasos com 2 Kg de solo. O mesmo foi fertilizado com NPK (04-14-08, 1g/kg de solo), e mantido em casa de vegetação nos períodos de novembro a dezembro de 2017, sob temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $70 \pm 5\%$, condições ideais para o desenvolvimento do patógeno.

Existem três locais da planta onde usualmente são realizadas inoculações com o mofo branco que podem ser adotadas: nas folhas primárias, nas axilas das folhas primárias ou no caule principal cortado. Neste estudo, adotou-se a estratégia de inoculação pelo caule principal, utilizando-se o método denominado de Straw Test (PETZOLDT; DICKSON, 1996), um dos mais utilizados em avaliações de resistência ou suscetibilidade do feijoeiro ao mofo branco. Outra razão para esta escolha se deve ao fato de que esta região da planta apresenta lesões típicas da infecção do mofo branco, e logo, potencialmente sítio para expressão de genes de resposta da planta à infecção pelo patógeno.

No procedimento de inoculação, foi utilizado o isolado do escleródio UFLA 27 (SILVA et al., 2014), obtido a partir da coleção micológica do Laboratório de Resistência de Plantas e Genética Molecular do Departamento de Biologia (DBI), da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Inicialmente, foi realizado o procedimento de desinfestação dos escleródios, livrando-os de qualquer contaminação superficial, pela sua imersão consecutiva em etanol a 70% por um minuto, em solução de água sanitária a 20% por três minutos e, logo depois, em água desmineralizada e esterilizada por três vezes, para lavagem. Posteriormente, os escleródios foram alocados em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar), e incubados em BOD por três dias a 23°C , com fotoperíodo de doze horas. Passados os três

dias, a colônia foi repicada apenas uma vez, sendo esta suficiente para a manutenção e propagação dos inóculos, e, logo em seguida, realocada em um novo meio BDA esterilizado, e o procedimento de incubação repetido. Após o terceiro dia de incubação, as placas com o crescimento micelial homogêneo foram utilizadas para a inoculação das plantas.

A inoculação das hastes foi realizada 35 dias após germinação, conforme o método de Straw Test, descrito por Petzoldt e Dickson (1996) e modificado por Terán et al. (2006), possibilitando a utilização de escala de notas de Singh et al. (2014) para a avaliação dos sintomas. A técnica de inoculação consistiu de um corte no ápice caulinar, seguido pelo encaixe de uma ponteira de micropipeta, com disco BDA contendo apenas micélios de *S. sclerotiorum*. Como controle experimental não inoculado, as plantas foram cortadas em sua haste principal e inoculadas com disco de ágar sem patógeno.

2.3 Delineamento experimental e avaliação fenotípica

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo composto por 2 cultivares x 2 tratamentos, com 3 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por um vaso com 3 plantas. As cultivares Beryl e Cornell foram inoculadas com ou sem o isolado do patógeno UFLA 27. Uma vez que amostras das hastes inoculadas foram coletadas para análise de expressão gênica não foi possível avaliar a resistência ou suscetibilidade dos indivíduos. Desta forma, foi conduzido um experimento espelho onde foi realizada a avaliação fenotípica de resposta das plantas ao patógeno e o progresso dos sintomas foi avaliado.

Para avaliação fenotípica dos genótipos, utilizou-se a escala de notas de Singh et al. (2014), na qual são atribuídas notas de 1 a 9 para cada indivíduo, dependendo de análise visual, enquadrando cada planta a uma determinada nota, a saber: 1- planta sem sintomas; 2- invasão do fungo além do sítio de inoculação; 3- invasão do fungo no primeiro nó; 4- invasão do fungo além do primeiro nó; 5- invasão do fungo próximo ao segundo nó; 6- quando o fungo atinge o segundo nó; 7- invasão do fungo além do segundo nó; 8- infecção do fungo atinge mais de 50% entre o segundo e terceiro nó, mas não atinge o terceiro nó; 9- terceiro nó ou morte da planta. Adicionalmente para análise do progresso dos sintomas, foi utilizada uma régua milimetrada para medição do progresso da extensão da lesão, desde a base final do desenvolvimento fúngico até o ponto de inoculação. Os valores, em milímetros, foram computados para averiguação estatística do diferencial de resistência ao patógeno.

A avaliação dos sintomas foi realizada em dois momentos. Primeiro, aos 7 dias após inoculação, como descrito por (SINGH et al., 2014), e adicionalmente, aos 14 dias após inoculação (DAI), com intuito de acompanhar e avaliar a agressividade do patógeno sobre a planta. A verificação visual dos sintomas foi tratada como requisito primordial para o prosseguimento dos estudos. As hastes coletadas deveriam, de fato, serem afetadas de modo pertinente à sua resistência e/ou suscetibilidade ao patógeno *S. sclerotiorum* (análise biológica), para que fosse possível a comparação dos resultados moleculares com os resultados da avaliação fenotípica, para que houvesse confirmação da susceptibilidade ou resistência do material genético avaliado.

2.4 Coleta das hastes de feijoeiro

A coleta das hastes foi realizada em dois momentos distintos: T0 (coleta das hastes antes da inoculação) e T1 (72 horas após inoculação), seguindo o método descrito por Vasconcellos et al. (2016). O período de 72 horas após inoculação foi utilizado, pois foi relatado que a planta teve uma resposta maior ao patógeno nesse tempo (VASCONCELLOS et al., 2016). Por este método, um corte foi feito no caule fornecendo para avaliação um pedaço de 2,5 cm de haste a partir do ponto de inoculação. Após o corte, as amostras foram colocadas em um tubo de microcentrífuga para serem imersas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a -80 °C até a extração do RNA.

