

## DETERMINAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À RESISTÊNCIA A *Meloidogyne paranaensis* EM *Coffea arabica* L.<sup>1</sup>

Camila Ronchi Macedo<sup>2</sup>; Claudete de Fátima Ruas<sup>3</sup>; Thiago Fernandes<sup>4</sup>; Ana Paulo Silva Campos Gaino<sup>5</sup>; Eduardo Augusto Ruas<sup>6</sup>; Andressa Cristina Zambolim Machado<sup>7</sup>; Tumoru Sera<sup>8</sup>; Gustavo Hiroshi Sera<sup>9</sup>; Paulo Maurício Ruas<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

<sup>2</sup>Bolsista, CAPES, Ms, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, less\_cah@hotmail.com

<sup>3</sup>Docente, PhD, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, ruas@uel.br

<sup>4</sup>Bolsista, PNPD, Dr, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, tfernandes34@gmail.com

<sup>5</sup>Bolsista, PNPD, Dr, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, apsdecampos@yahoo.com.br

<sup>6</sup>DocenteColaborador,Dr, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, wicca\_edu@uel.br

<sup>7</sup>Pesquisador, PhD, Instituto Agronômico do Paraná, tsera@iapar.br

<sup>8</sup>Pesquisadora, PhD, Instituto Agronômico do Paraná, andressamachado@iapar.br

<sup>9</sup>Pesquisador, PhD, Instituto Agronômico do Paraná, gustavosera@iapar.br

<sup>10</sup>Docente, PhD, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, pmruas@uel.br

**RESUMO:** *Meloidogyne paranaensis* é um agente patogênico que desestabiliza a cultura de *Coffea arabica* L. A resistência genética é uma das principais alternativas de controle, porém é rara em plantas de *C. arabica*, mas alta em *C. canephora* e *C. liberica*. Recentemente foi lançada no mercado a cultivar IPR100, que apresenta resistência a *M. paranaensis*. Este trabalho teve por objetivo identificar e isolar marcadores moleculares associados à resistência a *M. paranaensis*. Foram utilizadas plantas F2 resultantes do cruzamento entre IAPAR 59 x G37 (resistente). Utilizou-se bulks de plantas resistentes e suscetíveis da geração F2, os quais foram submetidos a 299 combinações de *primers* AFLP. Sete locos AFLP sugeriram associação com a resistência ao nematoide, porém destes, somente o loco 4 (*EcoRI* AGG/*MseI* CTT) mostrou estar associado a resistência a *M. paranaensis*. Este loco foi transformado no marcador SCAR Ca\_Nem1, o qual foi validado em IPR 100 e IAPAR 59, sendo que o mesmo amplificou em 95% das plantas resistentes. Através de análises *in silico* demonstrou-se que a sequência do SCAR Ca\_Nem1 tem alta similaridade com o fator de transcrição MYB46 e o gene de resistência RGA1. Os dados deste trabalho mostram que o marcador SCAR Ca\_Nem1 tem potencial para a seleção assistida de novos cultivares de *C. arabica* resistentes a *M. paranaensis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise *in silico*, cultivar IPR 100, marcador AFLP, marcador para resistência, SCAR.

## MOLECULAR MARKER ASSOCIATED TO *Meloidogyne paranaensis* RESISTANCE IN *Coffea arabica* L.

**ABSTRACT:** *Meloidogyne paranaensis* is a pathogenic agent that destabilizes the *Coffea arabica* L. productivity. Genetic resistance is a major alternative to control this pathogen agent, but is rare in *C. arabica*. However, the occurrence of genetic resistance is high in *C. canephora* and *C. liberica*. Recently, a resistant cultivar (IPR 100) was launched on marked by Instituto Agronômico Paraná. This study aimed to identify and isolate molecular markers associated with resistance to *M. paranaensis*. Plants of F2 that resulted from crossing between IAPAR 59 x G37 (resistant to *M. paranaensis*) was used to make two bulks: resistant and susceptible to the nematode. AFLP analysis with 299 selective combinations suggested 7 AFLP loci associated to *M. paranaensis* resistance. However, only the locus 4 (*EcoRI* AGG/*MseI* CTT) was shown to be associated with resistance. This locus was transformed into SCAR Ca\_Nem1 marker, which was validated in testing with cultivars (IPR 100 and IAPAR 59). The SCAR marker was amplified in 95% of the resistant plants. *In silico* analysis showed that the sequence of SCAR Ca\_Nem1 had high similarity with the MYB46 transcription factor and the RGA1 gene (resistance gene analog). The results of this study show that the SCAR Ca\_Nem1 has potential in marker-assisted selection in future coffee breeding programs.

