

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

WILLIAN ELIAS PAULINO

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES EM ALFACE
(*Lactuca sativa*) POR MARCADOR MOLECULAR AFLP

PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2018

WILLIAN ELIAS PAULINO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES EM ALFACE
(*Lactuca sativa*) POR MARCADOR MOLECULAR AFLP**

Artigo científico apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Terezinha Aparecida Teixeira

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2018

WILLIAN ELIAS PAULINO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES EM ALFACE
(*Lactuca sativa*) POR MARCADOR MOLECULAR AFLP**

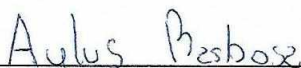
Artigo científico apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:



Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – UFU

Presidente



Prof. Dr. Aulus Estevão A. de D. Barbosa – UFU

Membro



Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes – UFU

Membro

Patos de Minas- MG, 06 de julho de 2018

RESUMO

A cultura da alface (*Lactuca sativa*) pode ser muito afetada por fatores ambientais, abióticos e bióticos, dentre estes, os nematoides. No Brasil, os nematoides prejudiciais à alface são majoritariamente do gênero *Meloidogyne*, que se instalam no sistema radicular da planta formando galhas. Uma alternativa para o controle destes nematoides é uso de cultivares resistentes, porém nem sempre estas agradam ao mercado. Então foi feito o cruzamento entre uma cultivar resistente (Salinas 88) e uma susceptível (Colorado), mas que possui características de mercado, avançando mais uma geração com autofecundação. As amostras utilizadas foram plantadas e avaliadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Utilizando marcador molecular AFLP, buscou-se identificar bandas polimórficas ligadas ao fenótipo de resistência, possibilitando o uso deste marcador em programas de melhoramento. Com as bandas formadas foi possível determinar um QTL para o caráter de resistência.

Palavras-chave: Olericultura. Nematóide-das-galhas. Mapa de ligação.

ABSTRACT

The lettuce (*Lactuca sativa*) crop can be very affected by environmental factors, abiotic and biotic, like nematodes. In Brazil, most of the nematodes which are harmful to lettuce belong to genus *Meloidogyne*, which are installed in the root system of the plant forming root-knots. An alternative for the control of these nematodes is the use of resistant cultivars, but these aren't usually pleasing to the market. Then, a cross was made between a resistant cultivar (Salinas 88) and a susceptible cultivar but that had market characteristics (Colorado), advancing another generation with self-fertilization. The samples used here were planted and evaluated at the Federal University of Lavras (UFLA). Using molecular marker AFLP, we sought to identify polymorphic marks linked to the resistance phenotype, making it possible to use this marker in breeding programs. With the formed marks, it was possible to determine a QTL for the resistance character.

Key words: Vegetables crop. Root-knot nematode. Linkage map.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
Análise estatística e mapa de ligação	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO	6
Amplificação e análise de gel de poliacrilamida.....	6
Segregação das bandas polimórficas.....	7
Mapa de Ligação	7
Análise de QTL	8
CONCLUSÃO	10
AGRADECIMENTOS.....	11
Referências.....	11

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é uma olerícola pertencente à família Asteraceae, sendo uma das hortaliças mais consumidas no mundo, cultivada há mais de 2500 anos, tendo como centro de origem o leste da região mediterrânea. É rica em fibras, vitaminas e minerais, comumente consumida *in natura* juntamente com outras hortaliças na forma de salada (Velasco et al. 2013). As principais variedades de alface cultivadas no Brasil são dos tipos crespa, americana, lisa e romana; ordenadas por importância econômica (Sala e Costa 2012).

Culturas de olerícolas no geral são altamente influenciadas por fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, tipo de solo e a fitossanidade do ambiente de cultivo, o que diz respeito à presença de patógenos no ambiente que possam prejudicar a produtividade do vegetal (Rosa et al. 2013). Várias doenças podem afetar a produtividade e a qualidade em um cultivo de alface, etiologicamente causadas por uma diversidade de patógenos diferentes como vírus, bactérias, fungos e nematoides (Pinheiro et al. 2013).

Os nematoides são organismos que podem se reproduzir de modo exponencial, gerando uma população muito grande e altamente concentrada, sendo capazes de comprometer a produção de cultivos sucessivos. Muitos gêneros de nematoides fitoparasitas podem ser encontrados em áreas de produção de alface. No Brasil, os problemas em alface em geral são causados por infestação das plantações pelo nematoide-das-galhas, *Meloidogyne* spp., principalmente *M. incognita* e *M. javanica*, espécies do gênero *Meloidogyne* mais distribuídas nas regiões produtoras (Pinheiro et al. 2013).

