

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Michelle de Lima Moreira**

**Análise *in silico* de genes de resistência aos nematoides das galhas em espécies do  
gênero *Lactuca***

**PATOS DE MINAS - MG  
AGOSTO DE 2022**

**MICHELLE DE LIMA MOREIRA**

**Análise *in silico* de genes de resistência aos nematoides das galhas em espécies do gênero *Lactuca***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes**

**PATOS DE MINAS - MG  
AGOSTO DE 2022**

M838a    Moreira, Michelle de Lima, 1981-  
2022        *Análise in silico* de genes de resistência aos nematoides das galhas em espécies do gênero *Lactuca* [recurso eletrônico] / Michelle de Lima Moreira. - 2022.

Orientador: Luiz Antônio Augusto Gomes.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5057>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Gomes, Luiz Antônio Augusto, 1955-, (Orient.).  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. III. Título.

---

CDU: 60

André Carlos Francisco  
Bibliotecário - CRB-6/3408

MICHELLE DE LIMA MOREIRA

**Análise *in silico* de genes de resistência aos nematoides das galhas em espécies do gênero *Lactuca***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Aprovada em 26 de agosto de 2022.**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes (orientador)**



---

**Prof. Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira**



---

**Dra. Livia Carneiro Fidélis Silva**

**Patos de Minas – MG  
2022**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Irani F. de Lima Moreira e Mauri P. Moreira e meu marido Aulus Barbosa pela confiança, incentivo e por sempre apoiarem minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio A. Gomes, pelo ensino, compreensão e disponibilidade na orientação deste trabalho.

À Vanessa Ap. Caetano Alves e Terezinha Aparecida Teixeira pela colaboração no decorrer do projeto.

Aos professores e técnicos da UFU-Campus Patos de Minas que ao longo da minha jornada contribuíram com ensinamentos e orientações.

## RESUMO

A alface (*Lactuca sativa* L) é uma olerícola de origem mediterrânea pertencente à família Asteraceae, ordem Asterales. Além de ser uma das mais importantes hortaliças cultivadas no mundo, também é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil. Uma das dificuldades em produzi-la está relacionada à infestação por fitopatógenos em áreas de produção. Dentre estes, destacam-se os nematoides das galhas, do gênero *Meloidogyne*, especialmente o *M. incognita* e *M. javanica*. Esses nematoides ocorrem em todas as regiões do Brasil, causando grandes prejuízos às lavouras. O principal sintoma dessa doença é a formação de galhas nas raízes, danificando os tecidos vasculares, o que, além dos danos causados pelo próprio patógeno, aumenta também a suscetibilidade da planta a fungos e bactérias causadores de doenças. A utilização de cultivares de alface resistentes é um método eficiente e seguro para o controle do patógeno, pois além de restringir a reprodução do nematoide e diminuir o custo de produção, não causa impacto ao meio ambiente. Poucos ainda são os trabalhos sobre gene(s) para resistência em alface e, ainda, não se encontram disponíveis cultivares de amplo uso comercial que apresentem resistência. Assim, o objetivo neste trabalho é a busca por genes de resistência a nematoides em alface, utilizando técnicas de análise genômica com ferramentas de bioinformática. Foi realizada uma busca por genes NBS-LRR, de resistência a *Meloidogyne spp*, pois foi identificado que esses genes são responsáveis pela resistência a *Meloidogyne spp* em diversas espécies. Posteriormente as sequências encontradas foram caracterizadas utilizando o algoritmo Blastx e o banco de dados InterproScan e feita uma análise filogenética pelo método neighbor joining. Os recursos da bioinformática foram essenciais para caracterização dos genes de resistência, de tal forma que ao final deste trabalho foi possível identificar dois genes da classe NBS-LRR com potencial de conferir resistência a *Meloidogyne spp* em *Lactuca saligna*. Este resultado abre perspectivas para novos trabalhos visando ao melhoramento para resistência a *Meloidogyne spp* em alface, visto que *L. saligna* é uma espécie já utilizada em programas de melhoramento da alface.

**Palavra-chave:** *Lactuca sativa*, *Meloidogyne spp*, genes de resistência, NBS-LRR

## ABSTRAT

Lettuce (*Lactuca sativa* L) is a vegetable of Mediterranean origin belonging to the Asteraceae family, order Asterales. In addition to being one of the most important vegetables grown in the world, it is also the most consumed leafy vegetable in Brazil. One of the difficulties in producing it is related to infestation by phytopathogens in production areas. Among these, *Meloidogyne*, a root-knot nematodes, stand out, especially *M. incognita* and *M. javanica*. These nematodes are common in higher temperatures conditions occurring in all Brazil regions, causing great crops damage. The main disease symptom is the formation of roots galls, damaging the vascular tissues, which, in addition to the damage caused by the pathogen itself, also increases the plant susceptibility to fungi and bacteria that cause another disease. The use of resistant lettuce cultivars is an efficient and safe method for nematodes control, because in addition to restricting the nematode reproduction and reducing the production cost, it does not impact the environment. There are still few works on nematode resistance genes in lettuce and, still, commercial cultivars that show resistance are not available. Thus, the objective of this work is to search for nematode resistance genes in lettuce, using genomic analysis techniques by bioinformatics. A search for NBS-LRR genes for resistance to *Meloidogyne* spp was carried out, as it was identified that these genes are responsible for resistance to *Meloidogyne* spp in several species. Subsequently, the sequences found were characterized by Blastx and InterproScan and a phylogenetic analysis was performed using the neighbor joining method. Bioinformatics resources were essential for the characterization of resistance genes, so that at the end of this work it was possible to identify 2 genes of the NBS-LRR class with the potential to confer resistance to *Meloidogyne* spp in *Lactuca saligna*. This result opens perspectives for further work aimed at improving the resistance to *Meloidogyne* spp in lettuce, since *L. saligna* is a species already used in lettuce breeding programs.

Keywords: *Lactuca sativa*, *Meloidogyne* spp, resistance genes, NBS-LRR

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – <i>Lactuca sativa</i> L .....	13
<b>FIGURA 2</b> – Diferentes tipos de alface .....	15
<b>FIGURA 3</b> – <i>Lactuca saligna</i> L .....	16
<b>FIGURA 4</b> – <i>Lactuca serriola</i> .....	17
<b>FIGURA 5</b> – <i>Lactuca virosa</i> .....	17
<b>FIGURA 6</b> – Fêmea de <i>Meloidogyne spp.</i> .....	20
<b>FIGURA 7</b> – Ciclo infectivo de <i>Meloidogyne spp.</i> .....	21
<b>FIGURA 8</b> – Células gigantes de <i>Meloidogyne spp.</i> .....	22
<b>FIGURA 9</b> – Galhas em raízes de alface.....	22
<b>FIGURA 10</b> – Modelo evolutivo clássico de resistência a patógenos em plantas.....	25
<b>FIGURA 11</b> – Principais domínios das proteínas NBS-LRR.....	27



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Problema de pesquisa.....	11
1.2 Hipótese.....	11
1.3 Objetivos.....	11
1.3.1 Objetivo geral.....	11
1.3.2 Objetivos específicos.....	11
1.4 Justificativa.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Lactuca sativa</i> L.....	12
2.2 <i>Lactuca saligna</i> L.....	15
2.3 <i>Lactuca serriola</i> .....	16
2.4 <i>Lactuca virosa</i> .....	17
2.5 Principais doenças em alface.....	18
2.6 Nematoides das Galhas.....	19
2.7 Mecanismo molecular de infecção do nematoide.....	23
2.8 Resistência de plantas aos nematoides.....	26
2.9 Bioinformática.....	28
<b>CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	30
ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
<b>3.0 CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>REFERÊNCIA</b> .....	53
<b>ANEXO 1 - NORMAS DA REVISTA PESQUISA AGROPECUÁRIA TROPICAL</b> .....	57

## CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Problema de pesquisa

A alface é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil, principalmente devido ao crescente uso em redes de “fast-foods”, o que tem estimulado o aumento da produção. Porém, com a ampliação do cultivo e o plantio sucessivo em uma mesma área, tem aumentado significativamente o problema de infestação por doenças de solo, destacando-se a incidência dos nematoides das galhas. Esses patógenos podem gerar prejuízos significativos ao produtor. Assim, a identificação de genes de resistência para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes aos fitonematoides torna-se de grande importância para os programas de melhoramento da alface.

#### 1.2 Hipótese

É possível identificar genes para resistência ao nematoide das galhas *Meloidogyne spp.* a partir do genoma de espécies de *Lactuca*, visando à utilização em programas de melhoramento desta espécie.

#### 1.3 Objetivos

##### 1.3.1 Objetivo geral

Identificar genes de resistência ao nematoide das galhas *Meloidogyne spp.* em espécies de *Lactuca* por meio de análise genômica *in silico*.

##### 1.3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar, *in silico*, genes envolvidos na via de resistência de plantas ao *Meloidogyne spp.*;
- b) Identificar e caracterizar, *in silico*, esses genes nas espécies *Lactuca sativa* e *Lactuca saligna*.

## 1.4 Justificativa

A alface (*Lactuca sativa* L) é uma olerícola de origem mediterrânea, com uma variedade de cores, formas e tamanhos. Seu valor nutricional é subestimado, sendo rica em fibra, ferro, folato, vitamina C e K e fonte de carotenoides. É a hortaliça folhosa de maior consumo no Brasil, com 6 tipos mais comercializados: repolhuda lisa, repolhuda crespa/americana, solta lisa, solta crespa, mimosa e romana. A alface por ser de clima temperado, passou por adaptações via melhoramento genético para o clima tropical.

A alface pode ser afetada por vários tipos de doenças, provocadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides. As principais doenças são o míldio, oídio, septoríose, podridão, *Xanthomonas*, *Pectobacterium* e vírus do mosaico.

O nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.), principalmente das espécies *M. incógnita* e *M. javanica*, é um dos principais problemas para o cultivo da alface, particularmente em condições de temperaturas mais elevadas, como é o caso do Brasil. Este patógeno ataca a raiz formando galhas, deixando a planta fraca e propicia à ocorrência de outras doenças, causando prejuízos significativos aos produtores.

Diferentes espécies de *Lactuca*, tais como *L. saligna*, *L. serriola* e *L. virosa* têm sido utilizadas em programas de melhoramento genético da alface para incorporação de características desejáveis, principalmente a resistência a doenças (LEBEDA; KŘÍSTKOVÁ; KITNER; MIESLEROVÁ *et al.*, 2014).

A identificação de genes de resistência pode ser feita por diversas técnicas, incluindo marcadores moleculares ou por análise genômica *in silico*. A procura por genes de resistência nas plantas é um recurso valioso para desenvolver novas variedades para melhorar o combate aos nematoides.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Lactuca sativa* L.

A alface (*Lactuca sativa* L.) provavelmente se originou no Mediterrâneo oriental e já era conhecida no antigo Egito desde 4500 a.C. Chegou ao Brasil no século XVI, trazida pelos portugueses por volta do ano de 1650 (AGUIAR; GONÇALVES; PATERNIANI; TUCCI *et al.*, 2014). É uma planta de clima temperado, pertencente à família Asteraceae, ordem Asterales, e se originou de espécies silvestres, como a *L. serriola* L. (KIM; MOON; TOU; MOU *et al.*, 2016).

A alface é uma planta herbácea, autógama, com um caule esverdeado, raiz pivotante com sistema ramificado e superficial, de flores amarelas e folhas simples. Sua inflorescência possui de 10 a 25 floretes formada por uma panícula com vários botões florais. Cada florete possui uma pétala amarela, envolta por brácteas que irão formar o involúcro. O ovário possui um óvulo e à medida que o estilete se alonga, ocorre a polinização. A abertura dos botões florais ocorre pela manhã e cada flor se abre apenas uma vez, garantindo a autofecundação e conferindo à planta a autogamia por cleistogamia (**Figura 1**) (SOUSAI; BONETTII; FILHOI; MACHADOI *et al.*, 2007).

**Figura 1.** *Lactuca sativa* L. Planta adulta e flores.



<https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/lactuca/sativa/>

Séculos de seleção genética e técnicas de reprodução levaram a modificações na planta como mudança no tamanho, forma, cor, textura e até mesmo o sabor, produzindo a alface como conhecemos hoje (MOU, 2012).

No Brasil, até a década de 1980, a alface mais consumida era do tipo lisa, conhecida como alface “manteiga”, porém, com o passar dos anos foram sendo introduzidas cultivares de outros tipos, como crespa de folhas soltas e crespa repolhuda (alface americana) (SALA; COSTA, 2012).

O valor nutricional da alface é subestimado, é pobre em calorias, gorduras e sódio, mas é rica em fibra, ferro, folato, vitamina C e K e fonte de carotenoides (KIM; MOON; TOU; MOU *et al.*, 2016).

A alface é uma das hortaliças mais consumidas e cultivadas no Brasil, não só pelo fato de poder ser facilmente cultivada em horta doméstica, mas também pela evolução de cultivares, práticas de manejo, técnicas e conservação da colheita, bem como a mudança

alimentar de grande parte da população (CARVALHO; FILHO; PEREIRA; COSTA *et al.*, 2018).

A produção nacional é de aproximadamente 321 mil toneladas ao ano, com consumo alimentar doméstico equivalente a 1,006 kg per capita anual. A estimativa de lucro para o agronegócio gira em torno de US\$ 2,1 bilhões (PESSOA; JUNIOR, 2021).

A alface tem um ciclo relativamente curto, de cerca de 60 a 90 dias na fase comercial e, até recentemente, era considerada uma cultura tipicamente de outono-inverno. Porém, ao longo dos anos as cultivares foram sendo adaptadas para o plantio durante a primavera-verão sendo possível hoje, encontrar alface o ano todo. As cultivares mais comercializadas no Brasil são agrupadas didaticamente em seis tipos de acordo com a cabeça e tipo de folha (**Figura 2**):

- **Repolhuda Lisa:** tem folhas lisas, aspecto “amanteigado”, de coloração verde-amarelada e forma uma cabeça típica e compacta.
- **Repolhuda Crespa (Americana):** possui folhas crespas, crocante com nervuras destacadas e forma uma cabeça grande.
- **Solta Lisa:** tem folhas lisas e macias e não forma cabeça.
- **Solta Crespa:** suas folhas são crespas e soltas e não forma cabeça.
- **Mimosa:** As folhas são delicadas e com aspecto “arrepido”, não forma cabeça.
- **Romana:** possui folhas alongadas, duras, com nervuras protuberantes, com uma cabeça na forma de cone. (FILGUEIRA, 2000).

