

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CAMPUS PATOS DE MINAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DANIELA BARBOSA BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR LIGADO A RESISTÊNCIA
AO NEMATÓIDE DAS GALHAS EM ALFACE**

PATOS DE MINAS – MG

2024

DANIELA BARBOSA BORGES

**DESENVOLVIMENTO MARCADOR MOLECULAR LIGADO A RESISTÊNCIA AO
NEMATOIDE DAS GALHAS EM ALFACE**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira.

PATOS DE MINAS – MG

2024

DANIELA BARBOSA BORGES

Desenvolvimento de marcador molecular ligado a resistência ao nematoide das galhas em alface.

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira - IBTEC - UFU
Presidente

Profa. Dra. Enyara Rezende Morais - IBTEC - UFU
Membro

Prof. Dr. Luiz Antônio A. Gomes - UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas-MG, 07 de novembro de 2024.

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça que se destaca pela significativa importância econômica entre as hortaliças folhosas. No Brasil, a ocorrência de nematoides do gênero *Meloidogyne* tem se constituído em um dos principais problemas para a cultura da alface, reduzindo significativamente sua produtividade. Um método mais eficiente, seguro e de baixo custo de controle de nematoides é o desenvolvimento de cultivares resistentes, que pode ser assistido por marcadores moleculares do tipo *Simple Sequence Repeat* (SSR). O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcador molecular SSR ligado a resistência ao nematoide das galhas (*M. incognita*) em alface. Para isso, foi realizado o cruzamento entre a cultivar Regina 71 (genitor feminino, suscetível ao *M. incognita*) e a cultivar Salinas 88 (genitor masculino, resistente ao *M. incognita*), obtendo uma planta da geração F₁, que autofecundada foram obtidas 121 plantas da geração F₂. Os DNAs de todos os indivíduos foram extraídos, quantificados e qualificados. Vinte e dois *primers* SSR pré-selecionados foram utilizados para amplificar, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o DNA dos parentais e identificar polimorfismos. Desses, dois *primers* polimórficos foram utilizados para amplificar os DNAs das plantas F₂ e avaliar a ligação entre as marcas moleculares e a associação entre as marcas e a resistência. O método de extração se mostrou eficiente para obter DNA em quantidade e qualidade para as análises moleculares. A análise de máxima verossimilhança obteve valor de recombinação igual a 0,428 e valor de LOD score de 0.253807, mostrando não haver ligação entre as marcas moleculares. A análise de variância mostrou que não houve associação entre as marcas moleculares e a resistência. Mesmo não obtendo marcador para a resistência ao nematoide, a pesquisa pode ter continuidade com a obtenção de novas marcas moleculares utilizando *primers* avaliados neste trabalho e que mostraram polimorfismos entre os parentais.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L. *Meloidogyne incognita*. Microsatélite.

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a vegetable that stands out for its significant economic importance among leafy vegetables. In Brazil, the occurrence of nematodes of the genus *Meloidogyne* has been one of the main problems for lettuce cultivation, significantly reducing its productivity. A more efficient, safe and low-cost method of controlling nematodes is the development of resistant cultivars, which can be assisted by molecular markers of the Simple Sequence Repeat (SSR) type. The objective of this work was to develop SSR molecular marker linked to resistance to root-knot nematode (*M. incognita*) in lettuce. To this end, a cross was carried out between the cultivar Regina 71 (female parent, susceptible to *M. incognita*) and the cultivar Salinas 88 (male parent, resistant to *M. incognita*), obtaining a plant of the F₁ generation, which, when self-fertilized, resulted in 121 F₂ generation plants. The DNA of all individuals was extracted, quantified and qualified. Twenty-two pre-selected SSR primers were used to amplify, via PCR (Polymerase Chain Reaction), the parental DNA and identify polymorphisms. Of these, two polymorphic primers were used to amplify the DNAs of F₂ plants and evaluate the link between the molecular marks and the association between the marks and resistance. The extraction method proved to be efficient in obtaining DNA in quantity and quality for molecular analysis. The maximum likelihood analysis obtained a recombination value of 0.428 and a LOD score of 0.253807, showing that there is no connection between the molecular marks. Analysis of variance showed that there was no association between molecular marks and resistance. Even without obtaining a marker for resistance to the nematode, the research can continue with the obtaining of new molecular marks using primers evaluated in this work and which showed polymorphisms between the parents.

Keywords: *Lactuca sativa* L. *Meloidogyne incognita*. Microsatellite.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Material Biológico	10
3.2 Desenvolvimento do Marcador Molecular	10
3.2.1 Liofilização das folhas	10
3.2.2 Extração de DNA	10
3.2.3 Obtenção do Marcador SSR	11
3.2.4 Construção do mapa molecular e associação à resistência	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1 Quantificação e Qualificação do DNA Extraído	13
4.2 Obtenção do Marcador.....	15
4.2.1 Teste de seleção dos <i>primers</i>	15
4.2.2 Construção do mapa molecular e associação com a resistência.....	18
4.2.2.1 Qui-quadrado.....	18
4.2.2.2 Mapa de ligação e associação à resistência	18
5 CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa L.*) apresenta aspectos nutricionais essenciais para o consumo humano por apresentar propriedades que são reconhecidas como benéficas à saúde devido ao alto teor de vitamina C, polifenóis e fibras (SHATILOV et al., 2019). Além disso, a hortaliça destaca-se pela significativa importância econômica entre as hortaliças folhosas, ocupando uma área de produção no Brasil de 86.900 hectares, sendo o estado de São Paulo o principal produtor (GÓIS et al., 2024). Na safra de verão 2023/24, a área ainda deve crescer 7,5 % em relação à de 2022/23, tendo em vista o maior investimento em material genético resistente (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI&FRUIT, 2023).