Muitas vezes, métodos convencionais de controle de patógenos de culturas, como o uso de insumos e a rotação de cultura, não atendem às necessidades dos agricultores quando se trata de nematoides em alface, que é uma espécie de cultivo rápido. Assim, é necessária uma alternativa que faça o controle mais efetivo dos fitonematoides na produção da alface; e o uso de cultivares resistentes é o método mais viável neste controle. Entretanto, nem sempre é possível usar estas cultivares, pois em alguns casos a cultivar não possui características agrônomicas desejáveis; logo, não atende às expectativas e exigências do mercado consumidor (Ferreira et al. 2013).

A cultivar Salinas 88 é resistente à *M. incognita* raças 1 e 2, à *M. javanica* e ao vírus do mosaico da alface (LMV); é do tipo americana com folhas verde escuro, porém, apresenta problemas na formação de cabeça devido às condições climáticas brasileiras. Já a cultivar

Colorado, que possui folhas crespas na cor verde claro, é suscetível ao nematoide-das-galhas e ao LMV (Oliveira 2012). Então, pode-se realizar o cruzamento entre uma cultivar que não é boa de mercado, mas é resistente ao nematoide, e uma cultivar que seja suscetível, mas que atenda ao desejo dos consumidores.

Para observar os resultados deste cruzamento e selecionar os indivíduos pretendidos, é necessário realizar um programa de melhoramento; porém, se este programa utilizar métodos convencionais de seleção, é necessário avançar uma quantidade considerável de gerações, o que tornaria o processo demorado e oneroso. Por isso, a seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta extremamente importante para a seleção indireta de genes de efeito quantitativo e de fenótipos mais difíceis de serem observados, acelerando a seleção das novas gerações e facilitando os processos do melhoramento genético convencional (Souto 2015).

Marcadores moleculares de DNA são basicamente descritos como uma sequência ou fragmento de DNA, relacionados ou não com um fenótipo e que demonstram diferenças em nível de genoma, os polimorfismos; portanto, podem auxiliar no processo de caracterização, seleção de genótipos e *fingerprint* molecular de variedades (Oliveira et al. 2016).

Existe uma diversidade de marcadores moleculares passíveis de serem utilizados em diferentes situações, de acordo com o que se deseja avaliar e com o material disponível. Entre as classes de marcadores moleculares existentes, a análise por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) apresenta algumas vantagens em relação a outros marcadores. A análise por AFLP utiliza tanto as enzimas de restrição quanto à velocidade de amplificação por PCR, o que gera um grande número de polimorfismo e alta repetibilidade, sendo muito indicada para o mapeamento genético e clonagem de genes de interesse (Ferreira e Grattapaglia 1998).

A partir da obtenção das bandas polimórficas, é possível gerar mapa de ligação e QTL (*Quantitative Trait Loci*). Os grupos de ligação são grupos de genes (marcadores) cujos *loci* estão localizados no mesmo cromossomo que os genes que controlam uma determinada característica, no caso deste trabalho, resistência a fitonematoides; e, portanto, mostram a sua localização no genoma avaliado (Carneiro e Vieira 2002). Identificando os grupos de ligação e as bandas responsáveis, é possível isolar a sequência e converter em outro tipo de marcador, o SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), passando a identificar a presença do gene de interesse com maior facilidade (Oliveira 2016).

A resistência a nematoides é um fenótipo de difícil mensuração, justificando o uso de marcadores moleculares para sua caracterização em alface, visto que é uma cultura de impacto econômico que é prejudicada por estes parasitas. Além disso, se o marcador a ser identificado estiver em uma região conservada evolutivamente, poderá ser utilizado em outras culturas também afetadas por estes nematoides.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

As amostras utilizadas nos experimentos são de diferentes gerações, sendo a geração F_1 obtida do cruzamento da cultivar Salinas 88 (genitor feminino) e Colorado (genitor masculino). A geração F_2 foi obtida da autofecundação natural da F_1 . Destas foram coletadas 40 amostras da cultivar Salinas 88, 39 amostras da cultivar Colorado, 40 amostras da geração F_1 e 318 amostras da geração F_2 .

A obtenção das gerações, a avaliação e a análise quanto à resistência a nematoides e a liofilização das amostras de folhas de alface foram realizadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. As etapas após a liofilização das amostras de folhas de alface foram realizadas na Universidade Federal de Uberlândia – UFU (Campus Patos de Minas – Patos de Minas e Campus Umuarama - Uberlândia), MG.

Extração de DNA

Para realizar a extração de DNA, o método escolhido segue o protocolo de Doyle e Doyle (1990), utilizando o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), com modificações em relação à quantidade de tecido foliar de cada amostra utilizada. Adicionou-se 0,02 M de bissulfito de sódio (0,06 g) ao tampão de lise (0,35 M de sorbitol, 0,10 M de tris-base e 5,00 mM EDTA Na_2) e ao tampão de extração (0,20 M de tris-base, 0,05 M EDTA Na_2 , 2,00 M de NaCl e 2,00 % CTAB).

