

Anais



V Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da V Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Francisco Célio Maia Chaves
Luadir Gasparotto
Lucinda Carneiro Garcia
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Ricardo Lopes
Wenceslau Geraldes Teixeira
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2009*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpaa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*

José Ricardo Pupo Gonçalves

Lucinda Carneiro Garcia

Luis Antonio Kioshi Inoue

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paulo César Teixeira

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Ricardo Lopes

Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2009): 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (5. : 2009 : Manaus).

Anais... / editores Wenceslau Gerales Teixeira, Lucinda Carneiro Garcia, Luadir

Gasparotto, Marcos Vinicius Bastos Garcia, Ricardo Lopes e Francisco Célio Maia

Chaves. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009.

1 CD-ROM; 4³ pol.

ISBN 978-85-89111-07-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Teixeira, Wenceslau Gerales. II. Garcia, Lucinda Carneiro. III. Gasparotto, Luadir. IV. Garcia, Marcos Vinicius Bastos. V. Lopes, Ricardo. VI. Chaves, Francisco Célio Maia. VII. Título.

CDD 501

Construção de um Banco de Isolados: Padronização da Técnica de ISSR em *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal da Sigatoka-Negra

Andréa Ramires de Souza
Luadir Gasparotto
Rogério Eiji Hanada
Nelcimar Reis Sousa
Gilvan Ferreira da Silva

Resumo

A banana constitui parte importante da alimentação e renda dos pequenos produtores rurais. No entanto, vários fatores são limitantes da produção, como manejo inadequado e ataque de doenças, entre as quais a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que ataca a bananeira. Essa tem sido considerada a doença mais importante na maioria das regiões produtoras do mundo. O estudo da diversidade, juntamente com a busca de estratégias para o controle da doença, principalmente por meio de melhoramento visando à resistência, é a forma mais econômica e ambientalmente correta. Desse modo, este trabalho teve por objetivo construir um banco de isolados e padronizar a técnica de ISSR em *M. fijiensis*. Os isolados foram obtidos a partir dos ascósporos ou conídios e mantidos em meio BDA. Para extração de DNA, os isolados foram crescidos sob agitação em meio líquido usando maltose como única fonte de carbono. A partir de 15 diferentes cultivares de bananeira, foram obtidos 82 isolados de três estados (Amazonas, Mato Grosso e São Paulo), destes, 63 são do Amazonas, 14 do Mato Grosso e 5 de São Paulo. Para triagem dos *primers* de ISSR, foi extraído DNA de 12 isolados e testado com dez diferentes *primers*.

Termos para indexação: bananicultura, diversidade genética, fitopatógeno, marcadores moleculares, ISSR.

Introdução

No Brasil, *M. fijiensis* foi detectado inicialmente no Amazonas em 1998, no Município de Tabatinga, fronteira do Brasil com a Colômbia e o Peru. Desde então, o fungo se alastrou rapidamente em todos os municípios do estado e tem se expandido rapidamente pelo País. A alta capacidade destrutiva do patógeno faz com que a doença adquira grande importância econômica e social (GASPAROTTO et al., 2006).

De modo geral, os esporos são disseminados a longas distâncias, pelo vento, por embalagens usadas no transporte de bananas, pelo caminhão transportador, pela água, por mudas infectadas e até por pessoas que tenham contato direto com o cultivo de banana. Por esse motivo, Hanada et al. (2004) estudaram formas de inibir a germinação de conídios.

Em virtude da recente introdução de *M. fijiensis* no Brasil e das condições climáticas aqui encontradas, é de salutar importância obter mais conhecimento sobre variações genéticas da população do patógeno. O estudo da diversidade, juntamente com a busca de estratégias para o controle da doença, principalmente por meio de melhoramento visando à resistência, é a forma mais econômica e ambientalmente correta. Por esse motivo, a análise molecular da diversidade é crucial para a determinação da estrutura genética da população. E conseqüentemente auxilia no direcionamento de estratégias de melhoramento e até mesmo no manejo de fungicida em agroecossistemas (MCDONALDS e LINDE, 2002).