No Brasil, a ocorrência de nematoides do gênero *Meloidogyne* tem se constituído em um dos principais problemas para a cultura da alface, reduzindo significativamente sua produtividade, visto que a maioria das cultivares é suscetível ao nematoide, o que ocasiona um aumento de suas populações nas áreas e inviabiliza plantios subsequentes (ASSUNÇÃO et al., 2021). A infestação de nematoides das galhas leva a um padrão de crescimento lento e atrofiado nas plantas, dificulta o desenvolvimento das raízes, clorose, galhas nas raízes e murcha. A infestação severa geralmente resulta na destruição das raízes, crescimento comprometido e redução do rendimento das culturas (YASEEN et al., 2024). Dentre os métodos de controle disponíveis, os nematicidas não são recomendados, pois a alface é uma hortaliça folhosa com ciclo vegetativo muito curto (PINHEIRO et al., 2020). Portanto, o método mais eficiente, seguro e de baixo custo de controle de nematoides é o desenvolvimento de cultivares resistentes por meio do melhoramento genético.

Os objetivos dos programas de melhoramento devem ser baseados na seleção de genótipos que tenham alto potencial produtivo, estabilidade e adaptabilidade a condições ambientais adversas (PORT et al., 2024). De acordo com Carvalho Filho e colaboradores (2009), além de acelerar o processo de florescimento, temperaturas mais altas também favorecem o desenvolvimento de nematoides, especialmente *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Assim, a cultivar Regina 71 tem sido utilizada para esse fim em programas de melhoramento, como fonte de tolerância ao calor, no entanto ela é suscetível ao nematoide, sendo necessário adicionar outros genótipos. A reação de resistência de cultivares de alface tipo americana ao *M. incognita* demonstrou que as cultivares Salinas 88 entre outras, foram consideradas fontes de resistência promissoras para esse nematoide (CARVALHO FILHO, 2012). Outro estudo de Carvalho Filho, Gomes e Maluf (2009) mostrou que a utilização das

progênes resultantes do cruzamento entre essas cultivares permite antever a possibilidade de sucesso na obtenção de linhagens de alface de folhas lisas resistentes ao calor, aos nematoides das galhas e ao *Lettuce Mosaic Virus* (LMV).

Embora existam pesquisas que indicam a viabilidade do estudo, é inegável a necessidade de empregar métodos que permitam distinguir claramente as características de interesse, como a aplicação de técnicas de melhoramento molecular. Esse pode ser definido em um sentido amplo como o uso de manipulação genética realizada em níveis moleculares de DNA para melhorar caracteres de interesse em plantas e animais, incluindo engenharia genética ou manipulação genética, seleção assistida por marcadores moleculares, seleção genômica, entre outros. Mais frequentemente, no entanto, o melhoramento molecular implica melhoramento assistido por marcadores moleculares e é definido como a aplicação de biotecnologias moleculares, especificamente marcadores moleculares, em combinação com mapas de ligação e genômica, para alterar e melhorar características de plantas ou animais com base em ensaios genotípicos (JIANG, 2013).

Informações de marcadores moleculares têm sido utilizadas em programas de melhoramento de diferentes espécies, juntamente com informações fenotípicas. Eles têm se provado ferramentas valiosas para caracterizar espécies, especialmente quando indivíduos morfológicamente semelhantes e com potencial agrônômico precisam ser distinguidos (SIMIANER, 2016; OLIVEIRA T. C. et al., 2023). Segundo trabalhos, como o de Oliveira A. J. e colaboradores (2023), determinar a variabilidade genética de uma amostra populacional para o melhoramento, por meio de marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeat*), ajuda a identificar genótipos com características desejáveis para o desenvolvimento de novas cultivares.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares apresentam vantagens e desvantagens dependendo da proximidade que os indivíduos a serem analisados apresentam, logo, o quanto mais próximo for os elementos, mais discriminatória deverá ser a técnica escolhida nessa abordagem molecular. Os marcadores SSR são considerados um marcador de escolha, pois são codominantes, com alta reprodutibilidade e maior abundância do genoma, e podem ser usados de forma eficiente em estudos de mapeamento de plantas. Os SSRs representam a menor repetição por loco com maior nível de polimorfismo. Este alto nível de polimorfismo é devido à ocorrência de vários números de repetições em regiões de microssatélites e pode ser detectado com facilidade por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (NADEEM et al., 2017).

Diversos tipos de marcadores moleculares já foram efetivamente utilizados no melhoramento de alface e em estudos genéticos anteriores, porém somente um número limitado

de marcadores baseados em microssatélites está disponível publicamente. No artigo de Rauscher e Simko (2013) foi descrito um método de bibliotecas de microssatélites enriquecidas para apresentar marcadores SSR genômicos. Os marcadores SSR genômicos desenvolvidos em 2013 foram adicionados ao conjunto de marcadores EST-SSRs desenvolvidos anteriormente. Esses dois tipos de marcadores baseados em SSR fornecem ferramentas úteis para impressão digital de cultivares de alface, desenvolvimento de mapas de ligação molecular integrados e mapeamento de genes (RAUSCHER; SIMKO, 2013).

Segundo o trabalho de Hong et al. (2015), os marcadores de DNA têm muitas vantagens para identificar cultivares devido à sua independência de influências ambientais. A União para a Proteção de Novas Variedades de Plantas (UPOV) sugere que os marcadores de repetição de sequência simples (SSR) são adequados para um banco de dados de perfis de DNA devido à sua natureza multialélica, reprodutibilidade, alto polimorfismo, fácil automação e herança codominante. Sendo assim, os objetivos do estudo de Hong et al. (2015) foram construir um banco de dados de marcadores de sequência expressa (EST)-repetição de sequência simples (SSR) para identificar cultivares de alface. Este estudo também afirma que esses marcadores EST-SSR podem ser usados para selecionar cultivares semelhantes por meio do gerenciamento da coleção de referência para complementar o teste de distinção de cultivares de alface.

Os artigos descritos acima foram usados como base para selecionar os *primers* para a presente pesquisa, levando em conta a localização nos grupos de ligações representando o genoma da alface, tornando viável a análise para identificar loco de resistência.

2 OBJETIVO

Desenvolver marcador molecular SSR ligado a resistência ao nematoide das galhas (*M. incognita*) em alface.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas: obtenção do material biológico e desenvolvimento dos marcadores moleculares. A primeira etapa foi desenvolvida na casa de vegetação no Centro

de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Fazenda Palmital, localizada no município de Ijaci-MG e no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras. A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus de Patos de Minas.

