

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**

BRUNA LEITE VIEIRA DO NASCIMENTO

Desenho de *primers* para estudo de expressão gênica, via PCR em tempo real, em mamona (*Ricinus communis* L.)

**Cruz das Almas
2019**

BRUNA LEITE VIEIRA DO NASCIMENTO

DESENHO DE *PRIMERS* PARA ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA,
VIA PCR EM TEMPO REAL, EM MAMONA (*Ricinus communis* L.)

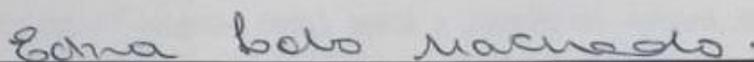
Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como parte das
exigências do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

**Cruz das Almas
2019**

Bruna Leite Vieira do Nascimento

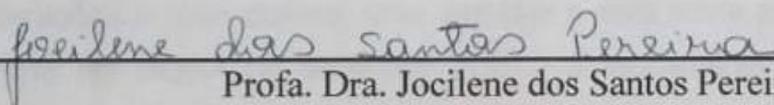
“Desenho de *primers* para estudo de expressão gênica, via PCR em tempo real, em mamona (*Ricinus communis* L.)”,

BANCA EXAMINADORA

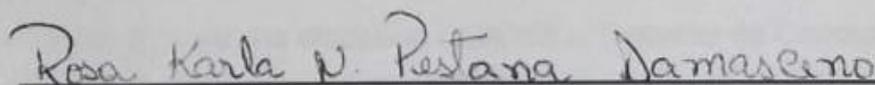


Profª. Dra. Edna Lobo Machado
(orientadora)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Profª. Dra. Jocilene dos Santos Pereira
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)



Profª. Dra. Rosa Karla Nogueira Pestana Damasceno
Embrapa Mandioca e Fruticultura

CRUZ DAS ALMAS

DEZEMBRO-2019

AGRADECIMENTOS

É com muita felicidade e orgulho que alcanço mais essa conquista e, como todas, nunca estamos sozinhos. Somos a soma de todo conhecimento e experiência que adquirimos ao longo da vida.

Sendo assim, sou grata em primeiro lugar à minha família por sempre me apoiar e me amparar nos momentos difíceis. Em especial à minha mãe Rosana, ao meu pai Silvano e ao meu segundo pai Ivair que sempre se esforçaram para garantir que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade, para que hoje eu chegasse aonde estou. À minha avó Gracieth, minha tia Joseane e aos meus irmãos Caio e Gustavo por todo carinho, apoio e palavras amigas ministradas ao longo desse tempo. Aos meus padrinhos Tania e Daniel *in memoriam* que sempre fizeram de tudo para me apoiar e que, se estivessem aqui, estariam radiantes com essa conquista.

Em seguida, sou grata a todos os professores e professoras que tive a honra de conhecer ao longo da vida, que compartilharam dos seus saberes comigo de forma grandiosa e gratificante. Em especial à Professora Edna Lôbo, mulher que sempre admirei e hoje tenho a honra de tê-la como minha orientadora. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e por estar sempre a disposição quando precisei.

Gostaria de agradecer às equipes de todos os laboratórios que estagiei durante esse período de graduação, locais que me proporcionaram lições incríveis, não só acadêmicas como também de vida. Obrigada à Denise, Mara, Laécio, Clara, Luciano, Silvan, John e a todo pessoal do Aqua pelos momentos e por vossa amizade. Obrigada a Karla por toda paciência e dedicação, a Andresa, Vanderson, Jocilene, Taís, Amanda e a todo pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa pelo acolhimento e ensinamentos. Obrigada, novamente, à Professora Edna, Daniel e Amanda por tornarem o Lamol o meu segundo lar e pelos momentos lá vividos.

Agradeço à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo espaço e estrutura cedidos para a realização da minha graduação.

Obrigada a todos os integrantes da diretoria da Atlético Primatas, por juntos termos feito um lindo trabalho.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer imensamente a TODOS os meus amigos que a UFRB me proporcionou conhecer. Foi junto a vocês que desde o primeiro semestre encaramos os melhores e piores momentos. Obrigada por estarem sempre comigo, independente das circunstâncias. Obrigada Pedro, Alana, Eduarda, Joadson, Lucas Nascimento, Robert, Dayala, Lucas Johnes, Arianny, Júlia, Thais, Victor, Emilly, Agne, Naira, Mara, Laécio, Clara e Luciano. Amo muito todos vocês e levarei comigo um pedacinho de cada um na memória. Aos não citados, o carinho e admiração são grandes também.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”

J.R.R. Tolkien

RESUMO

NASCIMENTO, Bruna Leite Vieira do, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, dezembro de 2019. **Desenho de primers para estudo de expressão gênica, via PCR em tempo real, em mamona (*Ricinus communis* L.)**
Orientadora: Edna Lôbo Machado.

A espécie *Ricinus communis* L., conhecida como mamona apresenta um elevado interesse industrial, por conta do óleo extraído das suas sementes. Doenças como Mofo cinzento, Podridão de macrophomina, Podridão de botryodiplodia Murcha de fusarium, entre outras, são doenças que acometem a cultura, interferindo na sua produtividade. Assim, objetivou-se com esse trabalho desenhar pares de primers para genes de resistência em mamona visando o estudo de expressão gênica para resistência a patógenos, via PCR em tempo real. Os oligonucleotídeos (*primers*) foram projetados usando ESTs (marcadores de sequências expressas) de mamona envolvidas nas rotas metabólicas de resistência a patógenos. As sequências foram recuperadas por meio do banco de dados do NCBI. Os pares de primers foram desenhados com a utilização do software Primer3 e sua qualidade aferida pelo software NetPrime. Para fins de padronização das reações da PCR, foram utilizados os seguintes critérios na seleção dos iniciadores: tamanho variando entre 20 a 24 pb (pares de bases); percentagem de GC (Guanina e Citosina) no intervalo de 40 a 60%; e temperatura de meltin entre 60 e 63°C. Sendo assim, foi possível o desenho de 100 pares de primers que flanqueiam as regiões ESTs para resistência a doenças em mamona. Apresentando tamanho médio de 22 nucleotídeos, flanquando regiões a serem amplificadas, via PCR, com um tamanho médio de 199 pb. Também, tiveram as médias de T_m de 60,1 °C e concentração de GC de 47,1%. A especificidade média foi de 94,3%. Além disso, foram sintetizados 8 pares de *primers* para a identificação do gene RPM1, 5 para RPS2, 6 para o gene N do TMV, 36 para identificação de genes que codificam proteínas ricas em repetições de leucina, 2 para o RPS5 e 3 para o RPP8. Os pares de primers desenvolvidos nesse trabalho é de grande contribuição para estudos de expressão gênica diferencial, relacionados a interação planta-patógeno em mamona.

Palavras-chave: Bioinformática; ESTs; Resistência.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Bruna Leite Vieira do, Biology Bachelor, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, dezembro de 2019. **Primer design for real-time PCR gene expression study in castor bean (*Ricinus communis* L.)**. Adviser: Edna Lôbo Machado.

The species *Ricinus communis* L., known as castor bean has a high industrial interest because of the oil extracted from its seeds. Diseases such as gray mold, macrophomine rot, botryodiplodia rot fusarium wilt, among others, are diseases that affect the crop, interfering with its productivity. Thus, the objective of this work was to design primer pairs for castor bean resistance genes aiming at the study of gene expression for pathogen resistance via real time PCR. Oligonucleotides (primers) were designed using castor bean ESTs (expressed sequence markers) involved in pathogen resistance metabolic pathways. The sequences were retrieved through the NCBI database. Primer pairs were designed using Primer3 software and their quality measured by NetPrime software. For standardization of PCR reactions, the following criteria were used in primer selection: size ranging from 20 to 24 bp (base pairs); percentage of GC (Guanine and Cytosine) in the range of 40 to 60%; and meltin temperature between 60 and 63°C. Thus, it was possible to design 100 primer pairs that flank the ESTs regions for castor disease resistance. Presenting an average size of 22 nucleotides, flanking regions to be amplified, via PCR, with an average size of 199 bp. Also, they had T_m averages of 60.1 ° C and GC concentration of 47.1%. The average specificity was 94.3%. In addition, 8 primer pairs were synthesized for identification of the RPM1 gene, 5 for RPS2, 6 for the TMV N gene, 36 for identification of genes encoding leucine repeating rich proteins, 2 for RPS5 and 3 for the RPP8. The primer pairs developed in this work are of great contribution to differential gene expression studies, related to plant-pathogen interaction in castor bean.