A definição dos tipos de alface é importante porque a diferença nas características morfológicas e fisiológicas determina a conservação pós-colheita e seu manuseio. (HENZ; SUINAGA, 2009).

**Figura 2.** Diferentes tipos de alface. **A.** Repolhuda lisa. **B.** Repolhuda crespa/americana. **C.** Solta lisa. **D.** Solta crespa verde. **E.** Solta crespa roxa. **F.** Romana. **G.** Mimosa verde. **H.** Mimosa roxa



(HENZ; SUINAGA, 2009)

Um dos grandes desafios para o cultivo da alface no Brasil diz respeito à temperatura, pois, mesmo com o melhoramento genético e a maior adaptação de cultivares se as temperaturas forem muito altas podem levar à perda de até 60% da lavoura, já que favorecem o ataque de fitopatógenos, assim como o pendoamento precoce (SOUSAI; BONETTI; FILHO; MACHADO *et al.*, 2007).

## ***2.2 Lactuca saligna L***

É uma espécie de alface selvagem conhecida pelo nome comum de alface de folha de salgueiro (**figura 3**). Cresce de uma raiz principal podendo chegar a 1 m, tem um caule fino, ereto com cerdas em sua porção inferior. As folhas são longas e estreitas, com até 15 cm de comprimento. A flor tem cerca de 4 cm de largura quando aberta, de raios amarelos pálidos com pontas dentadas (LIFE, 2022).

É considerada uma erva daninha, pois coloniza beiras de estradas, bordas de cultivos e lixões. É comum em áreas de planície e montanhosas, sendo amplamente distribuída no Mediterrâneo, estendendo-se pelo Cáucaso e Europa (KITNER; LEBEDA; DOLEŽALOVÁ; MARAS *et al.*, 2008).

**Figura 3.** *Lactuca saligna* L. **A.** Planta adulta. **B.** Flor.



<https://www.pgrportal.nl/en/lettuce-genetic-resources-portal/show/lactuca-saligna-l.-1.htm>

Acessos de *Lactuca saligna* tem sido utilizado em cruzamentos com outras espécies de alface para o desenvolvimento de novas cultivares, tais como a cultivar Salad Crisp que foi a primeira cultivar de alface derivada de cruzamento com o acesso PI 261653 de *Lactuca saligna*. Este acesso apresenta resistência a vários patógenos, assim como ao nematoide *Meloidogyne hapla*, à bactéria de solo *Rhizomonas suberifaciense* e à mosca minadora *Liriomyza langei* (LEBEDA; KŘÍSTKOVÁ; KITNER; MIESLEROVÁ et al., 2014).

### 2.3 *Lactuca serriola*

Também chamada de alface espinhosa ou selvagem, é uma erva daninha agrícola significativa em muitos países como Austrália, Ásia, África e alguns países da América do Norte, Central e Sul. Apresenta em suas folhas uma margem espinhosa com uma fileira de espinhos na face inferior da folha e ao longo da nervura central (**Figura 4**). Pode chegar até 2 m de altura, sendo um grande competidor de nutrientes dos solos em cultivos, prejudicando a qualidade dos grãos e a eficiência da colheita (CHADHA; FLORENTINE, 2021).

As cultivares Calrey e Calrico foram derivadas do cruzamento de cultivares de *L. sativa* com o acesso de *L. serriola* (PI 91532), uma fonte de resistência ao míldio (WEHNER, 1999).

**Figura 4.** *Lactuca serriola*.



<https://eol.org/pages/468149>

#### **2.4 *Lactuca virosa***

Encontrada em grande parte da Europa central, também chamada de “alface grande”, é semelhante a *L. serriola*, podendo chegar a 0,89 cm (**Figura 5**). Apresenta variações fenotípicas como folhas com espinhos, folhas largas ou lobadas (FERTET; GRAINDORGE; KOECHLER; DE BOER *et al.*, 2021).

A genealogia de algumas cultivares de alface de folhas crespas tais como Salinas, Winterset e Monterey mostram que são derivadas de cruzamentos e seleção a partir de cruzamento com o acesso PI 125130 de *Lactuca virosa* (MIKEL; CARVER, 2007).

**Figura 5.** *Lactuca virosa*



<https://eol.org/pages/486948>



## 2.5 Principais doenças em alface

Há relatos de mais de 75 tipos de doenças que acometem a alface no mundo, sendo causadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus. Para que o controle das doenças seja realizado é importante conhecer a interação entre patógeno, hospedeiro e o ambiente (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

As principais doenças que acometem a cultura da alface são o míldio, oídio, septoriose, podridão, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, vírus do mosaico e os nematoides (AGUIAR; GONÇALVES; PATERNIANI; TUCCI *et al.*, 2014):

- **Míldio:** É um fungo que causa uma das principais doenças que acometem a alface, ocorre principalmente em locais de temperatura baixa, onde as folhas ficam constantemente molhadas, seja por irrigação ou chuva (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Oídio:** Doença fúngica caracterizada pela presença de estruturas esbranquiçadas, com aparência cinza nas folhas. Ocorre, geralmente, em regiões de baixa umidade (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Septoriose:** Doença causada pelo fungo *Septoria lycopersici* que ataca a alface em épocas chuvosas ou cultivos irrigados por aspersão. Inicia-se com semente infectada ou em restos de cultivos mais antigos (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Podridão da Raiz:** Causada por fungos, além de causar podridão da raiz, ocorre também o murchamento das folhas (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Podridão de Esclerotínia:** Causada por fungos, é comum em ambientes frios e úmidos. Uma vez que infecta o cultivo, dificilmente é controlada, pois as estruturas de resistência do patógeno permanecem no solo por até dez anos (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Podridão mole (*Pectobacterium*):** A bactéria age principalmente no verão, podendo sobreviver no solo, em restos de cultivo, na água e em superfície de equipamentos (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

- **Mancha bacteriana (*Xanthomonas*):** A doença dissemina-se rapidamente, causando grandes perdas na lavoura. É favorecido por neblina, irrigação ou chuva (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).
- **Vírus do Mosaico (*Lettuce mosaic virus*, LMV):** É uma doença bastante comum na cultura da alface. O vírus é transmitido por várias espécies de pulgões, sendo disseminado por longas distâncias através de sementes (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

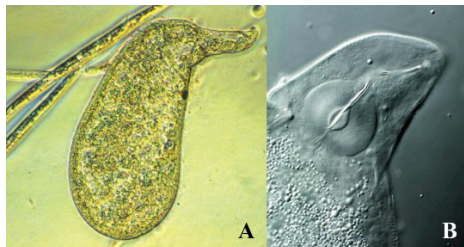
## 2.6 Nematoides das Galhas

Novas espécies de nematoides são constantemente descobertas e algumas que antes eram benignas, com o tempo, tornam-se prejudiciais à medida que os padrões das cultivares mudam. Nematoides que parasitam plantas e que têm relevância econômica na agricultura podem ser divididos em grupos que causam danos direto à planta ou agem como vetores de vírus (MITIKU, 2018).

No Brasil, muitas cultivares de alface são suscetíveis aos nematoides. As infestações ocorrem principalmente pelo nematoide das galhas *Meloidogyne spp.*, das espécies *M. incognita* e *M. javanica* (PINHEIRO; PEREIRA; CARVALHO; RODRIGUES *et al.*, 2013).

O *Meloidogyne spp* pertence a ordem *Tylenchida* e a família *Heteroderidae*, são parasitas obrigatórios de plantas, compreendendo mais de 100 espécies (**Figura 6**). Por isso, os aspectos morfológicos são de suma importância para identificar a espécie, como por exemplo, comprimento do estilete, região labial dos machos, configuração perineal da fêmea, entre outros (PINHEIRO; PEREIRA; SUINAGA, 2014). São seres microscópicos e medem de 0,5 a 4,0 mm de comprimento e são encontrados em raízes de plantas quando infectadas. Podem ocorrer tanto em clima quente como frio, causando grandes prejuízos nas plantas. Os nematoides parasitas de plantas alimentam-se principalmente de raízes, porém podem infectar folhas, flores, caules, rizomas (RALMI; KHANDAKER; MAT, 2016).

**Figura 6.** A. Fêmea de *Meloidogyne* spp. B. Glândula esofágica em detalhe.

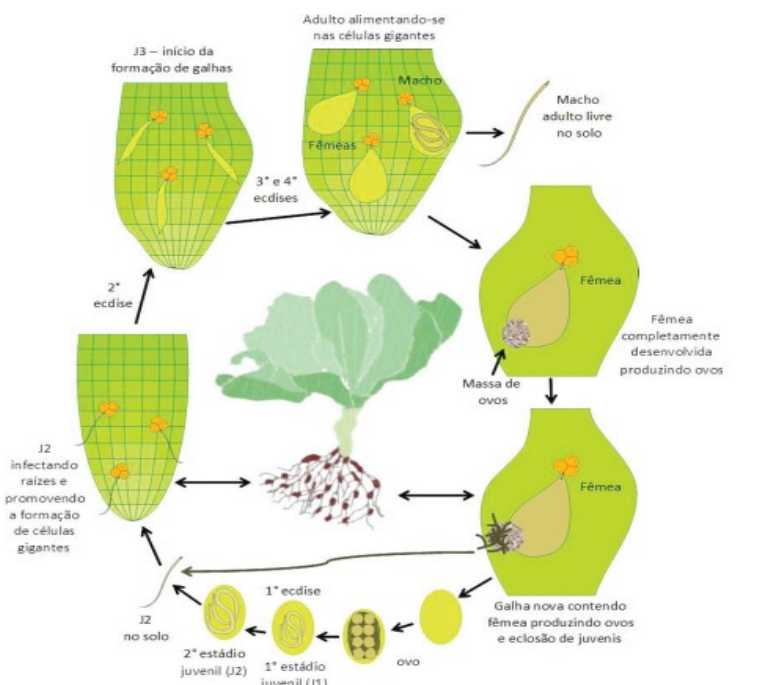


(PINHEIRO; PEREIRA; CARVALHO; RODRIGUES *et al.*, 2013)

O primeiro estágio do desenvolvimento do *Meloidogyne* dá origem ao juvenil – J1 – ainda no ovo, sofre ecdise para estágio J2 que ao eclodir infecta as células do hospedeiro. No estágio J2, já infeccioso, consegue penetrar as paredes celulares seja por dano físico na planta ou perfurando com o estilete pela ação de enzimas celulolíticas e pectolíticas, migrando para o córtex da planta. No estágio J2, sofre mudanças morfológicas sofrendo ecdises para estágios juvenis J3 e J4. Os machos mudam sua forma no estágio J4, assumindo uma forma alongada, chamada de vermiforme (MOTA, 2010).

O ciclo de vida do nematoide das galhas dura em torno de 25 dias e cada fêmea deposita em média de 500 a 2000 ovos em uma matriz gelatinosa (**Figura 7**). Uma vez que infecta a planta, o nematoide juvenil injeta secreções proteicas pelas glândulas esofagianas, penetra na raiz indo para seu ápice e em seguida para o cilindro vascular onde permanecerá. As secreções injetadas formam uma célula grande, chamada célula gigante, que será a sua fonte de alimentação (PINHEIRO; PEREIRA; CARVALHO; RODRIGUES *et al.*, 2013).

**Figura 7.** Ciclo infectivo de *Meloidogyne* spp em raízes de alface.

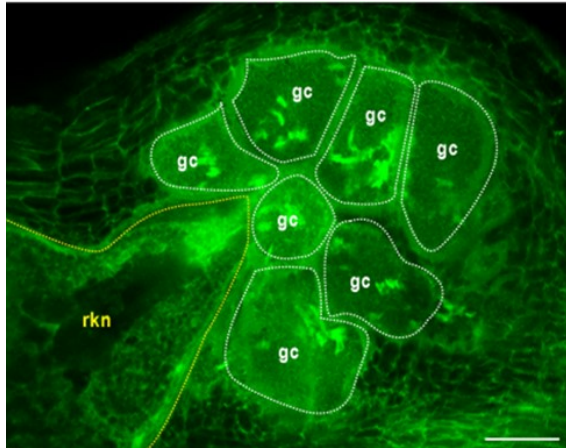


(PINHEIRO; PEREIRA; CARVALHO; RODRIGUES *et al.*, 2013)

Essas células gigantes são produzidas a partir de células da raiz vascular, que passam por diversas divisões nucleares sem a divisão celular, tornando-se polinucleadas. São cercados por células em divisão, cuja hiperplasia e hipertrofia leva a formação das galhas (**figura 8**) (MEJIAS; TRUONG; ABAD; FAVERY *et al.*, 2019). As células gigantes possuem citoplasma denso, com várias mitocôndrias, plastídios, ribossomos, aparelho de golgi e retículo endoplasmático liso (CAILLAUD; DUBREUIL; QUENTIN; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2008).

As fêmeas permanecem no hospedeiro e põe ovos na matriz proteica da raiz por aproximadamente três meses. Os machos não têm papel na reprodução, uma vez que a maioria dos nematoides de galhas se reproduzem por partenogênese, e migram para fora da planta (PINHEIRO; PEREIRA; CARVALHO; RODRIGUES *et al.*, 2013; RAWAL, 2020).

**Figura 8:** Células gigantes (contorno branco) induzidas pelo nematoide das galhas *Meloidogyne spp* (contorno amarelo).



(MEJIAS; TRUONG; ABAD; FAVERY *et al.*, 2019)

Os sintomas são tão graves que podem levar a planta à morte. Uma vez infectadas as plantas apresentam deficiência de nutrientes, nanismo, murchamento e amarelecimento das folhas (RALMI; KHANDAKER; MAT, 2016). Um dos principais sintomas é a formação das galhas de raiz que danificam os tecidos vasculares das raízes, aumentando a suscetibilidade da planta a fungos e bactérias causadores de doenças (**figura 9**) (ABAD; FAVERY; ROSSO; CASTAGNONE-SERENO, 2003).