3.1 Material Biológico

Nesta etapa foi realizado o cruzamento entre a cultivar Regina 71 (genitor feminino e suscetível ao *M. incognita*) e a cultivar Salinas 88 (genitor masculino e resistente ao *M. incognita*), obtendo uma planta da geração F₁. Em seguida, por meio da autofecundação natural dessa planta F₁, foi obtida a geração F₂. Uma planta de cada genitor, uma planta da geração F₁ e 121 plantas da geração F₂ foram utilizadas para a coleta de folhas jovens. Imediatamente após a coleta, as folhas foram colocadas em saquinhos plásticos e enviadas, dentro de uma caixa térmica com gelo, para a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas.

As plantas de todas as gerações utilizadas no estudo foram avaliadas quanto a resistência ao *M. incognita*.

3.2 Desenvolvimento do Marcador Molecular

3.2.1 Liofilização das folhas

Assim que as amostras de folhas chegaram ao LAGEM em Patos de Minas foram armazenadas em um ultra-freezer (-80 °C) e em seguida liofilizadas (Liofilizador L101 Liotop) por 72 horas. As amostras liofilizadas foram trituradas manualmente em almofariz e pistilo, o pó acondicionado em microtubos de 2 mL, devidamente identificados, e guardados em ambiente seco para posterior extração do DNA e obtenção dos marcadores moleculares.

3.2.2 Extração de DNA

O DNA de cada amostra foi extraído separadamente, seguindo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), modificado com a adição de bissulfito de sódio, carvão ativo e polivinilpirrolidone (PVP).

Uma solução de extração foi preparada contendo tampão de extração (0,35 M de sorbitol, 0,10 M de tris base, 5 mM EDTA Na₂ e pH 7,5), tampão de lise (0,2 M de tris base, 0,05 M EDTA Na₂, 2 M NaCl e 2 % CTAB), 0,02 M de bissulfito de sódio, 1 g/L de carvão ativo e 1,5 % de polivinilpirrolidone (PVP). Dessa solução foi adicionada 1,5 mL em cada microtubo contendo 72 mg do pó de cada amostra das folhas liofilizadas. Em seguida, os microtubos foram agitados no vortex por 30 segundos e colocados em banho maria (Banho Ultratermostático SL152 Solab) a 65 °C por 60 minutos, sendo invertidos de 15 em 15 minutos. Depois de 60 minutos no banho maria, os microtubos foram retirados e colocados em repouso até alcançarem a temperatura ambiente.

Em sequência, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (Centrífuga Refrigerada LOBOV Científica) a 15.000 rpm por cinco minutos, os sobrenadantes transferidos para outros microtubos do mesmo volume e adicionado o mesmo volume de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1) ao sobrenadante. Durante 15 minutos, os tubos foram invertidos manualmente até a obtenção de uma solução uniforme, seguida pela centrifugação a 15000 rpm por 5 minutos. Após essa etapa, os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros microtubos do mesmo volume, onde foi adicionado o mesmo volume de álcool isoamílico, invertendo os tubos até a obtenção de uma solução uniforme. O material foi mantido durante a noite em um freezer a -20 °C. Depois submetido a uma nova centrifugação a 15000 rpm por cinco minutos. O excesso foi descartado, os pellets foram lavados com álcool 70 % e então foram resuspendidos em 200 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; + EDTA 1 mM).

Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume (L-Quant®, Loccus Biotecnologia), nas faixas de 260 e 280 nm. Em seguida, 4 µL de cada amostra de DNA foi utilizada para a qualificação, sendo preparada com a adição de 2 µL de azul de bromofenol e 2 µL do corante GelRed (Uniscience do Brasil Ltda). As amostras de DNA preparadas e o marcador de peso molecular de 1 Kb foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 0,8 % e corrida a 80 volts por uma hora. Os resultados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados em fotodocumentador (L.PIX, Loccus Biotecnologia).

Depois de confirmar a concentração e integridade do DNA, as amostras foram diluídas de forma padronizada para 10 ng/µL e em seguida armazenadas no freezer a - 20 °C para análises posteriores.

3.2.3 Obtenção do Marcador SSR

As reações de SSR foram realizadas com *primers* pré-selecionados de acordo com os artigos de Rauscher e Simko (2013) e Hong et al. (2015), sendo escolhidos os *primers* que representassem todos os grupos de ligações da alface.

Os *primers* foram utilizados para o teste de amplificação via PCR com os parentais para determinar quais *primers* resultavam em diferenças significativas entre as bandas das amostras resistentes e suscetíveis.

Para as amplificações via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram usados o material genético de cada amostra e um mix com os seguintes reagentes: o *primer* selecionado, dNTPs, MgCl₂ (cofator da enzima Taq DNA polimerase), tampão, água ultrapura e a enzima Taq DNA polimerase (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição dos reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na composição do mix para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Componentes da reação e respectivas concentrações iniciais	Concentração final	1 reação (μL)
DNA (10,0 ng/ μL)	20 ng	2
Primer (10 μM)	0,2 Mm	0,2
dNTPs (10 mM)	0,25 Mm	0,25
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 Mm	0,3
Tampão (10X)	1 X	1
Taq (5 U/μL)	1 U	0,2
H ₂ O	-	6,05
Total		10

A visualização dos resultados foi realizada após eletroforese em gel de agarose 2,5 %, em aparato horizontal, com tampão TBE 1X. Os resultados do gel de agarose foram observados com o auxílio de um fotodocumentador (L.PIX, Loccus Biotecnologia).

Os *primers* selecionados foram utilizados para a amplificação das amostras da geração F₂, por apresentar variabilidade genética para a resistência ao nematoide. Os resultados obtidos após a eletroforese e a fotodocumentação foram analisados e codificados para compor uma matriz de dados, em que o indivíduo com a banda igual ao parental resistente recebeu o número 2 (homozigoto resistente), com a banda igual ao parental suscetível recebeu o número 0 (homozigoto suscetível) e com as duas bandas (heterozigoto) recebeu o número 1.

3.2.4 Construção do mapa molecular e associação à resistência

Inicialmente, para seleção das bandas polimórficas, foi realizado o teste do qui-quadrado (χ^2) com auxílio do programa GENES (CRUZ, 1998), com o objetivo de eliminar bandas com distorções de segregação.