Após a extração de DNA, a qualificação do DNA extraído das amostras foi feita em gel de agarose 1 % e para a quantificação foi utilizado o espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000*. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em tampão TRIS-HCl para a concentração final de DNA de 50 ng/ μL .

Caracterização molecular por AFLP

A primeira etapa consiste na digestão do DNA genômico utilizando duas enzimas de restrição do tipo 2, a enzima EcoRI de corte raro e a enzima MseI de corte frequente. Para a reação de digestão foi preparada uma solução com 250 ng do DNA, 1,5 U EcoRI, 1,5 U MseI e 1X o tampão da enzima. As amostras foram colocadas em banho-maria por duas horas a 37 °C, para a digestão, a 70 °C por 15 minutos, para a inativação das enzimas e em seguida armazenadas a -20 °C.

Na segunda etapa, os pares de adaptadores (EcoRI 1 5' CTG GTA GAC TGC CC 3' e EcoRI 2 5' AAT TGG TAC GTC TAC 3' / Mse I 1 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3' e Mse I 2 5' TAC TVA GGA CTC AT 3') foram ligados as extremidades do DNA digerido, contendo as pontas coesivas geradas pelos cortes das enzimas de restrição, em uma reação contendo T4 DNA ligase. A reação durou cerca 2 horas a 20 °C $\pm$ 2 °C (temperatura ambiente). Então foram novamente armazenadas a -20 °C.

Para a etapa de pré-amplificação, diluiu-se na proporção de 1:10 o DNA digerido e ligado aos adaptadores, em tampão TRIS-HCl (pH 8,0). Para preparar o mix necessário para esta etapa, adicionou-se 1,5 ng/ μ L de primer (primers Eco+A 5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3' e Mse+C 5' GAT GAG TCC TGA GTA AC 3'), 0,25mM de cada dNTP, 1X tampão da enzima Taq polimerase com MgCl₂, 1 U de Taq polimerase e 2,5 μ L de DNA digerido ligado aos adaptadores diluído em TRIS-HCl. O programa de PCR para essa etapa foi constituído de 23 ciclos (94 °C por 30 segundos para a desnaturação do DNA; 56 °C por 1 minuto para anelamento dos primers; e 72 °C por 1 minuto para extensão pela enzima Taq polimerase). Em seguida, as amostras foram diluídas a 1:10, mais uma vez, em TRIS-HCl (pH=8) e armazenadas a -20 °C.

Na etapa de amplificação seletiva, foram utilizados 5 μ L do DNA pré-amplificado e diluído, 1,25 ng/ μ L do primer E-AGC (GAC TGC GTA CCA ATT CAG C), 1,5 ng/ μ L do primer M-CAG (GAT GAG TCC TGA GTA ACA G), 0,25mM de cada dNTP, 1X o tampão com MgCl₂ e 0,5 U de Taq polimerase. Este é o programa de PCR estabelecido para realizar a amplificação:

- 1 ciclo (94 °C por 30 segundo para desnaturação do DNA; 65 °C por 30 segundos para anelamento dos primers; e 72 °C por 1 minuto para extensão pela Taq polimerase);
- reduzir 0,7 °C da temperatura de anelamento a cada ciclo, durante 12 ciclos;

- 32 ciclos (94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto) e armazenadas a -20 °C.

As amostras amplificadas foram desnaturadas com azul de formamida no termociclador (95 °C por 5 minutos). Em seguida, foram aplicadas no gel de poliacrilamida 6 % de polimerização rápida (85mL de acrilamida 6 %, 425 µL de persulfato de amônio 10 % e 85 µL de Temed). A eletroforese foi executada com tempo de corrida de 15 horas, em uma tensão de 300 V, corrente de 60 mA e potência de 90 W; em tampão TBE 1X.

A coloração das amostras foi feita com nitrato de prata. Inicialmente, adicionou-se 2 L de solução de fixação (220 mL de etanol absoluto, 20 mL de ácido acético e 1780 mL de água miliQ) por 10 minutos (tempo mínimo) sob agitação leve. Após a fixação o gel foi lavado em 2 L de água miliQ por 1 minuto. A próxima etapa foi a de pré-coloração com ácido nítrico por 3 minutos (30 mL de ácido nítrico e 1970 mL de água miliQ) sob agitação leve e depois lavado novamente por 1 minuto com 2 L de água miliQ. Posteriormente, ocorreu a etapa de coloração por 20 minutos com prata 0,2 % (4 g de nitrato de prata e 2 L de água miliQ) sob agitação leve e o gel foi novamente lavado em 2 L de água miliQ. Na quarta etapa o gel foi colocado em 1 L de solução de revelação (30 g de carbonato de sódio, 375 µL de formaldeído 37 %) até que as primeiras bandas do gel começaram a aparecer; após o aparecimento destas bandas, essa parte da solução foi descartada e foi adicionado mais 1 L de solução de revelação, até que o restante das bandas apareceram. Em seguida, a revelação das amostras foi bloqueada com a solução Stop (100 mL de ácido acético e 1900 mL de água miliQ) por 5 minutos em agitação leve e lavada com 2 L de água destilada para evitar a proliferação de microrganismos na placa. O gel secou em temperatura ambiente para que as bandas fossem analisadas.