Key-words: Bioinformatics; ESTs; Resistance.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Loci cromossômicos de sequências expressas (ESTs) de mamoneira utilizadas para desenho de pares de primers diretos e reversos, proteínas que codificam e classe gênica.....13

Tabela 2 - Características dos *primers* desenhados a partir da recuperação das sequências ESTs de *R. Communis*.....17

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Desenho dos oligonucleotédeos	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae está distribuída por regiões tropicais e temperadas de todo o planeta, constituindo-se de 317 gêneros e 5 subfamílias (WEBSTER, 1994). Só no Brasil, é possível encontrar 1100 espécies agrupadas em 72 destes gêneros. Membros desta família estão presentes em todo tipo de formação vegetacional do país (BARROSO, 1984).

De todas as espécies da família, três se destacam, por conta da sua grande representatividade econômica, sendo elas: a seringueira (*Hevea brasiliensis* L.), conhecida por ser a principal fonte de borracha natural; a mamona (*Ricinus communis* L.), da qual o óleo extraído de suas sementes é utilizado na indústria para diversos fins (OGUNNIYI, 2006), como na produção de biodiesel (SCHOLZ & SILVA, 2008), por exemplo, além de diversas aplicações medicinais (SCARPA & GUECI, 1982); e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), que é uma das principais fontes de amido para a alimentação de humanos e outros animais (GUIRA et al., 2016; ECHEBIRI; EDABA, 2008).

A espécie *Ricinus communis* L., também conhecida como mamona, mamoneira, carrapateira, carrapato e ricínio (ALMEIDA; CÁNECHIO FILHO, 1973); (BELTRÃO et al., 2001), é originária da região onde hoje é a Etiópia, no leste africano (MOSHKIN, 1986). A chegada da espécie no continente americano coincide com a vinda dos europeus e, conseqüentemente, com a chegada dos escravos trazidos de diversos locais da África (SAVY FILHO, 1999). Por conta das similaridades das características ambientais, a planta demonstrou ampla adaptação às condições edafoclimáticas do Brasil, podendo hoje ser encontrada em, praticamente, todo território nacional (SAVY FILHO, 1999).

De acordo com Schultz (1963), Vidal e Vidal (1980) e Popova e Moshkin (1986), a mamoneira é classificada, atualmente, da seguinte maneira:

Subdivisão: Fanerogamae ou Espermatophita

Filo: Angiospermae

Classe: Dicotyledonae

Subclasse: Archichlamydeae

Ordem: Geraniales

Família: Euphorbiaceae

Gênero: *Ricinus*

Espécie: *R. communis*.

A mamoneira apresenta um elevado interesse industrial, já que o óleo extraído das suas sementes é utilizado como matéria prima na fabricação de produtos elaborados como plásticos, fibras sintéticas, esmaltes, resinas, lubrificantes e, principalmente, o biodiesel (CANGEMI *et al.* 2009). Possui grande utilização também na área médica, com os biopolímeros, apresentando uma solução no desenvolvimento de órgãos artificiais (CANGEMI *et al.* 2009). Como subproduto da industrialização da mamona, obtém-se a torta, que possui a capacidade de restaurar terras esgotadas, sendo interessante enfatizar que desta planta é possível aproveitar todas as estruturas, já que as folhas servem de alimento para o bicho da seda e, misturadas à folhagem, aumentam a secreção láctea das vacas (CANGEMI *et al.* 2009). A haste, além de celulose própria para a fabricação do papel, fornece matéria prima para a produção de tecidos rústicos (BDMG, 2000).

O óleo de mamona é obtido da semente da planta e possui características químicas atípicas quando comparadas à maioria dos óleos vegetais, pois além da presença do triglicerídeo do ácido ricinoléico, que é um ácido graxo hidroxilado pouco frequente nos óleos vegetais, este está presente numa faixa de 84,0% a 91,0% da sua composição (CANGEMI *et al.* 2009). O triglicerídeo do ácido ricinoléico possui a particularidade de ser um dos poucos ácidos graxos naturais cuja estrutura química possui três grupos funcionais altamente reativos: o grupo carbonila no primeiro carbono, a dupla ligação (ou insaturação) no 9º carbono e o grupo hidroxila no 12º carbono (CANGEMI, 2006). Esses grupos funcionais fazem com que o óleo de mamona possa ser submetido a diversos processos químicos, nos quais podem ser obtidos uma grande variedade de produtos (CANGEMI *et al.* 2009).

Os produtos derivados da mamona apresentam diversas utilidades, sendo assim, é importante o estudo acerca das doenças que afetam a cultura, acarretando sua baixa produtividade. Dentre as fitopatologias que afetam a planta, as principais são: Mofo cinzento, provocada pelo fungo *Botryotinia ricini*; Podridão de macrofomina, provocada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*; Podridão de botryodiplodia, provocada pelo fungo *Lasiodyplodia theobromae*; Murcha de fusarium, que é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*; Tombamento, causado por diversos fungos, sendo os principais *Rhizoctonia solani*, *Sccherotium rolfsii*, *Fusarium sp* e *Alternaria sp*; Mancha de cercospora, causada pelo fungo *Cercospora ricinella* e Mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria ricini* (BELTRÃO *et al.* 2006). A maioria, se não todas, levam à perda de produtividade da planta e até a morte do indivíduo acometido. Atualmente diferentes técnicas podem ser empregadas visando o controle dessas doenças e manutenção da cultura e o melhoramento genético constitui uma das ferramentas que tem mostrado eficácia e durabilidade.

O melhoramento genético possibilitou a solução de diversos empecilhos que estão relacionados com a cultura da mamona como: maior produtividade, maior teor de óleo nas sementes, redução do porte da planta, tornando mais fácil a colheita mecânica, diminuição do grau de deiscência do fruto, evitando o desperdício no campo e proporcionar um menor número de colheitas, além do aumento do nível de resistência a algumas das principais doenças que ocorrem no país (VIEIRA;LIMA, 1999), entretanto, faz-se necessário o aprimoramento dessas técnicas, afim de reduzir o tempo gasto na seleção de indivíduos resistentes, a perda de culturas e o uso de agrotóxicos.

Mesmo possibilitando a solução de diversos problemas, o melhoramento genético clássico possui algumas limitações, já que se baseia na seleção fenotípica de características de interesse, utilizando então o fenótipo para a seleção de genótipos ditos superiores. Porém, já foi visto que mudanças morfológicas, fisiológicas e de desenvolvimento de plantas apresentam bases moleculares e genéticas (CASAGRANDE *et al.*, 2001). Sendo assim, a expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos resistentes pode ser usada para a análise desses mecanismos de resistência (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996,

1997). Uma resposta fisiológica específica representa na verdade combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (BRAY, 1993).

Com os avanços nas áreas da genética e da epidemiologia, ficou cada vez mais rápido e fácil de entender as interações planta-patógeno, ficando evidente que esse tipo de relação envolve fatores genéticos de ataque e de defesa presentes no patógeno e no hospedeiro, respectivamente, sob a influência do ambiente (FLOR, 1971). A resistência é, na maioria das vezes, poligênica ou de caráter quantitativo, normalmente envolvendo uma série de genes, com efeitos diferenciados, associados a um pronunciado efeito do ambiente, o que leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro (ALZATE-MARIN, *et al.*, 2005).