**KEYWORDS:** *In silico* analysis, IPR 100 cultivar, AFLP marker, resistance marker, SCAR.

## INTRODUÇÃO

Existem várias doenças que desestabilizam a sustentabilidade de modernos sistemas na cultura de *Coffea arabica* L., devido sua alta suscetibilidade a vários estresses bióticos. Os nematoides de galha ou *Meloidogyne* spp. são um dos principais patossistemas da cultura cafeeira. Esses agentes patogênicos, considerados endoparasitas sedentários, precisam ser abrigados por uma planta hospedeira para completar seu ciclo biológico (ANTHONY, 2003). Foram identificadas 17 espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro (CARNEIRO; COFCWICZ, 2008). No Brasil, destacam-se *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua* que estão diferencialmente distribuídas pelos estados brasileiros (CARNEIRO; ALMEIDA, 2000; LORDELLO; LORDELLO, 2001). Há a incidência de diversas espécies de

nematoides de raiz em vários locais do mundo, segundo Carneiro et al. (2004), as espécies *M. paranaensis* e *M. incognita* são as espécies que mais causam preocupação, devido à sua vasta distribuição pelo Brasil, na América Central e no Havaí (EUA). Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolvimento de cultivares resistentes nos programas de melhoramento genético, porém é muito rara ou inexistente a resistência a nematoide em plantas da espécie *C. arabica*, mas é alta em plantas de *C. canephora* (BERTRAND et al., 2001). A estratégia dos programas de melhoramento genético vem sendo explorar a resistência genética de outras espécies. Novos recursos genéticos de resistência a *M. paranaensis* estão sendo descobertos. No Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR foram detectadas plantas resistentes derivadas do Catuaí e genótipo “BA-10”, portador de genes de *C. liberica*. Em 2012 foi lançada a primeira cultivar de café arábica com resistência ao *M. paranaensis*, sem necessidade de enxertia, denominado IPR100. A técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) permite, com relativa eficiência, o desenvolvimento de marcadores associados a genes determinantes de características agrônomicas importantes (GAUDEUL et al., 2000; CAIXETA et al., 2013). Todavia, a técnica de AFLP é trabalhosa para ser usada como rotina em programas de melhoramento. Deste modo, marcadores moleculares obtidos por AFLP associados com característica de interesse agrônomico podem ser convertidos em outros tipos de marcadores de fácil manuseio, tal como SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Este pode ser utilizado com facilidade em programas de melhoramento, por ser definido como loco-específico. Este trabalho tem por objetivo identificar e isolar marcadores moleculares do tipo AFLP associados à resistência ao *Meloidogyne paranaensis* em *Coffea arabica* e transformá-los em SCAR, os quais serão eficientes para a seleção assistida por marcadores moleculares.