Análise estatística e mapa de ligação

As bandas que se formaram no gel foram analisadas, gerando uma matriz onde a presença de determinada banda na amostra é indicada pelo valor 1 e sua ausência pelo valor 0. Assim, estes valores foram utilizados para gerar o mapa de ligação e determinar a correlação entre a presença das bandas com a resistência a nematoides.

Também foram feitos testes de qui-quadrado (χ^2) para avaliar as hipóteses de segregação das bandas e do fenótipo de resistência a nematoides. Tanto os testes estatísticos

quanto o mapa de ligação foram feitos utilizando o *software* Genes – Genética Quantitativa e Estatística Experimental – da Universidade Federal de Viçosa (Cruz 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação e análise de gel de poliacrilamida

Das amostras biológicas fornecidas, obteve-se DNA amplificado e passível de ser analisado em gel de poliacrilamida de apenas 98 amostras, sendo 95 destas amostras pertencentes à geração F_2 . Diversos fatores podem influenciar para que a amplificação do DNA não ocorra como concentração e qualidade do DNA das amostras e dos reagentes utilizados, e para que a coloração em gel não resulte em bandas polimórficas aparentes, como heterogeneidade e densidade do gel, concentração e qualidade de tampão, contaminação das amostras de DNA ou problemas com o intercalador de bases nitrogenadas e soluções do processo de coloração.

Foi observada a presença de sete bandas polimórficas utilizando a combinação de um par de primers na amplificação, apresentando aproximadamente os seguintes comprimentos: 90 pb, 110 pb, 183 pb, 218 pb, 236 pb, 315 pb e 325 pb. Algumas bandas polimórficas podem ser visualizadas na figura 1.

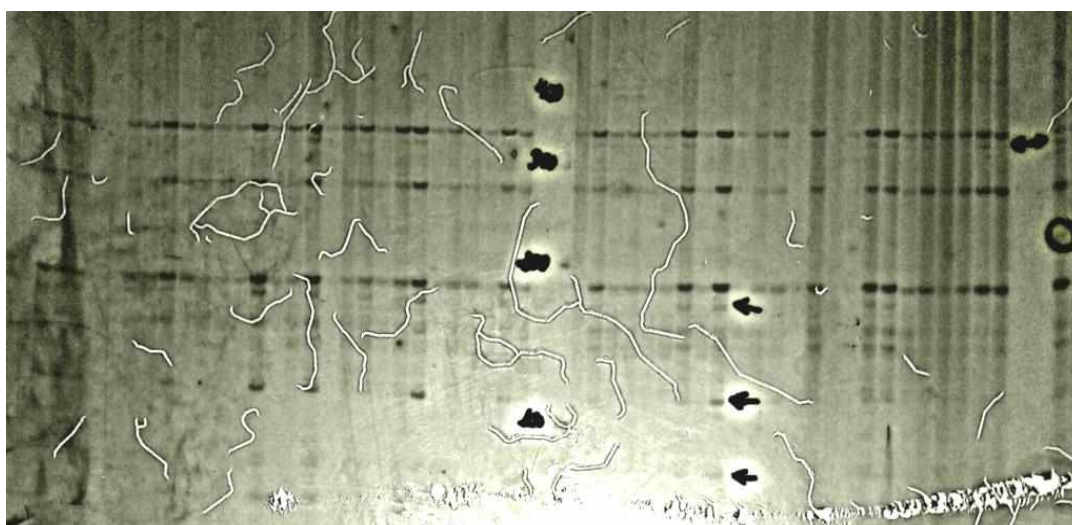


Figura 1 Gel de poliacrilamida 6 % mostrando as bandas polimórficas indicadas por setas para indivíduos da população F_2 , do cruzamento entre as cultivares de alface Salinas 88 e Colorado.

A identificação de apenas sete bandas polimórficas demonstra que a taxa de polimorfismo entre as amostras é baixa, porém isso já era esperado, assim como a presença de bandas monomórficas em maior quantidade, considerando que a população do estudo vem de descendentes de cultivares comerciais; sendo que estas cultivares já passaram por processos de seleção.