Em sequência, foram verificadas a ligação entre as marcas moleculares, utilizando LOD ≥ 3 e frequência máxima de recombinação $\theta = 0,3$, e a associação entre cada marca molecular e a resistência por meio da Análise de Variância (ANOVA). Para essas análises também foi utilizado o do programa GENES (CRUZ, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação e Qualificação do DNA Extraído

Os resultados da quantificação e da qualificação do DNA extraído referem-se a uma planta do genitor feminino (Regina 71), uma planta do genitor masculino (Salina 88), uma planta F_1 (resultado do cruzamento entre Regina 71 e Salina 88) e 121 plantas da geração F_2 .

Os resultados das quantificações para as 124 amostras de DNA, através do espectrofotômetro de microvolumes – L - Quant Loccus, variaram de 45,2 ng/ μ L (1,26 μ g/g de tecido seco) a 481,2 ng/ μ L (13,37 μ g/g de tecido seco), com média geral de 164,35 ng/ μ L (4,56 μ g/g de tecido seco), desvio padrão geral de 77,35 ng/ μ L (2,15 μ g/g de tecido seco) e coeficiente de variação de 47 %. Ao dividir as amostras em três grupos, sendo um grupo com a concentração de DNA até 99 ng/ μ L, o segundo grupo com a concentração entre 100 e 200 ng/ μ L e o terceiro grupo com a concentração superior a 200 ng/ μ L, verifica-se que o grupo como maior número de amostras (59 amostras) foi o grupo com a concentração entre 100 e 200 ng/ μ L (Tabela 2). Isso mostra que a variação na quantidade de DNA extraído foi alta, mas, em todas as amostras a quantidade foi suficiente para as análises moleculares. A média dos resultados das razões A_{260}/A_{280} (razão entre a concentração de DNA e a concentração de proteínas) foi de 1,84 (Tabela 2), com coeficiente de variação de 4,89 %. Segundo Brown (2003) o padrão desejado para a razão A_{260}/A_{280} é de 1,8 a 2,2. Geralmente, um valor A_{260}/A_{280} superior a 2,2 é indicativo de contaminação por RNA, enquanto valores abaixo de 1,6 são indicativos de contaminação por proteína (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2017). Portanto, a

razão A_{260}/A_{280} do DNA extraído está dentro do desejado para análises moleculares, indicando que o protocolo utilizado para a extração foi eficiente.

Tabela 2 - Resultado da quantificação de DNA em espectrofotômetro, média de três grupos, apresentando número de amostras de cada grupo, razão A_{260}/A_{280} em nm e concentração do DNA em μL^{-1} e $\mu\text{g. g}^{-1}$ tecido seco.

Grupos de amostras de acordo com a concentração de DNA (μL^{-1})	Número de amostras	Razão A_{260}/A_{280} nm ^a	Concentração ^a	
			$\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$	$\mu\text{g. g}^{-1}$ tecido seco
Até 99	31	1,84±0,09	74,79±14,81	2,08±0,21
Entre 100 e 200	59	1,84±0,09	156,77±31,17	4,35±0,87
Maior que 200	34	1,83±0,10	259,15±59,16	7,20±1,64
Geral	124	1,84±0,09	164,35±77,35	4,56±2,15

^aMédia±desvio padrão

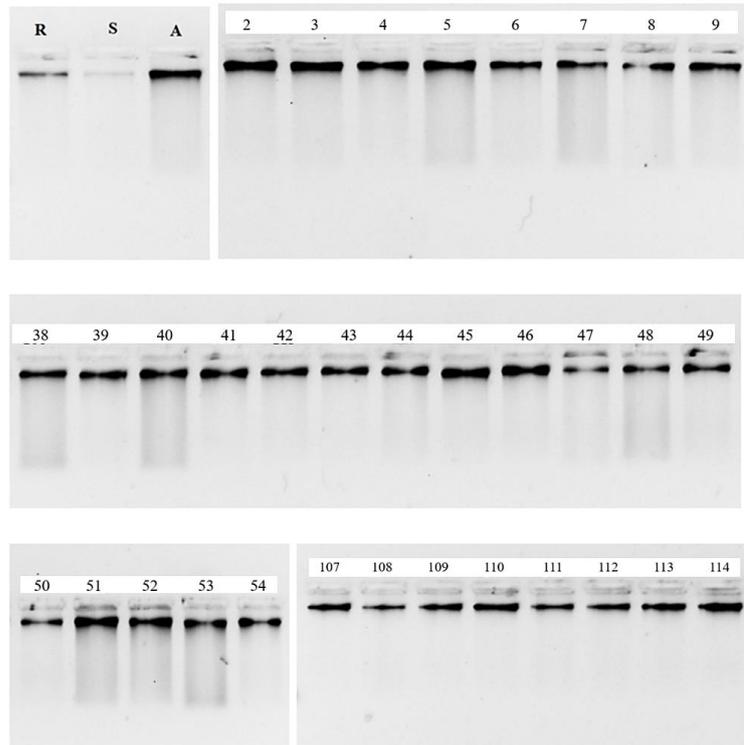
Trabalhos como o de Nunes et al. (2011) e Silva et al. (2015) já comprovaram que a adição de polivinilpirrolidone (PVP) melhora a qualidade da extração de DNA genômico de tecidos foliares. Algumas fontes, como no estudo de Oliveira (2022) e no folheto da Embrapa de Costa e Moura (2001), relatam o uso de bissulfito de sódio no processo de extração. Ambos os reagentes possuem propriedades antioxidantes e por isso auxiliam em manter a integridade do DNA durante o processo de extração.

No trabalho de Souza (2022) foram relatadas modificações em protocolos de extração, demonstrando que a adição de carvão aumenta significativamente a pureza do material genético. Dessa forma, ao utilizar o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com a adição de PVP, bissulfito de sódio e carvão, foi possível obter uma concentração adequada de material genético íntegro de todas as amostras estudadas, demonstrando a reprodutibilidade, precisão e viabilidade do método de extração.

Na Figura 1 são apresentadas algumas amostras após a qualificação e o teste de integridade do DNA resolvido em gel de agarose em concentração 0,8%.