2.5 Extração de RNA total em hastes de feijoeiro e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o protocolo do PureLink® RNA Kit (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA) modificado, conforme descrito a seguir. Inicialmente, 100 mg de hastes do feijoeiro foram macerados em nitrogênio líquido até o ponto de pó moído e transferidos para microtubo de 1,5 mL. Em seguida, 600 µL de reagente PureLink foram adicionados, e homogeneizado no vórtex por 1 minuto. Então, o microtubo foi mantido na horizontal, para maximização da superfície de contato com o reagente, por 10 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 7 minutos, a 4 °C. Enquanto isso, 100 µL NaCl 5M foram adicionados em microtubos novos. Logo após, 450 µL de sobrenadante (parte líquida) foram coletados e transferidos para os microtubos já contendo NaCl 5M. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio e submetidos ao vórtex por 1 minuto. Daí, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g, por

10 minutos e, enquanto isso, 100 μL de NaCl 5M foram adicionados a microtubos novos. Por mais uma vez, o sobrenadante foi coletado, transferido para microtubo contendo 100 μL de NaCl 5M, 300 μL de clorofórmio e a mistura foi centrifugada por 10 minutos, a 12.000 g e 4°C. Na sequência, a fase superior foi transferida para microtubo novo e reunida com 450 μL de isopropanol e homogeneizada de forma contínua e lenta. Os microtubos foram mantidos em posição vertical no freezer (-20 °C) overnight. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 4° C a 12.000 g. Nesta etapa, um pellet de ácidos nucleicos pôde ser observado no microtubo. A fase líquida foi descartada e 700 μL de etanol 75% foram adicionados. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas por 7 minutos a 4 °C em 12.000 g. O etanol 75% foi descartado, tomando-se o cuidado de não se perder o pellet. Desta vez, o excesso de álcool foi removido com micropipeta e o pellet deixado para secar em temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 20 μL de água Milli-Q autoclavada e as amostras quantificadas em espectrofotômetro para medidas de microvolumes Nanovue™ Plus.

Para a obtenção das bibliotecas de cDNA, foi utilizado o SuperScript® IV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o RNA total extraído junto com o Oligo d(T)20 primer (Invitrogen, USA) e SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/ μL). As bibliotecas de cDNA foram usadas para reações de cDNA-RAPD.

2.6 Amplificação de PCR-RAPD

Uma vez obtidas as bibliotecas de cDNA, estes materiais foram utilizados para a geração dos perfis de expressão dos tratamentos estudados. PCR's foram executadas utilizando-se conjuntos de primers aleatórios (RAPD) previamente estabelecidos (TABELA 1). Estes foram realizadas utilizando o kit 5x FIREPol® Master Mix (12.5 mM MgCl₂ - Solis BioDyne). O mix de reação foi previamente estabelecido em testes preliminares, contendo 5X FIREPol® Master Mix, primer RAPD (0,5 μM), 20 ng de cDNA e água Nuclease-Free para completar a reação, num volume final de 25 μL .

As reações foram conduzidas em termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems), programado com uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 36 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Uma etapa final a 72 °C por 10 minutos, seguida pela manutenção das amostras em baixa temperatura (4 °C).

Os fragmentos gerados pelas PCR's foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. As análises que se seguiram foram classificadas em qualitativa e quantitativa. Na primeira, computou-se presença e ausência de banda nos diferentes tratamentos, atribuindo 1 para presença e 0 para ausência, gerando uma matriz de dados com todos os primers utilizados. No caso da análise quantitativa, ainda que um determinado produto de PCR tenha sido verificado em diferentes tratamentos, a intensidade deste, no gel, foi avaliada, sendo que a consistência verificada nas repetições dos diferentes tratamentos foi considerada relevante aos propósitos de análise da expressão gênica diferencial. Portanto, fragmentos diferencialmente expressos foram entendidos como aqueles característicos de cada tratamento, seja de cultivar resistente ou susceptível, inoculada ou não, condição persistente em pelo menos duas repetições de cada tratamento analisado.

Tabela 1 - Primers (RAPD) utilizados na investigação de fragmentos de genes diferencialmente expressos em cultivares de feijão inoculadas por *Sclerotinia sclerotiorum*

Primer	Sequência	Primer	Sequência	Primer	Sequência
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPA-20	GTTGCGATCC	OPB-20	GGACCCTTAC
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPB-01	GTTTCGCTCC	OPC-01	TTCGAGCCAG
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPB-02	TGATCCCTGG	OPC-02	GTGAGGCGTC
OPA-04	AATCGGGCTG	OPB-03	CATCCCCCTG	OPC-03	GGGGGTCTTT
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPB-04	GGACTGGAGT	OPC-04	CCGCATCTAC
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPB-05	TGCGCCCTTC	OPC-05	GATGACCGCC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPB-06	TGCTCTGCCC	OPC-06	GAACGGACTC
OPA-08	GTGACGTAGG	OPB-07	GGTGACGCAG	OPC-07	GTCCCGACGA
OPA-09	GGGTAACGCC	OPB-08	GTCCACACGG	OPC-08	TGGACCGGTG
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-09	TGGGGGACTC	OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPB-10	CTGCTGGGAC	OPC-12	TGTCATCCCC
OPA-12	TCGGCGATAG	OPB-11	GTAGACCCGT	OPC-13	AAGCCTCGTC
OPA-13	CAGCACCCAC	OPB-12	CCTTGACGCA	OPC-14	TGCGTGCTTG
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPB-13	TTCCCCCGCT	OPC-15	GACGGATCAG
OPA-15	TTCCGAACCC	OPB-14	TCCGCTCTGG	OPC-16	CACACTCCAG
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPB-15	GGAGGGTGTT	OPC-17	TTCCCCCAG
OPA-17	GACCGCTTGT	OPB-17	AGGGAACGAG	OPC-18	TGAGTGGGTG
OPA-18	AGGTGACCGT	OPB-18	CCACAGCAGT	OPC-19	GTTGCCAGCC
OPA-19	CAAACGTCGG	OPB-19	ACCCCCGAAG	OPC-20	ACTTCGCCAC

Fonte: Do autor (2019).