Segregação das bandas polimórficas

Utilizando o software GENES, foi realizado o teste de χ^2 (qui-quadrado) para averiguar se a segregação das bandas polimórficas segue a proporção da primeira lei de Mendel, 3:1, que é o esperado de uma geração F_2 obtida por autofecundação (Bórem 2006). As classes consideradas para realização deste teste de hipótese foram 0, representando a ausência da banda; 1, representando a presença da banda; e 9, caso aquele dado houvesse sido perdido, utilizando um $\alpha = 0,05$ para determinar a rejeição ou aceitação da hipótese.

Apenas a segunda banda, 110 pb de comprimento – intitulada como CAG 2; e a terceira banda, 183 pb de comprimento – intitulada como CAG 3; demonstraram seguir a proporção mendeliana, só que em dominância por repulsão, sendo três ausências da banda para uma presença, como ilustra a tabela 1.

Mapa de Ligação

Apenas as bandas CAG 2 e CAG 3 foram utilizadas na construção do mapa de ligação. Com estas duas marcas foi possível gerar um grupo de ligação apresentando 10,59 cM (centiMorgan) de comprimento ou frequência de recombinação de 0,1059, como demonstrado na figura 2.

Tabela 1 Teste de χ^2 e probabilidade de segregação 3:1

Marca	Classes			Qui-quadrado	Probabilidade (%)
	0	1	9		
90 pb (CAG 1)	91	4	0	38,3219	0
110 pb (CAG 2)	71	24	0	0,0061*	99,6934*
183 pb (CAG 3)	72	23	0	0,0552*	97,2743*
218 pb (CAG 4)	84	11	0	15,971	0,034
236 pb (CAG 5)	93	2	0	46,4763	0
315 pb (CAG 6)	94	1	0	50,8482	0
325 pb (CAG 7)	80	15	0	7,5219	2,3261

* χ^2 na região de aceitação de H_0 e alta probabilidade de segregação 3:1.

Isto indica que as sequências das duas bandas estão no mesmo cromossomo e provavelmente próximas, considerando os parâmetros máximo de recombinação de 30% e mínimo de LOD (*Likelihood of odds*) escore de 3.

O LOD escore equivale ao logaritmo na base 10 da razão da verossimilhança de ligação dos genes sobre a verossimilhança da ausência de ligação; portanto, um LOD escore maior ou igual a 3 indica que a verossimilhança de ligação é no mínimo 1000 vezes maior que a de ausência de ligação (Cruz e Silva 2006).

Análise de QTL

O método de QTL permite analisar o efeito individual dos locos sobre um fenótipo de caráter quantitativo, sendo o QTL um segmento cromossômico que afeta aquele fenótipo sem se limitar necessariamente a ser composto por um único gene ou loco (Falconer e Mackay 1996).

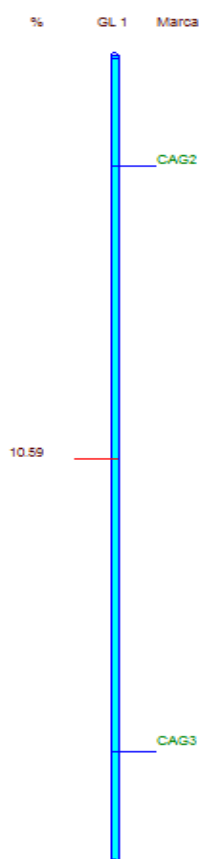


Figura 2 Grupo de ligação formado utilizando os dados de presença das bandas e grau de resistência a nematoides das amostras, GENES software.

Estatisticamente, existe um QTL vinculado ao grupo de ligação e pode ser verificado tanto pelo método de regressão quanto pelo método de máxima verossimilhança. A figura 3 representa graficamente a variação do LOD score do QTL, pelas análises de regressão e máxima verossimilhança, ao longo dos posicionamentos do grupo de ligação.