As plantas são resistentes à maioria dos patógenos, isso porque possuem uma habilidade natural de reconhecer os potenciais invasores e preparar uma defesa bem-sucedida (ALVARENGA, 2007). Sendo assim, Flor (1942) propôs a teoria do sistema de reconhecimento gene-a-gene, na qual diz que uma planta com o gene dominante de resistência *R* reconhece um patógeno com o gene dominante de avirulência *Avr* correspondente, assim, conferindo às plantas que possuem esse gene dominante a característica de resistente. Porém, a maioria dos patógenos apresenta uma rápida adaptação aos mecanismos de defesa das plantas.

Dessa forma, tem se tornado cada vez mais frequente a busca por genes *R* em plantas. Esses genes são divididos em 5 classes e, dentre elas se encontram os LRR (*Leucine Rich Repeats*), que são genes que codificam proteínas transmembranas, as quais a região N-terminal extracelular é composta de repetições ricas em leucinas (JONES *et al.*, 1994). Entretanto, a maioria dos genes de resistência codifica proteínas com um domínio N-terminal variável, seguido por um sítio de ligação de nucleotídeo, que são os NBS (*Nucleotide Binding Site*) (BAKER *et al.*, 1997; ELLIS *et al.*, 2000; DANGL & JONES, 2001).

O estudo de características poligênicas não é tão fácil, visto que tem forte influência do ambiente e a ação de diferentes genes interagindo. Sendo assim, estudar a expressão gênica tem se tornado cada vez mais comum, visto que vem demonstrando ser um importante aparato no entendimento de processos moleculares.

Um exemplo disso é que estes estudos podem ser utilizados na identificação de redes de genes expressos de fundamental importância na resposta de um organismo a um estímulo externo como a ação de um patógeno, por exemplo. Dessa forma, o estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir para a caracterização da resistência, já que possibilita a identificação de genes-chave de redes pela comparação da expressão gênica durante o desenvolvimento sob condições normais e um indivíduo acometido com algum patógeno, por exemplo (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Marcadores do tipo EST-PCR, são marcadores baseados em cDNA que marcam genes expressos, originados de regiões codificadoras e são altamente conservados (ALVARENGA, 2007). O grupo TIGR sequenciou e reuniu aproximadamente 400 Mpb do genoma da mamoneira através do sequenciamento por shotgun, gerando 5000 ESTs de diferentes tecidos que ajudam na descoberta e anotação de genes (CASTOR BEAN GENOME DATABASE, 2009). Isso facilita ainda mais a utilização de bioinformática para o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas para a identificação e seleção dos genes de resistência.

Aliada a essa tecnologia, a PCR em tempo real (RT-qPCR) tem se mostrado uma importante ferramenta, já que segundo Berdal & Holst-Jensen (2001), permite um acompanhamento durante cada ciclo da reação de PCR, em um sistema fechado e sem interferências durante a reação. Sendo assim, um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação (BARROS *et al.*, 2008), sendo um método que produz dados rápidos e reprodutíveis (HAYWARD-LESTER *et al.*, 1995; GINZINGER, 2002).

Segundo Nishi *et al.*, (2009), a técnica de PCR em tempo real permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, apresentando maior sensibilidade que o PCR convencional e uma boa reprodutibilidade. A quantificação da expressão dos genes é feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo a um outro grupo não exposto, denominado grupo controle (ZARLENGA; HIGGINS, 2001). Em seu trabalho, Nishi *et al.*, (2009) descreveu que uso da técnica da RT-PCR em tempo real permitiu a detecção e a comparação da expressão de genes em diferentes tecidos de vacas. Frente à escassez de reagentes espécie específicos, a quantificação

da expressão de mRNA torna-se uma ferramenta adicional para a avaliação da atividade celular contra as infecções.

Como a foi dito, os patógenos podem se adaptar facilmente aos mecanismos de defesa das plantas, sem falar que características poligênicas sofrem uma grande influência do ambiente e são reguladas por um número grande de genes . Sendo assim, diante do exposto, são necessários estudos visando a regulação da expressão de genes envolvidos em rotas metabólicas de resistências a doenças na mamoneira, via RT-qPCR. Para tanto, como passo inicial, é preciso desenho de pares de primers que anelem em regiões gênicas para resistências à patógenos na espécie.

Dessa forma, objetivou-se desenhar pares de primers para genes de resistência em mamona visando o estudo de expressão gênica, via PCR em tempo real. Sendo assim, resgatando sequências expressas relacionadas à genes de resistência a doenças, depositas em bancos de dados do NCBI, em *R. communis*; desenhando pares de primers e verificar a qualidade para então disponibilizar os pares de primers desenvolvidos para futuros estudos de expressão diferencial de genes envolvidos na rota metabólica de resistência a patógenos em mamoneira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho dos oligonucleotédeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados usando ESTs de mamona envolvidas em rotas metabólicas de resistência a patógenos (Tabela 1).

Tabela 1: Loci cromossômicos de sequências expressas (ESTs) de mamoneira utilizadas para desenho de pares de primers diretos e reversos, proteínas que codificam e classe gênica.

NCBI Loci	Proteína	Classe gênica
RCOM_0009540	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0016080	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0024370	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0024480	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0042270	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_0108660	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0127740	Precursor EXS da proteína quinase recessiva rica em leucina, putativo	eLRR
RCOM_0205410	Proteína quinase transmembrana repetida rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_0268610	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR

Tabela 1: Continuação		
RCOM_0280040	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0280590	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0292060	Precursor EXS da proteína quinase recessiva rica em leucina, putativo	eLRR
RCOM_0364920	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0393490	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0407000	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0407120	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0455430	Proteína de resistência à doença RPH8A, putativa	NBS-LRR
RCOM_0458060	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0464860	Proteína de resistência à doença RPP8, putativa	NBS-LRR
RCOM_0496700	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0534550	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0585380	Proteína de resistência à praga tardia R1-A, putativa	NBS-LRR
RCOM_0585390	Proteína de resistência à doença RPH8A, putativa	NBS-LRR
RCOM_0585520	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0585530	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0602290	Proteína de resistência à doença ADR1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0602300	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0625620	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0633880	Proteína quinase transmembrana repetida rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_0645130	Proteína quinase transmembrana repetida rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_0662960	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0687360	Proteína 2 contendo repetição rica em leucina, lrrc2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0699260	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0699270	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0739250	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_0739360	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_0740720	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0742270	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0742650	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0751360	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0768900	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0812210	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0812230	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0812250	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0820400	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0873960	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_0884220	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0885080	Proteína de resistência à doença RPS5, putativa	NBS-LRR
RCOM_0895260	Proteína de resistência à doença RPS5, putativa	NBS-LRR
RCOM_0897880	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0898290	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0898300	Proteína de resistência à doença RPS5, putativa	NBS-LRR
RCOM_0898840	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_0898850	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0898870	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0900670	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_0902160	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_0979720	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_0979730	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1000560	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1019160	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1045150	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_1045320	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_1047690	Proteína 2 contendo repetição rica em leucina, lrrc2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1055490	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1077550	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_1098990	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR

Tabela 1: Continuação

RCOM_1118640	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1122050	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1184740	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1184850	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1195490	Proteína de resistência à doença RPH8A, putativa	NBS-LRR
RCOM_1282160	Repetição rica em leucina contendo proteína quinase, putativa	eLRR
RCOM_1292200	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1296800	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1298340	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1298580	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1321720	Proteína de repetição rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_1329890	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_1330160	Proteína N de resistência ao TMV, putativa	NBS-LRR
RCOM_1330180	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1331470	Proteína de resistência à doença RPP13, putativa	NBS-LRR
RCOM_1331600	Proteína de resistência à doença RFL1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1331610	Proteína de resistência à doença RPS2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1333060	Proteína 2 contendo repetição rica em leucina, lrrc2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1333070	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1397630	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1429080	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1452690	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1452690	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1452730	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1452990	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1453360	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1453390	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1453510	Proteína de resistência à doença RPM1, putativa	NBS-LRR
RCOM_1453660	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1455020	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1467510	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1481570	Proteína de resistência à doença RPP8, putativa	NBS-LRR
RCOM_1482430	Proteína de resistência à doença RPP8, putativa	NBS-LRR
RCOM_1487620	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1508820	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_1509380	Proteína de resistência à doença RPP13, putativa	NBS-LRR
RCOM_1506660	Proteína de repetição rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_1516000	Proteína de resistência à doença RGA2, putativa	NBS-LRR
RCOM_1516110	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1579060	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1590790	Proteína de resistência à doença RPP13, putativa	NBS-LRR
RCOM_1591970	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1678470	Proteína de repetição rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_1680260	Repetidor de quinase rico em leucina, putativo	eLRR
RCOM_1680500	Repetidor de quinase rico em leucina, putativo	eLRR
RCOM_1681360	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1681370	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1681450	Proteína quinase transmembrana repetida rica em leucina, putativa	eLRR
RCOM_1689510	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1689520	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente
RCOM_1727110	Proteína contendo repetição rica em leucina, putativa	NBS-LRR
RCOM_1772130	Proteína de resistência à doença RPP8, putativa	NBS-LRR
RCOM_1797940	Proteína de resistência à doença RPH8A, putativa	NBS-LRR
RCOM_1965050	Proteína resposta à resistência à doença, putativa	tipo dirigente

As ESTs de mamona foram obtidas no banco de dados NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019). Os primers foram projetados com a ajuda do software Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Para fins de padronização das reações da PCR, foram utilizados os seguintes critérios na seleção dos *primers* tamanhos dos *primers* entre 20 e 24 pb, sendo 22 o tamanho considerado como ideal; percentagem de GC no intervalo de 40 a 60%, sendo 50% o valor ideal; e temperatura de meltin entre 60 e 63°C, sendo 62° considerada ideal.

A qualidade do desenho dos *primers* foi verificada por meio do aplicativo Net Primer (Premier Biosoft, 2015). Os desenhos mais adequados livres de grampos, dímeros, dímeros cruzados, sequências palíndromas e repetições de nucleotídeos, foram selecionados para posterior síntese dos iniciadores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recuperadas 121 sequências ESTs de mamoneira para resistência à patógenos. Para estas sequências, foi possível projetar 100 pares de primers para estudo de expressão gênica (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos *primers* desenhados a partir da recuperação das sequências ESTs de *R. communis*.

NCBI Locus	TAMANHO (PB)*	Tm (°C)	Dímeros	Grampos	GC (%)	Avaliação (%)	Primer	Sequência (5'→3')
RCOM_0009540	233	60,57	-3,65	0	50	93	F	TCTTCCCCCGTACTTTCACCTA
		60,43	-7,05	-1,19	40,91	85	R	TTGCAGCAAGTTTATGGCAGTT
RCOM_0016080	229	59,41	0	0	45,45	100	F	TGCTTATGCTGGATGATGTGTG
		60,58	0	0	50	100	R	TGCTCCTCTTTGCTTCCTAACC
RCOM_0024370	240	60,21	-6,57	-2,07	40,91	85	F	TTGGCATAGGAATGCTTCAAGA
		60,11	-4,62	-0,34	50	91	R	AGGAAGAAGATCCACAGCGTTC
RCOM_0024480	229	60,4	0	0	45,45	100	F	GCCAAGAGCAAAATCTCAAGGT
		61,2	-10,3	-2,11	50	78	R	GGCCAAAAGAAGCCTAGGAAGT
RCOM_0042270	230	60,32	0	0	50	100	F	AATCCTATCCCCAGCCACACTA
		60,7	0	0	50	100	R	CGTAAATCCCTTGTGCTCTTCC
RCOM_0108660	160	60,14	0	0	50	100	F	CTTCTCCGAACGAGTCTCCATT
		60,19	-4,89	-0,69	45,45	90	R	GGGCAAACCTTCACACTTTTCT
RCOM_0127740	193	60,36	0	0,62	40,91	99	F	ATGGTGTGCAAGAAGGATTT
		60,09	-10,23	0	40,91	81	R	TCCCTTGTGAAGCTTTTGTGTA
RCOM_0205410	222	59,91	-3,94	0	50	92	F	TCACCCAGTATGCTCGCACTAT
		60,44	0	0	45,45	100	R	TTAGCATCTCACCTTCCCCATT
RCOM_0268610	168	59,59	-6,3	0	50	88	F	GACATGACGTGTTTGGAGAAGC
		60,96	0	0	40,91	100	R	TAAGGAAAACAAGGCAGGCAAT
RCOM_0280590	158	60,46	-6,34	-1,93	50	85	F	ATAGCTGAAAAGGGTGCTCAGG
		59,8	-3,94	0	50	92	R	TTCACATAGTCCATCCCCTGC
RCOM_0292060	151	59,97	-9,75	0	45,45	82	F	CCGGTGGAGATGAAACAATGTA
		60,09	0	-0,92	40,91	98	R	TTGCTGGAACCTGAACCAAAGAA
RCOM_0407000	247	59,36	0	0	50	100	F	ACAGCCACACCACAACAGAACT

		59,54	0	0	50	100	R	TTGTCATCTGCTTCTCCTCTGC
RCOM_0455430	154	60,39	-6,34	0	45,45	88	F	CTGCGAAGCTGCTAAAAGATGA
		60,44	0	0	45,45	100	R	ATTCTTTCTCCAGGCACCCATA
RCOM_0458060	243	60,03	0	0	50	100	F	GGGAAGAGTGATTGGTTTGGTC
		60,37	-4,54	-0,44	45	91	R	ACCCAAAACCTTCAAGAGCCAAG
RCOM_0464860	155	60,71	-4,62	0	40,91	91	F	TAATCAAGATCAAGGGCGGTTT
		59,89	-6,34	-0,32	45,45	88	R	CAGCTTCTTCTGATGCCTTGAA
RCOM_0534550	166	59,75	0	0	50,5	100	F	CTTGCTGCTGGAATCTCTCTCA
		60,14	0	0	50	100	R	CCTCTGCTCTTCCTTTGTCCAT
RCOM_0585530	198	60,54	-3,65	0	50	93	F	GATTGGGAGTACGAAGGAAACG
		59,5	0	0	50	100	R	GGTTCTTGATGCTGGATGTCTG
RCOM_0625620	228	60,1	-6,34	-0,02	50	88	F	CGAGCTTCAGCATCTACGAGAA
		59,95	0	0	45,45	100	R	GCATCACCTCCATAACCAACAA
RCOM_0633880	215	59,5	-5,38	0	50	90	F	CATGAATGAGGTGCTGTCTTCC
		60,02	0	0	45,45	100	R	TGGTCTGAAGAATGCCGAGTTA
RCOM_0645130	195	59,74	-4,53	-0,57	45,45	91	F	TGAGGGTGCTATTCCTTCATCA
		60,09	0	0	40,91	100	R	TTGTTGCCAGAAAAAGAGGTCA
RCOM_0662960	152	60,14	-7,05	0	50	87	F	AGCTTTCTCGTCTGCAAGTCCT
		60,42	-5,12	0	45,45	90	R	AGGACGCTCTTTTGAAGATTGG
RCOM_0687360	239	60,35	0	0	45,45	100	F	TAATGAGTTGCTACGGGCTGAA
		60,06	-5,67	-1,17	50	88	R	GTGCTCTTCAGGGTGACCTTTT
RCOM_0739250	154	59,76	0	0	50	100	F	GCATCACCGTTATCACACCAGT
		60,48	0	0	50	100	R	ATGTTAGGACGGGCTATCAGGA
RCOM_0739360	248	59,48	0	0	50	100	F	CAGTCTGCTGACACCGAAAAGT
		59,58	-6,34	0	54,55	88	R	AGCTCACGCACTGGACTCATAG
RCOM_0742270	198	60,22	0	0	50	100	F	GCCAAAAGTTCAGAGTCGGAGT
		59,57	0	0	50	100	R	TCTGATGAGTCTCTTCCGCTTG
RCOM_0751360	249	60,02	-4,53	-0,23	45,45	91	F	TTAGGTTTCTGAGGCGTTGA