2.7 Análise dos fragmentos diferencialmente expressos

Fragmentos gerados pelas PCRs foram codificados com 0 e 1 para ausência e presença, respectivamente. Foram submetidos à análise de cluster, gerando um dendograma. Este dendograma foi construído usando a opção de plotagem de árvore disponível no software R studio. Este método se baseou no coeficiente de Dicer. Também foi visualizada a matriz de dissimilaridade por meio do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). A partir desta construção, analisou-se a similaridade entre os tratamentos inoculados e não inoculados, das cultivares Cornell 605 e Beryl.

2.8 Análise estatística

Como já anunciado, o experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, composto por 2 cultivares x 2 tratamentos, com três repetições. Ressalta-se que, para as parcelas nas quais as hastes foram coletadas, não haveria possibilidade de avaliação fenotípica, uma vez que para a visualização dos sintomas seriam necessários pelo menos sete dias pós-inoculação. Como já informado, para a avaliação fenotípica foi necessário a implantação de um experimento controle, no qual se deu apenas a inoculação, mas não a coleta das hastes.

Cada parcela experimental foi constituída por um vaso contendo três plantas. Para a análise estatística da reação das cultivares, o modelo estatístico adotado foi descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + l_i + a_j + (l a)_{ij} + e_{ij} \quad (1)$$

Onde,

Y_{ij} : observação referente à linhagem i , no DAI j ;

μ : média geral

l_i : efeito fixo da linhagem i ;

a_j : efeito fixo do DAI j ;

$(l a)_{ij}$: efeito fixo da interação entre linhagem i e DAI j ;

e_{ij} : efeito aleatório do erro experimental, $e_{ij} \cap N(0, \sigma^2_e)$

Em que o significado de DAI seria “dias após inoculação”.

Foi realizada também o teste de médias com os dados de avaliação das plantas individuais com suas respectivas repetições biológicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do procedimento de inoculação

Para fins de validação dos procedimentos de inoculação do isolado de *S. sclerotiorum* em hastes dos feijoeiros, o progresso dos sintomas foi monitorado. A cultivar Beryl apresentou suscetibilidade mais pronunciada ao patógeno em comparação a cultivar Cornell 605, nos dois tempos analisados, tanto aos 7 quanto aos 14 dias após inoculação (DAI), independentemente do método adotado, seja Straw Test ou régua milimetrada (TABELA 2).

A partir dos resultados observados, foi confirmada a expectativa prévia que apontava para resistência parcial da linhagem Cornell 605 e suscetibilidade da linhagem Beryl ao patógeno *S. sclerotiorum* (GRIFFITHS, 2009; GRIFFITH et al., 2012; MIKLAS et al., 2013; LEHNER et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2016, 2017; LEITE et al., 2017).

Tabela 2 - Grau de Desenvolvimento da Doença (Régua Milimetrada).

		Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Σ (B1;B2;B3)	
		Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão
7 DAI	Beryl	4,975a	1,884	5,283a	1,053	4,192a	1,607	4,817	1,579
	Cornell	2,608b	1,152	3,000b	1,395	1,883b	0,697	2,497	1,184
	DMS	1.3227		1.0468		1.0488			
14 DAI	Beryl	9,592a	2,636	12,325a	2,182	7,433	3,481a	9,783	3,407
	Cornell	3,492b	1,795	3,892b	1,504	2,650	0,961b	3,344	1,513
	DMS	1.9094		1.5869		2.1622			
		Bloco 1		Bloco 2		Bloco 3		Σ (B1;B2;B3)	
		Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão	Média	Desv. Padrão
7 DAI	Beryl	6,0	2,0	5,0	1,0	6,0	1,0	6,0	2,0
	Cornell	4,0	1,0	4,0	1,0	4,0	0,0	4,0	0,0
14 DAI	Beryl	8,0	2,0	7,0	2,0	7,0	1,0	7,0	2,0
	Cornell	4,0	1,0	3,0	1,0	4,0	1,0	4,0	1,0

Fonte: Do autor (2019).

As plantas susceptíveis apresentaram sintomas típicos da doença, tais como apodrecimento da região inoculada, amarelecimento das folhas e, conseqüentemente, murcha

da planta. Já as plantas resistentes apresentaram sintomas de forma mais amena, sem muitos danos a planta demonstrando a resistência parcial ao patógeno *S. sclerotiorum*.

3.2 Quantificação e qualificação do RNA extraído

A quantificação do espectrofotômetro é um importante indicador da qualidade do RNA (DESJARDINS; CONKLIN, 2011), sendo este, um procedimento crucial para a verificação da qualidade, considerando que ele informa tanto a concentração de RNA obtido, quanto a presença de substâncias contaminantes na amostra.

Com base nas leituras de absorvâncias, o protocolo investigado forneceu concentrações satisfatórias de ácidos nucleicos. A produção média de RNA total variou de 1.129,30 a 1.580,75 ng/ μ L antes do tratamento com DNase (TABELA 3). O processo de extração de RNA total foi considerado satisfatório, tanto em quantidade quanto em qualidade.