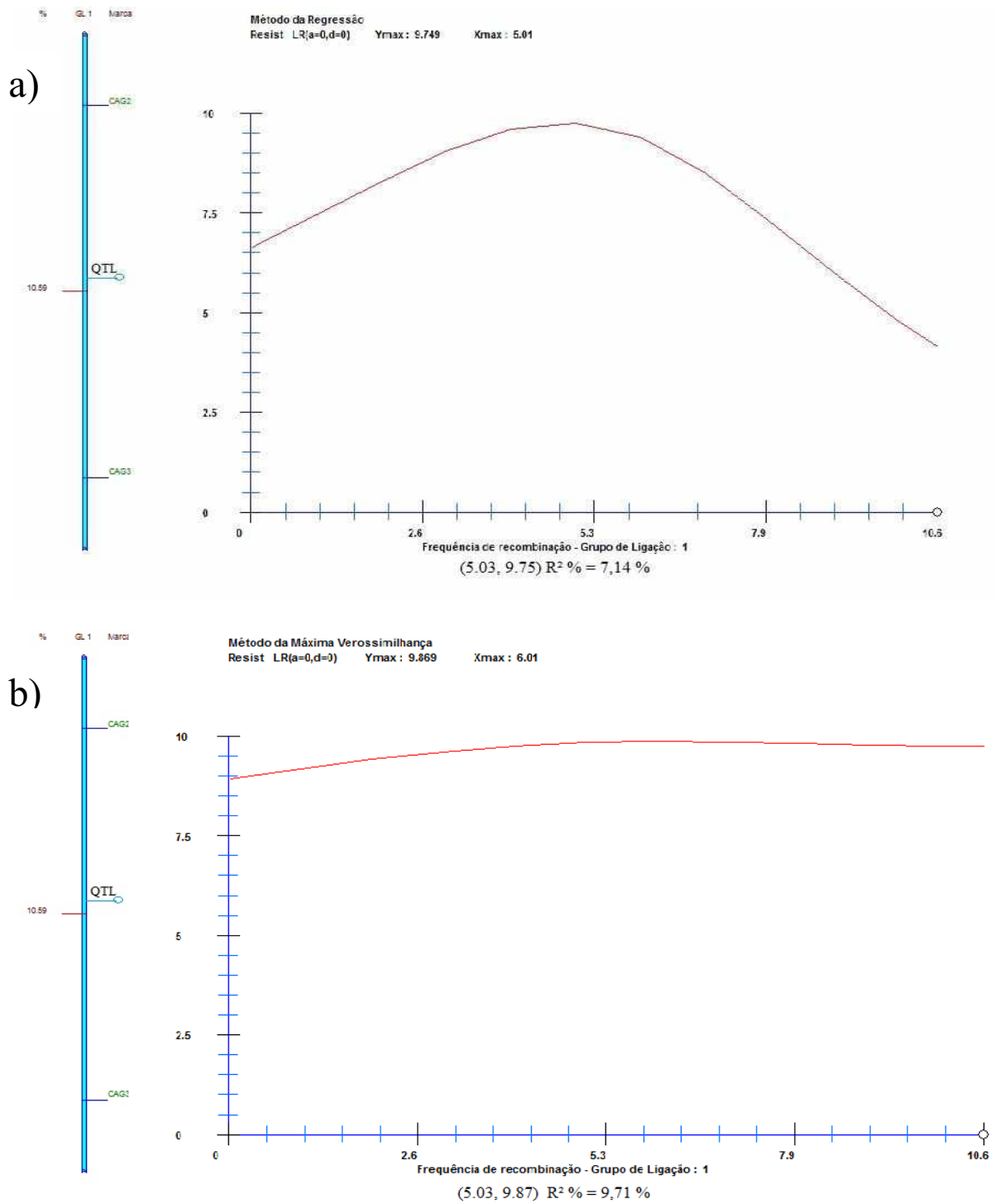


Figura 3 Análise de QTL pelo método de regressão (a) e máxima verossimilhança (b).

Os parâmetros avaliados para determinar a existência de QTL no grupo de ligação foram R^2 %, que é a porcentagem de correlação entre o loco no grupo de ligação e o fenótipo avaliado, e $LOD \geq 3$. Pela análise de regressão, o QTL encontrado demonstrou um LOD score máximo de 9,75 e R^2 % = 7,14 %, um resultado positivo, sendo que este pico está vinculado a um loco no grupo de ligação na metade da distância entre as marcas CAG 2 e CAG 3.

Para verificar se o resultado positivo para este QTL pelo método de regressão não se trata de um “QTL-fantasma”, que representaria um falso positivo, foi realizada a análise por máxima verossimilhança. Através desta análise, obtiveram-se valores ainda maiores dos parâmetros avaliados, sendo o LOD score máximo de 9,87 e R^2 % = 9,71 %, sendo que o LOD e a correlação do loco da banda CAG 3 apresentaram valores muito próximos dos valores máximos.

Silva 2015 analisou a presença de QTL's para a resistência a *M. incógnita* raça 3 em uma população F_2 de algodoeiro (*Gossypium spp.*) utilizando marcador molecular SSR e obteve dois locos ligados ao fenótipo de resistência nos cromossomos 11 e 15, apresentando LOD scores de 18,6 e 3,2; e R^2 % de 9,39 % e 4,31 %, respectivamente. Ambos foram considerados como QTL's existentes, sendo que o QTL do cromossomo 15 foi tido como inédito e do cromossomo 11 já havia sido descrito anteriormente por diversos autores e possui a maior influência na resistência à formação de galhas.

Campos 2016 encontrou QTL's em diferentes grupos de ligação no genoma da geração F_1 de híbrido de citros (*Citrus reticulata* X *Citrus sinensis*) para a resistência a *Alternaria alternata* demonstrando LOD scores que vão de 2,74 a 5,62, porém com valores baixos de correlação da variação fenotípica (R^2 %), de 0,17 % a 2,83 %; entretanto, alguns ainda foram considerados com efeitos significativos de dominância para a resistência ao fungo.