Todas as amostras estudadas apresentaram um DNA íntegro, sendo essa característica importante, pois, é ela que dará reprodutibilidade e intensidade em amplificações de PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Figura 1 - Padrão de bandas obtido no teste de qualificação das amostras dos parentais resistente (R) e susceptível (S), amostra F₁ (A) e algumas amostras da geração F₂ enumeradas.



Além da integridade do DNA é possível verificar também a pureza do DNA (Figura 1). A presença de polissacarídeos pode ser visualizada quando há retenção de DNA no poço e na imagem a maioria das amostras não apresenta retenção, demonstrando assim que essas amostras não estão contaminadas com polissacarídeos.

4.2 Obtenção do Marcador

4.2.1 Teste de seleção dos *primers*

Os *primers* foram selecionados de acordo com as pesquisas de Rauscher e Simko (2013) e Hong e colaboradores (2015). No artigo de Rauscher e Simko (2013) foram obtidos os mapas de ligação, que foram construídos a partir da análise com *primers* microssatélites apresentados no estudo. Ao analisar visualmente esses mapas de ligação foram selecionados *primers* que pertenciam a diferentes grupos de ligação apresentados no estudo de Rauscher e Simko (2013), com o objetivo de abranger todo o genoma e aumentar a probabilidade de encontrar uma ligação entre as bandas analisadas e o gene de resistência.

Na pesquisa de Hong e colaboradores (2015) um total de 81.330 ESTs foram baixados do NCBI (até 1º de julho de 2011) e montados com CAP3, um programa de montagem de sequência de DNA (Huang, 1999). Uma ferramenta da web chamada identificação de microssatélites (MISA) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) foi usada para procurar SSRs nos unigenes com um mínimo de seis unidades de repetição para um dinucleotídeo, cinco unidades de repetição para um tri-nucleotídeo, cinco unidades de repetição para um tetra-nucleotídeo, quatro unidades de repetição para um penta-nucleotídeo e hexa-nucleotídeo. De acordo com os dados obtidos nesse estudo alguns primers foram selecionados.

A partir dessa pesquisa foram selecionados 22 *primers* (Tabela 3) para teste com a amplificação do material genético dos parentais e eletroforese em gel de agarose a 2,5 % para identificar bandas que apresentavam polimorfismo entre os pais. Os *primers* que demonstraram um melhor resultado foram reavaliados em nova eletroforese (Figura 2 e 3).

Tabela 3 – Sequência dos primers testados com indicação numérica e código de identificação da bibliografia.

Nº	Código	Primer Forward	Primer Reverse
1	SML-001	5'CCATGGATCCTGTGTGAAGA3'	5'CACCATGTTCCACTTCCACTT3'
2	SML-002	5'GTGATTGCATGCCAAATGAA3'	5'TTAGTAGCCCGCATGCTTTT3'
3	SML-022	5'GGGCCTCAAATCCTCTCTG3'	5'TGTTCTTCCCCTCTTTGGAA3'
4	KSL-37	5'TCTCTTGCTCCAATACCCGA3'	5'GTATCGGGCTCATGTCCCTT3'
5	KSL-51	5'CCCCTACCACCACCAAAGTC3'	5'TACCAAATGACATGCACCCC3'
6	KSL-87	5'GCGGGATCGATACTTACCCT3'	5'ATCATCGACGGGCTTTTCTT3'
7	KSL-173	5'ATAGTCACGACTCACGCCCA3'	5'CCATTTTCTCTTTCTGCGA3'
8	KSL-245	5'CTTCACCTCCGGAATCCTGT3'	5'GAGGCACGACTGCCATTTAG3'
9	KSL-26	5'GGGCTTTCTCTCCTTTCCCTT3'	5'AATTTGGATCCTGTGCGAGGG3'
10	KSL-32	5'CGGGGAGCATTTAGTGTGTG3'	5'AATTTGGGGTCCGATTTGAG3'
11	KSL-92	5'GGTCTCTTTCTCTGCCCTG3'	5'TCGCGTTCTGAAGTAGCCAT3'
12	KSL-123	5'ATTGTA ACTTCTGCGGGCCT3'	5'GCCTCACATGTTCTTCCCCT3'
13	KSL-137	5'TTCTCTGAGCTTACAAGAGGG3'	5'TCATCACCATCATCATTTCCC3'
14	SML-007	5'ACACTTGCCGATTCCTTCAC3'	5'ACCCGTGTTGAAAATGGAGA3'
15	SML-045	5'ACAAAACCGTTTCACCCAAA3'	5'AGCCCTGTCCTTTCAGGAT3'
16	SML016	5'AAACCAAGACTTTGTATTTGTCGT C3'	5'TTCCTTGGAATCACAATAATAGTAGA G3'
17	SML023	5'TATGGTGTT CAGGGGAATGG3'	5'AAACCAACCAACCAAAAACAGA3'
18	SML024	5'CAGGTGGCAGAAGATGGAGT3'	5'TGCTTTGATGATTTTGGATGA3'
19	SML042	5'CATGAAGTGT TTTGGGGTGA3'	5'GGCCTTTCATTTCTTCCTCA3'
20	SML044	5'TCTAAGGGGGTGTGATCTGG3'	5'CCAACAGCCCAACACACTTT3'
21	SML052	5'CTGTAGCCGGGAATTGAAGT3'	5'TGCCCCTAAACAAGACCTACA3'
22	SML058	5'CAAGAGGAATTCAAGCCTTCAT3'	5'CTCAAGGGCTCCTTCATCAG3'

Figura 2 - Padrão de bandas obtido para o teste com os primers 1, 7, 12, 13, 14 e 15, enumerados. Identificando amostras dos parentais resistente (R) e susceptível (S). Com marcador molecular 100 pb a esquerda.