Do ponto de vista de absorvância, a razão de 260/280 apresentou resultados ideais, estabelecidos entre 2,10 e 2,20 em média (MA et al., 2015; MOAZZAM JAZI et al., 2015), indicando ausência de metabólitos secundários, proteínas e contaminantes acima do desejado (DJAMI-TCHATCHOU; STRAKER, 2012). É importante notar que as amostras de RNA com alta qualidade, têm valores próximos a 2,0, uma vez que a absorvância da uracila é maior em relação a timina. Por sua vez, o DNA tende a ter uma relação de 260/280 nm em torno de 1,8. Para a relação de 260/230, os resultados também se apresentaram dentro da faixa desejada com média entre 1,81 e 2,45 (PEREIRA et al., 2017). Assim, o RNA extraído se mostrou com boa qualidade para o prosseguimento deste projeto.

Após o tratamento com DNase, observou-se estabilidade em relação a concentração, o que poderia ser esperado, já que houve o balizamento da concentração do RNA total antes do momento da DNase. Do ponto de vista da relação 260/230, as amostras renderam resultados satisfatórios em sua maioria, uma vez que todos os tratamentos apresentaram médias dentro da faixa esperada. O mesmo foi visto na relação 260/280, na qual obteve-se uma exceção, pois o tratamento Beryl mock se distanciou da faixa desejável da relação. Os valores de RIN variaram de 8,40 a 9,30, indicando alta qualidade do RNA, como também observado por Pereira et al. (2017).

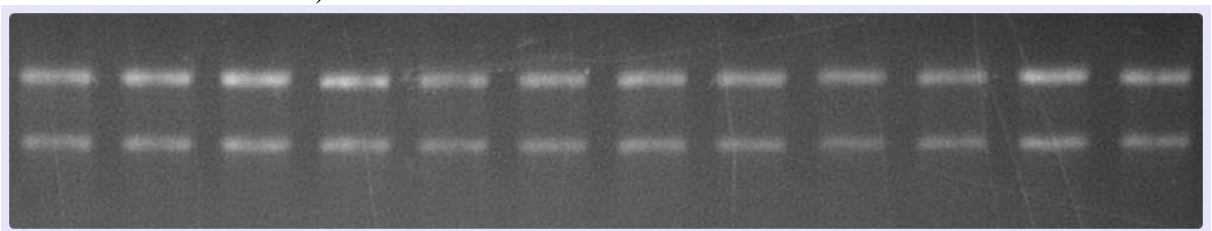
Tabela 3 - Quantificação em ng / μL de RNA e relações de absorvâncias 260/280 e 260/230 nm antes e após tratamento com DNase, medidas por espectrofotômetro.

Cultivar	Tratamento	RNA Total antes da DNase			RNA Total depois da DNase		
		[] ng/ μl	260/280	260/230	[] ng/ μl	260/280	260/230
Beryl	Não inoculado	1404,50 \pm 167,00	2,10 0,01	\pm 2,30 0,12	\pm 152,80 49,15	\pm 1,79 0,15	\pm 1,54 0,65
	Inoculado	1576,25 \pm 427,55	2,13 0,005	\pm 2,37 0,09	\pm 167,50 8,21	\pm 1,94 0,02	\pm 1,99 0,57
Cornell 605	Não inoculado	1129,30 \pm 206,52	2,12 0,01	\pm 2,15 0,03	\pm 145,90 21,56	\pm 1,94 0,03	\pm 1,97 0,38
	Inoculado	1580,75 \pm 476,41	2,12 0,002	\pm 2,41 0,12	\pm 144160 17,10	\pm 1,93 0,05	\pm 2,06 0,55

Fonte: Do autor (2019).

O sucesso no processo de extração do RNA deve ser medido em função da quantidade, qualidade e integridade do RNA extraído (MA et al., 2015). É aceitável que a visualização de alíquotas em géis de agarose submetidos à eletroforese, seja fundamental para a certificação da integridade da amostra (DJAMI-TCHATCHOU; STRAKER, 2012; AHMAD et al., 2017). Assim, todas as amostras de RNA tratadas com DNase foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, verificando que o padrão de bandas estava dentro do esperado (FIGURA 1).

Figura 1 - RNA Total extraído pelo método PureLink. Alíquotas (2 μL) das amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose a 1% coradas com brometo de etídio (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A ordem de aplicação das amostras no gel foi a seguinte: 1, 2, 3 (Mock Beryl), 4, 5, 6 (Mock Cornell 605), 7, 8, 9 (inoculado Beryl), 10, 11 e 12 Cornell 605 inoculado).



Fonte: Do autor (2019).

Para certificação da qualidade do RNA extraído para reações enzimáticas subsequentes, as amostras foram convertidas em bibliotecas de cDNA (DJAMI-TCHATCHOU; STRAKER, 2012) e submetidas a PCR utilizando-se primers para dois genes: o primeiro de expressão endógena (actina), e o segundo de expressão indutível (PvFBOX). Para ambos os genes, a expressão das bandas foi forte e regular, dando indícios de que todas as etapas realizadas até então, haviam sido satisfatórias.

É importante ressaltar sobre a extração de RNA a partir de hastes do feijoeiro, a existência de algumas dificuldades inerentes às características morfológicas do tecido em estudo. As hastes são compostas por tecidos de suporte de plantas, incorporados por metabólitos secundários que proporcionam rigidez tecidual e, conseqüentemente, resistência ao procedimento de maceração. Tais metabólitos são relatados na literatura como influenciadores na qualidade do RNA extraído (JORDON-THADEN et al., 2015; MA et al., 2015). Uma das adaptações feitas no protocolo de extração do RNA total consistiu do aumento no número de lavagens por clorofórmio, uma vez que essa etapa elimina a contaminação e, conseqüentemente, apresenta um RNA mais íntegro para futura utilização, uma vez que os metabólitos secundários afetam a qualidade, o rendimento e as reações a jusante (AHMAD et al., 2017).