Portanto, o QTL obtido é real e os locos do grupo de ligação tem uma contribuição considerável sobre o fenótipo de resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne*.

CONCLUSÃO

Foi possível gerar um mapa de ligação e um QTL para o fenótipo de resistência a nematoides com as bandas segregantes 3:1 encontradas. O QTL está em um loco entre as duas

marcas encontradas, que são próximas, e que se fossem sequenciadas poderiam ser localizadas no genoma da alface e anotadas.

A análise desta sequência indicaria quais os possíveis transcritos e produtos proteicos relacionados; e, conseqüentemente, poderia indicar também alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na resistência ao nematoide-das-galhas; uma vez que o valor de correlação fenotípica obtido demonstra um efeito significativo.

Isto seria interessante para o programa de melhoramento da alface, pois facilitaria não apenas a compreensão do mecanismo de resistência da planta, mas também auxiliaria no processo de seleção assistida por marcadores considerando a possibilidade de conversão em marcadores mais específicos para genes de resistência à *Meloidogyne spp.*

AGRADECIMENTOS

O autor gostaria de agradecer à Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes pela parceria com este trabalho, fornecendo as amostras biológicas utilizadas neste experimento.

Referências

- Campos KAFD (2016) Mapeamento de QTLs associados à resistência a *Alternaria alternata* em híbridos de citros.
- Carneiro MS e Vieira MLC (2002). Mapas genéticos em plantas. **Bragantia** **61(2)**: 89-100.
- Cruz CD e Silva LC (2006) Análise de marcadores moleculares. In Borém A, Caixeta ET (Eds.) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, Minas Gerais, p. 307-374.
- Cruz CD (2016) Programa Genes – Genética Quantitativa e Estatística Experimental – versão 2016.6.15. www.ftp.ufv.br/dbg/biodata/.
- Doyle J e Doyle J (1990) Isolation of DNA from small amounts of plant tissue. **BRL Focus** **12**: 13–15.
- Falconer DS e Mackay TFC (1996) **Intoduction to quantitative genetics**. New York, New York, p. 464.
- Grattapaglia, D., & Ferreira, M. E. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, Distrito Federal, p. 220.
- Ferreira S et al (2013) Caracterização de famílias F2:3 de alface para resistência ao nematoide das galhas. **Revista Agrogeoambiental** **5**: 35-42.

Oliveira, EJ et al (2016) Desenvolvimento de ferramentas moleculares e seleção assistida por marcadores para resistência ao vírus do mosaico africano na cultura da mandioca.

Oliveira MS (2012) Caracterização de famílias F3 de alface americana quanto à resistência ao míldio e aos nematóides das galhas e aspectos comerciais.

Pinheiro JB (2013). Manejo de nematoides na cultura da alface. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**.

Rosa JM, Westerich, JN e Wilcken SRS (2013) Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. **Tropical Plant Pathology**: 133-141.

Sala FC e Costa CP (2012) Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira** 30: 187-194.

Silva E H (2015) Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium spp.*) a esse nematoíde.

Souto FDL (2015) Identificação de motivos conservados e prospecção de marcadores EST-SSR em genes responsáveis pela homeostase de metais pesados em plantas.

Velasco UP et al. (2014) Parasitos intestinais em alface (*Lactuca sativa*, L.) das variedades crespa e lisa comercializadas em feiras-livres em Niterói-RJ. **Revista de Patologia Tropical** 43(2): 209-218.

ANEXO

Instructions for authors

General policy and scope of the journal

The **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1984-7033) – is the official quarterly journal of the Brazilian Society of Plant Breeding (www.sbmp.org.br), abbreviated CROP BREED APPL BIOTECHNOL. It is indexed in ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Google Scholar, Acervo Documental da Embrapa, Portal da Capes and SciELO. It publishes original scientific articles, which contribute to the scientific and technological development of plant breeding and agriculture. Articles should be to do with basic and applied research on improvement of perennial and annual plants, within the fields of genetics, conservation of germplasm, biotechnology, genomics, cytogenetics, experimental statistics, seeds, food quality, biotic and abiotic stress, and correlated areas. The article must be unpublished. Simultaneous submitting to another periodical is ruled out. Authors are held solely responsible for the opinions and ideas expressed, which do not necessarily reflect the view of the Editorial board. However, the Editorial board reserves the right to suggest or ask for any modifications required. The journal adopts the Ithenticate software for identification of plagiarism. Complete or partial reproduction of articles is permitted, provided the source is cited. All content of the journal, except where identified, is licensed under a Creative Commons attribution-type BY. All articles are published free of charge. This is an open access journal.