		60,34	0	-0,01	45,45	99	R	ATCCTGTGGTTTTTCACCTGCT
RCOM_0768900	218	59,97	-4,53	0	40,91	91	F	TGCTTCAAGTTCCCATTTCTGA
		60,67	0	0	54,55	100	R	CCCCTCTACCTCCTTTCCACTT
RCOM_0812210	164	59,67	-5,38	0	45,45	90	F	GTTGATCCATCCCATGTTTCGTA
		59,28	0	0	50	100	R	TCTGGACTGGTACTCGTGAAT
RCOM_0812250	232	60,02	-4,05	0	45,45	92	F	CAAAGGCAACATCAGAGATTCG
		60,39	0	0	50	100	R	GGATTGAAACTCGGTGGTAAGG
RCOM_0873960	212	59,91	0	-0,11	45,45	99	F	ACCACAAAGGGTCAATCTCCAT
		60,68	0	0	50	100	R	TTGGCGTTAGGGTAGGTGAAGT
RCOM_0884220	150	59,65	-3,65	0	50	93	F	TCTTTGTGAGTACCCTCGTGGA
		59,8	-6,38	-1,6	45,45	86	R	ACGGCAATCATACCACATGAAC
RCOM_0895260	152	60,14	0	0	50	100	F	GGGTGTGGGAAAAACAACCTCTC
		60,4	-5,36	0	40,91	90	R	TTCCGATCTCCAATTTGTTCTT
RCOM_0897880	240	60,42	0	0	45,45	100	F	CATTCTTCCGCTCACCTTTCTT
		59,97	-8,53	0	40,91	84	R	TCTTTCATGAGGCAGTTCCAAA
RCOM_0898290	246	60,81	-5,36	0	40,91	90	F	AACAATTTTCCCCTTCGCTACA
		59,62	-5,12	0	45,45	90	R	AGGTTGTCTTGAAGATGGCACA
RCOM_0898300	234	60,35	0	0	45,45	100	F	GGAAAACCTGGGTGGAAGAAATG
		59,99	0	0	54,55	100	R	CTCCATCCTCCCATTACCAGTC
RCOM_0898840	157	60,35	-5,36	0	45,45	90	F	CATTGGCTAAATTGCTCTGTCTG
		60,02	0	0	45,45	100	R	TCATCGCTCTCAAACCTGGGTA
RCOM_0898850	162	59,91	-5,38	0	45,45	90	F	CAAAGAGCATGAAGCAGCAGAT
		60,34	0	0	45,45	100	R	ATCTTCATCTTGGGGCATCCTA
RCOM_0898870	216	60,42	0	0	45,45	100	F	TGGGAAGATGGAGAAGGGTAAA
		60,81	-5,36	0	45,45	90	R	CCGAAATTCCAGTAGGCAAAAAC
RCOM_0902160	202	60,58	-6,3	-0,82	50	87	F	TGGACGTATAGCCCAACCTTCT
		60,81	-5,36	0	40,91	90	R	TTTCGGCAATTTCTTGGGTAGT
RCOM_0979720	166	60,3	0	0	50	100	F	AGCAAGAAGAGCAGAGCCAACCT

		60,54	0	0	45,45	100	R	AATCCTTGGACCTGGCTGTAAA
RCOM_0979730	164	59,74	-5,67	-1,27	54,55	88	F	CTAGACTGTGCCTGCTTGAGGA
		60,48	-3,91	0	50	92	R	TCTGGGTAATATCCTGGCGTCT
RCOM_1000560	242	59,91	0	0	54,55	100	F	GGGTCCAACCTCCACATCCTAC
		60,54	-5,36	0	40,91	90	R	CCAAATTCCCTTTCCTTCAATG
RCOM_1045150	151	59,36	-4,17	0	45,45	92	F	TTGAGACCATCCCTGAATCTGA
		59,92	-5,41	0	50	90	R	GGGTGATGATTGGAGAGAAACC
RCOM_1045320	223	60,62	0	0	40,91	100	F	AAAACACGGGAACCTGAAGCAAT
		60,54	-4,52	-0,02	45,45	91	R	AAAGGGTAGCCATTCCAGTGAA
RCOM_1047690	170	60,38	-3,62	0	50	93	F	ACAGTGTACGGGAGCAAGGAAT
		59,62	0	0	45,45	100	R	TCCAAGGCTGTGACTTTGTGAT
RCOM_1098990	221	60,66	-6,97	-2,47	45,45	84	F	ACTATGTTGGCTGCCCAAAGTT
		60,44	0	0	45,45	100	R	TTTTGGGCTGAGGGATAGATGT
RCOM_1122050	208	60,11	-4,62	0	45,45	91	F	TGAAGGGGATCAATGAGAGGTT
		60,53	0	0	45,45	100	R	TCTTCTCCTTTACCCCAACCAA
RCOM_1184740	171	59,78	0	0	50	100	F	ACCTGTCTCACACCGCACTAAA
		59,91	-7,05	-0,69	45,45	86	R	GCATCTTTTGCACACCACTTTC
RCOM_1184850	194	60,57	-10,3	-0,57	54,55	80	F	CCTAGGATCTTCCCTGGAGGT
		59,62	0	0	50	100	R	CAAGATTGACAGGCAACAGACC
RCOM_1195490	169	59,5	0	-0,72	45,45	98	F	TTTCCAATCCAGTGGTGTATGC
		59,5	-6,38	-0,23	45,45	88	R	TTCTGATCCAAGGCTGTCATGT
RCOM_1282160	246	60,02	-7,05	0	54,55	87	F	GGCTACATTGCACCAGAGTACG
		60,4	-4,89	0	45,45	91	F	CAAAAGATGATCTCCCGTTTCC
RCOM_1292200	168	59,57	-6,37	-2,27	45,45	85	F	ACCATGTGGATTGGTGTCAAAG
		59,5	0	0	45,45	100	F	ATCCAACAAGTCCTCAGCATCA
RCOM_1298340	166	60,71	0	0	45,45	100	F	GCGAGGGAATAGTGGAAAAATG
		60,6	-9,75	-0,44	50	81	F	CTCAACCTTAGAGCCGGAAGAA
RCOM_1298580	158	59,49	0	0	50	100	F	CTTCGCACTCTCAAGTTCCTCA

