

Diversidade Genética e Seleção Assistida por Marcadores moleculares RAPD em populações de alface.

S. A. Silva; R. Silva-Mann; S. V. A. Carvalho

Laboratório de Genética Molecular, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

susi_agro@hotmail.com

A cultura da alface é atingida por diversas pragas e doenças, além de não tolerar temperaturas elevadas. A alternativa sustentável para o controle destas pragas é a utilização de cultivares resistentes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de linhagens F₄ de alface, por meio de marcadores RAPD, buscando identificar sequências de DNA associadas aos genes de resistência, visando a seleção assistida por marcadores. Foram utilizados, além dos parentais Salinas 88 e Regina 71, a geração F₂ e 8 linhagens da geração F₄, inicialmente obtida na Universidade Federal Lavras – MG, e selecionadas para a obtenção de cultivares resistentes a nematóides, vírus e tolerantes ao calor. Foi realizada a extração do DNA, pelo método CTAB 2%. A seguir procedeu-se a purificação e amplificação do DNA utilizando 19 oligonucleotídeos, sendo os produtos de amplificação separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. A similaridade genética entre os indivíduos foi calculada pelo Coeficiente de Similaridade de Jaccard e a construção do dendrograma, realizada utilizando-se o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas – UPGMA. As linhagens e cultivares estudadas apresentaram similaridade abaixo de 83%, sendo consideradas divergentes, e ocorreram marcas associadas aos genes de resistência que poderão ser sequenciadas e utilizadas para a construção de primers específicos na seleção de genótipos adaptados à região nordeste.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., tolerância, similaridade.

The lettuce is affected by several pests and diseases, and does not tolerate high temperatures. The more sustainable alternative to control is the use of resistant cultivars. This study aimed to evaluate the genetic diversity of strains F₄ lettuce using markers to identify tags associated with resistance genes. Were used in addition to parental Regina 71 and Salinas 88, the F₂ generation and 8 lines of the F₄ generation, first obtained at the Universidade Federal Lavras – MG, selected to obtain cultivars resistant to nematodes, virus and heat-tolerant. We performed DNA extraction by CTAB 2%. Then behaved to the purification and amplification of DNA using 19 primers, and the amplification products were separated on agarose gel 0.8% stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The genetic similarity between individuals was calculated by the coefficient of Jaccard similarity and dendrograms, performed using the unweighted pairgroup method with arithmetic averages - UPGMA. The lines and cultivars had similar below 83%, are considered different, and there were marks associated with resistance genes that may in future work be sequenced for the construction of specific primers.

Keywords: *Lactuca sativa* L., tolerance, similarity.

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea e anual, pertence à família Asteraceae, gênero *Lactuca* (CHUNG, 2005). É uma espécie autógama, sendo a incidência de alogamia pouco freqüente. Ao fim da fase vegetativa, quando a planta atinge o máximo desenvolvimento das suas folhas, ocorre o florescimento da planta, o qual é caracterizado por uma inflorescência ramificada terminal com flores hermafroditas (FILGUEIRA, 1982). A fase reprodutiva não interessa ao mercado de consumo *in natura*, apenas aos produtores de sementes.

A alface é consumida *in natura* na forma de salada (FIORINI et al., 2007). Assim como o consumo, o cultivo da alface vem crescendo e ganhando importância dentro do grupo das olerícolas. É uma cultura que deve ser plantada próxima ao mercado consumidor, para que ocorra um transporte em um menor tempo possível devido a sua alta perecibilidade (FIORINI et al., 2005).

Vários estudos vêm sendo realizados visando obter cultivares com características favoráveis adaptadas às diversas regiões climáticas. Porém, a inexistência de genótipos mais tolerantes ao calor e a ocorrência de pragas e doenças são problemas observados nesta cultura.

O pendoamento precoce é um problema grave, desencadeado por altas temperaturas, ainda enfrentado pelos produtores que cultivam a alface. Durante a fase vegetativa a cultura necessita de temperaturas amenas, especialmente na época do desenvolvimento da cabeça. O ciclo da alface é acelerado quando se tem temperaturas elevadas (acima de 20°C) resultando em plantas menores e queda na produtividade (FILGUEIRA, 1982). O desenvolvimento de cultivares que não apresentem florescimento precoce é muito importante para a região Nordeste onde as temperaturas são acima da média desejada na maior parte do ano.

Após o início do florescimento, a alface torna-se imprestável para a comercialização, pois o seu teor em látex eleva-se, conferindo um sabor amargo pronunciado, as folhas tornam-se endurecidas perdendo o frescor tão apreciado pelos consumidores (FILGUEIRA, 1982). Por isso, o ponto de colheita deve ser quando a cabeça atinge o máximo de desenvolvimento, mas com suas folhas ainda tenras.