Article

The **CBAB** publishes articles exclusively in English. The authors must submit their articles in English. It is mandatory that the article, after approval, be reviewed in linguistic terms, which must be made exclusively by the journal's official translators, being the onus of this service responsibility of the author. Contributions are submitted via WEB, access <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/> clicking **Submission**, whereupon the article registration system will automatically ask for a password and author's e-mail. **Delete all author and correspondence information from the manuscript file.** As the Journal has a double blind review policy, authors should not reveal their identities in the manuscript. The author will be asked to enter this information in a separate form, during the submission

process before uploading the manuscript file. The author can monitor the manuscript's status of proceeding by his/her e-mail and personal password. Expert *ad hoc* reviewers evaluate the manuscripts to assist the Editorial Board with the final decision of approval, modification, or disapproval.

The complete manuscript should comply with the following sequence: **Title, Abstract, Key words, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figures**. The manuscript must be typed in Word for Windows, in times new roman 12 font, double spacing, format A4, with 20 mm margins and consecutive top right numbering. The double spaced text must not exceed 18 pages, including separately placed Tables and Figures (one a page) in the end of text. All the equations, models and simbols should be made in Microsoft Equation. The **Title** should be clear, concise, and express the gist of the article. It should not surpass 15 words, be typed in bold, justified, with initial upper case letters. The **Authors'** complete names, and their institutional addresses should be entered later in the proof reading. The **Abstract** should not contain more than 150 words. A maximum of 5 **Key words**, different from the title, are allowed. The **Introduction** should include a brief literature review on subject and aims of the study. **Material and Methods** must enable other researchers to repeat the experience. Preferentially, **Results and Discussion** should be presented together for easiness of reading. **Acknowledgements** should be succinct, and limited to effective co-workers and financing agencies. Be carefull about the **References**. Never cite summaries of events and theses, or any other unpublished literature. These measures will help shape a manuscript that will be a credit both to your article and to the journal. **References** cited in the text by the last name of the author and the year (for instance, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) are to be alphabetically listed in the item **References**, according to the following examples:

Article in journals

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1: 3-10.

Book

Hallauer AR, Carena MJ and Miranda Filho JB (2010) **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer, New York, 664p.

Book chapter

Morais PPP and Borem A (2017) GM cultivars. In Silva FL, Borem A, Sediya T and Ludke WH (eds) **Soybean breeding**. Springer, New York, p. 174-189.

Congress

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In Stalker HT and Murphy JP (eds) **Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

The **CBAB** publishes, besides articles, other text forms, equally subjected to the discretion of *ad hoc* reviewers.

Review

Leading authors of certain topics will be asked for a **Review** by the Editorial board (also restricted to 18 pages), which should shed light specifically on stirring subject matters that deserve a deeper analysis into their stage of development.

Note

Notes are limited to 12 pages and designated to inform about new studies or observations, wherefore the analytical tools are not required. They may focus on a matter of broad interest; briefly describe an original study; report on participatory research; express observations of special interest in the fields of research, teaching, and applied sciences; or comment on the release of new software in a plant breeding-related area.

Plant breeding program

Outstanding breeding programs regarding innovation, efficiency, impact, and/or continuity can be portrayed in the **CBAB**, restricted to 18 pages.

Cultivar release

New cultivars deserve special attention for their key role in plant breeding, and consequently, for domestic agriculture. A contribution to this section should comprise an Abstract of maximally 50 words, Key words, an Introduction, mention the applied improvement methods, performance characteristics, foundation seed production, and contain a minimum of References (follow examples of articles references), Tables, and Figures. The entire text should not exceed 12 pages.

Software/Device release

New softwares and devices are going to be published in the Special section because of the importance they represent for the current improvement and, therefore, for agriculture. This new section must contains Abstracts limited to 50 words, Key words, introduction, methods, history used for the development of the manuscript, performance characteristics, applications, forms of access and a minimum of references, tables and figures. The entire manuscript will be limited to 12 pages.

Book review

This new section was created to announce new books related to plant breeding. A contribution to this section should comprise two copies of the book sent in by the Author. The book will be revised by an expertise referee chosen by the Editorial Board to edit a brief.

Viewpoint

At invitation of the Editorial board, viewpoints will be - as reviews - worked out for the **CBAB**, to outline topics which interest plant breeders and society.

Letters

Short letters of general interest are also welcome for publication, subject to changes by the Editorial Board for reasons of space limits or clearness of expression.

Authors of articles in the journal **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** profit from the following benefits:

- § CBAB is an open access journal
- § All articles are published free of charge
- § On line submission and revision of articles
- § Quick publication: average time of 7 months, in 2016
- § Pdf articles freely available on the WEB
- § CBAB adopts the Ithenticate software against plagiarism
- § All articles are published with DOI

Send your article to

<http://www.sbmp.org.br/cbab/sisbab/> clicking Submission