A estrutura genética de uma população é a quantidade e distribuição das variações genéticas dentro e entre populações. Estas são conseqüências das interações entre diferentes forças que afetam a evolução da população e permitem inferências a respeito da

capacidade de dispersão do patógeno, taxa de mutações, forma de reprodução, grau de variabilidade genética, tamanho populacional efetivo, potencial de causar epidemias, distribuição dos genes de virulência e patogenicidade. O conhecimento dessas variações genéticas permite a compreensão dos processos evolutivos ocorridos e suas perspectivas futuras (BURDON e SILK, 1997; MCDONALDS e LINDE, 2002; ANDERSON et al., 2004).

O estudo da diversidade por meio de marcadores moleculares possui como vantagem o fato de esses marcadores permitirem ampla amostragem do genoma. Várias ferramentas moleculares têm sido disponibilizadas para o estudo de diversidade em fungos, entre as quais podemos destacar: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Simple Sequence Repeats (SSR), Inter simple sequence repeat (ISSR), ITS (Internal Transcribed Spacer) e mais recentemente a técnica chamada de Diversity Arrays Technology-DarT (WITTENBERG, 2007; YANG et al., 2006), entre várias outras ferramentas disponíveis.

Os microssatélites, também chamados de SSR, são regiões no genoma eucarioto que possuem repetições em tandem de mono-, tri-, tetra-, penta- ou até mesmo hexanucleotídeos, que se repetem várias vezes de maneira idêntica (motivos). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies relacionadas, permitindo a confecção de *primers* específicos que as amplificam, via PCR (POWELL et al., 1996; FISHER et al., 1996; HITE et al., 1996; PRIMMER et al., 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; TÓTH et al., 2000; HAYDEN e SHARP, 2001). Os genomas cloroplástico e mitocondrial também possuem SSR, mas

em geral se trata de repetições mononucleotídicas (POWELL et al., 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os ISSR são produtos de PCR obtidos usando-se *primers* com repetição de di- tri- tetra- ou pentanucleotídeos. Esse marcador é baseado na amplificação entre regiões de microssatélite e vem sendo extensivamente usado nos últimos anos em diferentes organismos, inclusive fungos: *Acromyrmex* ssp. (ABRIL e BUCHER, 2007), *Fusarium pseudograminearum* (MISHRA et al., 2006), *Bouveria bassiana* (ESTRADA et al., 2006), entre vários outros.

Este trabalho teve como principal objetivo construir um banco de isolados de *M. fijiensis*, agente causal da sigatoka-negra. Esse banco será de fundamental importância para estudos da estrutura genética da população do patógeno, por meio de marcadores moleculares e análise de virulência ou patogenicidade. Além de contribuir de maneira efetiva para a caracterização genética desse fitopatógeno, esses estudos permitirão aperfeiçoar o manejo de genes de resistência e durabilidade dos métodos de controle empregados no cultivo de banana, que é um alimento de grande importância para todo o País.

Material e Métodos

Isolamento de *M. fijiensis*

Foi inicialmente realizado o método de isolamento direto de esporos das lesões foliares (GASPAROTTO et al., 2006) e isolamento por meio de conídios. O isolamento foi realizado a partir de material infectado coletado no Mato Grosso, em São Paulo e nos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, Itacoatiara, Manacapuru e Novo Airão, no Amazonas.

Para o isolamento a partir de ascósporos, após a seleção do material com alta quantidade de peritécio, discos de 1,7 cm de diâmetro do tecido lesionado foram grampeados em papel filtro de 11 cm de diâmetro (4 discos por papel filtro), a desinfecção foi realizada em álcool 70% por um minuto, hipoclorito 2% por três minutos e água autoclavada por quatro minutos. Após esse tratamento, os discos foram colocados em placa com ágar-água com a superfície adaxial para cima, exposta ao meio de cultura por 24h; depois, identificados na placa e colocados na câmara de crescimento para que ocorra a ejeção de ascósporos no meio de cultura. O isolamento monospórico é obtido através da coleta de um único ascósporo ejetado dos peritécios existentes na parte adaxial da folha da bananeira infectada (Fig. 1). O isolamento de conídios foi realizado com uma alça de repicagem, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Os isolados são mantidos em placa de petri e em tubo contendo BDA.