3.3 Análises cDNA-RAPD

Os perfis de amplificação por PCR utilizando primers RAPD sobre bibliotecas de cDNA, foram analisados para identificação de bandas de amplificação que apresentam polimorfismo claro entre as cultivares, visando identificação de diferencial de expressão entre os 4 tratamentos. A presente investigação revelou um alto nível de polimorfismo nos genótipos testados. Foram utilizados 58 primers RAPD para caracterização dos genótipos, porém, desse total, apenas 40 primers RAPD apresentaram polimorfismos nos tratamentos avaliados, gerando um total de 136 bandas polimórficas de um total de 255 bandas (53,34%). Foi obtido um número médio de 2 bandas polimórficas por primer, variando de 0 a 7 bandas no total (TABELA 4). Em ordem, nas combinações de primers OPB-10, OPA-04, OPA-07, OPB-07 e OPC-11 observou-se o maior número de marcadores polimórficos com 7, 7, 6, 6 e 6 respectivamente

Dos 58 primers testados, 8 foram selecionados (OPA-05, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPA-15, OPC-11, OPB-17 e OPC-19), tendo como base a ocorrência de polimorfismos, seja em caráter qualitativo ou quantitativo (FIGURA 2). O restante dos primers e seus respectivos fragmentos de PCR gerados, foram utilizados para análise de diversidade genética. A seleção dos primers foi baseada na robustez de amplificação, tanto para nitidez, quanto para intensidade das bandas, dando preferência para bandas polimórficas, de acordo com os critérios utilizados por Lynch e Milligan (1994). Esse critério foi utilizado, sendo uma maneira objetiva de se obter resultados mais concisos, utilizando as propriedades do RAPD.

Tabela 4 - Primers com seus respectivos graus de polimorfismo. LM: Locus Monomórficos; LP: Locus Polimórficos; TL: Total de Locus; % P: % Polimorfismo. (continua...)

Primer	Sequência (5'-3')	TL	LM	LP	%P
OPA-05	AGGGGTCTTG	6	3	3	50,0
OPA-06	GGTCCCTGAC	0	0	0	0,0
OPA-07	GAAACGGGTG	12	6	6	50,0
OPA-08	GTGACGTAGG	0	0	0	0,0
OPA-09	GGGTAACGCC	5	2	3	60,0
OPA-10	GTGATCGCAG	4	2	2	50,0
OPA-11	CAATCGCCGT	0	0	0	0,0
OPA-12	TCGGCGATAG	0	0	0	0,0
OPA-13	CAGCACCCAC	10	5	5	50,0
OPA-14	TCTGTGCTGG	0	0	0	0,0
OPA-01	CAGGCCCTTC	0	0	0	0,0
OPA-02	TGCCGAGCTG	10	5	5	50,0
OPA-03	AGTCAGCCAC	10	5	5	50,0
OPA-04	AATCGGGCTG	14	7	7	50,0
OPA-16	AGCCAGCGAA	0	0	0	0,0
OPA-17	GACCGCTTGT	4	2	2	50,0
OPA-18	AGGTGACCGT	3	1	2	66,7
OPA-19	CAAACGTCGG	4	2	2	50,0
OPA-20	GTTGCGATCC	3	1	2	66,7
OPB-01	GTTTCGCTCC	3	1	2	66,7
OPB-02	TGATCCCTGG	0	0	0	0,0
OPB-03	CATCCCCCTG	0	0	0	0,0

Tabela 4 - Primers com seus respectivos graus de polimorfismo. LM: Locos Monomórficos; LP: Locos Polimórficos; TL: Total de Locos; % P: % Polimorfismo. (continua...)