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação de marcadores moleculares associados à resistência a *M. paranaensis* em *C. arabica*, foram utilizados o genótipo resistente G37, o cultivar suscetível IAPAR59, a planta resistente F<sub>1</sub>, 10 amostras resistentes e 10 amostras suscetíveis em geração F<sub>2</sub>. A extração de DNA seguiu conforme o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações. Os DNAs foram diluídos para 700 ng/μL e submetidos às etapas de AFLP conforme protocolo de Vos et al., (1995), com modificações. Os DNAs das 10 plantas suscetíveis e 10 plantas resistentes da geração F<sub>2</sub> foram reunidos em dois bulks. Os bulks dos grupos suscetíveis e resistentes, o DNA dos genitores e F<sub>1</sub> foram submetidos a diferentes combinações de *primers* seletivos *EcoRI-MseI*, até a identificação de marcador candidato à associação com a resistência a *M. paranaensis*. Foi utilizado o Kit QIAEXII® (QIAGEN) para extração e purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de poliacrilamida, conforme o protocolo sugerido pelo fabricante. A ligação do fragmento de interesse foi realizada em vetor de clonagem pGEM®-T (Promega, Winchester, USA) e transformado em linhagem TOP 10 *E. coli*. A sequência dos insertos foi determinada com o uso do kit ABI PRISM Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Califórnia, USA) e sequenciadas no ABI 3500XL Automated Sequencer (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As sequências de DNA foram analisadas no programa BioEdit v7.2.3 General Information (HALL, 1999) para alinhamento e eliminação da região do vetor. Também foram analisadas no programa Electropherogram quality analysis (TOGAWA e BRIGIDO, 2003; TOGAWA e BRIGIDO, 2006) para formação do *Consense* e verificação da qualidade da sequência. Através do sequenciamento do marcador candidato, pares de *primers* foram desenhados, com a utilização do PRIMER3 (UNTERGRASSER, et al., 2012) e avaliados quanto sua qualidade através do OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Depois de analisada a qualidade dos *primers*, foi feito Blast no banco de dados do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) para verificar a especificidade do mesmo. Com a obtenção da sequência para *C. arabica*, também foi realizado a avaliação *in silico* para verificar a similaridade com outras espécies vegetais. Essas análises foram realizadas no GeneBank (National Center for Biotechnology Information) na plataforma BlastN, BlastX e BlastP, no Banco de Dados do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), Banco de Dados Coffee Genome Hub com genoma de *C. canephora* (<http://coffee-genome.org/>) e utilizada a ferramenta GBrowse. Também foi utilizada a ferramenta ORFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para busca de regiões codificantes. Foi realizado o alinhamento de sequências similares e construído o dendograma através do método *neighbor-joining* no programa MEGA versão 6.06 (TAMURA et al., 2013). Para a confirmação da associação do marcador molecular com a resistência a *M. paranaensis*, o mesmo foi usado para a amplificação em genótipos de IPR100 e na cultivar IAPAR 59.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 299 combinações de *primers* seletivos e gerados 5.790 locos com média de 19 fragmentos por combinação. A porcentagem de locos polimórficos foi de 14,53%, e destes foram detectados setemarcadores polimórficos candidatos. Na abertura dos *bulks* dos marcadores candidatos observou-se que seis deram resultados falso-positivos, pois a amplificação ocorreu também em indivíduos suscetíveis a *M. paranaensis*. No entanto, o marcador candidato advindo do loco 4 com cerca de 800 pb amplificou em sete dos 10 indivíduos resistentes, e em um dos 10 indivíduos suscetíveis (Figura 1).