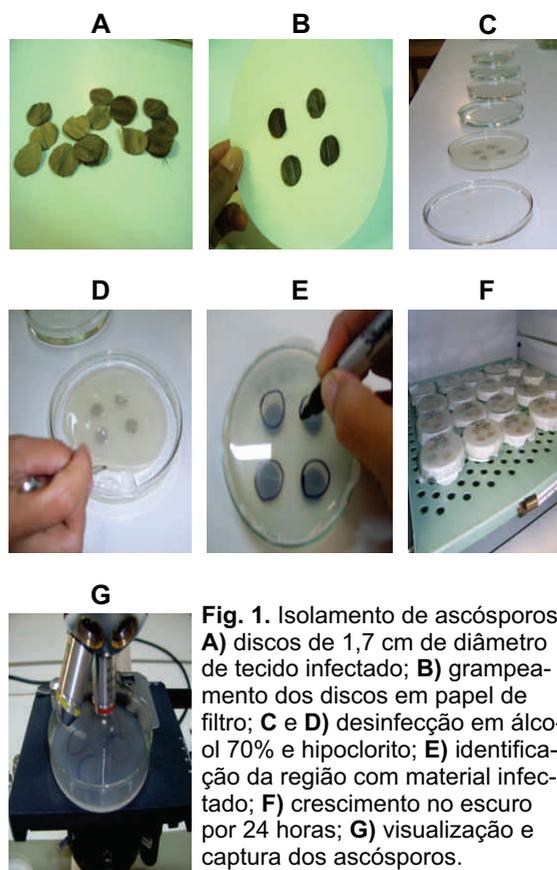


Fig. 1. Isolamento de ascósporos: **A)** discos de 1,7 cm de diâmetro de tecido infectado; **B)** grampeamento dos discos em papel de filtro; **C e D)** desinfecção em álcool 70% e hipoclorito; **E)** identificação da região com material infectado; **F)** crescimento no escuro por 24 horas; **G)** visualização e captura dos ascósporos.

Extração de DNA

Os isolados foram crescidos em meio malte líquido sob agitação para obtenção de massa micelial. O micélio foi coletado por filtração, lavado em água destilada e autoclavada, seco com papel toalha e estocado a 20 °C para posterior extração. As extrações de DNA foram feitas segundo Goodwin et al. (2001), quantificados por espectrofotometria, e a qualidade, analisada em gel de agarose a 0,8%.

Amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacers)

Um segmento do gene do RNA ribossomal no DNA nuclear compreendendo o ITS um e dois (ITS1 e ITS2) a e subunidade ribossomal 5,8S (coletivamente chapada de região ITS) foi amplificada usando os *primers* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') As reações de PCR foram realizadas em volume de 20 µL usando 1X de tampão IB (Phoneutria contendo 1,5 mM de MgCl²), 0,5 µM de cada primer, 0,2 µM de dNTPs, 2 ng/µL do DNA genômico e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As condições de amplificação foram um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 94 °C por um min, 52 °C por 30s e 72 °C por 1 min, como um passo final de 7 min a 72 °C.

Caracterização usando ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

A sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões ISSR foram baseadas na lista set#9 (*primers* 801-900) da University of British Columbia (UBC). Para triagem dos *primers* polimórficos e padronização das condições de amplificação, foram usados 12 isolados, os produtos amplificados separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,3 µg de brometo de etídio por mL.

Para padronização das condições de PCR, analisou-se a concentração de *primers* (de 0,3 ng a 1,0 ng), de DNA (10 ng a 100 ng), magnésio (1,5 mM a 3,0 mM) e unidades de enzimas Taq polimerase (1U a 2,5U) dos fabricantes Phoneutria, Invitrogen e GoTaq do fabricante Promega. Os *primers* utilizados nesses testes foram: UBC : **801**-ATA TAT ATA TAT ATA T, **802**- ATATATATA TAT ATATG **803**-ATA TAT ATA TAT ATA **804**-TAT ATA TAT ATA TAT AA **805**-TAT ATA TAT ATA TAT AC **806**-TAT ATA TAT ATA TAT AG **807**- AGA GAG AGA GAG AGA GT **808** AGA GAG AGA GAG AGA GC **809**AGA GAG AGA GAG AGA GG **810** GAG AGA GAG AGA GAG AT. As condições de amplificação foram: um ciclo a 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos a 94 °C 30 s, 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, extensão final a 72 °C por 7 min, as reações foram amplificadas usando o termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