**Figura 9.** Galhas em raízes de alfaca causadas por *Meloidogyne spp*.



(LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010)

A prevenção é a melhor forma de controle desses nematoides, e diversas medidas visam reduzir a população desses parasitas no solo, como: uso de **Cultivares resistentes**

para restringir a reprodução do nematoide; **solarização do solo**, que consiste em cobrir o solo com plástico filme por cerca de duas semanas com objetivo de matar o ovo do nematoide; aplicação de **matéria orgânica** visando aumentar os micro-organismos antagonico aos nematoides, não permitindo o desenvolvimento do mesmo até a fase adulta; e **rotação de culturas** com a finalidade de reduzir o alimento desses organismos (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010; RALMI; KHANDAKER; MAT, 2016).

## 2.7 Mecanismo molecular de infecção do nematoide

A compreensão do mecanismo de ação da infecção planta-nematoide ainda é limitada, mas mostra que existe uma relação sutil entre o mecanismo de infecção do patógeno e o mecanismo de defesa da planta (ZINOVIEVA, 2014).

Muitas proteínas efetoras, derivadas do nematoide das galhas, funcionam como moduladores de mecanismos celulares das plantas, modificando aspectos fisiológicos na planta em benefício do patógeno (ISHIDA; SUZUKI; NAKAGAMI; KUROHA *et al.*, 2020).

Já foram identificados mais de 100 genes de proteínas efetoras dos nematoides das galhas, também conhecidos como genes do parasitismo, entre eles destacam-se: pectato liase, poligalacturase, corismato mutase, caoreticulina, proteínas semelhantes a alérgenos, proteína de ligação à celulose, sinais de localização nuclear, entre outros. Suas funções são diversas como facilitar a penetração do nematoide na raiz da planta promovendo a degradação da parede celular, prevenir ou neutralizar a resposta de defesa da planta e iniciar ou manter o desenvolvimento das galhas (ZINOVIEVA, 2014). Adicionalmente, os nematoides das galhas secretam proteínas necrófagas que os protegem dos efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (CAILLAUD; DUBREUIL; QUENTIN; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2008).

Essas secreções produzidas pelos nematoides, na hipoderme e glândulas esofágicas, estão envolvidas em interações moleculares nematoide-planta durante a infecção. A glândula esofágica sintetiza proteínas efetoras que são secretadas através do estilete do nematoide para a célula da planta, sendo responsável pela manutenção da infecção (Figura 2B). De acordo com suas funções primárias, elas são divididas em grupos: I) Mediadores de quimiotaxia envolvidos na localização do hospedeiro; II) Degradação da parede celular e modificações enzimáticas que auxilia na penetração do nematoide na planta; III) Reguladores de reprogramação de plantas envolvidos na

formação das células gigantes de alimentação; IV) Moduladores do metabolismo da planta para a produção de nutrientes para o nematoide e V) Imunomoduladores que protege o nematoide contra as respostas de defesa da planta (NIU; LIU; LIU; CHEN *et al.*, 2016).

As respostas das plantas aos nematoides são baseadas em dois mecanismos: primeiro tem-se a defesa basal, que podem ser ativadas pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como flagelina bacteriana, lipopolissacarídeos e proteínas elicitoras. Estes PAMPs serão reconhecidos por receptores transmembrana das plantas ativando a defesa contra os patógenos (DEYOUNG; INNES, 2006).

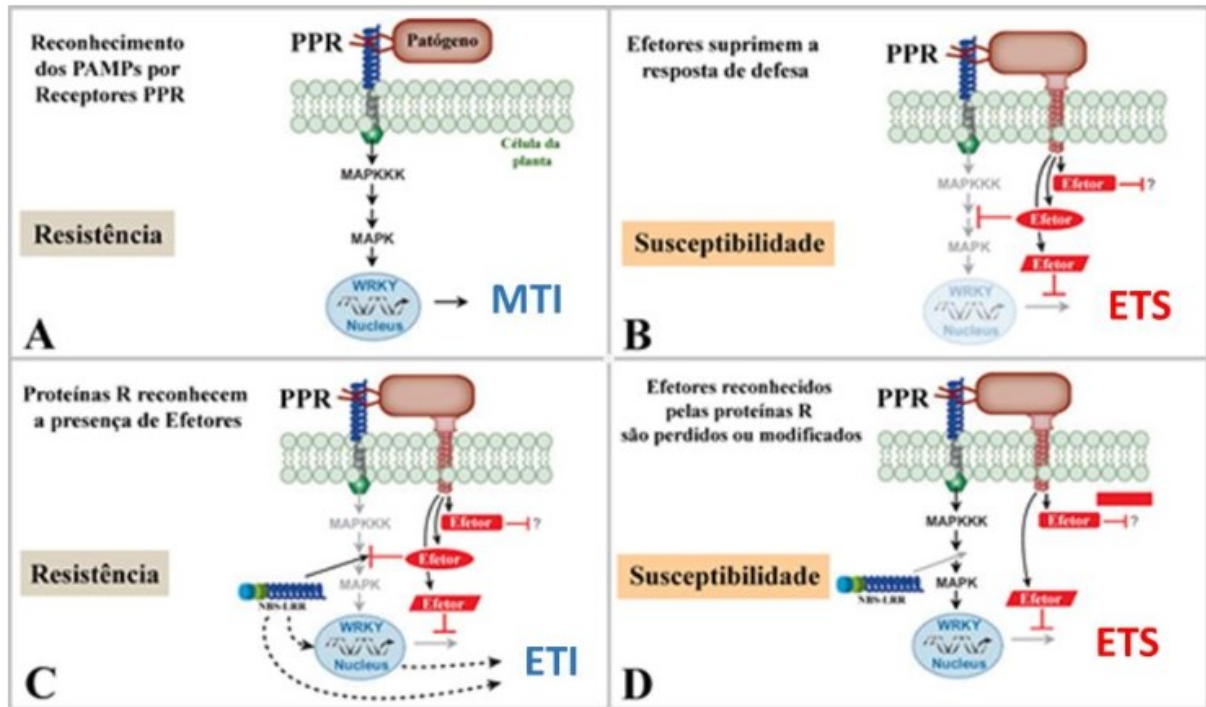
O segundo mecanismo de defesa é a imunidade adaptativa, chamada de “imunidade desencadeada por efetores” que é composto por genes de resistência que reconhecem proteínas efetoras do patógeno (MARONE; RUSSO; LAIDO; DE LEONARDIS *et al.*, 2013).

Análises moleculares mostraram que a evolução das respostas de defesa na interação planta-patógeno segue o modelo “zig-zag”. Primeiro os padrões moleculares associados ao patógeno (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs), ou mais recentemente conhecido como padrões moleculares associados a micróbios (molecular patterns-associated with microbes - MAMPs), são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões transmembrana de plantas (pattern recognition receptors - PRRs), compostos por proteínas transmembrana com domínio extracelular LRR (leucine-rich-repeat). Isto resulta em imunidade acionada por padrão (pattern-triggered immunity - PTI), o que impede a entrada de alguns nematoides por meio da transcrição de genes relacionados à resistência, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), deposição de calose e fechamento de estômatos. Em um segundo momento, os patógenos que se adaptaram ao processo anterior secretam proteínas efetoras para suprimir PTI, o que resulta em suscetibilidade desencadeada pelos efetores (susceptibility triggered by effectors - ETS). Esses efetores são utilizados no desvio de componentes sinalizadores do hospedeiro, prejudicando a defesa basal. Posteriormente, efetores dos nematoides serão reconhecidos por receptores dos genes de resistência nas plantas, resultando em uma imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity - ETI), que está associada a uma resposta de morte celular hipersensível (hypersensitivity responses - HR), onde ocorreu a infecção pelo nematoide, limitando seu crescimento e colonização. (NIU; LIU; LIU; CHEN *et al.*, 2016). Essa resposta está associada à liberação de

moléculas antimicrobianas, como as enzimas hidrolíticas, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase (MARQUES, 2016).

Para evitar ETI, os nematoides evoluíram adquirindo efetores adicionais para suprimir essa imunidade, permitindo a infecção (**Figura 10**) (MARQUES, 2016; PRZYBYLSKA; OBREPALSKA-STEPLowska, 2020).

**Figura 10.** Modelo evolutivo clássico de resistência a patógenos em plantas.



(MARQUES, 2016)

Estudos indicam que alguns efetores dos nematoides interferem nas vias do ácido salicílico (SA) e do ácido jasmônico (JA). Por exemplo, o efector Misp12, encontrado em *M. incognita*, regula negativamente os genes de defesa de SA e JA, aumentando o parasitismo do nematoide. O efector MiLSE5 altera a regulação da transcrição. Já o efector MjCM-1 encontrado em *M. javanica* promove o aumento da patogenicidade do nematoide (PRZYBYLSKA; OBREPALSKA-STEPLowska, 2020).

A proteína secretora de células da glândula esofágica de *M. incognita*, a MiMsp40, é um efector imunomodulador que irá suprimir a morte programada de células vegetais que são associadas a respostas PTI ou ETI, promovendo o parasitismo dos nematoides (NIU; LIU; LIU; CHEN *et al.*, 2016). Já a proteína efetora MiD05 de *M. incognita* afeta diversas funções das células vegetais, promovendo o aumento das células gigantes e alimentação dos nematoides (ZINOVIEVA, 2014).



## 2.8 Resistência de plantas aos nematoides

A resistência planta-patógeno pode ser definida como a habilidade da planta em conseguir inibir a reprodução ou desenvolvimento do patógeno, podendo expressar uma herança monogênica, oligogênica ou poligênica (ROHDE, 1972).

Há três categorias de genes de plantas que estão envolvidas na resposta que a planta tem quando ocorre a infecção por nematoides: I) Genes que vão induzir a defesa da planta; II) Genes relacionados ao estresse e; III) Genes envolvidos na alimentação dos nematoides (ZINOVIEVA, 2014).

Quando a planta apresenta resistência, o desenvolvimento das células de alimentação do nematoide são interrompidas, isso acontece porque há dois tipos de processo de resistência envolvido: o primeiro está relacionado com a morte celular programada e o segundo envolve a SAR (resistência sistêmica adquirida), que bloqueia o desenvolvimento da célula hospedeira (ZINOVIEVA, 2014).

Os nematoides causam grandes perdas nas lavouras no mundo todo. No entanto, com o processo de seleção natural, foram produzidos mecanismos de resistência como uma forma de conter o avanço dos parasitas, por exemplo: síntese de fitoalexinas (composto químico com propriedades antimicrobianas); inibidores de protease; acumulação de enzimas hidrolíticas, entre outros (SILVESTRINI; MALUF; GUERREIRO--FILHO; GONÇALVES, 2005).

A resistência das plantas a muitos patógenos pode ser alcançada pela presença dos genes de resistência R. A maioria dos genes de resistência a doenças em plantas codificam sítios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas de leucina (class NBS-LRR - nucleotide-binding site–leucine-rich repeat), que estão envolvidos no reconhecimento dos genes de avirulência (Avr) e estão relacionadas com a interação das proteínas efetoras de patógenos e HR (hypersensitivity responses), importantes fatores de resistência a doenças em plantas (DEYOUNG; INNES, 2006).

Os genes NBS-LRR são a maior classe de genes de resistência conhecida até então, e a mais importante, sendo todos os genes conhecidos ligados à resistência e estão envolvidos na detecção de diversas pragas e patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos, nematoides e insetos (MCHALE; TAN; KOEHL; MICHELMORE, 2006).

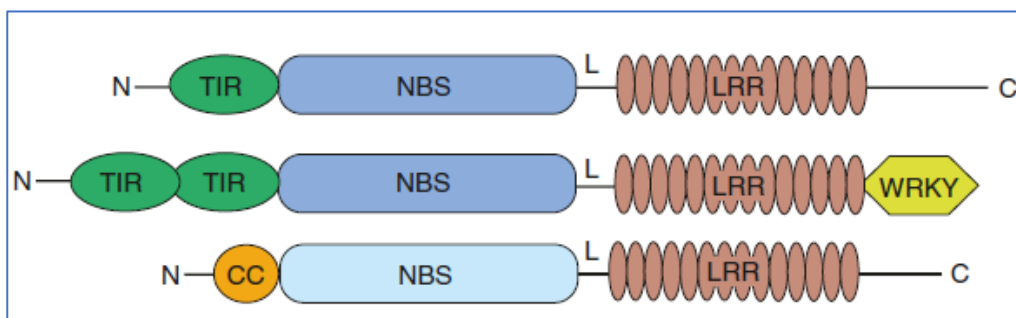
O domínio LRR está presente em diversas proteínas e está relacionado como detector contra patógenos invasores, seja pela interação com os efetores liberados dos

patógenos ou monitorando o status das proteínas hospedeira direcionadas pelos efetores. O domínio NBS sofre uma mudança conformacional de um estado ligado ao ADP para um ligado ao ATP desencadeando reações de hipersensibilidade causando apoptose de células infectadas suprimindo a disseminação e proliferação de patógenos. (SHAO; XUE; WANG; WANG *et al.*, 2019).

Há duas subfamílias principais de NBS-LRR, classificadas pela presença de motivos:

- 1) TIR (Toll interleucine receptor) (TIR-NBS-LRR) que controla a resposta imune por meio da ativação de uma via de sinalização.
- 2) Coiled-coil (CC-NBS-LRR) no domínio amino-terminal ou pode estar ligado a um motivo TIR no N-terminal e um WRKY no C-terminal (**Figura 11**). (MCHALE; TAN; KOEHL; MICHELMORE, 2006).