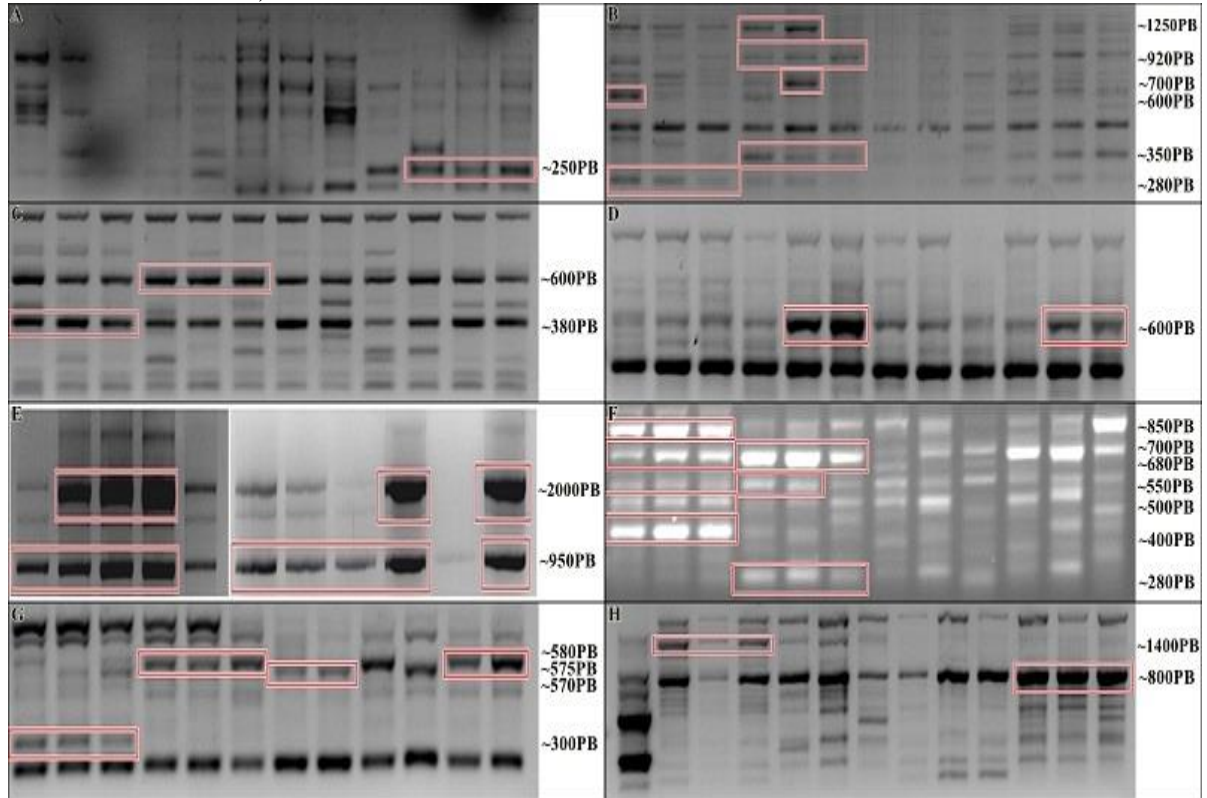
Primer	Sequência (5'-3')	TL	LM	LP	%P
OPB-04	GGACTGGAGT	2	1	1	50,0
OPB-05	TGCGCCCTTC	7	3	4	57,1
OPB-06	TGCTCTGCCC	7	3	4	57,1
OPB-07	GGTGACGCAG	11	5	6	54,5
OPB-08	GTCCACACGG	4	2	2	50,0
OPB-09	TGGGGGACTC	10	5	5	50,0
OPB-10	CTGCTGGGAC	12	5	7	58,3
OPA-15	TTCCGAACCC	5	1	4	80,0
OPC-11	AAAGCTGCGG	12	6	6	50,0
OPC-12	TGTCATCCCC	2	1	1	50,0
OPC-14	TGCGTGCTTG	4	2	2	50,0
OPB-13	TTCCCCCGCT	0	0	0	0,0
OPB-14	TCCGCTCTGG	0	0	0	0,0
OPB-15	GGAGGGTGTT	10	5	5	50,0
OPB-17	AGGGAACGAG	6	3	3	50,0
OPB-18	CCACAGCAGT	0	0	0	0,0
OPC-13	AAGCCTCGTC	2	1	1	50,0
OPC-15	GACGGATCAG	10	5	5	50,0
OPC-16	CACACTCCAG	8	4	4	50,0
OPC-17	TTCCCCCAG	0	0	0	0,0
OPC-18	TGAGTGGGTG	2	0	2	100,0
OPC-19	GTTGCCAGCC	5	2	3	60,0

Tabela 4- Primers com seus respectivos graus de polimorfismo. LM: Locus Monomórficos; LP: Locus Polimórficos; TL: Total de Locus; % P: % Polimorfismo. (conclusão...)

Primer	Sequência (5'-3')	TL	LM	LP	%P
OPC-20	ACTTCGCCAC	6	3	3	50,0
OPB-11	GTAGACCCGT	4	2	2	50,0
OPB-12	CCTTGACGCA	0	0	0	0,0
OPB-19	ACCCCGAAG	0	0	0	0,0
OPB-20	GGACCCTTAC	6	3	3	50,0
OPC-01	TTCGAGCCAG	7	3	4	57,1
OPC-02	GTGAGGCGTC	4	2	2	50,0
OPC-03	GGGGGTCTTT	4	2	2	50,0
OPC-04	CCGCATCTAC	2	1	1	50,0
OPC-05	GATGACCGCC	0	0	0	0,0
OPC-06	GAACGGACTC	4	2	2	50,0
OPC-07	GTCCCGACGA	2	1	1	50,0
OPC-08	TGGACCGGTG	9	4	5	55,6
Total		255	119	136	53,34

Dos oito primers selecionados 64 amplicons foram gerados, e destes, 36 são de bandas polimórficas (56,25%), o que é aproximado ao valor obtido por Maciel et al. (2001) em *P. vulgaris*. Esses altos valores podem ser devidos a natureza dos marcadores RAPD. O número de bandas obtidas com cada primer variou, chegando a apresentar 14 e 12 fragmentos para os primers OPA-04, OPA-07, OPB-10 e OPC-11 respectivamente. Já Zhang et al. (2008) realizaram um estudo de diversidade genética de 229 genótipos com 30 marcadores de microsatélite e relataram a detecção de 166 alelos com uma média de 5,5 alelos por loco, para todos os marcadores. Da mesma forma, Sharma et al. (2006) investigaram 46 acessos de feijão comum com marcadores RAPD e relataram uma geração de 43 amplicons com 70% de polimorfismo.