A incidência de doenças tem causado a redução do rendimento de diversas culturas. Para o controle dessas doenças o mais indicado é a utilização de variedades resistentes. Assim, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é a resistência a doenças.

Outro grave problema enfrentado pelos produtores de alface é a alta incidência de nematóides (FIORINI et al., 2005). Cultivares de alface infestadas por *Meloidogyne* possuem sistema radicular muito pobre, com escassas radículas atuando precariamente. Há uma densa formação de galhas que obstruem a absorção de água e nutrientes, provocando baixa produção, amarelecimento das plantas que apresentam cabeça de tamanho reduzido e pequeno volume foliar, características sem valor para o consumo *in natura* (KIMATI et al., 2005).

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Quatro tipos de marcadores têm sido utilizados em plantas: morfológico, citológico, bioquímico e molecular (BORÉM e MIRANDA, 2005). Marcadores moleculares são segmentos cromossômicos que podem ser utilizados para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos (BORÉM e MIRANDA, 2005).

Na técnica de RAPD utiliza-se um oligonucleotídeo sintético como iniciador do processo de amplificação, que produz um polimorfismo detectado na presença ou ausência de bandas discretas de DNA, sendo, portanto, de expressão dominante (BORÉM e MIRANDA, 2005). Polimorfismo é a ocorrência, em uma mesma população, de duas ou mais formas distintas (BORÉM e MIRANDA, 2005) do mesmo gene. O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do "primer", que impedem o seu pareamento e a conseqüente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o tamanho do segmento amplificado (ALZATE-MARIN et al., 2005). É uma técnica simples e rápida que requer pequenas quantidades de DNA.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de linhagens F₄ de alface por meio de marcadores moleculares RAPD visando à identificação de marcas associadas aos genes de resistência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação e no laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal de Genética Molecular-Setor de Genética Molecular, localizados na Universidade Federal de Sergipe, no período de 17 de novembro de 2008 a 19 de janeiro de 2009.

Para o estudo foram utilizados os parentais Salinas 88 (americana, resistente ao nematóide das galhas e florescimento precoce) e Regina 71 (folhas lisas, suscetível ao nematóide das galhas e florescimento tardio), a geração F₂ e 8 linhagens da geração F₄ (sendo 5 resistentes e 3 segregantes para resistência ao nematóide das galhas), de acordo com Carvalho Filho (2006), já selecionados para a resistência ao *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) e tolerância ao pendoamento precoce nas gerações anteriores (Tabela 1).

TABELA 1. Linhagens de alface (*Lactuca sativa* L.) utilizadas para avaliar a diversidade genética de por meio de marcadores moleculares RAPD. UFS, São Cristóvão-SE, 2009.

Número	Resistência e Suscetibilidade a nematóide (<i>Meloidogyne incognita</i>)	Notas de maior frequência*	Linhagens
		* Notas atribuídas a n. de galhas e a n. massa de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	
1	Segregante	5 - 5	Regina 71
2	Resistente	1 - 1	Salinas 88
3	Resistente	-	F ₂
4	Resistente	1 - 1	AFX005B-273-02
5	Resistente	1 - 1	AFX005B-121-02
6	Resistente	1 - 1	AFX005B-124-06
7	Resistente	1 - 1	AFX005B-72-02
8	Segregante	2 - 3	AFX005B-16-03
9	Resistente	1 - 1	AFX005B-114-01
10	Segregante	3 - 2	AFX005B-183-01
11	Segregante	3 - 2	AFX005B-43-02

As sementes foram cedidas pela Universidade Federal de Lavras (Prof. Luiz Antônio Augusto Gomes), plantadas em bandejas de poliestireno expandido, com 128 células, utilizando como substrato pó-de-coco, esterco bovino e solo, na proporção de 1:1:1, sendo semeadas duas a três sementes por alvéolo, sem realização de desbaste.

Após o surgimento da terceira folha as plântulas foram colhidas para a extração do DNA seguindo o protocolo descrito por Nienhuis et al. (1995), com modificações. Nesta extração empregou-se 5 a 8 folhas jovens, que foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo adicionando-se 20 µL de β-mercaptoetanol e 10 mL de tampão CTAB 2% (brometo de cetil trimetil amônio). O material obtido foi colocado em tubos de ensaio, que foram levados para banho-maria a 65°C por 30 minutos. A seguir procedeu-se a purificação, onde foi adicionado clorofórmio (álcool isoamílico 24:1). As amostras foram homogeneizadas por meio de lentas inversões e centrifugadas a 7.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se 750 µL de acetato de amônio. As amostras foram mantidas em freezer a -20°C por 24 horas para precipitação do DNA. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de etanol mantendo-as em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugando, posteriormente, a 4.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou o precipitado secar.