**Figura 11.** Principais domínios das proteínas NBS-LRR.



(MCHALE; TAN; KOEHL; MICHELMORE, 2006)

A resistência contra os nematoides, principalmente contra *Meloidogyne* spp., foi encontrada em diversas plantas, que podem tanto suprimir como reduzir o desenvolvimento dos nematoides. Alguns dos genes de resistência mapeados mais conhecidos são os genes Mi do tomate. Dez genes (Mi-1 a Mi-9 e Mi-HT) foram relatados para resistência, porém somente o gene Mi-1 confere efetivamente resistência aos nematoides de galhas e pertence à classe NBS-LRR de genes R (EL-SAPPAH; M; H; YAN *et al.*, 2019).

A resistência genética em alface é o método mais eficaz no controle de nematoide de galhas, pois além de restringir a reprodução do patógeno, diminui o custo de produção, sendo mais econômico no manejo de doenças. Outra vantagem é a menor agressão ao meio ambiente, uma vez que limita o uso de agrotóxicos, tornando o produto mais

saudável para o consumidor final (SILVESTRINI; MALUF; GUERREIRO--FILHO; GONÇALVES, 2005).

No Brasil, o melhoramento genético da alface visa, principalmente, adaptá-las às condições climáticas, com destaque para as temperaturas mais elevadas comuns na grande maioria das regiões do país. Neste contexto surge a necessidade de encontrar genes de resistência para características que estão mais relacionadas às temperaturas altas, como é o caso da ocorrência dos nematoides das galhas.

## **2.9 Bioinformática**

A bioinformática é uma área multidisciplinar que envolve a biologia, matemática e ciências da computação. Surgiu a partir dos avanços na área de biologia molecular, com o avanço dos projetos genomas gerando grandes informações com o sequenciamento do DNA (SINGH; SINGH; CHAND; KUSHWAHA, 2011).

Tem como base três objetivos: primeiro, ela organiza os dados permitindo acessar as informações e enviar novas entradas à medida que esses dados são produzidos. Em segundo, desenvolve ferramentas e recursos que auxiliam na análise dos dados. E em terceiro objetiva usar as ferramentas para análise de dados e interpretação dos resultados (LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001).

Dra. Dayhoff foi a pioneira no campo da bioinformática para o estudo de biomoléculas, desenvolvendo matrizes de substituição e contribuindo para estudos de filogenética. É uma área em constante evolução, o que exige uma atenção a novos métodos e tendências (VERLI, 2014).

Com o avanço nas técnicas de sequenciamento do DNA, aumentou substancialmente o número de genomas disponíveis nos bancos de dados, com isso, as ferramentas para análises desses dados foram sendo aperfeiçoadas. Existem diversos programas online que são capazes de analisar e alinhar centenas de sequências (VERLI, 2014).

O alinhamento é uma técnica que compara uma ou mais sequências alvo com milhares de dados disponíveis nos bancos de armazenamento online, fornecendo informações da função e estrutura das sequências biológicas, permitindo também o entendimento da variabilidade genética de indivíduos e populações (VERLI, 2014).

Há dois tipos de alinhamento, o simples e o alinhamento múltiplo e sua aplicabilidade se dará conforme o objetivo do pesquisador. O alinhamento simples descrevem a relação de similaridade entre duas sequências diferentes, já o alinhamento múltiplo envolvem três ou mais sequências similares. Conceitualmente pode-se dividir os alinhamentos simples e múltiplos em outros dois: o alinhamento global que envolve centenas de sequências, levando em consideração toda a extensão dessas sequências e o alinhamento local que busca pequenas regiões de similaridade (VERLI, 2014).

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) é um dos programas mais usados na bioinformática e compara uma sequência desconhecida com as que estão disponíveis nos bancos de dados. Dentro do BLAST existem diferentes ferramentas que podem ser usadas conforme a necessidade do pesquisador e variam quanto ao tipo de sequência de busca, o banco de dados a ser empregado, e o tipo de comparação a ser realizada (VERLI, 2014):

- 1) **Blastn** (nucleotídeo-nucleotídeo): usa sequência de DNA, mostrando as sequências de DNA mais próximas no banco de dado usado como referência,
- 2) **Blastp** (proteína-proteína): usa sequência de proteína, mostrando sequências proteicas mais próximas no banco de dado usado como referência,
- 3) **Blastpgp**: usado para encontrar proteínas distantemente relacionadas,
- 4) **Blastx**: compara produtos de tradução conceitual nos seis quadros de leitura de uma sequência de nucleotídeos contra o banco de dados de sequências proteicas,
- 5) **Blasttx**: é o mais lento, encontra relações distantes entre sequências de nucleotídeos,
- 6) **tblastn**: alinha e compara uma sequência de proteínas contra um banco de dados de nucleotídeos traduzidos em todos os seis quadros de leitura,
- 7) **Megablast**: usado quando se emprega um alto número de sequências de busca. Normalmente utilizado para metadados.

O uso da bioinformática e da genética comparativa na pesquisa do genoma das plantas, mostrou que alguns genes foram conservados durante o processo evolutivo. Essa informação torna-se bastante útil na agricultura, com uso no melhoramento genético, indicando genes de resistência a seca, doenças e insetos (SINGH; SINGH; CHAND; KUSHWAHA, 2011).

A análise genômica por bioinformática já foi utilizada para identificar e caracterizar genes de resistência a nematoides em outras plantas. Por exemplo, a

resistência da soja a nematoides tem um papel importante no controle do mesmo. O uso da bioinformática permitiu conhecer os mecanismos moleculares e genéticos da resistência e assim gerar recursos genômicos e associações de traços de marcadores (KIM; VUONG; QIU; ROBBINS *et al* 2016).

As aplicações da bioinformática associadas à biotecnologia, são uma grande ferramenta para o melhoramento genético vegetal. O uso computacional para análise de dados, planejamento e desenvolvimento de hipóteses, começa na bioinformática, promovendo uma melhor compreensão do organismo, auxiliando no diagnóstico de doenças e no uso para o melhoramento de plantas (SINGH; SINGH; CHAND; KUSHWAHA, 2011).

## **CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO**

1 **Análise *in silico* de genes de resistência aos nematoides das galhas em espécies do**  
2 **gênero *Lactuca***

3 Michelle de Lima Moreira<sup>1</sup>, Luiz Antônio Augusto Gomes<sup>2</sup>

4 1,2. Programa de pós-graduação em Biotecnologia UFU – Patos de Minas -MG

6 RESUMO

7 A alface (*Lactuca sativa* L) é uma olerícola de origem mediterrânea pertencente à família  
8 Asteraceae, ordem Asterales. Além de ser uma das mais importantes hortaliças cultivadas  
9 no mundo, também é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil. Uma das dificuldades  
10 em produzi-la está relacionada à infestação por fitopatógenos em áreas de produção.  
11 Dentre estes, destacam-se os nematoides das galhas, do gênero *Meloidogyne*,  
12 especialmente o *M. incognita* e o *M. javanica*. Esses nematoides ocorrem em todas as  
13 regiões do Brasil, causando grandes prejuízos às lavouras. O principal sintoma dessa  
14 doença é a formação de galhas nas raízes, danificando os tecidos vasculares, o que, além  
15 dos danos causados pelo próprio patógeno, aumenta também a suscetibilidade da planta  
16 a fungos e bactérias causadores de doenças. A utilização de cultivares resistentes de  
17 alface é um método eficiente e seguro para o controle do patógeno, pois além de restringir  
18 a reprodução do nematoide e diminuir o custo de produção, não causa impacto ao meio  
19 ambiente. Poucos ainda são os trabalhos sobre gene(s) para resistência aos nematoides  
20 em alface e, ainda, não se encontram disponíveis cultivares de amplo uso comercial que  
21 apresentem resistência. Assim, o objetivo neste trabalho é a busca por genes de resistência  
22 a nematoides em alface, utilizando técnicas de análise genômica com ferramenta de  
23 bioinformática. Foi realizada uma busca por genes NBS-LRR, de resistência a  
24 *Meloidogyne spp*, pois foi identificado que esses genes são responsáveis pela resistência  
25 a nematoides em diversas espécies. Posteriormente as sequências encontradas foram

1 caracterizadas pelo algoritmo Blastx e banco de dados de proteínas InterproScan e foi  
2 feita uma análise filogenética pelo método neighbor joining. Os recursos da  
3 bioinformática foram essenciais para caracterização dos genes de resistência, de tal forma  
4 que ao final deste trabalho foi possível identificar dois genes da classe NBS-LRR com  
5 potencial de conferir resistência a *Meloidogyne* spp em *Lactuca saligna*. Este resultado  
6 abre perspectivas para novos trabalhos visando ao melhoramento para resistência ao  
7 *Meloidogyne* spp em alface, visto a *L. saligna* ser uma espécie já utilizada em programas  
8 de melhoramento da alface.

9

10 **Palavra-chave:** *Lactuca sativa*, *Meloidogyne* spp, genes de resistência, NBS-LRR

11

12

13

## 14 INTRODUÇÃO

15

16 A alface, *Lactuca sativa* L, é uma olerícola de origem mediterrânea, com uma  
17 variedade de cores, formas e tamanhos. Seu valor nutricional é subestimado, sendo rica  
18 em fibra, ferro, folato, vitamina C e K e fonte de carotenoides (KIM; MOON; TOU; MOU  
19 *et al.*, 2016). É a hortaliça de maior consumo no Brasil, com seis tipos mais  
20 comercializados: repolhuda lisa, repolhuda crespa/americana, solta lisa, solta crespa,  
21 mimosa e romana (FILGUEIRA, 2000). Dentro do gênero *Lactuca* existem diferentes  
22 espécies, das quais três delas são próximas à alface, sendo passíveis de cruzamento para  
23 fins de melhoramento. São as espécies *Lactuca saligna* L, *L. serriola* e *L. virosa*, que são  
24 espécies selvagens, consideradas ervas daninha, que normalmente colonizam beiras de  
25 estradas, bordas de cultivos e lixões (KITNER; LEBEDA; DOLEŽALOVÁ; MARAS *et*  
26 *al.*, 2008).

27 A alface pode ser afetada por vários tipos de doenças, provocadas por fungos,  
28 bactérias, vírus ou nematoides. As principais doenças são o míldio, oídio, septoriose,



1 podridão, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, nematoides e vírus do mosaico (LOPES;  
2 QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

3 Os nematoides das galhas, das espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, são  
4 um dos principais problemas para o cultivo da alface. Este patógeno ataca a raiz formando  
5 galhas, deixando a planta fraca e susceptível a outras doenças, causando enormes  
6 prejuízos nas lavouras.

7 As respostas das plantas aos nematoides são baseadas em dois mecanismos: primeiro  
8 tem-se a defesa basal, que pode ser ativadas pelos padrões moleculares associados a  
9 patógenos (PAMPs), como flagelina bacteriana, lipopolissacarídeos e proteínas  
10 elicitoras. Estes PAMPs serão reconhecidos por receptores transmembrana das plantas  
11 ativando a defesa contra os patógenos (DEYOUNG; INNES, 2006). O segundo  
12 mecanismo de defesa é a imunidade adaptativa, chamada de “imunidade desencadeada  
13 por efetores” que é composto por genes de resistência que reconhecem proteínas efetoras  
14 do patógeno (MARONE; RUSSO; LAIDO; DE LEONARDIS *et al.*, 2013).

15 A resistência das plantas a muitos patógenos pode ser alcançada pela presença dos  
16 genes de resistência R. A maioria dos genes de resistência a doenças em plantas codificam  
17 sítios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas de leucina (classe NBS-LRR), que estão  
18 envolvidos no reconhecimento dos genes de avirulência (Avr) e estão relacionadas com  
19 a interação das proteínas efetoras de patógenos e HR (hypersensitivity responses),  
20 importantes fatores de resistência efetiva a doenças em plantas (DEYOUNG; INNES,  
21 2006).

22 A identificação de genes de resistência pode ser feita por diversas técnicas, incluindo  
23 marcadores moleculares ou por análise genômica *in silico*. A procura por genes de  
24 resistência nas plantas é um recurso valioso para desenvolver novas variedades para o  
25 controle de nematoides.

1 O objetivo desse trabalho é identificar genes de resistência ao nematoide das  
2 galhas *Meloidogyne spp.* em espécies de *Lactuca* por meio de análise genômica *in silico*.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 8 Busca por genes de resistência a *Meloidogyne spp*

10 Inicialmente foi realizada uma revisão bibliográfica buscando na literatura quais  
11 os principais genes conhecidos que conferem resistência a nematoides. Após o  
12 levantamento bibliográfico, foi identificado que os genes da família NBS-LRR são  
13 responsáveis por conferir resistência a nematoides em diferentes espécies. Sequências  
14 desses genes foram usadas como sequências de referência para buscar genes de resistência  
15 em espécies do gênero *Lactuca* (**Tabela 1**).

17 **Tabela 1. Genes NBS-LRR de resistência a *Meloidogyne spp.* usados como**  
18 **referência.**

13 <b>Espécie</b>	14 <b>Código NCBI</b>	15 <b>Código da</b>	16 <b>Referência</b>
		17 <b>Proteína</b>	
18 <i>Prunus</i>	MT665980	QZL09480.1	(XIAO; ZHU; ZHU; LIU <i>et</i>
<i>sogdiana</i>			<i>al.</i> , 2021)
<i>Prunus</i>	KU198632.1	ANB44748.1	(XIAO; ZHU; ZHU; LIU <i>et</i>
<i>sogdiana</i>			<i>al.</i> , 2021)
<i>Prunus</i>	ADP37704.1	ADP37704.1	(XIAO; ZHU; ZHU; LIU <i>et</i>
<i>sogdiana</i>			<i>al.</i> , 2021)

<i>Capsicum</i>	XM_016699613.1	XP_016555099.1	(CHANGKWIAN;
<i>annuum</i>	XM_016697574.1	XP_016553060.1	VENKATESH; LEE; HAN <i>et al.</i> , 2019)
<i>Glycine max</i>	<i>Glyma.13g194600</i>	XP_003541584.1	(ALEKCEVETCH; DE
	<i>Glyma.13g194900</i>	XP_003542820.1	LIMA PASSIANOTTO; FERREIRA; DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2021)
<i>Arachis</i>	GDBK01000706.1		(GUIMARAES;
<i>stenosperma</i>			GUIMARAES; MORGANTE; SILVA <i>et</i> <i>al.</i> , 2015)
<i>Oryza sativa</i>	Os11g10760	ABA92135.1	(HADA; DUTTA; SINGH; SINGH <i>et al.</i> , 2020)
<i>Solanum</i>	AF039681	AAC67237.1	(EL-SAPPAH; M; H; YAN
<i>lycopersicum</i>			<i>et al.</i> , 2019)

1

2 Busca de genes de resistência em espécies do gênero *Lactuca*

3

4 A busca de genes de resistência a *Meloidogyne*, do grupo NBS-LRR, em espécies  
5 do gênero *Lactuca* foi realizada usando a ferramenta tBlastn no banco de dados do NCBI  
6 contra os genomas das espécies *Lactuca sativa*  
7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4236>) e *Lactuca saligna*  
8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid75948>). Foram usadas as sequências  
9 listadas na tabela 1 no tBlastn e gravadas as cinco sequências com melhores pontuações  
10 de cada alinhamento.