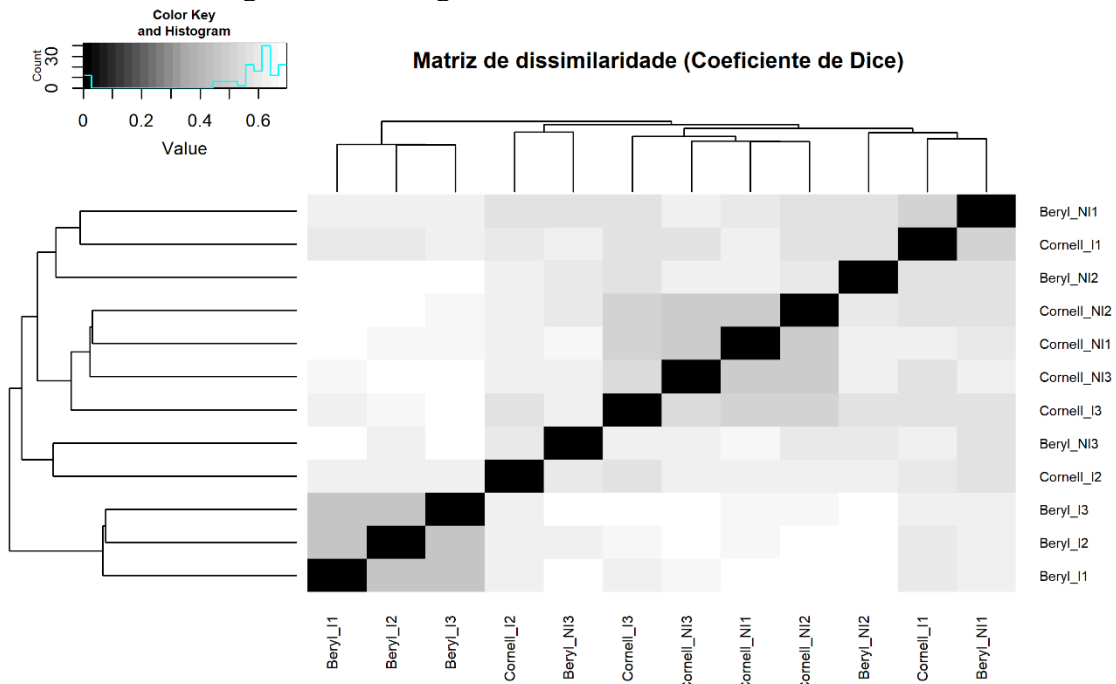
Figura 2 - Géis de cDNA-RAPD dos primers selecionados. Primer OPA-05 (A), Primer OPB-06 (B), OPB-07 (C), OPB-10 (D), OPA-15 (E), OPC-11 (F), OPB-17 (G) e OPC-19 (H). A ordem de aplicação das amostras no gel foi: 1, 2, 3 (Beryl inoculado), 4, 5, 6 (Cornell 605 inoculado), 7, 8, 9 (Beryl não inoculado), 10, 11 e 12 (Cornell 605 não inoculado).



Fonte: Do autor (2019).

Os resultados revelaram que o alto nível de similaridade genética foi obtido entre cultivares inoculados e não inoculados de mesma cultivar, como de esperado. Para facilitar a visualização (FIGURA 3).

Figura 3 - Dendrograma utilizando coeficiente de Dice.



Fonte: Do autor (2019).

Baseado no coeficiente de similaridade de dados, o índice variou de 0,348 a 0,639. O índice máximo de similaridade foi obtido entre os genótipos Beryl inoculado 2 e Beryl inoculado 3, enquanto que, o índice mínimo, como esperado, foi obtido por Cornell 605 não inoculado 1 e Beryl inoculado 1. Esse pequeno diferencial entre cultivares iguais pode ser explicado devido a adaptação ao meio ambiente, como por exemplo, pelo estresse biótico ou abiótico que cada planta recebe, além das condições e tipo de solo e práticas de cultivo no momento de seu crescimento em casa de vegetação. Nota-se que a variação das amplitudes foi pequena em razão do maior parentesco entre as cultivares, e que a amplitude aumenta de acordo com a divergência dos genótipos.

Marcadores moleculares, diferentemente das características morfo-agronômicas, não são influenciados pelas condições ambientais e, portanto, são ferramentas mais confiáveis, não apenas para caracterizar os genótipos, mas também para mensurar a relação genética com maior precisão. O presente estudo estabeleceu a expressão gênica dos genótipos usando marcadores RAPD entre os genótipos estudados. O polimorfismo gerado pelo RAPD corresponde aos fragmentos aleatórios do genoma, amplificados ou não entre as linhagens utilizadas. Assim, é importante lembrar que a similaridade genética identifica com grande segurança o parentesco entre os genótipos. É importante relembrar, no entanto, que as análises foram feitas sobre material expresso na forma de cDNA. O indicativo de expressão gênica diferencial entre cultivares é bastante importante no que se refere aos genes que foram

expressos sobre cada circunstância. O sequenciamento das bandas polimórficas, seja em caráter qualitativo ou quantitativo deverá trazer informações muito importantes no entendimento de quais proteínas são produzidas nos primeiros dias após a infecção pelo patógeno.

O estudo pode ser bem apoiado pela pesquisa de Chiorato et al. (2007), que estudaram um conjunto de 220 genótipos de feijoeiro e relataram que esses genótipos formaram dois grupos com 47 e 60% de similaridade genética, e interpretaram que tanto conjuntos de dados moleculares, quanto morfo agrônômicos, são igualmente eficazes para quantificar e organizar a diversidade genética de grãos comuns. Da mesma forma, Jose et al. (2009) descobriram que o valor do coeficiente de similaridade pareada por Jaccard de 0,5 a 0,95, indicou uma variação genética intra-específica prevalente em variedades crioulas de feijão.