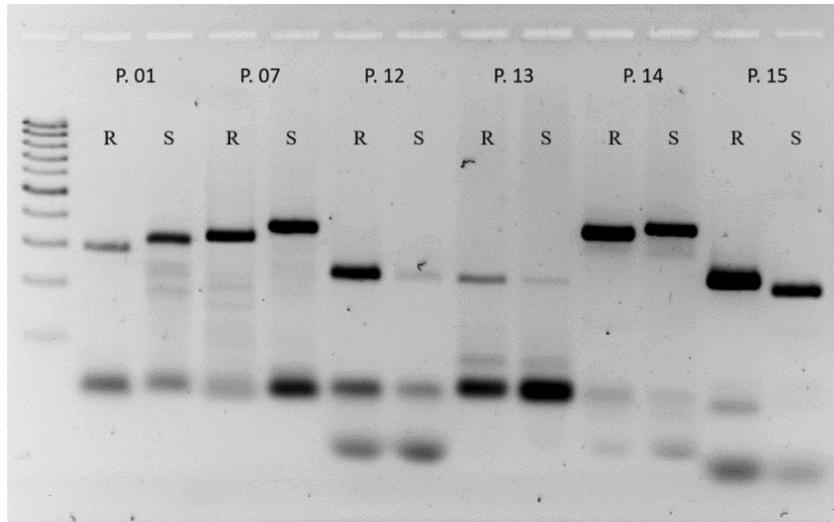
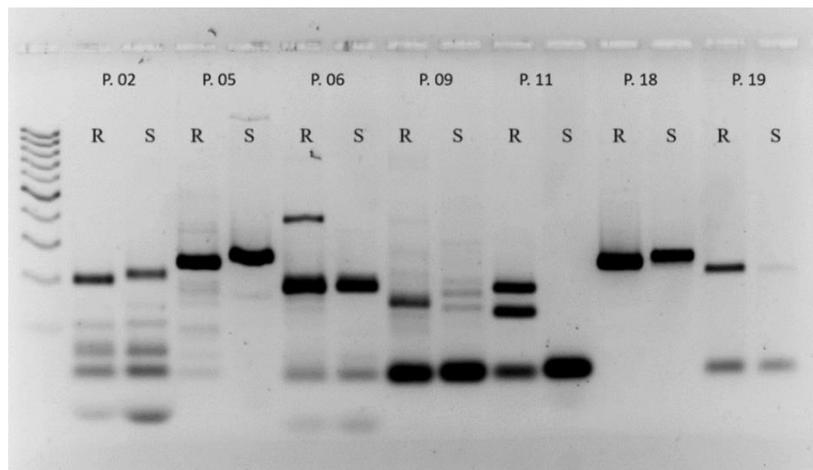


Figura 3 - Padrão de bandas obtido para o teste com os primers 2, 5, 6, 9, 11, 18 e 19, enumerados. Identificando amostras dos parentais resistente (R) e susceptível (S). Com marcador molecular 100 pb a esquerda.



Os primers 1 e 7 foram selecionados para a amplificação do DNA das plantas da geração F₂, pois, apresentou melhor resultado visual que permitiu diferenciar os parentais. Além disso, de acordo com Hong e colaboradores (2015) eles estão entre os 58 marcadores polimórficos que foram selecionados com base na alta reprodutibilidade e qualidade máxima entre as cultivares.

4.2.2 Construção do mapa molecular e associação com a resistência

4.2.2.1 Qui-quadrado

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi realizado com base na lei de segregação mendeliana. O nível de significância adotado para esse teste foi de 5% ($p \leq 0,05$), sendo assim o χ^2_{tab} foi de 3,84, para um grau de liberdade. De acordo com os testes realizados com os dados de ambos os *primers*, os resultados seguiram a segregação Mendeliana 1:2:1 para um loco (Tabelas 4 e 5). Isso permitiu que as bandas obtidas com esses primers fossem utilizadas para a obtenção do mapa de ligação.

Tabela 4 – Resultado do teste qui-quadrado (χ^2) realizado para o *primer 1*.

Classes	Observados	Esperados	(χ^2)
Resistente	32	29,75	0,17
Heterozigoto	65	59,5	0,51
Suscetível	22	29,75	2,02
Total	119	119	2,7

Tabela 5 – Resultado do teste qui-quadrado (χ^2) realizado para o *primer 7*.

Classes	Observados	Esperados	(χ^2)
Resistente	19	18,25	0,031
Heterozigoto	34	36,5	0,171
Suscetível	20	18,25	0,168
Total	73	73	0,370

4.2.2.2 Mapa de ligação e associação à resistência

Para construir um mapa genético de ligação, primeiramente é necessário verificar evidência de que existam genes ligados. Se dois genes segregam individualmente, como previsto na primeira lei de Mendel, porém, quando considerados juntos não seguem a lei da independência (segunda lei de Mendel), haverá então evidência de que eles estão ligados (CRUZ; SILVA, 2006). Ainda segundo Cruz e Silva (2006), quanto maior a distância entre dois genes, maior a probabilidade de recombinação, que ocorre quando o rearranjo dos cromossomos produz gametas diferentes dos parentais. Nas células germinativas em que não há recombinação, são produzidos apenas gametas paternos, enquanto naquelas em que ocorre a recombinação são produzidos tanto gametas paternos quanto não-paternos (recombinantes). O

mapa de ligação tem como princípio determinar a distância entre dois genes por meio da porcentagem de recombinantes.

Quando há uma baixa taxa de recombinação há uma alta probabilidade de os genes estudados estarem ligados. Isso se torna a base para o desenvolvimento de um marcador molecular, visto que genes ligados tendem a ser herdados em conjunto. Duas marcas são consideradas ligadas quando a frequência de recombinação é inferior a um limite pré-definido e o LOD score, superior a um limite também pré-definido. Para estabelecer os critérios a serem utilizados no agrupamento, é necessário, então, definir a frequência máxima de recombinação ($r_{\text{máx}}$) e o LOD mínimo ($\text{LOD}_{\text{mín}}$), para conferir se dois locos estão, ou não ligados (CRUZ; SILVA, 2006). Esses valores foram considerados como sendo $\text{LOD} \geq 3$ e frequência máxima de recombinação $\theta = 0,3$.

4.2.2.2.1 Método analítico da máxima verossimilhança

A frequência de recombinação varia entre 0 e 0,5, sendo que uma frequência de 0,5 é equivalente a genes não ligados. Para estimar a frequência de recombinação no programa GENES (CRUZ, 1998) foi utilizado o método analítico da máxima verossimilhança (Tabela 6) que é largamente utilizado na estimação de parâmetros de genética. No mapeamento genético é empregado tanto na obtenção de estimativas das frequências de recombinação entre dois locos de herança simples, quanto no cálculo de estimativas de parâmetros no mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) (CRUZ; SILVA, 2006). Os resultados da análise de máxima verossimilhança indicaram um valor de recombinação igual a 0,428, como se trata de um valor superior a 0,3 e próximo a 0,5, não há ligação entre as marcas.