1           Essas espécies foram selecionadas por serem as únicas disponíveis com genoma  
2 completo nos bancos de dados. Não há resistência conhecida a *Meloidogyne* na cultivar  
3 utilizada para sequenciamento de *Lactuca sativa*, a cultivar Salinas, porém maioria dos  
4 acessos de *Lactuca saligna* são resistentes (KAUR; MITKOWSKI, 2011).

5

#### 6 Caracterização das sequências encontradas

7

8           As sequências encontradas nos genomas de alface foram caracterizadas por meio  
9 do InterproScan usando o programa Blast2Go (CONESA; GOTZ; GARCIA-GOMEZ;  
10 TEROL *et al.*, 2005). As sequências que não apresentaram os domínios conservados NB-  
11 ARC (IPR002182) e TIR (IPR000157) foram excluídas das análises posteriores. Esses  
12 domínios estão presentes nos genes NBS-LRR e nas sequências de referência da tabela 1.

13           As sequências que apresentaram os domínios conservados foram alinhadas pelo  
14 programa MUSCLE utilizando o MEGA 11.0 para observação dos sítios conservados  
15 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

16

17

#### 18 Análise filogenética

19

20           Na análise filogenética foram usados alinhamentos editados, onde foram mantidas  
21 apenas as sequências dos domínios TIR e NB-ARC. A análise filogenética foi feita  
22 usando o método neighbor joining com teste de “bootstrap” de 1000 réplicas, no programa  
23 MEGA 11.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016; SAITOU; NEI, 1987).

24

25

## 1 Organização genômica

2

3 A organização genômica dos possíveis genes de resistência a *Meloidogyne* foi  
4 determinada buscando a localização cromossômica dos genes bem como a posição dos  
5 exons e introns. A determinação da posição dos exons e introns foi feita com um  
6 alinhamento da sequência genômica com a sequência de mRNA usando o programa  
7 CLUSTAW. O diagrama descrevendo as posições dos exons e introns foi feito usando o  
8 programa Exon-Intron Graphic Maker (<http://wormweb.org/exonintron>).

9

## 10 **4.0 Resultados e discussão**

11

12 Após análises de alinhamento e busca por domínios conservados foram  
13 encontrados 54 genes, sendo 24 de *L. saligna* e 30 de *L. sativa*, apresentando os domínios  
14 NB-ARC (IPR002182) sozinho ou juntamente com outros domínios, sendo eles, TIR  
15 (IPR000157), RX-N-terminal (IPR041118), C-JID domain (IPR045344) e LRR  
16 (IPR001611) (KASMI, 2021; MARONE; RUSSO; LAIDO; DE LEONARDIS *et al.*,  
17 2013) (**Tabelas 2 e 3**).

18 A presença de genes de resistência NBS-LRR já foi identificada em várias  
19 plantas, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*,  
20 *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* e *Secale cereale* (SONG; GUO; HU; QIAN *et al.*,  
21 2019). Contudo, o número de genes NBS-LRR varia muito entre as diferentes espécies  
22 de plantas, variando de dezenas a centenas. Por exemplo, em *Arachis hypogaea* foram  
23 identificados 713 genes da classe NBS-LRR, sendo que 229 sequências continham  
24 domínios TIR e 118 sequências incluíam domínios CC (SONG; GUO; HU; QIAN *et al.*,  
25 2019). Em plantas de centeio (*Secale cereale*) foram identificados 582 genes NBS-LRR,

1 já em *Ipomoea trifida*, um total de 442 genes codificadores de NBS foram identificados  
2 (SI; QIAO; ZHANG; JI *et al.*, 2022).

3 O número de genes encontrado neste trabalho é inferior ao observado em outras  
4 plantas, pois foi realizada uma tentativa de buscar os genes mais homólogos a genes de  
5 resistência a *Meloidogyne* e não todos os genes NBS-LRR dos genomas analisados.

6 Esses genes foram alinhados com as sequências referência e o alinhamento usado  
7 para construção da análise filogenética. Essa análise foi feita com objetivo de identificar  
8 nos genomas de alface analisados a existência de genes homólogos aos genes de  
9 resistência a *Meloidogyne* usados como referência (**Figura 12**).

- 1 **Tabela 2. Genes de *Lactuca saligna* com os domínios NB-ARC, TIR RX N- terminal e C-JID.** Tabela mostra código das sequências no NCBI,
- 2 descrição do gene, número de aminoácidos, e-value, similaridade média e código do InterProscan.

Cód. Sequência	Descrição	Nº aa	e-Value	Sim. média	InterProscan IDs
CAB4071327.1	probable disease resistance RPP8-like protein 2	354	0.0	86.03	IPR002182 (PFAM)
CAB4074623.1	putative disease resistance RPP13-like protein 3	911	0.0	77.63	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4075316.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	369	0.0	89.6	IPR002182 (PFAM)
CAB4075318.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	890	0.0	83.36	IPR002182 (PFAM)
CAB4078064.1	disease resistance protein Roq1 isoform X1	922	0.0	83.07	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4080709.1	disease resistance protein RUN1	1176	0.0	79.47	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4080871.1	disease resistance protein RPY1 isoform X1	1234	0.0	79.51	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4080872.1	disease resistance protein RUN1	1233	0.0	79.65	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4082349.1	NB-ARC domains-containing protein	416	0.0	75.54	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4082515.1	TMV resistance protein N isoform X2	1108	0.0	78.94	IPR045344 (PFAM); IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4082837.1	putative disease resistance protein RGA3	1072	0.0	83.49	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4085314.1	TMV resistance protein N-like	1033	0.0	64.53	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4089530.1	putative disease resistance protein At3g14460	928	0.0	87.33	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4089531.1	putative disease resistance protein At3g14460	809	0.0	87.07	IPR002182 (PFAM)
CAB4089548.1	putative disease resistance protein At3g14460	1241	0.0	84.88	IPR001611 (PFAM); IPR002182 (PFAM); IPR041118 (PFAM)
CAB4105670.1	disease resistance protein RUN1	1119	0.0	72.83	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM); IPR045344 (PFAM)
CAB4108040.1	TMV resistance protein N-like	435	0.0	73.0	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4108969.1	TMV resistance protein N isoform X1	1067	0.0	77.81	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4110899.1	disease resistance protein RUN1	537	0.0	92.24	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4111097.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	886	0.0	82.66	IPR002182 (PFAM)
CAB4111192.1	Disease resistance protein	880	0.0	77.41	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
CAB4111201.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	925	0.0	80.33	IPR002182 (PFAM)
CAB4113791.1	TMV resistance protein N-like	843	0.0	74.13	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
CAB4115494.1	disease resistance protein RPY1 isoform X1	1248	0.0	80.24	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)

**Tabela 3. Genes de *Lactuca sativa* com os domínios NB-ARC, TIR RX N- terminal e C-JID.** Tabela mostra código das sequências no NCBI, descrição do gene, número de aminoácidos, e-value, similaridade média e código do InterProscan.

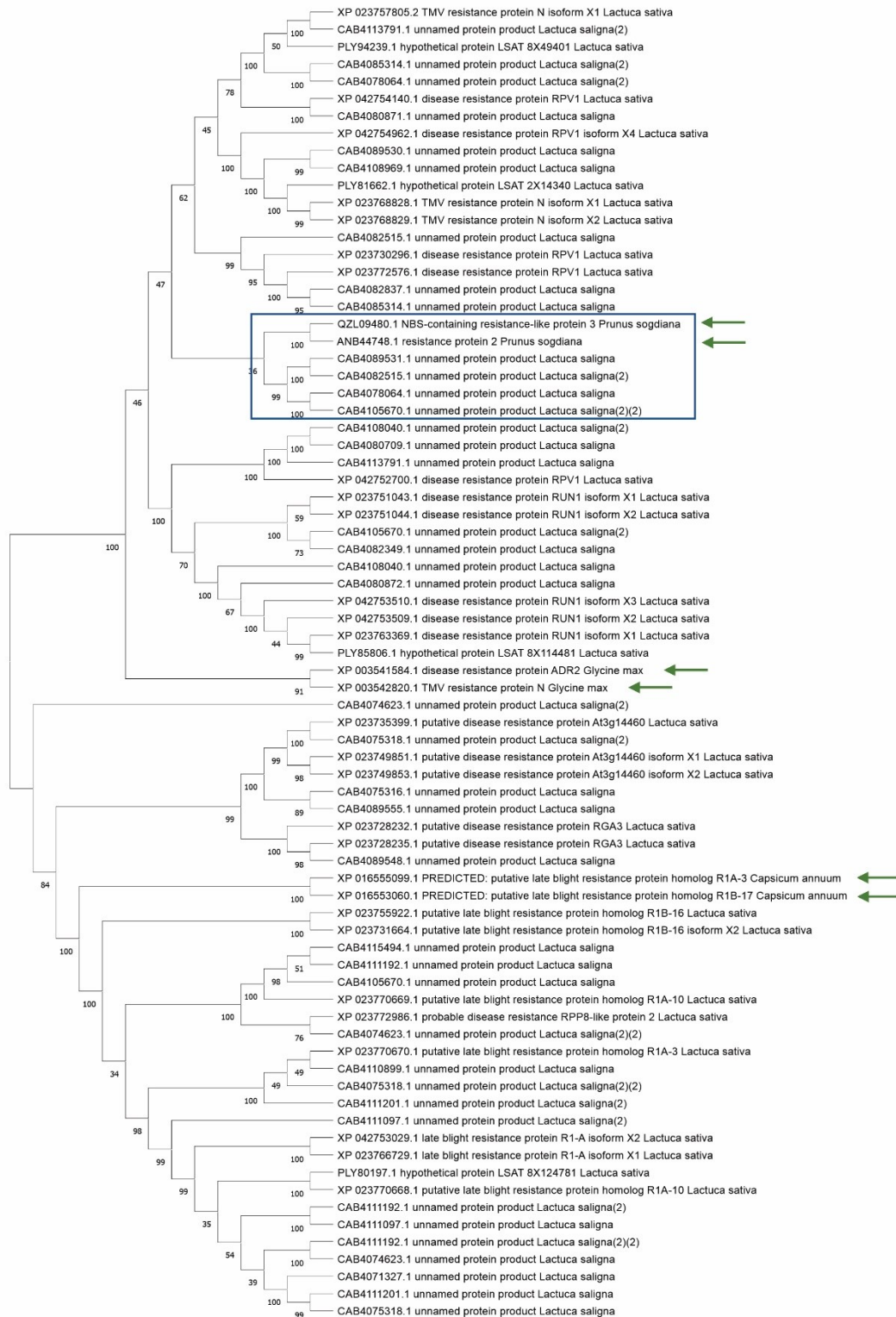
Cód. Sequência	Descrição	Nº aa	e-Value	Sim. média	InterProcan IDs
PLY80197.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	902	0.0	81.47	IPR002182 (PFAM)
PLY81662.1	TMV resistance protein N isoform X1	1201	0.0	82.56	IPR000157 (PFAM); IPR045344 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
PLY85806.1	disease resistance protein RPV1 isoform X2	1195	0.0	88.94	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM); IPR045344 (PFAM)
PLY94239.1	TMV resistance protein N isoform X1	808	0.0	83.07	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
XP_023728232.1	putative disease resistance protein RGA3	1063	0.0	81.51	IPR001611 (PFAM); IPR002182 (PFAM); IPR041118 (PFAM)
XP_023728235.1	putative disease resistance protein RGA3	1072	0.0	84.04	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023730296.1	TMV resistance protein N-like	1111	0.0	74.92	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM); IPR045344 (PFAM)
XP_023731664.1	putative late blight resistance protein homolog R1B-16	748	0.0	82.21	IPR002182 (PFAM)
XP_023735399.1	putative disease resistance protein At3g14460	1278	0.0	82.91	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023749851.1	putative disease resistance protein At3g14460	1249	0.0	85.76	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023749853.1	putative disease resistance protein At3g14460	1162	0.0	85.35	IPR002182 (PFAM)
XP_023751043.1	disease resistance protein RPV1 isoform X1	1234	0.0	78.69	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023751044.1	disease resistance protein RPV1	1233	0.0	77.93	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
XP_023755922.1	putative late blight resistance protein homolog R1B-16	839	0.0	80.67	IPR002182 (PFAM)
XP_023757805.2	TMV resistance protein N isoform X1	1085	0.0	77.88	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
XP_023763369.1	disease resistance protein RPV1 isoform X2	1183	0.0	88.96	IPR002182 (PFAM); IPR045344 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
XP_023766729.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	925	0.0	82.74	IPR002182 (PFAM)
XP_023768828.1	TMV resistance protein N isoform X1	1187	0.0	82.94	IPR002182 (PFAM); IPR045344 (PFAM); IPR000157 (PFAM)
XP_023768829.1	TMV resistance protein N isoform X2	1183	0.0	83.15	IPR045344 (PFAM); IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023770668.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	928	0.0	81.47	IPR002182 (PFAM)
XP_023770669.1	putative disease resistance RPP13-like protein 3	876	0.0	80.79	IPR002182 (PFAM); IPR041118 (PFAM)
XP_023770670.1	Disease resistance protein	880	0.0	77.4	IPR041118 (PFAM); IPR002182 (PFAM)