Para testar possível problema na síntese dos *primers* disponíveis na Embrapa CCAA, os oligos UBC 812 (GAG AGAG AGA GAG AGA A), 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG), 841 (GAG AGAG AGA GAG AGA YC), 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA), 890 (VHV GTG TGT GTG TGT GT) e 891 (HVH TGT GTG TGT GTG TG) oriundos de duas diferentes sínteses foram testados. A reação de PCR foi preparada num volume de 15 µL contendo tampão 1X GoTaq green, dNTP Mix 0,2 mM, *primer* 0,4 µM, DNA 1 ng/µL e 1 unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega). As condições de amplificação foram: um ciclo a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, extensão final a 72 °C por 7 min. Todas as reações foram amplificadas usando o termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

Resultados e Discussão

Isolamento de *M. fijiensis* de material infectado

O isolamento a partir de ascósporos foi realizado como descrito na metodologia. Entretanto, devido às dificuldades para isolamento da fase sexuada, foi necessário modificar o processo de coleta de material infectado e também a estratégia de isolamento, que passou a ser realizada a partir dos conídios. Essa modificação mostrou-se eficiente, uma vez que apenas 7 isolados foram obtidos durante período de fevereiro a abril, e 75 durante três meses, utilizando o isolamento a partir do conídio.

Constituição do banco de isolados

Um total de 82 isolados de *M. fijiensis* foi obtido a partir de amostras coletadas nos estados do Mato Grosso, São Paulo e Amazonas (Figura 2). No Estado do Amazonas, as coletas de material para isolamento foram oriundas dos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo, Manacapuru, Rio Preto da Eva, Novo Airão

e Itacoatiara (Fig. 3).

A população de isolados obtida foi oriunda de 15 diferentes cultivares de bananeira pertencentes a grupos genômicos distintos. Em virtude da amplitude geográfica do Estado do Amazonas, foram realizadas coletas nos municípios de Manaus, Itacoatiara, Manacapuru, Rio Preto da Eva e Novo Airão (Figura 3). Desse modo, maior número de isolados pode ser observado quando se compara a população de isolados por unidades da Federação (Figura 2).

Quando analisadas as diferentes cultivares de bananeira em relação ao número total de isolados obtidos, a maioria pertence aos grupos: Maçã (20 isolados), Pacovan (18 isolados) e Prata (27 isolados), que são cultivares suscetíveis à sigatoka-negra. Isolados das cultivares FHIA 18, Thap Maeo e Figo Cinza, consideradas resistentes ou altamente resistentes, também foram obtidos. Esse número de menor isolados nas cultivares consideradas resistentes se deve ao fato de a infecção acontecer em menor grau, o que dificulta a obtenção de ascósporos ou conídios.