Seguiu-se com a amplificação do DNA onde foram preparados coquetéis para cada amostra de DNA constituídos de 2,92 µL de água pura; 1,30 µL de tampão PCR 10X; 1 µL de cloreto de magnésio (25 mM) 1,04 µL de dNTP (bases nitrogenadas), 1,04 µL de BSA (Soro Albumina Bovina); 0,20 µL de *Taq* polimerase; 2,5 µL do oligonucleotídeo e 3,0 µL do DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometria Tpersonal programado para um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 60 segundos (desnaturação), 36°C por 2 minutos (anelamento da sequência iniciadora) e 72°C por 60 segundos (elongação). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,045 M, 5,4 g/L de Tris-base, 2,75 g/L de ácido bórico, 5 mL de EDTA 0,20 M e 1 L de água destilada), corados com brometo de etídio 25 µL em 500 mL de água destilada e visualizados sob luz ultravioleta.

A similaridade genética entre as linhagens avaliadas foi obtida utilizando 19 oligonucleotídeos decâmeros (IDT Technology) (Tabela 2), e as bandas obtidas correlacionadas com as informações disponibilizadas pela Universidade Federal de Lavras sobre resistência ao nematóide *M. incognita* raça 1 (Tabela 1).

TABELA 2. Seqüência dos 19 primers utilizados. UFS, São Cristóvão-SE, 2009.

Primer	Seqüência
IDT -01	CAG GCC CTT C
IDT -03	GTT TCG CTC C
IDT -04	TGA TCC CTG G
IDT -05	TTC GAG CCA G
IDT -06	GTG AGG CGT C
IDT -07	ACC GCG AAG G
IDT -08	GGA CCC AAC C
IDT -09	CCC AAG GTC C
IDT -10	GGT GCG GGA A
IDT -11	ACG GAT CCT G
IDT -12	GAG GAT CCC T
IDT -13	CTA CGG AGG A
IDT -14	GGC ACT GAG G
IDT -15	GGT CGG AGA A
IDT -16	TCG GAC GTG A
IDT -17	ACC TGG ACA C
IDT -18	GGA GGA GAG G
IDT -19	CCC GGC ATA A
IDT -20	AAA GTT GGG A

Para a avaliação dos resultados obtidos na reação de RAPD, cada banda presente no gel foi designada como 1 (um) e a ausência de bandas como 0 (zero). Com a obtenção desses dados foi construída uma matriz de 0 e 1. Esta matriz binária foi empregada para identificação de bandas associadas à resistência, para fins de seleção assistida por marcadores e para cálculo das similaridades genéticas usando o Coeficiente de Jaccard por meio da expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a+b+c} \quad (1)$$

onde:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i ;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j ;

As similaridades foram obtidas usando o pacote estatístico NTSYS-pc versão 2.1 e a construção do dendrograma realizada utilizando-se o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas – UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic

Averages) (ROHLF, 2001). Os erros associados a cada similaridade foram estimados pelas seguintes expressões:

$$V = \frac{ns(1-s)}{(n-1)} \quad (2)$$

$$\text{Erro padrão estimado} = \left(\frac{V}{n} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Sendo:

v : variância da similaridade entre cada par de progênies;

s : similaridade genética entre cada par de progênies;

n : número total de bandas utilizadas na estimativa da similaridade genética.

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados nos dendrogramas a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade (sg_n). O sg_n foi estimado por meio do teste t , no nível de 1% de probabilidade.

$$Sg_m = 1 - \left(t - \bar{S}sg_{ij} \right) \quad (4)$$

Em que:

t = o valor tabelado de t com $n - 2$ graus de liberdade;

$\bar{S}sg_{ij}$ = erro médio das comparações consideradas no dendrogramas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 19 *primers*, dos quais 17 apresentaram bandas polimórficas nítidas. Foi gerado um total de 96 bandas sendo 59 bandas polimórficas (61,5%) e 37 bandas monomórficas. O *primer* 7 foi o que apresentou o maior número de bandas polimórficas (8).