XP_023772576.1	TMV resistance protein N-like	843	0.0	74.09	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_023772986.1	putative disease resistance RPP13-like protein 3	896	0.0	84.86	IPR002182 (PFAM); IPR041118 (PFAM)
XP_042752700.1	disease resistance protein RML1A-like isoform X1	584	0.0	77.85	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_042753029.1	putative late blight resistance protein homolog R1A-10	881	0.0	82.74	IPR002182 (PFAM)
XP_042753509.1	disease resistance protein RUN1	1044	0.0	88.99	IPR002182 (PFAM); IPR000157 (PFAM); IPR045344 (PFAM)
XP_042753510.1	disease resistance protein RUN1 isoform X1	1040	0.0	89.5	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_042754140.1	disease resistance protein RPV1	658	0.0	87.22	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM)
XP_042754962.1	TMV resistance protein N isoform X1	990	0.0	86.46	IPR000157 (PFAM); IPR002182 (PFAM); IPR045344 (PFAM)

1

1 **Figura 12. Análise filogenética de possíveis genes de resistência NBS-LRR de *L.***  
 2 ***sativa* e *L. saligna* e comparados com as sequências de referência. As sequências de**  
 3 **referência estão destacadas com setas verdes. As sequências com maior homologia**  
 4 **a sequências de referência estão destacadas em um retângulo azul.**



5  
6

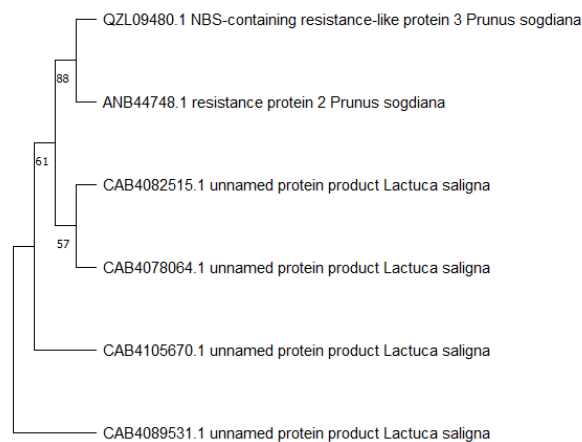
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

Como observado na análise filogenética os genes CAB408953.1, CAB4082515.1, CAB4078064.1 e CAB4105670.1 foram os únicos que apresentaram uma maior homologia com alguma das sequências de referência utilizadas, todos eles são da espécie *Lactuca saligna*, sendo os mais próximos das sequências de *Prunus sogdiana* (QZL09480.1 e ANB44748.1). Para as outras sequências de referência não foram encontrados genes homólogos, nem em *L. saligna* e nem em *L. sativa*.

Esses resultados podem ser explicados, provavelmente, porque não existe resistência conhecida a *Meloidogyne* na cultivar Salinas, que foi utilizada para sequenciamento de *Lactuca sativa*. Porém, a cultivar salinas 88, que é derivada de Salinas, apresenta resistência a *Meloidogyne*, de acordo com resultado de alguns trabalhos descritos na literatura (CORREIA; SILVA; COSTA; WILCKEN, 2019; FILHO; GOMES; WESTERICH; MALUF *et al.*, 2008). Salinas 88” foi desenvolvida para resistência ao vírus LMV (*Lettuce mosaic virus*), a partir de cruzamento entre ‘Salinas’ e material derivado do acesso PI 251245, um acesso do Egito (RYDER, 1991). Infelizmente, não existe sequenciamento genômico para essa cultivar. No entanto, uma referência aponta resistência a *Meloidogyne* em vários acessos de *Lactuca saligna*, que é uma espécie selvagem não melhorada geneticamente (KAUR; MITKOWSKI, 2011). Isso pode explicar a existência de homologia com genes de resistência a *Meloidogyne spp* identificados nessa espécie.

Um segundo alinhamento e árvore filogenética foram realizados apenas com as sequências de referência de *Prunus sogdiana* (QZL09480.1 e ANB44748.1) e suas prováveis homólogas em *L. saligna* (**Figura 13**).

1 **Figura 13. Análise filogenética dos possíveis genes de resistência a *Meloidogyne spp***  
2 **de *Lactuca saligna*.**



3  
4

5 Apesar de observarmos quatro alinhamentos mais próximos aos genes de *Prunus*  
6 *sogdiana*, é possível ver que os dois primeiros genes (CAB4082515.1 e CAB4078064.1)  
7 tem maior homologia aos genes de *P. sogdiana*. Os outros dois genes (CAB408953.1 e  
8 CAB4105670.1) ficaram mais distante na árvore provavelmente por terem diversas  
9 mutações, incluindo inserções e deleções, que não são compartilhadas pelos genes de  
10 referência, como pode ser visto no alinhamento (**Figura 14**).

11 A resistência das plantas às espécies de *Meloidogyne spp* é encontrada em diversas  
12 cultivares, por exemplo o gene Mi do tomate que confere resistência a vários tipos de  
13 nematoides das galhas (EL-SAPPAH; M; H; YAN *et al.*, 2019), assim como o gene Me5  
14 da pimenta, gene RMC da batata, todos esses genes conferem resistência a *Meloidogyne*  
15 (*HAJIHASSANI; RUTTE; LUO, 2019; XIAO; ZHU; ZHU; LIU et al.*, 2021). E na maior  
16 parte dessas espécies a resistência foi provocada por um ou poucos genes, como  
17 observado em *Prunus sogdiana*, uma das espécies de referência deste trabalho, e possui  
18 três genes NBS-LRR que conferem resistência a *Meloidogyne* (*XIAO; ZHU; ZHU; LIU*  
19 *et al.*, 2021).

1 Os genes de resistência com domínio NBS-LRR e domínio adjacente a LRR c-  
2 terminal (C-JID) desempenham papel importante nas interações intramoleculares entre  
3 planta e patógenos. O domínio N-terminal auxilia na via de sinalização que será ativada  
4 no reconhecimento de efetores além de estar envolvido no reconhecimento de patógenos  
5 e nas interações com os alvos de efetores dos patógenos (KASMI, 2021).

6 As sequências desta família de genes têm um domínio conservado o NB-ARC que  
7 é um adaptador de ligação ao nucleotídeo, compartilhado pelas proteínas NOD-LRR,  
8 APAF-1, proteínas R, que desempenham um importante papel na resistência a doenças  
9 de plantas e transdução de sinal. O domínio TIR localizado no domínio amino-terminal é  
10 responsável pela transdução de sinal e reconhecimento de patógenos (**Figura 15**)  
11 (ZHANG; YUAN; WU; ZHANG *et al.*, 2022).

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

1 **Figura 14. Alinhamento dos possíveis genes de resistência a *Meloidogyne spp* de**  
 2 ***Lactuca saligna*. As seqüências desse alinhamento estão na mesma ordem da análise**  
 3 **filogenética da figura 12.**

```

      10      20      30      40      50      60      70
QZL09480.1 Prunus sogdiana  -RGEDTRKGFTHLHAALYDAGISTFLDDNELERAEFIKTQLEQAIDKSMISIIIVFSKSYADSSWCDEL
ANB44748.1 Prunus sogdiana  -RGEDTRNGFTSHLHKALESRYGVNFMEDDDLVGVQVIKPELLQAIKSKISVIVLSTRYADSSWCDEL
CAB4082515.1 Lactuca saligna -RGEDTRNNFVDHLYTALSQRGISVFKDDQALDKGKPIRELLKAI EESRFVAVVFSKKNYADSSWCDEL
CAB4078064.1 Lactuca saligna MRGEDTRKTFVDHLHTALVQQGIYAYKDDDELTPQGKSGISGPSIMTAIEDSQISVIVFSKKNYADSSWCDEL
CAB4105670.1 Lactuca saligna -RGVDTRNSFDHHLKALLDANINTEFLDEEEIQTGEDLKPPELESAIKASKASIIIVLSKKNYASSTWCDEL
CAB4089531.1 Lactuca saligna -----LDNITIK-----LQEL

      80      90      100     110     120     130     140
QZL09480.1 Prunus sogdiana  VKIMECRERLRQHVIPLFYNVDASVVRKQTGSFAQAFKHEAGICEGKHEKEKVQR-----WRNAL
ANB44748.1 Prunus sogdiana  VKIMECRRTLNQIVLPIFYKVDPSDVRKQTGTTLESDFQKH-----TIRHKDGVVKE-----WRKAL
CAB4082515.1 Lactuca saligna VKIMECRDQMKQMLPVFYVDVPSDVRGQKND FDSAFQEHED-----KFKGEMKEVKVN-----WRKAL
CAB4078064.1 Lactuca saligna VHIKCKDRRGQIVMPEVYFDVDPSEVRKQKGYGEAFVKH-----ELENNKKEVES-----WRKAL
CAB4105670.1 Lactuca saligna VLILEQRNRNYKHIVPIPIFYVHVEPTDVRKQSSSFGDAMAKHKY-----KMAEAEIDVHKRNQQAYKMEWLKQAL
CAB4089531.1 Lactuca saligna VE---EKDNLGLSV-----KGESPRHINIR-----LQTSI

      150     160     170     180     190     200     210
QZL09480.1 Prunus sogdiana  TQAADLCCGEDLKNADNGHEAKFIQKIL-GVVNKQLYSKYRLDIKHPVGTISRLNVLNSNHLDIENSGFKVD
ANB44748.1 Prunus sogdiana  TEAANLCA---GVLEDRNEAKFIEAFIENNIVGRLSTTLPVAAYPVGVHSRVHDMISYLG---GRSQD
CAB4082515.1 Lactuca saligna AAAAGLSGWHIKETGNGGESAILRDIRV-AKISKSIQP--RDLQKHLFGIESRIDEPLYLLDM---EATEK
CAB4078064.1 Lactuca saligna MDAGNISGWETEHIANGHESKCIKIV-DTISHNLHPVTTSSVDDNLVGVETRMQLDISKLQI---GFGGK
CAB4105670.1 Lactuca saligna VEVVDLKG---MDANGCRETVFIQEIV-MNMSSKLDQRIRKCTPHIIGMRSSVNIITSWLKD---KSSDT
CAB4089531.1 Lactuca saligna VDASTIVG-----REGDKESILLHKLGGEPDRNYS-----

      220     230     240     250     260     270     280
QZL09480.1 Prunus sogdiana  VRMIGIWMGGIGKTTLAKAIYNEFEFS--FEGRSFLANVREVI AHQPITGLVGLQKRLNLDI-LK
ANB44748.1 Prunus sogdiana  VVMIGIWMGGGLGKTTAAKAIYNRIDK--FEAHGFLGDIRDTANRH---GLVYLQKLLAEINNK---
CAB4082515.1 Lactuca saligna VHMVGILGMMGIGKTTIAQALFRRIQHN--FEGYSFVKDVRENSYSK--KDVVALQOKILREILKQMDPA
CAB4078064.1 Lactuca saligna -RMIGIWLGGGGKTTLASSVYDKISSK--FDGCCFLKNIREETS NK--NGLERLQEKILCGV-LK
CAB4105670.1 Lactuca saligna ADILTIWGMAGTIGKTSLARVYVHYND--FERCSFIEDIGRRC TQQ-VNTLFDLQKHLVLDI-QN
CAB4089531.1 Lactuca saligna --IVPIVGMGGVCKTTLARLLYDEMOKDQFELKAWV---CVSDE--FDIFGSKTILLES I-G

      290     300     310     320     330     340     350
QZL09480.1 Prunus sogdiana  ---SKGITVDVSPKGIEMIRKRLPCKRALVIDDA--DDLHQPEAIA GAHDFWFGPGSRVITTRNQHLLD
ANB44748.1 Prunus sogdiana  ---PTKGFHISCVDGGMGMIKKELGRRKRVLVIIDV--DDKEQLEAIVGNRDWFGSGSRIIITTRDKRFLD
CAB4082515.1 Lactuca saligna GNVSVSYPTVDPEYGANMIRERFCHKKVLVLDV--DNSEQLEFLARTHEWFGPGSRIIITTRDEHLLS
CAB4078064.1 Lactuca saligna ---QKQVDVGRVEEGRNMIKDLRHHKRVLILLDDV--DNLEHLEELAGSRDWFEGSRIIITTRDEHVLIT
CAB4105670.1 Lactuca saligna ---GNLQKLHDVNNCTNKIENVLLHKRTLIVLDGI--DNFEQLDVLIGTKR--FHRPSKIIITTRIDRSLTE
CAB4089531.1 Lactuca saligna ---GRNHEIKDLNLLQVAIQEKISKRRFLVLDVWVSESYADWEILERPFLAGEAGSKIIMTTRKMSLIT

      360     370     380     390     400     410     420
QZL09480.1 Prunus sogdiana  QVGV-----DSTYMAQAMDEEAELEFSRHAFESG--CPNQEYLDLSKRVIRYCRGLPLALEVVGGSF
ANB44748.1 Prunus sogdiana  ILHV-----NKTFTVPEMNPDEGLELFCWHAFQKG--YPDEQFLELSEKVVSYSGGLPLALKVLGSS
CAB4082515.1 Lactuca saligna DANV-----IYRDPFLSMNEAAELFCWHAFRKS--SPPEAYEELS DRAIRVASSLPLALKVLGSSF
CAB4078064.1 Lactuca saligna AHKV-----DVIHNISLLNTDEAMKLFCKHAPQGY--RRIKDYQQLSKDAVSYAGGLPLALRVLGRF
CAB4105670.1 Lactuca saligna KSGLFGKNMSLKHTKHLLEGLDETESLQILCLHAFKCN--DPKEGYQELSRKVVVKHCGGHPLALKVMGSS
CAB4089531.1 Lactuca saligna QLGY-----DQPYHLSVLSCDNALS LFCQH ALGKSNFDSHP TPKPHGEGITIEKCAGLPLALIALGRL

      430     440     450     460     470     480     490
QZL09480.1 Prunus sogdiana  LIKRSTA EWENHLEK--LKRS PDGDIQKILRISLDGLPDHTTREIFLDISCFFIG-M-DKDYVTKILDGC
ANB44748.1 Prunus sogdiana  LIEGSIAEWESQLQE--LEGIPHEDILKLLKISYNGL-DRDGKCIFLDISCFFIG-M-NKDHVVRKILDGC
CAB4082515.1 Lactuca saligna FHGRQLSVWESALNR--LRKGSIDKIHETLKL SFDGL-DASEKHIFLDIACFYKD-Q-YEEYVTRVLDSF
CAB4078064.1 Lactuca saligna LCDKETNEWRSALDR--LKEIPDANILEKLIKISFDGL-TSEERELFLDIACFFRGR I-KDEDVMMKLDAC
CAB4105670.1 Lactuca saligna LRNEDVVAWEDAIEF--LEKEPNPDVQKPLQISYDSLRSENEKELFKHIACFFVVG-K-DREFTEITLKEC
CAB4089531.1 Lactuca saligna LRTKTEEEWKE LLNNKIWESRGDEIVPALKLSYNDL-FASLKLQFAYCSLFPKDYLFDKKE LILLWMAE

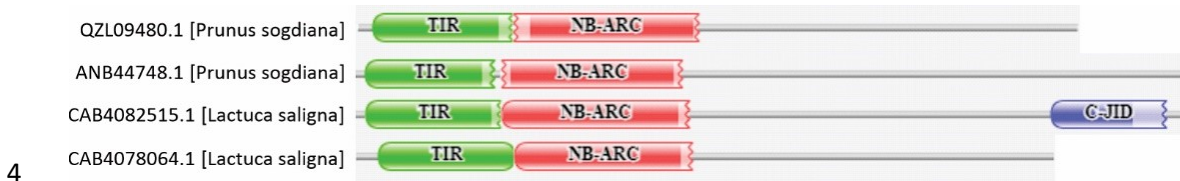
      ....|
QZL09480.1 Prunus sogdiana  GFYATI
ANB44748.1 Prunus sogdiana  GFRAEI
CAB4082515.1 Lactuca saligna  GFDFVI
CAB4078064.1 Lactuca saligna  GFHSVI
CAB4105670.1 Lactuca saligna  GIKTTS
CAB4089531.1 Lactuca saligna  GFLHQ5