Tabela 6 - Estimador de máxima verossimilhança por método analítico.

Fenótipos	Observado	Esperado
AABB	6	$1/4(1-r)^2$
AABb	2	$1/2r(1-r)$
AAbb	5	$1/4(r^2)$
AaBB	10	$1/2r(1-r)$
AaBb	23	$1/2(1-r)^2 + 1/2(r^2)$
Aabb	7	$1/2r(1-r)$
AaBB	4	$1/4(r^2)$
AaBb	9	$1/2r(1-r)$
Aabb	7	$1/4(1-r)^2$

Frequência de recombinação (r): 0,428

4.2.2.2.2 LOD score

O valor de LOD score encontrado foi de 0,253807, o que indica a ausência de ligação entre as marcas. Geralmente, admite-se que os locos estejam ligados quando o valor de LOD score é maior do que 3, ou seja, quando há uma probabilidade 1000 vezes maior da presença de ligação do que a ausência de ligação dos genes estudados. Também existem trabalhos de mapeamento de populações com LOD_{min} de 2, porém são menos frequentes (CRUZ; SILVA, 2006).

O LOD score é o logaritmo na base 10 (\log_{10}) da razão entre a verossimilhança considerando o valor da recombinação (r) estimada pela função de máxima verossimilhança e a verossimilhança para $r=0,5$ (r é igual a 0,5 quando se verifica a ausência de ligação). O logaritmo é utilizado, pois geralmente o resultado encontrado em ambas as funções de verossimilhança, um par fixo de 0,5 e o outro valor de r , é muito pequeno, dificultando a visualização da superioridade do valor de probabilidade encontrado para o r estimado pela máxima verossimilhança e o valor de probabilidade para r de 0,5. A razão entre essas duas probabilidades fornece um indicativo da existência ou não de ligação fatorial (CRUZ; SILVA, 2006).

4.2.2.2.3 Análise de variância e grupos de ligações

Após analisar a ligação entre as marcas, com o método analítico da máxima verossimilhança e o LOD score, foi determinado que as bandas não se encontravam em um mesmo grupo de ligação. Mas, ainda era necessário verificar se as bandas tinham ligação com a resistência. Com o auxílio do GENES (1998), foi realizada a análise de variância (ANOVA) para verificar a relação entre marcas e a característica estudada. Segundo Cruz e Silva (2006) uma ligação fatorial ou gênica diz respeito à existência de genes localizados em um mesmo cromossomo, para as quais as propriedades da segunda lei de Mendel (Lei da Segregação e Combinação Independente) não se aplicam, salvo quando há grande distância entre eles.

Os testes de ANOVA (Análise de Variância) feitos para ambas as bandas resultaram em testes F com valores inferiores a 1, indicando que as bandas não estão no mesmo cromossomo que a característica ou que, mesmo que a característica esteja no mesmo cromossomo, há uma grande distância entre ela e a banda e por isso não há ligação fatorial.

A não associação entre as marcas moleculares e a resistência também pode ser visualizada nos gráficos das Figuras 4 e 5.

Figura 4 – Mapa de ligação da marca 1 (*primer 1*): eixo x representa as classes da marca analisada e eixo y as notas fenotípicas.

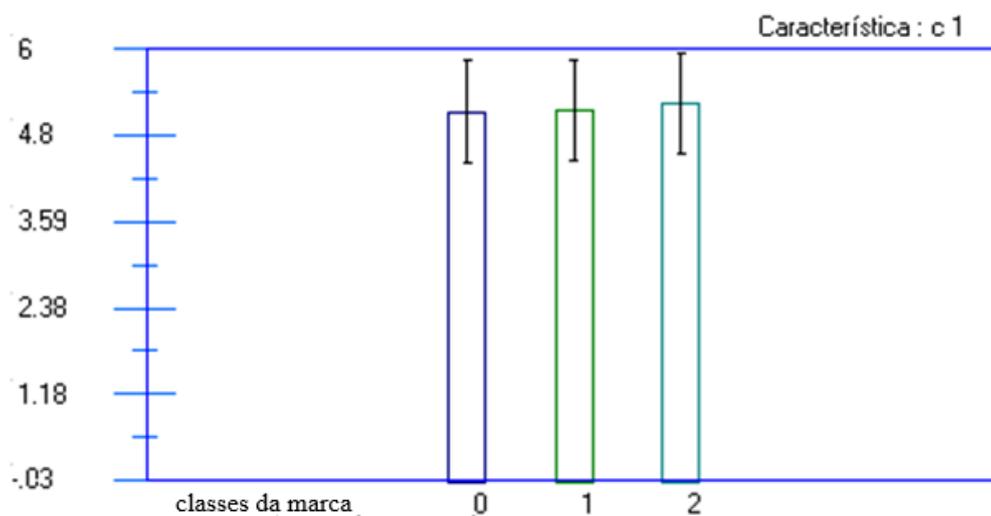
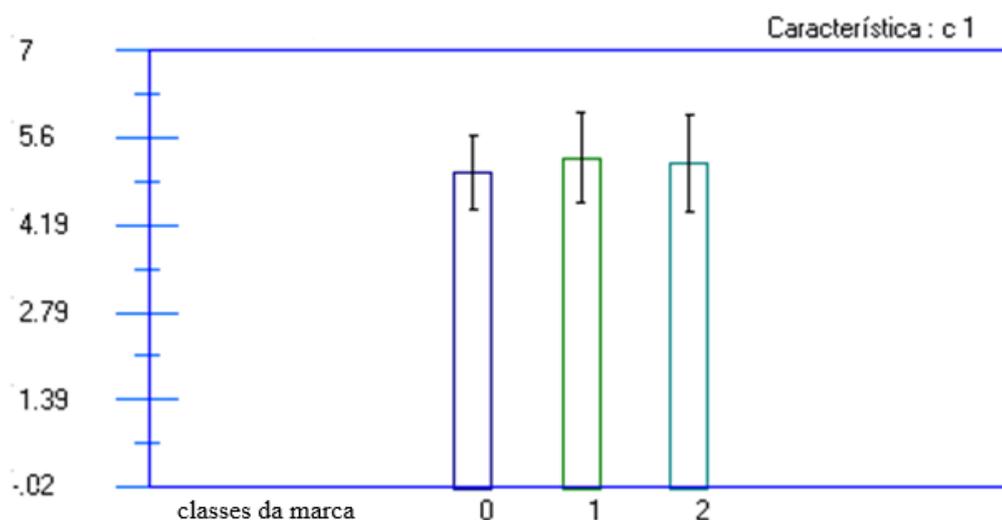


Figura 5 - Mapa de ligação da marca 2 (*primer 7*): eixo x representa as classes da marca analisada e eixo y as notas fenotípicas.