		59,48	0	0	45,45	100	F	TTTGCCTCCACCATCTCTTCA
RCOM_1321720	158	60,11	0	0	50	100	R	GAAGGCAATCAAGAGACCGACT
		60,24	-6,34	-1,47	50	86	F	CAAGCTCCTCCAGTGAAAAGGT
RCOM_1330160	238	60,66	0	0	40,91	100	R	TGGGAAATCAAAGAGGCAAAGT
		59,95	-4,52	-0,02	45,45	91	F	GCTATGTGTGAACCCATTCCAA
RCOM_1331470	197	59,67	0	0	54,55	100	R	GACTTGAGGAGGGAGGAGATGA
		59,76	-4,9	0	50	91	F	CAAAGACAGTTCCACTCCGTTG
RCOM_1331600	184	60,36	0	0	50	100	R	GAATGGCTGGTGTAGGGAAAAC
		60,24	-4,54	-0,44	50	91	F	CTTGCTCTTCCCACCAAAGTCT
RCOM_1331610	186	60,1	0	0	50	100	R	TGTATGGGAGGAGGTGGACTTT
		60,21	-3,91	0	40,91	92	F	TTGCCTGCCATATCTCTGAAAA
RCOM_1333060	200	59,9	-6,38	-1,62	50	86	R	GTTTCTGACACCAGAGCATGGA
		59,76	-4,52	0	40,91	91	F	GGGCAAATGCTGTTCTGAAATA
RCOM_1429080	238	60,54	-7,34	-0,52	45,45	86	R	TTGTGGGGTTCCATTAGCTCTT
		60,54	-5,85	0	50	89	F	GCAGCCGTCCAGAACTTTAACT
RCOM_1298340	166	60,71	0	0	45,45	100	R	GCGAGGGAATAGTGAAAAAATG
		60,6	-9,75	-0,44	50	81	F	CTCAACCTTAGAGCCGGAAGAA
RCOM_1298580	158	59,69	0	0	50	100	R	CTTCGCACTCTCAAGTTCTCTCA
		59,48	0	0	45,45	100	F	TTTGCCTCCACCATCTCTTCA
RCOM_1321720	157	60,11	0	0	50	100	R	GAAGGCAATCAAGAGACCGACT
		60,24	-6,34	-1,47	50	86	F	AAGCTCCTCCAGTGAAAAGGTG
RCOM_1329890	151	60,14	-6,34	-0,74	54,55	87	R	GAGGGAGTTACCTGAGCTTCCA
		59,99	-11,66	0	40,91	89	F	TTCACTGCATGCCTTTTGATCT
RCOM_1330160	238	60,66	0	0	40,91	100	R	TGGGAAATCAAAGAGGCAAAGT
		59,95	-4,52	-0,02	45,45	91	F	GCTATGTGTGAACCCATTCCAA
RCOM_1331470	197	59,67	0	0	54,55	100	R	GACTTGAGGAGGGAGGAGATGA
		69,76	-4,9	0	50	91	F	CAAAGACAGTTCCACTCCGTTG
RCOM_1331600	184	60,36	0	0	50	100	R	GAATGGCTGGTGTAGGGAAAAC

		60,24	-4,54	-0,44	50	91	F	CTTGCTCTTCCCACCAAAGTCT
RCOM_1333060	201	59,9	-6,38	-1,62	50	86	R	GTTTCTGACACCAGAGCATGGA
		60,67	-4,52	0	40,91	91	F	AGGGCAAATGCTGTTCTGAAAT
RCOM_1429080	238	60,54	-7,34	-0,52	45,45	86	R	TTGTGGGGTTCCATTAGCTCTT
		60,54	-5,85	0	50	89	F	GCAGCCGTCCAGAACTTTAACT
RCOM_1452690	238	60,54	-7,34	-0,52	45,45	86	R	TTGTGGGGTTCCATTAGCTCTT
		60,54	-5,85	0	50	89	F	GCAGCCGTCCAGAACTTTAACT
RCOM_1452730	212	60,27	-4,91	0	40,91	91	R	TCACCCAAAAAGCCACAATATG
		59,74	0	0	45,45	100	F	ACAACCTGACCAAAGGCACTGA
RCOM_1452990	216	58,92	0	0	45,45	100	R	GTTGTGCTTGATGATGTGTGGA
		60,3	0	0	45,45	100	F	ATCCCATCTACAAATGCTCGT
RCOM_1453360	216	58,92	0	0	45,45	100	R	GTTGTGCTTGATGATGTGTGGA
		60,3	0	0	45,45	100	F	ATCCCATCTACAAATGCTCGT
RCOM_1453390	222	60,33	0	-0,24	40,91	99	R	AAGCCATTGCTGATTGCTGTAA
		59,78	-4,3	0	50	92	F	TGACAACTCTGCGGGTTACTGT
RCOM_1453510	161	60,3	-6,09	-1,79	40,91	86	R	TTTGAGCACCATCAAATATGC
		60,24	0	0	50	100	F	CAGGAAAAGTGCCCAACTCTCT
RCOM_1453660	159	59,85	-4,9	0	45,45	91	R	CTTGAGCAATCTCAACAATGG
		60,13	0	4	45,45	100	F	TAGGTGCGTGGTCTTTTCTTCA
RCOM_1455020	230	60,54	0	0	50	100	R	GGGAAAGCACAAGGGTTCTATG
		59,62	-5,5	-1,2	50	88	F	GTGGCAAGATCCAACCTGTGAG
RCOM_1467510	228	59,7	-7,05	0	45,45	87	R	AGATCACCCGTGTGCAATTCTA
		59,92	0	0	40,91	100	F	TGAACTCTTTTTGTTGGGACGA
RCOM_1481570	152	59,75	0	0	40,91	100	R	GACAACATTGCCAACATCCATT
		60,57	0	0	50	100	F	CCAACCGAAACTTCCCTCTATG
RCOM_1482430	250	59,95	-4,62	0	50	91	R	CTGCGAAGATCAGATCCGTATG
		60,04	0	0	40,91	100	F	CAAACAAAACATCCCTTGGTGA
RCOM_1487620	246	60,24	-4,9	-0,72	50	90	R	AGTCCAAAAGGCTGGTCTTGAG

		60,11	0	0	50	100	F	CGTAAAACTGGTCTGGCACTG
RCOM_1508820	234	59,87	-4,3	-1,94	50	89	R	ACTCCCTGACACTTTGGGTGAT
		60,12	0	0	50	100	F	CTCTTCCTTTCTTCTCCACCA
RCOM_1508820	234	59,87	-4,3	-1,94	50	89	R	ACTCCCTGACACTTTGGGTGAT
		60,12	0	0	50	100	F	CTCTTCCTTTCTTCTCCACCA
RCOM_1509380	181	59,54	-10,24	0	50	81	R	GGATTGAGCTGCAGAAGAGTGA
		60,28	0	0	45,45	100	F	TCCTTCGGTCCTTCAATGGTAT
RCOM_1506660	197	60,06	0	0	50	100	R	TAACAGCCAGGACAGCCATAGA
		59,98	-3,65	0	50	93	F	CCTTTGTACCATCTGCTGTTGC
RCOM_1516000	241	61,15	0	0	40,91	100	R	TGGGCGACGCTTATTTATCTTT
		59,97	0	0	50	100	F	TCCTCTACATCCCAGACAGCAA
RCOM_1516110	211	59,89	0	0	50	100	R	CAACTTATGCCGATGACTCTGG
		59,89	0	0	40,91	100	F	CAACTTATGCCGATGACTCTGG
RCOM_1579060	177	60,43	0	0	40,91	100	R	TGAAATAGTTTGGTTGCGATGG
		59,93	0	0	50	100	F	CCATTCTGAAGGTGATGACGAG
RCOM_1591970	210	60,24	-4,9	-0,4	50	90	R	AGGAGACTGGAACAAAGGCTTG
		60,5	0	0	45,45	100	F	CCCACAAATCCCAATAACACCT
RCOM_1678470	157	60,6	0	0	40,91	100	R	TTTTCAAGGTTTTGTCCCCTCT
		60,02	-6,76	0	45,45	87	F	TGTCGAAACCCATGAGCTAGAA
RCOM_1680260	156	60,96	-9,26	0	50	83	R	AATATCGCCTGCGGTAGCTAAG
		60,46	0	0	50	100	F	TCGGGAGGGATACTACCAGAAA
RCOM_1681360	188	60,1	0	0	54,55	100	R	GTCCTCTCGCCTTACCACAGTT
		60,41	-5,64	-0,44	50	89	F	GGAATCGTATGCTCCTGGAAAC
RCOM_1681370	237	60,47	0	0	40,91	100	F	TTGAAATCTTTCCTGCTCGTA
		60,29	-6,97	-2,67	50	83	R	CCAACGAGTGGTACTTGGCATA
RCOM_1681450	178	60,07	0	0	45,45	100	F	GGCAATAACACAGCACCAACAT
		59,74	-4,3	-0,2	50	91	R	CCAAAGGTGTGCTCTCAACAAC
RCOM_1689510	204	60,77	0	0	40,91	100	F	GCTTGGATGGGTTTTTCTTTTG

		54,94	-4,53	-0,23	40,91	91	R	AATGTCAACACGAAGCCTGAAA
RCOM_1689520	170	59,71	-3,65	0	50	93	F	GTACACACAACCAGGGCACAAT
		60,23	0	0	54,55	100	R	GTCCACCCTGAGCCTGAAATAC
RCOM_1727110	197	59,41	0	0	45,45	100	F	TGCTTATGCTGGATGATGTGTG
		60,09	0	0	40,91	100	R	TTGCTCAAACAAAGACCAGGAA
RCOM_1797940	219	60,03	0	0	50	100	F	GGCGAGTGCTTCATAACATCAG
		60,39	0	0	45,45	100	R	TTTCTGCTGTTTCTTCCCCTTC
RCOM_1965050	197	60,04	0	0	40,91	100	F	TTTCAACCACAAAATCCCACAG
		60,1	-5	-0,6	45,45	90	R	TGGGTCATCGGCTATGAATATG

* Tamanho em pb do produto a ser amplificado via PCR; F *primer* direto; R *primer* reverso.