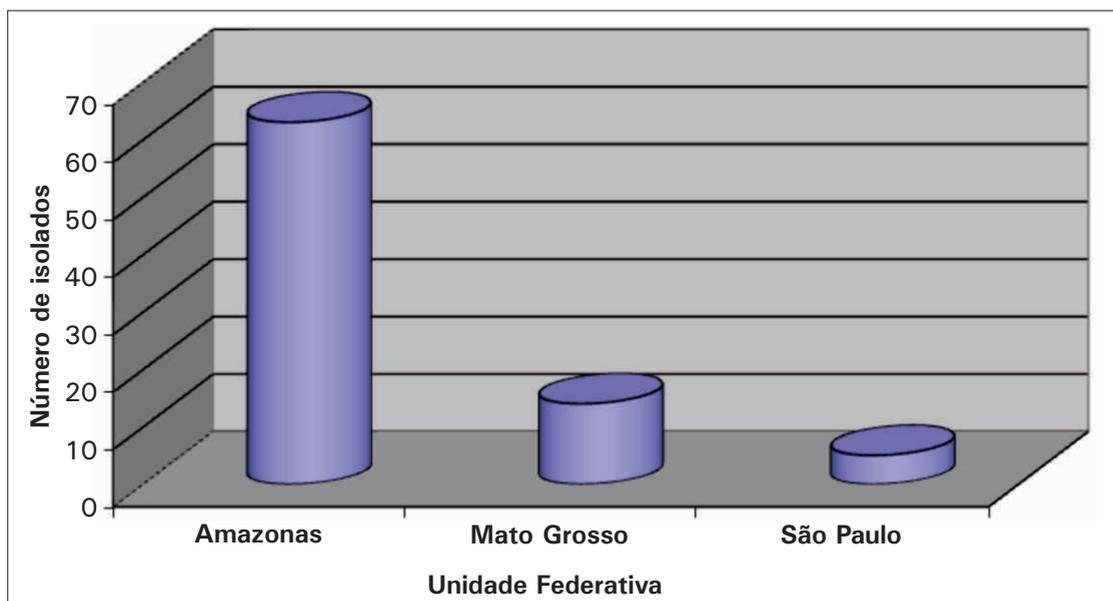


Fig. 2. Isolados de *M. fijiensis* por estados da Federação.

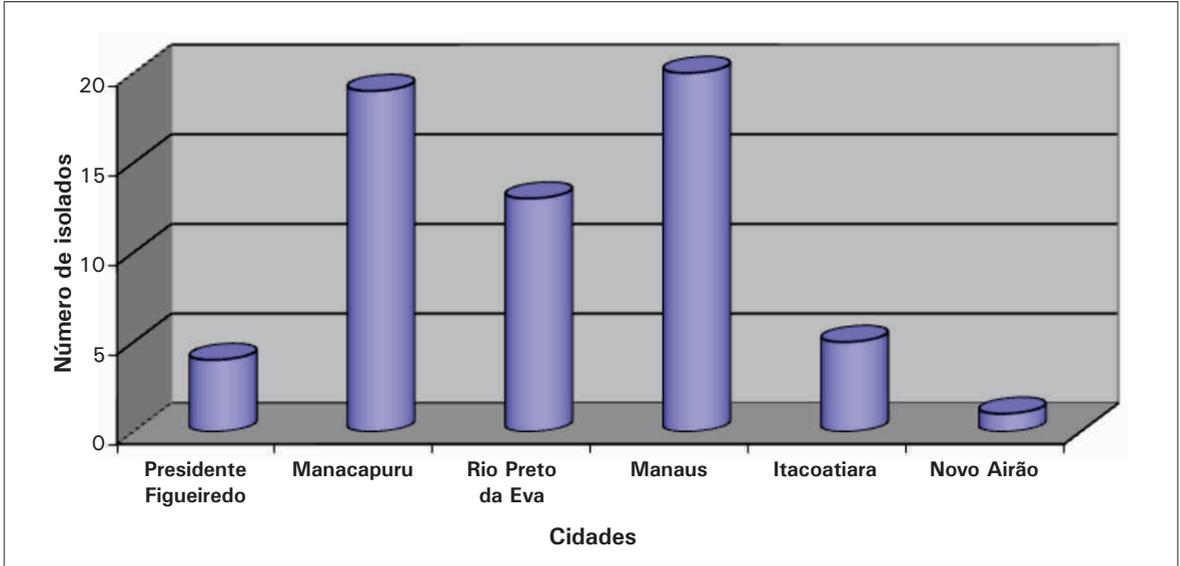


Fig. 3. Isolados de *M. fijiensis* obtidos no Estado do Amazonas.