No eixo X estão representados os números correspondentes as características analisadas, sendo 1 o padrão para o heterozigoto (presença das duas bandas), 2 o padrão para o parental resistente e 0 o padrão para o parental suscetível. No eixo Y estão os dados de avaliação fenotípica com notas atribuídas de acordo com a resistência dos indivíduos. Nota-se que não há relação entre as bandas e os dados fenotípicos. Portanto não foi possível obter um marcador

para a resistência, pois, a presença das bandas não tem correlação com as notas fenotípicas atribuídas de resistência.

5 CONCLUSÕES

O método de extração utilizado, com as modificações propostas, se mostrou eficiente na obtenção de DNA em quantidade e qualidade para análises moleculares.

Devido à ausência de associação entre as marcas moleculares obtidas e a resistência ao nematoide não foi possível desenvolver o marcador molecular ligado a resistência. Entretanto, os resultados dos testes dos *primers* com os parentais apresentaram polimorfismos consistentes para o seguimento da pesquisa.

Além disso, mesmo não tendo ligação entre as marcas moleculares e a característica, com a adição de novos dados com outros *primers* avaliados nesta pesquisa pode ser possível encontrar associação entre a característica e novos grupos de ligações, não descartando qualquer resultado apresentado nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORT&FRUIT. **Anuário HF Brasil: Retrospectiva 2023 & perspectiva 2024**, 2023. 42p. Available on: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2023-perspectiva-2024.aspx>>. Acesso em 23 de setembro de 2024.
- ASSUNÇÃO, M. C. et al. Espécies de *Meloidogyne* em alface na região Agreste do estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 1, p. 60–61, jan. 2021.
- BROWN. T.A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. 4 e d. Porto Alegre: **Artmed**, 376p. 2003.
- CARVALHO FILHO, J. L. S. DE .et al. F4 families of crisp-leaf lettuce with tolerance to early bolting and homozygous for resistance to *Meloidogyne incognita* race 1. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 335–339, set. 2009.
- CARVALHO FILHO, J. L. S.; GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R. Tolerância ao florescimento precoce e características comerciais de progênies F4 de alface do cruzamento Regina 71 x Salinas 88. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 37–42, jan. 2009.
- CARVALHO FILHO, J. S.; GOMES, L. A.; COSTA-CARVALHO, R. R. Incidência de galhas de *Meloidogyne incognita* raça 1 em progênies de F2:3 (‘Salinas 88’ x ‘Colorado’) de alface. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2012.
- COSTA, M. R.; MOURA, E. F. Manual de extração de DNA. **Embrapa Amazônia Oriental**. Documentos, 89. 2001.
- CRUZ, C. D. Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). **Plant Genetics. Genet. Mol. Biol.**, v.21, n. 1, 1998. DOI: 10.1590/S1415-47571998000100022.
- CRUZ, C. D.; SILVA, L. da C. **Análise de Marcadores Moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Editora UFV, 2006. p. 307 – 372.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11–15, 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. **Brasília: Embrapa-Cenargen**. p.220. 1998.
- GÓIS, H. M. DE M. N. et al. Lettuce growing in different hydroponic systems and nutrient concentrations of the nutrient solution. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 28, n. 8, p. e279686, ago. 2024.
- HONG, J.-H. et al. Construction of EST-SSR Databases for Effective Cultivar Identification and Their Applicability to Complement for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Distinctness Test.

American Journal of Plant Sciences, v. 06, n. 01, p. 113–125, 1 jan. 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.61013.

HUANG, X. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1 set. 1999.

JIANG G. L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: **Andersen SB**, editor. *Plant breeding from laboratories to fields*. Rijeka: InTech; 2013. p. 45–83. DOI: 10.5772/52583.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C.R. et al. Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). **Plant Methods**, 13, 82, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>.

NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261–285, 14 nov. 2017.

NUNES, C. F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1383–1389, 1 ago. 2011.

OLIVEIRA, A. J. DE et al. Genetic variability in genotypes of safflower via SSR molecular marker. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. e011922, 2023.

OLIVEIRA, R. V. et al. Biocompósito biodegradável hidrofóbico a base de amido de banana verde associado à celulose bacteriana. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 27, n. 1, p. e202149059, 2022.

OLIVEIRA, T. C. DE et al. Molecular characterization of common bean accessions using microsatellite markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. e003523, 2023.

PINHEIRO, J. B. et al. Characterization of lettuce genotypes for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Horticultura Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 239–245, jul. 2020.

PORT, E. D. et al. Early selection of resilient progenies to seed yield in soybean populations. **Ciência Rural**, v. 54, n. 8, p. e20230287, 2024.

RAUSCHER, G.; SIMKO, I. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 11, 2013.

SHATILOV, M. V.; RAZIN, A. F.; IVANOVA, M. I. Analysis of the world lettuce market. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 395, n. 1, p. 012053, 1 nov. 2019.

SILVA, A. Z. C. et al. Comparação de três tampões para extração de DNA genômico de tecidos foliares de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**, Issue: 48. 2015. DOI: 10.20435/multi.v0i48.152.

SIMIANER, H. Genomic and other revolutions—why some technologies are quickly adopted and others are not. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 1, p. 53–58, 1 jan. 2016.

SOUZA, A. M. DE. Benefícios da cinética na obtenção de DNA com alto grau de pureza: cinética associada a extração de DNA. **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil** - Volume 5, p. 73–83, 2022.

YASEEN, I. et al. Interactive effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* on okra cultivars. **Bragantia**, v. 83, p. e20230266, 2024.