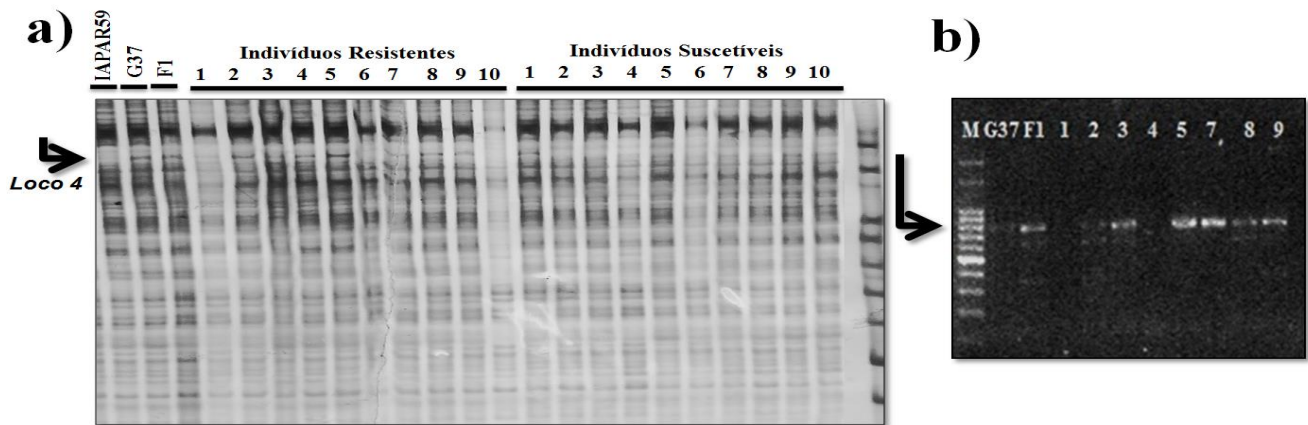


Figura 1. Marcadores AFLP associados à resistência a *M. paranaensis* em *C. arabica* e isolamento de loco de interesse para a conversão de marcadores multilocos em loco específico. a) Obtenção do Loco 4 em gel de Poliacrilamida 7%. b) Recuperação do Loco 4 em gel de agarose 2%.

O DNA deste marcador foi isolado do gel de poliacrilamida e foi obtido uma sequência de 762 pb, sendo a partir deste fragmento, desenhados *primers* loco específicos (Ca\_nem1) com *amplicon* de 574 pb. Para validação deste marcador SCAR o mesmo foi amplificado em 20 plantas do cultivar IPR100, o qual apresenta resistência a *M. paranaensis*, e em 14 plantas do IAPAR 59 (suscetível). A amplificação se deu em 95% das plantas de IPR 100 testadas, porém, em plantas do controle IAPAR 59 ocorreu 15% de amplificação (Figura 2). Desta maneira, esse marcador molecular diagnóstico seria efetivo para a seleção assistida, com ressalvas a uma taxa de erro na genotipagem de amostras falso-positivas. Segundo BERALDO et al.(2009), marcadores falso-positivos são encontrados, pois amplificar marcador associado a genes de resistência nem sempre se reflete em resistência na planta, podendo ocorrer por diversos motivos como: deleção de base no gene, *crossing-over* desigual entre outros. O desenvolvimento de marcadores SCAR associados a caracteres de interesse contribui para acelerar e facilitar a seleção de genótipos potenciais na seleção assistida por marcadores moleculares, pois superam as dificuldades das etapas de restrição e ligação do AFLP e aumentam a especificidade do loco em estudo.

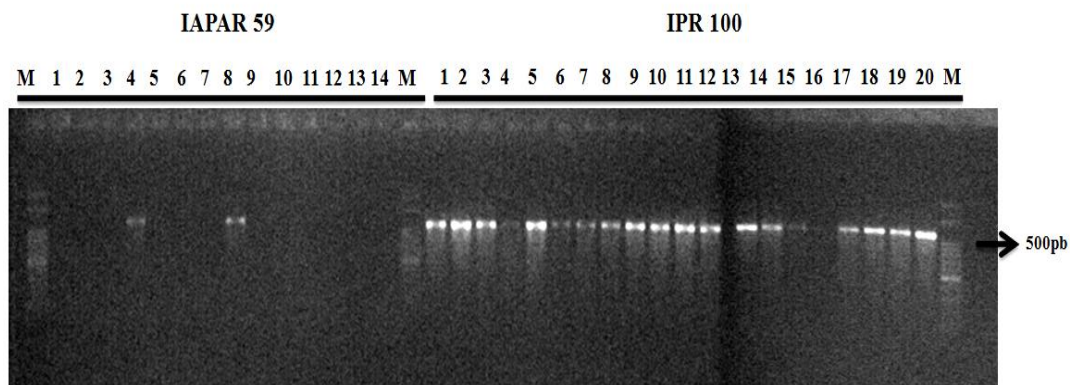


Figura 2. Marcador molecular SCAR Ca\_Nem1 amplificado em genótipos resistentes de IPR 100 e genótipos suscetíveis do IAPAR 59.