5 CONCLUSÃO

Este estudo verificou que o método de RAPD-cDNA, é um método alternativo interessante para análises de ESTs e de similaridade entre genótipos no nível de expressão gênica. Foi verificado número de bandas polimórficas em relação aos vários tratamentos, podendo ser putativos alelos, referente a resistência ao mofo branco do feijoeiro. Com isto, tais alelos podem ser estudados de forma mais aprofundada, a fim de identificá-los frente as características fenotípicas que lhe atendem.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, J.; BAIG, M. A.; ALI, A. A.; AL-HUQAIL, A.; IBRAHIM, M. M.; QURESHI, M. I. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. **3 Biotech**, v. 7, n. 6, p. 373, 16 dez. 2017.
- BARROS, A. P. O. de; AMÂNCIO, L. C. S.; MICHEREFF, S. Interaction between herbicides and root pathogens, with special reference to *Rhizoctonia*. **Revisão Anual de Patologia em Plantas**, v. 25, n. August, 2017.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, jun. 1994.
- CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BENCHIMOL, L. L.; CHIAVEGATO, M. B.; DIAS, L. A. dos S.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 3, p. 256-262, jun. 2007.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2018/19**. v. 6, p. 1-26, out. 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: jan. 2019.
- DESJARDINS, P. R.; CONKLIN, D. S. Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Current Protocols in Molecular Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 1-16.
- DJAMI-TCHATCHOU, A. T.; STRAKER, C. J. The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 44-46, jan. 2012.
- GRIFFITH, P. D.; HALSETH, E. S.; HALSETH, D. Release of Cornell 607-612: Common Bean Breeding Lines with Resistance. **Hortscience**, v. 47, n. 7, p. 952-954, 2012.
- GRIFFITHS, P. D. Release of Cornell 601 – 606: Common Bean Breeding Lines with Resistance to White Mold. **Hortscience**, v. 44, n. 2, p. 463-465, 2009.
- JORDON-THADEN, I. E.; CHANDERBALI, A. S.; GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, D. E. Modified CTAB and TRizol Protocols Improve RNA Extraction from Chemically Complex Embryophyta. **Applications in Plant Sciences**, v. 3, n. 5, p. 14001-05, 2015.
- JOSE, F. C.; THOMAS, G.; JOSE, F. C.; MOHAMMED, M. M. S.; THOMAS, G.; VARGHESE, G.; SELVARAJ, N.; DORAI, M. Genetic diversity and conservation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) landraces in Nilgiris. **Current science**, v. 97, n. August, p. 227-235, 2009.
- JUNIOR, M. L.; NASSER, L. C. B. Mofo Branco pode Limitar o agronegócio da soja, feijão e girassol em áreas infestadas. **Informativo Agromen**, v. 20, p. 4, 2005.

- LEHNER, M. S.; TEIXEIRA, H.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; LIMA, R. C.; CARNEIRO, J. E. S. Adaptation and Resistance to Diseases in Brazil of Putative Sources of Common Bean Resistance to White Mold. **Plant Disease**, v. 99, n. 8, p. 1098-1103, ago. 2015.
- LEITE, M. E.; FIGUEIREDO, I. C. R. de; DIAS, J. A.; ALVES, F. C.; SANTOS, J. B. dos. Reaction of common bean lines derived from recurrent selection for white mold resistance and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotirum* isolates. **Bioscience Journal**, p. 1177-1187, 2017.
- MA, Z.; HUANG, B.; XU, S.; CHEN, Y.; LI, S.; LIN, S. Isolation of High-Quality Total RNA from Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0130234, 17 jun. 2015.
- MACIEL, F.; GERALD, L.; ECHEVERRIGARA, S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of south-Brazil. **Euphytica**, v. 120, n. 2, p. 257-263, 2001.
- MIKLAS, P. N.; PORTER, L. D.; KELLY, J. D.; MYERS, J. R. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 3, p. 525-543, 2013.
- MOAZZAM JAZI, M.; RAJAEI, S.; SEYEDI, S. M. Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 4, p. 597-603, 7 out. 2015.
- NASCIMENTO, K. J. T.; DEBONA, D.; REZENDE, D.; DAMATTA, F. M.; RODRIGUES, F. Á. Changes in leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence on soybean plants supplied with silicon and infected by *Cercospora sojina*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 11-12, p. 747-760, dez. 2018.
- NIMBALKAR, S. B.; HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; FRANCESCHI, V.; GUPTA, V. S. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4-6, p. 176-188, abr. 2006.
- PATEL, T. K.; WILLIAMSON, J. D. Mannitol in Plants, Fungi, and Plant – Fungal Interactions. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 6, p. 486-497, 2016.
- PEREIRA, W. J.; BASSINELLO, P. Z.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. An improved method for RNA extraction from common bean seeds and validation of reference genes for qPCR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 150-158, jun. 2017.
- PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 39, n. 39, p. 142-143, 1996.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994.

SHARMA, T. R.; RANA, J. C.; SHARMA, R.; RATHOUR, R.; SHARMA, P. N. Genetic diversity analysis of exotic and Indian accessions of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Using **RAPD markers**. v. 66, n. 4, p. 275-278, 2006.

SILVA, P. H.; SANTOS, J. B.; LIMA, I. A.; LARA, L. A. C.; ALVES, F. C. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, 2014.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. A new scale for white mold disease rating for the common bean cut-stem method of inoculation in the greenhouse. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 57, n. October, p. 231-232, 2014.

SONG, Z. P.; XU, X.; WANG, B.; CHEN, J. K.; LU, B.-R. Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 8, p. 1492-1499, 15 nov. 2003.

TERÁN, H.; LEMA, M.; SCHWARTZ, H. F.; DUNCAN, R.; GILBEILSON, R.; SINGH, S. P. Modified Petzoldt and Dickson Scale for White Mold Rating of Common Bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 49, n. 49, p. 115-116, 2006.

VASCONCELLOS, R. C. C.; LIMA, T. F. C.; FERNANDES-BRUM, C. N.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; SANTOS, J. B. Expression and validation of PvPGIP genes for resistance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

VASCONCELLOS, R. C. C.; ORAGUZIE, O. B.; SOLER, A.; ARKWAZEE, H.; MYERS, J. R.; FERREIRA, J. J.; SONG, Q.; MCCLEAN, P.; MIKLAS, P. N. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-22, 2017.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A.; LIVAK, K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; ANTONI RAFALSKI, J.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Analysis of residual stress by diffraction using neutron and synchrotron radiation. **Methods Enzymol.**, v. 218, p. 704-40, 1993

ZHANG, X.; BLAIR, M. W.; WANG, S. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 629-640, 2008.