Todos os pares de primers desenhados apresentaram um tamanho de 22 nucleotídeos. Segundo Wu *et al.*, (2004), o tamanho ideal de primers deve variar entre 15 a 30 nucleotídeos, visto que primers mais curtos que esse intervalo podem diminuir a especificidade da reação da PCR (MITSUHASHI, 1996). Por outro lado, primers maiores que esse intervalo podem se combinar melhor com a sequência alvo, no entanto, há uma diminuição na eficiência da amplificação via PCR (LIM *et al.*, 2011).

A concentração de GC para todos os primers desenhados variou entre 40,91 à 54,55, com média de 47,1%, o que aumenta a especificidade dos primers. De acordo com Raymaekers *et al.* (2009), o conteúdo de GC nas sequências, deve-se apresentar numa percentagem recomendada entre 30% e 80%, uma vez que, primers com maior concentração de GC são mais estáveis, podendo não desnaturar tão facilmente durante a PCR, o que causaria uma diminuição na eficiência da amplificação.

A T_m média dos primers foi de 60,1 °C. A diferença de T_m entre os pares de primers R e F ficou abaixo de 1. Segundo Chuang *et al.* (2013), os valores ideais para tal parâmetro é, aproximadamente, entre 55 e 60°C. A T_m dos primers direto e reverso devem ser próximas, para evitarem a formação de grampos (MITSUHASHI, 1996), sendo assim, a diferença entre elas não deve ser maior que 1°C (THORNTON & BASU, 2011). A temperatura de melting (T_m) é definida segundo Thornton *et al.* (2011) como sendo aquela na qual metade dos primers se encontra na forma desnaturada, ou seja, não pareados, sendo também um parâmetro importante para o desenho de primers.

O tamanho médio das sequências flanqueadas pelos pares de primers é de, aproximadamente, 199 pb. Para Tooul *et al.* (2000), a amplificação de produtos de menores tamanhos é mais eficiente que aqueles de tamanho maior, uma vez que são menos suscetíveis a estruturas secundárias que podem interferir na reação da PCR. Isso ocorre porque estes são mais suscetíveis à desnaturação durante o processo de extensão, concedendo primers para completar com mais eficiência as suas sequências alvo complementares (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Alguns primers desenhados apresentam possibilidade de auto complementariedade, principalmente próximo à região 3' final, o que pode levar à formação de grampos, que interfere no processo de extensão (RODRÍGUEZ, *et al.*, 2015), fato que pode ser corrigido por meio da otimização da reação de PCR,

principalmente pelo ajuste na concentração de magnésio e temperatura de anelamento. Os primers desenhados no presente trabalho apresenta um valor médio para a formação de grampos de $-0,2$, considerado aceitável. Ademais, interações intramoleculares e intermoleculares entre os diferentes primers pode formar dímeros de primers, fator que também deve ser considerado no desenvolvimento dos primers (SAIK 1989; KUBISTA *et al.*, 2006). Este valor, no presente trabalho apresenta uma média de $-2,84$. A avaliação da qualidade dos desenhos dos primers variou entre 100% a 74% (apenas 1 primer), com média de 94,3 %. Tal valor depende dos parâmetros apresentados acima e é considerado ideal para o desenvolvimento de primers. Aqueles que apresentam uma avaliação mais baixa, os parâmetros podem ser corrigidos durante a PCR.

Com relação aos ESTs de mamona selecionados para o desenho de primers, alguns se destacam por serem genes chaves na rota metabólica de resistência a patógenos em plantas. Um total de 13 ESTs apresentam alta homologia com a subclasse CC-NBS-LRR, que inclui os genes RPM1 e RPS2, identificados em *Arabidopsis* que conferem resistência a doenças (Ellis & Jones, 1998; Bendahmane *et al.*, 1999). De acordo com Reuber & Ausubel (1996) estas regiões gênicas estão envolvidas no reconhecimento de patógenos em *Arabidopsis*, identificando os genes de avirulência *avrRpm* e *avrRpt*, respectivamente. Assim, os primers aqui desenvolvidos para 8 ESTs auxiliarão na identificação do gene RPM1, sendo eles RCOM_0024370, RCOM_0024480, RCOM_0108660, RCOM_0662960, RCOM_0742270, RCOM_1452690, RCOM_1453360 e RCOM_1453510 e 5 ESTs para a identificação do gene RPS2 em mamona, sendo eles RCOM_0585530, RCOM_0768900, RCOM_0898850, RCOM_1298340 e RCOM_1331610.

Já a subclasse TIR-NBS-LRR abrange o gene N do tabaco, responsável por conferir resistência ao *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) (ELLIS & JONES, 1998; GASSMAN *et al.*, 1999). No presente trabalho, foram utilizadas um total de 6 ESTs capazes de identificar o gene N de resistência ao TMV para mamona, sendo eles RCOM_0268610, RCOM_0902160, RCOM_1045150, RCOM_1045320, RCOM_1329890 e RCOM_1330160.

Genes como o Cf9 do tomate confere resistência a *Cladosporium fulvum* e codificam proteínas transmembrana ricas em repetições de leucina (JONES *et al.*, 1994). O presente trabalho utilizou um total de 36 ESTs responsáveis pela identificação

dessas regiões em mamona, sendo elas RCOM_0458060, RCOM_0625620, RCOM_0687360, RCOM_0751360, RCOM_0812210, RCOM_0812250, RCOM_0884220, RCOM_0898840, RCOM_0902160, RCOM_1045150, RCOM_1045320, RCOM_1047690, RCOM_1098990, RCOM_1122050, RCOM_1184740, RCOM_1184850, RCOM_1298580, RCOM_1321720, RCOM_1333060, RCOM_1329890, RCOM_1330160, RCOM_1333060, RCOM_1429080, RCOM_1452690, RCOM_1452990, RCOM_1487620, RCOM_1508820, RCOM_1506660, RCOM_1516110, RCOM_1579060, RCOM_1591970, RCOM_1678470, RCOM_1681360, RCOM_1681370, RCOM_1681450 e RCOM_1727110.

O gene Xa21 confere ao arroz a resistência a *Xanthomonas aryzae* e faz parte de uma classe de genes que codificam receptor-quinase ricos em repetições de leucina (SONG *et al.*, 1995; ELLIS & JONES, 1998). Dessa forma, o presente estudo utilizou de 8 regiões ESTs para a identificação desse gene em mamona, sendo elas RCOM_0127740, RCOM_0205410, RCOM_0292060, RCOM_0633880, RCOM_0645130, RCOM_1282160, RCOM_1680260 e RCOM_1681450

Outra classe importante, a classe LZ-NBS-LRR, inclui os genes RPS5 (que confere resistência a *Pseudomonas syringae*) e RPP8 (que confere resistência a *Peronospora parasítica*), ambos de *Arabidopsis*. (ELLIS & JONES, 1998; BENDAHMANE *et al.*, 1999). Para mamona foram utilizados no desenho de primers um total de 2 EST's para o primeiro, sendo eles RCOM_0895260, RCOM_0898300 e 3 para o segundo, sendo eles RCOM_0464860, RCOM_1481570 e RCOM_1482430.