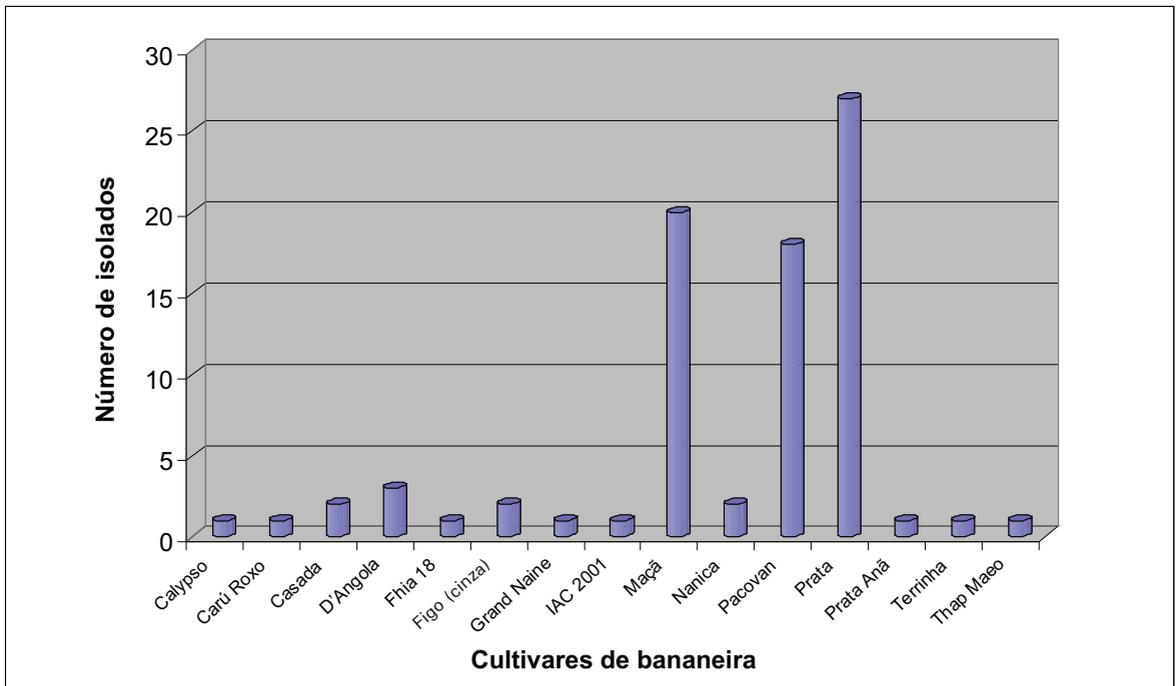


Fig. 4. Relação de isolados de *M. fijiensis* por cultivares de bananeira.

Caracterização usando ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Foi extraído o DNA de 12 isolados para a padronização da técnica de ISSR e caracterização do polimorfismo entre regiões de microssatélite. Para determinar a fonte de carbono com maior taxa de crescimento do fungo, foram testados os meios de cultura BDA e malte. Maior massa micelial foi verificada quando a maltose foi utilizada como única fonte de carbono, desse modo o meio malte foi utilizado para crescimento e obtenção de massa celular para extração de ácido nucleico.

Para realizar a quantificação e chegar à qualidade do DNA extraído, um microlitro (1 μL) de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 0,8% (Figura 5). Como está descrito na literatura, a extração de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA, de *M. fijiensis* apresenta como

uma das dificuldades a alta quantidade de melanina. A melanina é um pigmento de elevado peso molecular, produzida naturalmente por grande parte dos fungos, e está associada à patogenicidade. Durante a homogeneização do micélio no processo de extração, a melanina geralmente se liga ao ácido nucleico, além de coprecipitar com o DNA ou RNA, dificultando a quantificação por espectrofotometria. A contaminação com melanina também pode interferir na síntese de cDNA e na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para checar problemas na amplificação das amostras, foi utilizado o PCR da região ITS do rDNA por ser um sistema já padronizado em nosso laboratório. As amostras de DNA extraídas amplificaram a banda de tamanho esperado.