```

4  
5  
6

1

2 **Figura 15.** Domínios conservados dos possíveis genes de resistência a *Meloidogyne* em  
3 *Lactuca saligna* comparados com as sequências de referência de *Prunus sogdiana*.

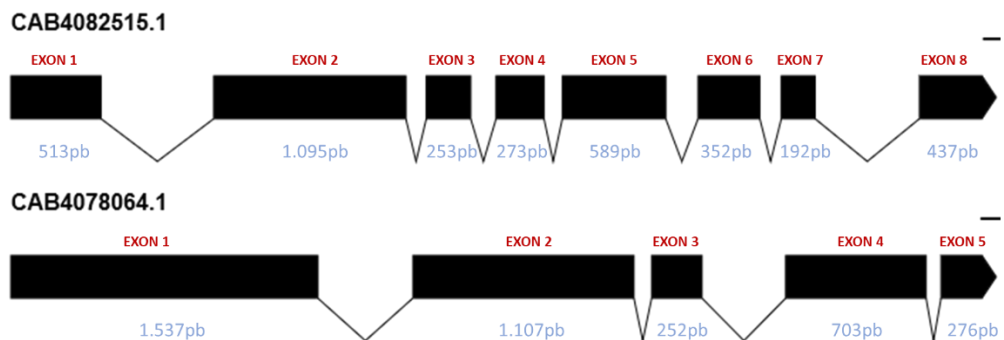


4

5  
6 A alface *L. saligna* tem um genoma dividido em apenas 10 cromossomos,  
7 identificados no banco de dados do NCBI, como os números 0 a 9. O gene  
8 CAB4082515.1 encontra-se no cromossomo 2 e o gene CAB4078064.1 no cromossomo  
9 0. A organização de exons e introns destes genes é bem diferente, o gene CAB4082515.1  
10 possui 8 exons e 7 introns, enquanto o CAB4078064.1 apresenta apenas 5 exons e 4  
11 introns (**Figura 16**).

12

13 **Figura 16.** Diagrama de posição dos genes CAB4082515.1 e CAB4078064.1 indicando  
14 os introns e exons, assim como o tamanho dos exons em pares de bases.



15

16

17 Nos resultados deste trabalho foi possível encontrar 54 genes da categoria NBS-  
18 LRR, sendo 24 de *L. saligna* e 30 de *L. sativa*. No entanto, apenas dois genes, da espécie  
19 *L. saligna*, parecem ser homólogos com outros genes de resistência a *Meloidogyne*,  
20 resultado que é similar ao visto em outras espécies resistentes, onde poucos genes são

1 responsáveis pela resistência. *L. saligna* é uma espécie selvagem. Então é provável que  
2 seja mais resistente do que as cultivares melhoradas.

3 A ativação da defesa da planta para impedir a invasão dos patógenos é realizada  
4 por genes de resistência (R). A classe mais prevalente contém repetições ricas em leucina  
5 (LRRs) e sítio de ligação de nucleotídeos (NBS). Após a colonização da terra pelas  
6 plantas, os genes de resistência NBS-LRR se expandiram nos genomas sugerindo que  
7 esses genes podem ter servido como um dos principais receptores do sistema de defesa  
8 das plantas por milhões de anos (QIAN; WANG; CHEN; LIU *et al.*, 2021). A  
9 caracterização de novos genes R, da classe NBS-LRR, pode auxiliar no melhoramento  
10 genético não só de alface, mas de diversas culturas como arroz, trigo, tomate. E os dois  
11 genes identificados neste trabalho podem ser utilizados em projetos de melhoramento  
12 genético visando à resistência a *Meloidogyne spp.*

13 O envolvimento de genes NBS-LRR na resistência de plantas não só a  
14 *Meloidogyne*, como a outras doenças causadas por vírus, bactérias etc. torna-os os  
15 essenciais para a melhoria da resistência a doenças nas plantas. As informações que são  
16 fornecidas pelos bancos de dados na bioinformática são de suma importância, pois  
17 ajudam a ampliar o conhecimento da interação planta-patógeno, contribuindo  
18 potencialmente para o melhoramento genéticos de plantas.

19

## 20 CONCLUSÃO

21

22 No presente trabalho foram encontrados dois genes da classe NBS-LRR com  
23 potencial de conferir resistência a *Meloidogyne spp* em *Lactuca saligna*. Em *L. sativa*  
24 não foram encontrados genes homólogos a genes de resistência a *Meloidogyne* da classe  
25 NBS-LRR. Contudo, são necessários mais estudos para caracterizar e validar esses dois  
26 possíveis genes de resistência em *Lactuca saligna*. A confirmação da função destes genes



1 de *L. saligna* permitirá a incorporação da resistência ao *Meloidogyne* spp em variedades  
2 comerciais de alface.

3

4

## 5 REFERÊNCIAS

6 ALEKCEVETCH, J. C.; DE LIMA PASSIANOTTO, A. L.; FERREIRA, E. G. C.; DOS  
7 SANTOS, A. B. *et al.* Genome-wide association study for resistance to the *Meloidogyne*  
8 *javanica* causing root-knot nematode in soybean. **Theor Appl Genet**, 134, n. 3, p. 777-  
9 792, Mar 2021.

10

11 CHANGKWIAN, A.; VENKATESH, J.; LEE, J. H.; HAN, J. W. *et al.* Physical  
12 Localization of the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Resistance Locus Me7  
13 in Pepper (*Capsicum annuum*). **Front Plant Sci**, 10, p. 886, 2019.

14

15 CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J. *et al.* Blast2GO: a  
16 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.  
17 **Bioinformatics**, 21, n. 18, p. 3674-3676, Sep 15 2005.

18

19 CORREIA, E. C. S. S.; SILVA, N.; COSTA, M. G. S.; WILCKEN, S. R. S. Response of  
20 lettuce cultivars to *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* race 1 and 21.  
21 **Revista Ciência Agronômica**, 50, p. 100-106, 2019.

22

23 DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host  
24 defense. **Nat Immunol.**, 7, p. 1243–1249, 2006.

25

26 EL-SAPPAH, A. H.; M, M. I.; H, H. E.-A.; YAN, S. *et al.* Tomato Natural Resistance  
27 Genes in Controlling the Root-Knot Nematode. **Genes (Basel)**, 10, n. 11, Nov 14 2019.

28

29 FILHO, J. L. S. d. C.; GOMES, L. A. A.; WESTERICH, J. N.; MALUF, W. R. *et al.*  
30 INHERITANCE OF RESISTANCE OF ‘SALINAS 88’ LETTUCE TO THE  
31 ROOTKNOT NEMATODE *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood.  
32 **Revista Brasileira de Agrociência**, 2, 14, p. 279-289, 2008.

33

34 GUIMARAES, P. M.; GUIMARAES, L. A.; MORGANTE, C. V.; SILVA, O. B., Jr. *et al.*  
35 Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode  
36 Resistance. **PLoS One**, 10, n. 10, p. e0140937, 2015.

37

38 HADA, A.; DUTTA, T. K.; SINGH, N.; SINGH, B. *et al.* A genome-wide association  
39 study in Indian wild rice accessions for resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne*  
40 *graminicola*. **PLoS One**, 15, n. 9, p. e0239085, 2020.

41

42 HAJIHASSANI, A.; RUTTE, W. B.; LUO, X. Resistant Pepper Carrying N, Me1, and  
43 Me3 have Different Effects on Penetration and Reproduction of Four Major *Meloidogyne*  
44 species. **JOURNAL OF NEMATOLOGY**, 51, p. 1-9, 2019.

45

- 1 KASMI, F. E. How activated NLRs induce anti-microbial defenses in plants.  
2 **Biochemical Society Transactions**, 49, n. 5, p. 2177–2188, 2021.
- 3
- 4 KAUR, P.; MITKOWSKI, N. A. Evaluation of *Lactuca* Germplasm for Resistance to the  
5 Northern Root-knot Nematode. **International Journal of Vegetable Science**, 17, p. 26-  
6 36, 2011.
- 7
- 8 KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics  
9 Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, 33, n. 7, p. 1870-1874, Jul  
10 2016.
- 11
- 12 MARONE, D.; RUSSO, M. A.; LAIDO, G.; DE LEONARDIS, A. M. *et al.* Plant  
13 nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host  
14 defense responses. **Int J Mol Sci**, 14, n. 4, p. 7302-7326, Apr 2 2013.
- 15
- 16 QIAN, L. H.; WANG, Y.; CHEN, M.; LIU, J. *et al.* Genome-wide Identification and  
17 Evolutionary Analysis of NBS-LRR Genes From *Secale cereale*. **Front Genet**, 12, p.  
18 771814, 2021.
- 19
- 20 RYDER, E. J. Salinas 88' Lettuce. **HORTSCIENCE**, 26, p. 439-440, 1991.
- 21
- 22 SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
23 phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, 4, n. 4, p. 406-425, Jul 1987.
- 24
- 25 SI, Z.; QIAO, Y.; ZHANG, K.; JI, Z. *et al.* Genome-wide identification and  
26 characterization of NBS-encoding genes in the sweet potato wild ancestor *Ipomoea trifida*  
27 (H.B.K.). **Open Life Sci**, 17, n. 1, p. 497-511, 2022.
- 28
- 29 SONG, H.; GUO, Z.; HU, X.; QIAN, L. *et al.* Evolutionary balance between LRR domain  
30 loss and young NBS-LRR genes production governs disease resistance in *Arachis*  
31 *hypogaea* cv. Tifrunner. **BMC Genomics**, 20, n. 1, p. 844, Nov 13 2019.
- 32
- 33 XIAO, K.; ZHU, H.; ZHU, X.; LIU, Z. *et al.* Overexpression of PsoRPM3, an NBS-LRR  
34 gene isolated from myrobalan plum, confers resistance to *Meloidogyne incognita* in  
35 tobacco. **Plant Mol Biol**, 107, n. 3, p. 129-146, Oct 2021.
- 36
- 37 ZHANG, W.; YUAN, Q.; WU, Y.; ZHANG, J. *et al.* Genome-Wide Identification and  
38 Characterization of the CC-NBS-LRR Gene Family in Cucumber (*Cucumis sativus* L.).  
39 **Int J Mol Sci**, 23, n. 9, May 2 2022.

### 3.0 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram encontrados dois genes da classe NBS-LRR com potencial de conferir resistência a *Meloidogyne* spp em *Lactuca saligna*. Em *L. sativa* não foram encontrados genes homólogos a genes de resistência a *Meloidogyne* desta classe. Contudo, são necessários mais estudos para caracterizar e validar esses dois possíveis genes de resistência em *Lactuca saligna*. A confirmação da função destes genes de *L. saligna* permitirá a incorporação da resistência ao *Meloidogyne* spp em variedades comerciais de alface.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Mol Plant Pathol**, 4, n. 4, p. 217-224, Jul 1 2003.
- AGUIAR, A. T. d. E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; TUCCI, M. L. S. A. *et al.* **Instituições Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**. 2014. 460 p. 0375-1538.
- CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L. *et al.* Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **J Plant Physiol**, 165, n. 1, p. 104-113, Jan 2008.
- CARVALHO, I. D. E.; FILHO, J. L. S. C.; PEREIRA, C. C. A.; COSTA, D. S. *et al.* Performance of Lettuce Cultivars of Inoculum of Nematode. **Journal of Experimental Agriculture International**, 24, n. 4, p. 1-7, 2018.
- CHADHA, A.; FLORENTINE, S. Biology, Ecology, Distribution and Control of the Invasive Weed, *Lactuca serriola* L. (Wild Lettuce): A Global Review. **Plants (Basel)**, 10, n. 10, Oct 11 2021.
- DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nat Immunol.**, 7, p. 1243–1249, 2006.
- EL-SAPPAH, A. H.; M, M. I.; H, H. E.-A.; YAN, S. *et al.* Tomato Natural Resistance Genes in Controlling the Root-Knot Nematode. **Genes (Basel)**, 10, n. 11, Nov 14 2019.
- FERTET, A.; GRAINDORGE, S.; KOEHLER, S.; DE BOER, G. J. *et al.* Sequence of the Mitochondrial Genome of *Lactuca virosa* Suggests an Unexpected Role in *Lactuca sativa*'s Evolution. **Front Plant Sci**, 12, p. 697136, 2021.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV: 2000. 402 p. 85-7269-065-4.
- HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de Alface Cultivados no Brasil**. 2009. 1-7 p. 1414-9850.
- ISHIDA, T.; SUZUKI, R.; NAKAGAMI, S.; KUROHA, T. *et al.* Root-knot nematodes modulate cell walls during root-knot formation in *Arabidopsis* roots. **J Plant Res**, 133, n. 3, p. 419-428, May 2020.
- KIM, K. S.; VUONG, T. D.; QIU, D.; ROBBINS, R. T. *et al.* Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. **Theor Appl Genet**, 129, n. 12, p. 2295-2311, Dec 2016.
- KIM, M. J.; MOON, Y.; TOU, J. C.; MOU, B. *et al.* Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, 49, p. 19-34, 2016.