A busca por identidade utilizando BlastN entre a sequência do marcador SCAR Ca\_Nem1 com as depositadas no banco de dados NCBI gerou alinhamentos significativos com sequências que codificam o fator de transcrição pertencente à família MYB de diferentes espécies vegetais. A tradução *in silico* da sequência SCAR Ca\_Nem1 (574 pb) pela ferramenta *ORFinder* gerou três ORFs diferentes. Uma das ORFs mostrou um trecho interno de 130 aminoácidos, região entre os 1-393 pb do SCAR Ca\_Nem1, e através do BlastP foram gerados alinhamentos com alta similaridade com fatores de transcrição MYB, no qual os mais frequentes foram MYB46 e MYB86. Quando foi utilizado o BlastX com a sequência Ca\_Nem1, foi confirmada similaridade com fatores de transcrição MYB em várias espécies diferentes, como também identificou-se similaridade com diversos tipos de MYB com *e-values* de 4,00E-48 à 1,00E-55 e identidades de 72% a 91%. Ademais, uma alta similaridade com uma proteína ainda não caracterizada de *Coffea canephora* também foi encontrada. Com o objetivo de confirmar, qual MYB tem maior similaridade com a proteína caracterizada na sequência do marcador CA Nem\_1, foram selecionadas 14 sequências proteicas obtidas com BlastX,

sendo selecionados os MYBs mais frequentes como MYB46, MYB83, MYB86 e MYB23. A alta similaridade entre as sequências de espécies próximas, bem como em diferentes espécies evolutivamente distantes, é indicio de que a sequência identificada pelo SCAR Ca\_Nem1 contendo o fator de transcrição MYB46, seja uma região conservada entre as espécies, podendo estar associada a específicas funções.

Essas sequências foram alinhadas e o dendrograma foi obtido através do método *neighbor-joining* utilizando o programa MEGA (versão 6.06). A região codificante da sequência proteica pertencente à família do MYB encontrada no marcador CA Nem\_1 está mais próxima da sequência codificante do MYB46 em *Glycine max*, assim como também a sequência obtida no banco de dados de *C. canephora* tem maior proximidade ao MYB46 (Figura 3).

O resultado desta análise mostra que o MYB46 foi o de maior associação com o SCAR Ca\_Nem1. Os fatores de transcrição MYBs representam uma das maiores famílias de fatores de transcrição de proteínas de ligação ao DNA, tendo particular importância na regulação de mecanismos de defesa de plantas. Os membros são caracterizados por terem um domínio de ligação ao DNA estruturalmente conservado, de uma a três repetições hélice-volta-hélice (HTH) (R1, R2 e R3), com cerca de 50 aminoácidos cada e resíduos de triptofanos regularmente espaçados. A classe R2R3 é a mais numerosa entre as plantas, e estão envolvidas no controle de processos específicos, incluindo a síntese de metabólitos e respostas a estresse biótico (JIN E MARTIN, 1999; STRACKE, et al., 2001; DUBOS, et al., 2010; FELLER et al, 2011).

O gene MYB46 é predominantemente expresso em células que sofrem espessamento da parede secundária e a repressão dominante MYB46, provoca uma redução na espessura da parede secundária de fibras e vasos em *Arabidopsis thaliana*. A rede transcricional ajusante de MYB46 envolve processos moleculares e bioquímicos na biossíntese e deposição de paredes secundárias em plantas, uma vez que o fator de transcrição MYB46 é um alvo direto do gene SND1 que regula a síntese da parede secundária em *Arabidopsis* (ZHONG et al., 2007).