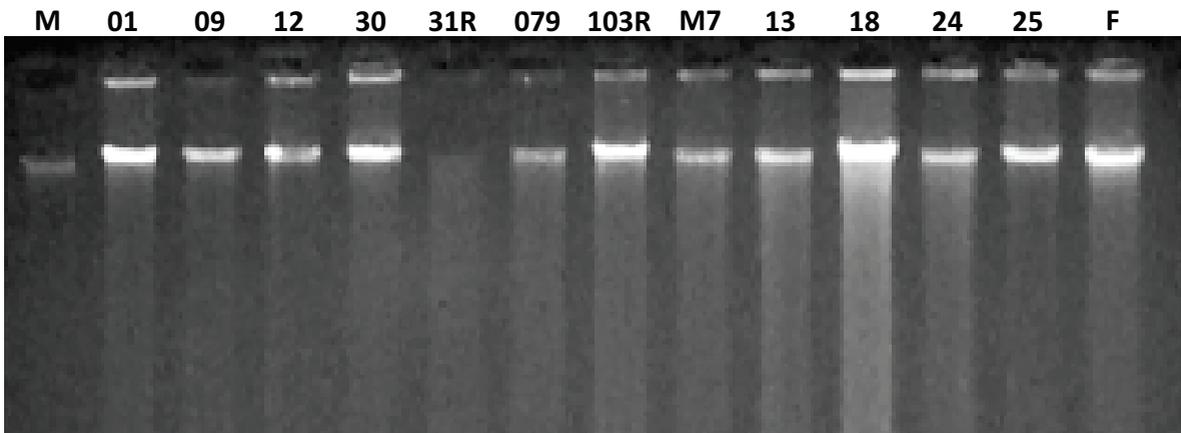


Fig. 5. DNA genômico de *M. fijiensis* em gel de agarose a 0,8%, de 01 a 25 amostras de isolados de diferentes cultivares de bananeira. M representa o marcador Lambda contendo 100 ng; F representa *M. fijiensis* isolado de *Helicônia* ssp.

Com o intuito de padronizar a técnica de ISSR em *M. fijiensis*, foram realizados testes de concentração de *primers* (de 0,3 a 1,0 μ M), de DNA (10 a 100 ng), magnésio (1,5 a 3,0 mM) e unidades de enzimas Taq polimerase (1 a 2,5U) dos fabricantes Phoneutria, Invitrogen e GoTaq do fabricante Promega. Em nenhum dos testes houve amplificação, exceto o controle positivo. Após essa bateria de testes, hipotetizou-se que um possível problema estaria na síntese dos *primers* de ISSR set#9 (*primers* 801-900) cujas sequências são disponibilizadas no site da University of British Columbia (UBC). Para testar essa hipótese, dos 100 *primers* de

ISSR disponíveis no laboratório de biotecnologia da Embrapa Amazônia Ocidental os *primers* 812 (GAGAGAGAGAGAGAGAA), 827 (ACACACACACACACACG), 841 (GAGAGAGAGAGAGAGAYC), 888 (BDBCACACACACACACA), 890 (VHVGTGTGTGTGTGTGT) e 891 (HVHTGTGTGTGTGTGTG) foram comparados com os *primers* UBS 812, 827, 841, 888, 890 e 891 sintetizados pela Wmed (alíquotas gentilmente doadas pela pesquisadora Tânia Maria Fernandes Salomão – UFV). Os resultados mostrados na Figura 6 confirmam a hipótese de um possível problema de síntese dos *primers*.