KITNER, M.; LEBEDA, A.; DOLEŽALOVÁ, I.; MARAS, M. *et al.* AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. **Israel Journal of Plant Sciences**, 56, p. 185–193, 2008.

LEBEDA, A.; KŘÍSTKOVÁ, E.; KITNER, M.; MIESLEROVÁ, B. *et al.* Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. **European Journal of Plant Pathology, Dordrecht**, 138, p. 597-640, 2014.

LIFE, E. O. **Least Lettuce (*Lactuca saligna* L.)**. 2022. Disponível em: <https://eol.org/pages/468143>. Acesso em: 13/05/22.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da Alface**. 2010. 1-70 p. 978-85-86413-20-9.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? An introduction and overview. **Yearbook of Medical Informatics**, p. 83-99, 2001.

MARONE, D.; RUSSO, M. A.; LAIDO, G.; DE LEONARDIS, A. M. *et al.* Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses. **Int J Mol Sci**, 14, n. 4, p. 7302-7326, Apr 2 2013.

MARQUES, F. G. **Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii***. 2016. 121 f. (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

MCHALE, L.; TAN, X.; KOEHL, P.; MICHELMORE, R. W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biol**, 7, n. 4, p. 212, 2006.

MEJIAS, J.; TRUONG, N. M.; ABAD, P.; FAVERY, B. *et al.* Plant Proteins and Processes Targeted by Parasitic Nematode Effectors. **Front Plant Sci**, 10, p. 970, 2019.

MIKEL, M. A.; CARVER, R. J. Genealogy of Contemporary North American Lettuce. **HORTSCIENCE**, 42, p. 489–493, 2007.

MITIKU, M. Plant-Parasitic Nematodes and Their Management: A Review. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, 8, p. 34-42, 2018.

MOTA, F. C. **Análise de fontes de resistência do algodoeiro a *Meloidoyne incognita* raça 3 e caracterização histopatológica da interação planta-nematoide**. 2010. 83 f. - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília.

MOU, B. Nutritional Quality of Lettuce **Current Nutrition & Food Science**, 3, 8, p. 177-187, 2012.

NIU, J.; LIU, P.; LIU, Q.; CHEN, C. *et al.* Msp40 effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. **Sci Rep**, 6, p. 19443, Jan 22 2016.

PESSOA, H. P.; JUNIOR, R. M. **Folhosas : Em destaque no cenário nacional**. Revista campo e negócios, 2021. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional/>. Acesso em: 29/06/2022.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F. d.; RODRIGUES, C. d. S. *et al.* Manejo de nematoides na cultura da alface. **Embrapa Hortaliças** 124, p. 1-8, 2013.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. Manejo de nematoides na cultura do tomate. **Embrapa Circular Técnica** 132, p. 1-12, 2014.

PRZYBYLSKA, A.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Plant defense responses in monocotyledonous and dicotyledonous host plants during root-knot nematode infection. **Plant Soil**, 451, p. 239-260, 2020.

RALMI, N. H. A. A.; KHANDAKER, M. M.; MAT, N. Occurrence and control of root knot nematode in crops: A review. **Australian Journal of Crop Science**, 12, p. 1649-1654, 2016.

RAWAL, S. A Review On Root-Knot Nematode Infestation and its management practices through different approaches in tomato. **Tropical Agroecosystems (TAEC)**, 1, p. 92-96, 2020.

RIBEIRO, D. G.; MOTA, A. P. Z.; SANTOS, I. R.; ARRAES, F. B. M. *et al.* NBS-LRR-WRKY genes and protease inhibitors (PIs) seem essential for cowpea resistance to root-knot nematode. **J Proteomics**, 261, p. 104575, Jun 15 2022.

ROHDE, R. A. EXPRESSION OF RESISTANCE IN PLANTS TO NEMATODES. **Rev. Phytopathology**, 10, p. 233-252, 1972.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. d. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, 30, p. 187-194, 2012.

SHAO, Z. Q.; XUE, J. Y.; WANG, Q.; WANG, B. *et al.* Revisiting the Origin of Plant NBS-LRR Genes. **Trends Plant Sci**, 24, n. 1, p. 9-12, Jan 2019.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M. P.; GUERREIRO--FILHO, O.; GONÇALVES, W. Expressão de genes de resistência em resposta à infecção por nematóides. **Embrapa Café**, p. 1-4, 2005.

SINGH, V. K.; SINGH, A. K.; CHAND, R.; KUSHWAHA, C. ROLE OF BIOINFORMATICS IN AGRICULTURE AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT **International Journal of Bioinformatics Research**, 3, n. 2, p. 221-226, 2011.

SOUSAI, C. S. d.; BONETTI, A. M.; FILHO, L. R. G.; MACHADO, J. R. d. A. *et al.* Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Instituto Agrônomo de Campinas**, 66, p. 11-16, 2007.

VAN DER PUTTEN, W. H.; COOK, R.; COSTA; DAVIES, S. K. G. *et al.* NEMATODE INTERACTIONS IN NATURE: MODELS FOR SUSTAINABLE CONTROL OF NEMATODE PESTS OF CROP PLANTS? **Advances in Agronomy**, 89, p. 227-260, 2006.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade**. 2014. 282 p. 978-85-69288-00-8.

WEHNER, T. C. Vegetable cultivar descriptions for North America List 24. **HortScience**, 34, p. 763-806, 1999.

ZINOVIEVA, S. V. Co-adaptation mechanisms in plant-nematode systems. **Parazitologiya**, 48, n. 2, p. 110-130, Mar-Apr 2014.

## **ANEXO 1 - NORMAS DA REVISTA PESQUISA AGROPECUÁRIA TROPICAL**

### **Informação para Autores**

Pesquisa Agropecuária Tropical (PAT) é o periódico científico editado pela Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, em versão eletrônica (e-ISSN 1983-4063). Destina-se à publicação de Artigos Científicos cuja temática tenha aplicação direta na agricultura tropical. A submissão de Notas Técnicas e Comunicações Científicas não é aceita e Artigos de Revisão somente são publicados a convite do Conselho Editorial. Também não é aceita a submissão de manuscritos já publicados em anais de congressos ou depositados em servidores preprint.

A submissão de trabalhos é gratuita e deve ser feita exclusivamente via sistema eletrônico, acessível por meio do endereço <https://www.revistas.ufg.br/pat>. Os autores devem cadastrar-se no sistema e manifestar, por meio de documento (ver sugestão de modelo) assinado por todos, escaneado e inserido no sistema como documento suplementar (mesmo local onde foi inserido o texto do artigo, cabeçalho “Outros”, sempre preservando o histórico), anuência acerca da submissão e do conhecimento da política editorial e diretrizes para publicação na revista PAT (caso os autores morem em cidades diferentes, mais de um documento suplementar pode ser inserido no sistema, pelo autor correspondente). Os dados de todos os autores devem ser inseridos no sistema (ao clicar na opção "Incluir coautor", no ato da submissão, novos campos se abrirão).

A revista PAT recomenda a submissão de artigos com, no máximo, 5 (cinco) autores. A partir deste número, uma descrição detalhada da contribuição de cada autor deve ser encaminhada ao Conselho Editorial (nota: a mera participação na tomada de dados, ou apoio de natureza infraestrutural, não justifica autorias, embora possa merecer crédito na seção Agradecimentos). Após a submissão, não será permitida a inclusão de novos coautores.

Durante a submissão on-line, o autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os autores, a originalidade do trabalho, a sua não submissão a outro periódico, a conformidade com as características de formatação requeridas para os arquivos de dados, bem como a concordância com os termos da Declaração de Direito Autoral, que se aplicará em caso de publicação do trabalho. Se o trabalho envolveu diretamente animais ou seres humanos como



sujeitos da pesquisa, deve-se comprovar a sua aprovação prévia por um comitê de ética em pesquisa. Caso haja fontes potenciais de conflito de interesse (qualquer interesse ou relacionamento, financeiro ou não, que possa influenciar nos resultados de uma pesquisa; por exemplo, financiamento proveniente de uma entidade comercial, interesse comercial na publicação, participação em conselho de administração ou comitê consultivo de uma empresa ligada diretamente à pesquisa, patentes concedidas ou pedidos pendentes), os autores devem reportá-las, sob pena de rejeição do manuscrito, ou outras sanções cabíveis. Por fim, deve-se incluir os chamados metadados (informações sobre os autores e sobre o trabalho, tais como título, resumo, palavras-chave - somente no idioma do manuscrito) e transferir os arquivos com o manuscrito e documento suplementar (anuência dos Autores).

Os trabalhos podem ser escritos em português ou inglês, entretanto, serão publicados apenas em Inglês. Logo, em caso de submissão em português e aprovação para publicação, a versão final do manuscrito deverá ser traduzida por especialista em Língua Inglesa (preferencialmente falante nativo), sendo que a tradução ficará a cargo dos autores, sem qualquer ônus para a revista.

Os manuscritos devem ser apresentados em até 18 páginas. O texto deve ser editado em Word for Windows (tamanho máximo de 2MB, versão .doc) e digitado em página tamanho A-4 (210 mm x 297 mm), com margens de 2,5 cm, em coluna única e espaçamento duplo entre linhas (inclusive para tabelas, cabeçalhos, rodapés e referências). A fonte tipográfica deve ser Times New Roman, corpo 12. O uso de destaques como negrito e sublinhado deve ser evitado. Todas as páginas e linhas devem ser numeradas. Os manuscritos submetidos à revista PAT devem, ainda, obedecer às seguintes especificações:

**1.** Os Artigos Científicos devem ser estruturados na ordem: Título (máximo de 20 palavras); Resumo (máximo de 250 palavras; um bom resumo primeiro apresenta o problema para, depois, apresentar os objetivos do trabalho); Palavras-chave (no mínimo, três palavras, e, no máximo, cinco, separadas por vírgula); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; e Referências. Título, Resumo e Palavras-chave podem ser apresentados apenas no idioma do manuscrito, neste estágio. Chamadas relativas ao título do trabalho e os nomes dos Autores, com suas afiliações e endereços (incluindo e-mail) em notas de rodapé, bem como agradecimentos, somente devem ser inseridos na versão final corrigida do manuscrito, após sua aceitação definitiva para publicação.

2. As citações devem ser feitas no sistema "autor-data". Apenas a inicial do sobrenome do Autor deve ser maiúscula e a separação entre Autor e ano é feita somente com um espaço em branco. Ex.: (Gravena 1984, Zucchi 1985). O símbolo "&" deve ser usado no caso de dois autores e, em casos de três ou mais, "et al.". Ex.: (Gravena & Zucchi 1987, Zucchi et al. 1988). Caso o(s) autor(es) seja(m) mencionado(s) diretamente na frase do texto, utiliza-se somente o ano entre parênteses. Citações de citação (citações secundárias) devem ser evitadas, assim como as seguintes fontes de informação: artigo em versão preliminar (no prelo ou preprint) ou de publicação seriada sem sistema de arbitragem; resumo de trabalho ou painel apresentado em evento científico; comunicação oral; informações pessoais; comunicação particular de documentos não publicados, de correios eletrônicos, ou de sites particulares na Internet.

3. As referências devem ser organizadas em ordem alfabética, pelos sobrenomes dos Autores, de acordo com a norma NBR 6023:2018, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com a seguinte adequação: não é necessária a inclusão da cidade após os títulos de periódicos. Os destaques para títulos devem ser apresentados em itálico e os títulos de periódicos não devem ser abreviados.

4. As tabelas (também com corpo 12 e espaçamento duplo) e figuras, dispostas no decorrer do texto, devem ser identificadas numericamente, com algarismos arábicos, e receber chamadas no texto. As tabelas devem ser editadas em preto e branco, com traços simples e de espessura 0,5 ponto (padrão Word for Windows), e suas notas de rodapé exigem chamadas numéricas. Expressões como "a tabela acima" ou "a figura abaixo" não devem ser utilizadas. As figuras devem ser apresentadas com resolução mínima de 300 dpi.

5. A consulta a trabalhos recentemente publicados na revista PAT (<https://www.revistas.ufg.br/pat>) é uma recomendação do corpo de editores, para dirimir dúvidas sobre estas instruções e, conseqüentemente, agilizar a publicação.

6. Os Autores não serão remunerados pela publicação de trabalhos na revista PAT, pois devem abrir mão de seus direitos autorais em favor deste periódico. Os conteúdos publicados, contudo, são de inteira e exclusiva responsabilidade de seus Autores, ainda que reservado aos Editores o direito de proceder a ajustes textuais e de adequação às normas da publicação. Por outro lado, os Autores ficam autorizados a publicar seus artigos, simultaneamente, em repositórios da instituição de sua origem, desde que citada a fonte da publicação original na revista PAT. Ainda,

visando assegurar a preservação, permitir a reutilização e atestar a reprodutibilidade das conclusões de cada estudo publicado, o Comitê Editorial recomenda e estimula a publicação em repositórios públicos, pelos autores, dos dados de pesquisa e/ou códigos de programação utilizados na análise dos dados, explicitando sua vinculação à publicação na revista PAT.