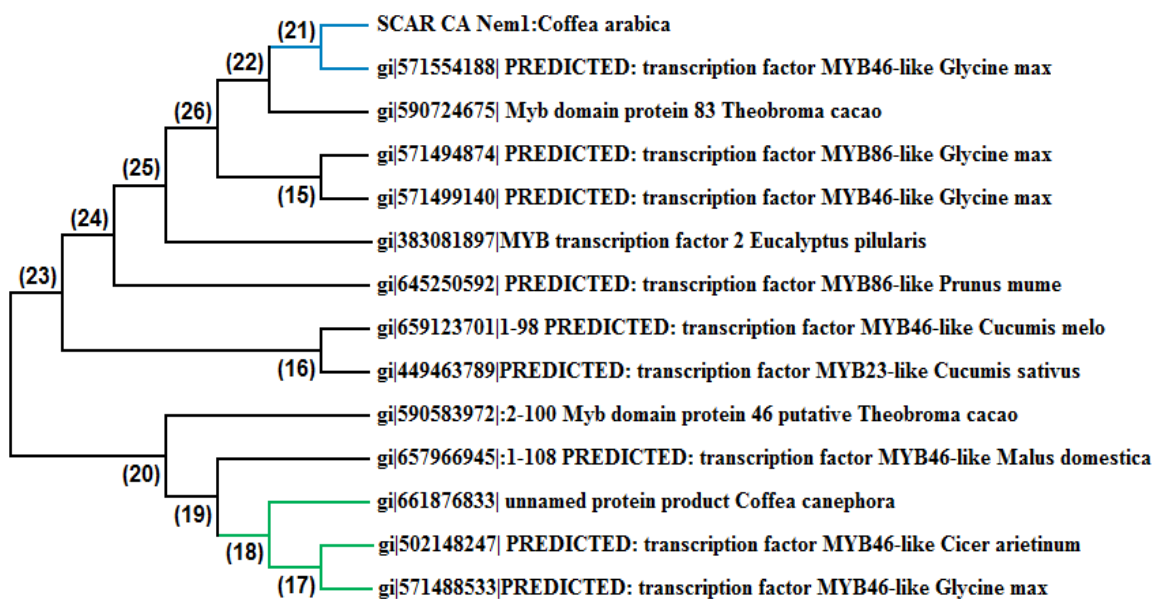


Figura 3. Dendrograma obtido através do método de *neighbor-joining* para análise de agrupamento de sequências proteicas MYB.

Utilizando o BlastN com o genoma de *C. canephora* (DENOEUDE et al., 2014), verificou-se que a ORF contida no SCAR Ca\_Nem1 possui um alinhamento com 97% em uma região intersticial do cromossomo 2 de *C. canephora* (26259930 pb a 26260619 pb, + strand). Através da ferramenta GBrowse, uma análise das regiões adjacentes dessa região cromossômica de *C. canephora* foi realizada. Praticamente sobreposta ao início da região contendo identidade com a sequência Ca\_Nem1, há outra sequência que também codifica para um MYB (MYB46), codificando para um proteína de 301 aminoácidos no genoma de *C. canephora*. Foi detectado a presença de regiões putativas para o gene da subunidade catalítica da celulose sintase A e um gene análogo de resistência RGA1 (*resistence gene analog*) em uma extensão de 100 kb downstream à região contendo identidade ao SCAR\_Nem1 em *C. canephora*, como também foi encontrado a presença de outros genes como, *Ankyrin* e *Rbcx*. Genes da família RGA foram descritos em variedades resistentes a *Meloidogyne incognita* em *Capsicum annum* e *Solanum lycopersicum* (CHEN et al., 2007) como também a resistência ao nematoide *Heterodera avenae* em *Triticum turgidum* (CORTESE et al., 2003). O marcador Ca\_Nem1 também mostrou-se eficiente para a busca direcionada por locos de interesse, através de detecção regiões putativas para genes relacionados a diferentes mecanismos de resistência em plantas.