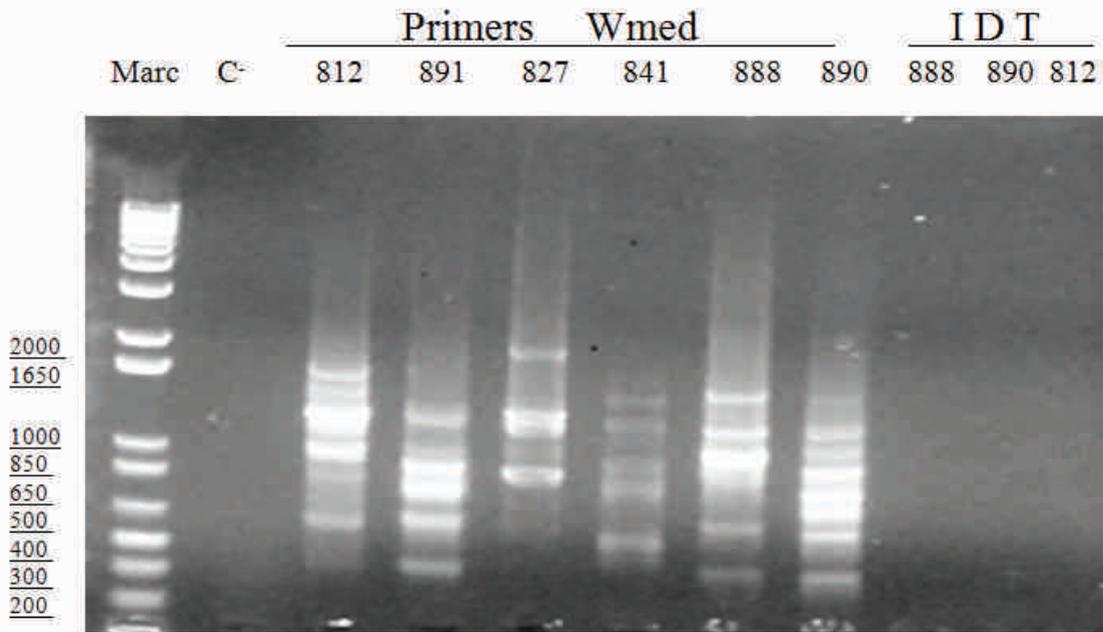


Fig. 6. Análise da amplificação de ISSR usando dois lotes diferentes de *primers*. O lote IDT adquirido pela Embrapa Amazônia Ocidental e os mesmos *primers* sintetizados pela Wmed. Marc representa o marcador 1 kp plus (invitrogen), C⁻ controle negativo e os *primers* UBC 812, 827, 841, 888, 890 e 891.

Conclusões

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que o banco de isolados de *M. fijiensis*, mesmo contando com 82 isolados, precisa ser ampliado de modo que se obtenha uma população mais representativa. A análise e a padronização usando o marcador ISSR precisam ser refeitas utilizando-se um novo lote de *primers*. Vale ressaltar que o presente trabalho é um passo fundamental de um longo caminho a ser percorrido no estudo da estrutura genética da população desse fitopatógeno, por meio de marcadores moleculares e análise da virulência ou patogenicidade. Contribuirá, assim, de maneira efetiva para os estudos que, no futuro, otimizarão manejo e durabilidade dos genes de resistência e métodos de controle empregado no cultivo de banana.

Agradecimentos

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos técnicos do Laboratório de Fitologia e Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental e ao Dr. Hanada, pela ajuda indispensável.

Referências

ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Genetic diversity of Fungi occurring in nests of three *Acromyrmex* leaf-cutting ant species from Cordoba, Argentina. **Microbial Ecology**, apr. 2007.

ANDERSON, P. K. et al. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 87, p. 664-669, 1997.

ESTRADA, M. E.; CAMACHO, M. V.; BENITO, C. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). **Cellular and Molecular Biology Lett.** v. 12, n. 2, p. 240-252, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220 p.

FISHER, P. J.; GARDNER, R. C.; RICHARDSON, T. E. Single locus microsatellites isolated using 5'anchored PCR. **Nucleic acids Research**, v. 24, n. 21, p. 4369-4371, 1996.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; HANADA, R. E.; MONTARROYOS, A. V. V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177 p.

GOODWIN, S. B.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analyses of the ITS region of ribosomal DNA reveal that *Septoria passerinii* from barley is closely related to the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Mycologia**, v. 93, n. 5, p. 934-946, set./out. 2001.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Efeitos dos desinfestantes na germinação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka Negra da bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 1, p. 94-96, 2004.

HAYDEN M. J.; SHARP, P. J. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 8, 2001.

HITE, J. M.; ECKERT, K. A.; CHENG, K. C. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of D(C-A)_n D((G-T)_n Microsatellite repeats. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 12, p. 2429-2434, 1996.

MCDONALDS, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance,. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MISHRA, P. K. et al. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western. **International Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 65-68, mar. 2006.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, jul. 1996.

PRIMMER, C. R., et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, v. 7, p. 471-482, 1997.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellite in different eukaryotic genome survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

WITTENBERG, A. H. J. **Genetic mapping using the Diversity Arrays Technology (DarT): application and validation using the whole-genome sequences of Arabidopsis thaliana and the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola***. 2007. Thesis (PhD) - Wageningen University, Netherland.

YANG, S. et al. Low level of genetic diversity in cultivated Pigeonpea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 4, p. 585-595, 2006.