4. CONCLUSÃO

Com o sequenciamento do genoma da mamona e identificação de regiões ESTs para resistência a patógenos, é possível desenvolver primers específicos para estudos da expressão gênica diferencial e entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nessa rota metabólica.

O presente trabalho traz uma importante contribuição, com o desenvolvimento de 100 pares de primers, para estudo da regulação gênica na resposta patógeno-hospedeiro em mamona via PCR em Tempo Real.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, T. C.; CANÉCHIO FILHO, V. **Principais Culturas**. 2. ed. Campinas, SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, v. 2, 403 p. 1973.
- ALVARENGA, S. M. **Caracterização de sequências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D.; MOREIRA, M. A.; & BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia brasileira**, 30(4), 333-342. 2005.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo. 2009.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B. & DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, 276(5313), 726-733. 1997.
- BARROS, N. E. F. D.; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, 21(1):85-92, jan./fev., 2008.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 1984.
- BDMG. Banco de Desenvolvimento de Minas Gerais. Programa operacional de incentivo à cultura da mamona na área mineira da sudene. Belo Horizonte, 2000.
- BELTRÃO, N. E. de M., et al. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. Sub-Espécies de Mamona 23 F. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p 37-61. 2001.

- BELTRÃO, N. E. de M.; CARTAXO, W. V.; PEREIRA, S. R. de P.; SOARES, J. J.; SILVA, O. R. R. F. **O Cultivo sustentável da mamona no Semi-Árido brasileiro.** Embrapa Algodão - Fôlder / Folheto / Cartilha (INFOTECA-E), p. 62. 2006.
- BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., & BAULCOMBE, D. C. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **The Plant Cell**, *11*(5), 781-791. 1999.
- BERDAL, K. G.; HOLST-JENSEN, A. Roundup ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. **Eur Food Res Technol**. 213(6):432-8. 2001.
- BOTSTEIN, O.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331. 1980.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol**. 103:1035-1040. 1993.
- CANGEMI, J.M. **Biodegradação de poliuretano derivado do óleo de mamona.** Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- CANGEMI, J.M.; SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S. Poliuretano: de travesseiros a preservativos, um polímero versátil. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 3, agosto, 2009.
- CASTOR BEAN GENOME DATABASE. Disponível em: <<http://castorbean.tigr.org/>>. Acesso em: 09 set. 2019.
- CHUANG, L.Y.; CHENG, Y.H., YANG, C.H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. **Biotechnol Lett**. 35:1541–1549. 2013.
- DANGL, J. L., & JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **nature**, *411*(6839), 826. 2001.

- ECHEBIRI, R. N.; EDABA, M. E. I. Production and utilization of cassava in Nigeria: prospects for food security and infant nutrition. **Production Agriculture and Technology**, v. 4, p. 38-52, 2008.
- ELLIS, J., & JONES, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. **Current opinion in plant biology**, 1(4), 288-293. 1998.
- ELLIS, J., DODDS, P., & PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current opinion in plant biology**, 3(4), 278-284. 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENAGEN. 220p. 1998.
- FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, p. 653-669, 1942.
- FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9:275-296. 1971.
- GASSMANN, W., HINSCH, M. E., & STASKAWICZ, B. J. The Arabidopsis RPS4 bacterial- resistance gene is a member of the TIR- NBS- LRR family of disease- resistance genes. **The Plant Journal**, 20(3), 265-277. 1999.
- GUIMARÃES, P. M.; PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.; BERTIOLI, D. Análise in silico da expressão gênica diferencial de *Arachis stenoperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2005.
- GUIRA, F.; SOME, K.; KABORE, D.; SAWADOG-LINGANI, H.; TRAORE, Y.; SAVADOGO, A. Origins, production, and utilization of cassava in Burkina Faso, a contribution of a neglected crop to household food security. **Food Science & Nutrition**, v.4, p. 1-9, 2016.

- HAYWARD-LESTER, A.; OEFNER, P. J.; SABATINI, S.; DORIS, P. A. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. **Genome Research**, v. 5, p. 494–499, 1995.
- JONES, D. A.; THOMAS, C. M.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; BALINT-KURTI, P. J. & JONES, J. D. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, 266(5186), 789-793. (1994).
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; *et al* The real-time polymerase chain reaction. **Mol Asp Med**. 27:95–125. 2006.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2000.
- LIM, J.; SHIN, S.G.; LEE, S.; *et al*. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. **Front Environ Sci Eng**. 5:28–39. 2011.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, vA4, p.398-401. 1989.
- MITSUHASHI, M. Technical report: Part 1. Basic requirements for designing optimal oligonucleotide probe sequences. **J Clin Lab. Anal** 10:277–284. 1996.
- MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986.
- MULLIS, K.; FALOONA, E. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155. p.335. 1987.
- National Center for Biotechnology Information NCBI shotgun assembly sequences : Genome (WGS) and Transcriptome (TSA). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: set. 2019.
- NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; SOARES, R. M.; MAIORKA, P. C.; & GENNARI, S. M. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes

associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Braz J Vet Parasitol**, 18(S1), 8-14. 2009.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology** 97: 1086-1091. 2006.

PAVY, N.; PAULE, C.; PARSONS, L. *et al.* Generation, annotation, analysis and database integration of 16,500 white spruce EST clusters. **BMC Genomics**. 6:144. 2005.

POPOVA, G. M.; MOSHKIN, V. A. Botanical classification. In: MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind. p. 11-27. 1986.

RAYMAEKERS, M.; SMETS, R.; MAES, B.; *et al.* Checklist for optimization and validation of realtime PCR assays. *J Clin Lab Anal* 23:145–151. 2009.

REUBER, T. L., & AUSUBEL, F. M. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. **The Plant Cell**, 8(2), 241-249. 1996.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J. & ANDRADE, M. J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In **PCR Primer Design** (pp. 31-56). Humana Press, New York, NY. 2015.

ROZEN, S.; & SKALETSKY, H.J. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology* (Krawetz S and Misener S, ed.). **Humana Press**, Totowa, 365-386. 2000.

SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: Erlich HA (ed) *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. **McMillan Publishers (Stockton Press)**. New York, NY, pp 7–22. 1989.

SCARPA, A. & GUERCI, A. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.) A review. **Journal of Ethnopharmacology** 5: 117-137. 1982.

- SCHOLZ, V & SILVA, J.N. Prospects and risks of the use of castor oil as fuel. **Biomass and Bioenergy** 32: 95-100. 2008.
- SCHULTZ, A. R. **Botânica sistemática**. Rio de Janeiro: Globo, 427 p. 1963.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiol.** 115: 327-334.1997.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology** 7: 161-167.1996.
- SOLLER, M. & BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics** 67:25-33. 1983.
- SONG, W. Y., WANG, G. L., CHEN, L. L., KIM, H. S., PI, L. Y., HOLSTEN, T., ...& FAUQUET, C. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **science**, 270(5243), 1804-1806. 1995.
- THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochem Mol Biol Educ.** 39:145–154. 2011.
- THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochem Mol Biol Educ.** 39:145–154. 2011.
- TOOULI, C.D.; TURNER, D.R.; GRIST, S.A.; *et al* The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences. **Anal Biochem.** 280:324–326. 2000.
- VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Fitossistemática: famílias de angiospermas**. Viçosa: UFV, 59 p. 1980.
- VIEIRA, R.M.; LIMA E.F.; **Importância sócio econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil**. In QUEIROZ, M.A. DE; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R.; (Ed). Recursos genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Disponível em: <www.cpatia.embrapa.br>. Acesso em: 09 set. 2019.

WEBSTER, G.L. **Classification of the Euphorbiaceae.** Ann. Missouri Bot. Gard. 81 (1): 3 – 144. 1994.

WU, J.S.; LEE, C.; WU, C.C.; *et al.* Primer design using genetic algorithm. **Bioinformatics.** 20:1710–1717. 2004.

YAKOLEV, I.A.; FOSSDAL, C.; JOHNSEN, O.; *et al.* Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries. **Tree Genet Genom.** 2:39–52. 2006.