## CONCLUSÕES

O marcador molecular Ca\_Nem1 desenvolvido neste estudo apresenta eficiência na seleção de genótipos IPR 100 resistentes a *M. paranaensis* em *C. arabica*, podendo ter grande potencial em futuras estratégias de melhoramento genético.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Capes pela bolsa de mestrado, ao CNPq pelo custeio de bolsas de produtividade científica e de Pós-Doutorado, ao Consórcio Café pelo financiamento desta pesquisa, a Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina e ao Instituto Agrônômico do Paraná.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY F, TOPART P, ANZUETO F. La resistencia genética de *Coffea* spp. A *Meloidogyne paranaensis*: identificación y utilización para La caficultura latino americana. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 67: 4–11, 2003.
- BERALDO, A.L.A; COLOMBO, C.A; CHIORATO, A.F; ITO,M.F;CARBONELL, S.A.M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. *Bragantia*. 68(1):53-61, 2009.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathology*, v.50, p. 637-643, 2001.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L.F.V.; ZAMBOLIM, E. M. Marcadores Moleculares. *Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas/ Aluizio Borém e Roberto Fritsche-Neto [editores]- Visconde do Rio Branco: Suprema*, 31-68. 2013.
- CARNEIRO, R. M. D.G.; TIGANO, M. S.; RANDIG, O.;ALMEIDA, M. R. A.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*,v. 6, n.2, p. 287-298, 2004.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Distribution of *Meloidogynespp* on Coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability. In: *Mejoramiento sostenible del Café arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, com énfasis em La resistencia a los nemátodos*. Turrialba.Publicación Especial. CATIE/IRD, Turrialba, p.43-48, 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ E.T.Taxonomy of Coffee-Parasitic Root-Knot Nematodes, *Meloidogynespp*.In:SOUZA,R.M. (ed.).*Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Springer Science+Business Media B.V..p. 87-122, 2008.
- CHEN, K. Y., B. CONG. Changes in Regulation of a Transcription Factor Lead to Autogamy in Cultivated Tomatoes. *Science* 318(5850): 643-645. 2007.
- CORTESE M.R., E. FANELLI., C. DEGIORGI.Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat *Plant Science* 164:71-75. 2003
- DENOEUDE F, CARRETERO-PAULET L, DEREPPER A, DROC G, GUYOT R, PIETRELLA M, ZHENG C, ALBERTI A, ANTHONY F, APREA G et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis.. *Science (New York, N.Y.)*. 345(6201):1181-4. 2014.
- DUBOS, C.; R. STRACKE., E.GROWOLD., B. WEISSHAAR., C. MARTIN., L. LEPINIEC. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Science*,v.15, p.573-581. 2010.
- FELLER, A., K. MACHEMER., E. L. BRAUN., E. GROTEWOLD. Evolutionary and comparative analysis of MYB and HLH plant transcription factors.*The Plant Journal*, v.66, p.94-116. 2011.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 3a Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.
- GAUDEUL, M.; TABERLET, P.; TILL-BOTTRAUD, L.Genetic diversity in an endangere alpine plant, *EryngiumalpinumL.* (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers.*Molecular Ecology*, v. 9,p. 1625-1637, 2000.
- Hall, T.A .BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp. Ser.* 41:95-98. 1999.
- JIN, H. Y., C. MARTIN. Multifunctionality and diversity within the plant MYB gene family.*Plant Molecular Biology* 41: 577–585. 1999.
- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. Nematoides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. In: *Congresso Brasileiro de Nematologia, Garça.Resumos. Garça: SBN/FAEF*, p.85. 2001.
- MICHELMORE RW; PARAN I; KESSELI RV.Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *ProcNatlAcadSci USA* 88:9828-9832. 1991.
- STRACKE, R., M .WERBER., B. WEISSHAAR. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*.*CurrOpin Plant Biol* 4,447-456. 2001.

- TAMURA K, G. STECHER, F.A. PETERSON, S KUMAR. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–2729. 2013.
- TOGAWA, R.C., M.M. BRIGIDO. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. 2003.
- TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M.; SANTOS, C.M.R.; JÚNIOR M.T. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) - Aguas de Lindoia, São Paulo, Brazil. 2006.
- UNTERGRASSER A., I. CUTCUTACHE, T. KORESSAAR, J. YE, B.C. FAIRCLOTH, M. REMM, S.G.ROZEN. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115. 2012.
- VOS, P., R. HOGERS, R. M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJERS, J. POT, J. PLEMAN, M. KUIPER, and M. ZABEAU. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414. 1995.
- ZHONG, R., A. RICHARDSON, Z.H. YE. The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SD1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell. Sep*; 19(9): 2776–2792. doi: 10.1105/tpc.107.053678. 2007.