De acordo com as estimativas de similaridades genéticas (Tabela 3), as linhagens AFX005B-183-01 e AFX005B-43-02 apresentam menor similaridade (28,26%). A maior similaridade foi observada entre o par Salinas 88 (resistente ao nematóide das galhas raça 1) e AFX005B-124-06 (82,6%). As linhagens AFX005B-121-02, AFX005B-114-01 e AFX005B-72-02 apresentam elevadas similaridades com a cultivar Salinas 88,74%, 70,45% e 70,21%, respectivamente. Estas cultivares (AFX005B-124-06, AFX005B-121-02, AFX005B-114-01 e AFX005B-72-02), segundo Carvalho Filho (2006), são homozigotas para os genes de resistência para os caracteres avaliados (número de galhas e número de massa de ovos).

TABELA 3. Estimativas de similaridade genética (%) (abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre cultivares e linhagens de *Lactuca sativa* L. (alface) empregando o coeficiente de Jaccard. UFS, São Cristóvão-SE, 2009.

Matrizes	Regina 71	Salinas 88	F ₂	AFX005B-273-02	AFX005B-121-02	AFX005B-124-06	AFX005B-72-02	AFX005B-16-03	AFX005B-114-01	AFX005B-183-01	AFX005B-43-02
Regina 71		0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06
Salinas 88	56,52		0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
F ₂	54,76	67,39		0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07
AFX005B - 273-02	60,32	58,69	60,97		0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06
AFX005B - 121-02	53,06	74,00	66,66	58,33		0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07
AFX005B - 124-06	56,52	82,60	71,11	55,31	77,55		0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
AFX005B - 72-02	54,54	70,21	69,76	50,00	76,59	77,77		0,06	0,06	0,06	0,06
AFX005B - 16-03	56,09	58,33	60,46	51,16	64,58	65,21	60,00		0,07	0,06	0,07
AFX005B - 114-01	46,51	70,45	58,13	45,45	62,50	70,45	65,11	48,88		0,06	0,07
AFX005B - 183-01	34,28	34,09	33,33	29,72	37,77	34,09	34,14	37,83	38,88		0,06
AFX005B - 43-02	41,17	61,53	45,28	35,18	55,35	61,53	60,00	46,15	53,06	28,26	

Pela análise do dendrograma (Figura 1), nota-se a formação de três grupos, sendo o grupo I formado pela linhagem AFX005B-183-01, sendo a mais divergente com apenas 34% de similaridade quando comparado às demais. O grupo II formado por AFX005B-43-02, AFX005B-16-03, AFX005B-114-01, F₂, AFX005B-72-02, AFX005B-121-02, AFX005B-124-06 e Salinas 88 e o grupo III formado por Regina 71 e AFX005B-273-02. Com base nos erros associados a cada similaridade, os indivíduos são considerados semelhantes acima de 83% de similaridade. Diante disso, todas as linhagens empregadas apresentam divergência. Assim poderão vir a ser utilizadas no desenvolvimento de cultivares resistentes.

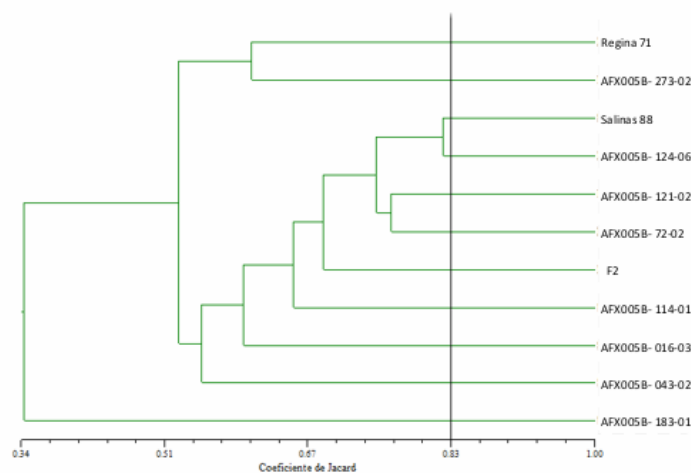


FIGURA 1. Dendrograma construído por meio do método UPGMA a partir dos valores de similaridade genética entre cultivares e linhagens de alface. UFS, São Cristóvão-SE, 2009.

Pela análise do dendrograma pode-se notar também que a linhagem AFX005B-273-02 apresenta uma similaridade genética maior com o parental suscetível, Regina 71, sendo, portanto, esta menos recomendada para programas de melhoramento visando resistência a nematóide.

O primer 10 apresentou bandas diferenciadas para as classes de linhagens resistentes e segregantes (Tabela 4), podendo ser identificadas marcas (bandas) associadas a genes de resistência.

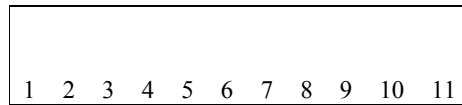


FIGURA 2. Zimograma primer 10 em alface: 1 = Regina 71; 2 = Salinas 88; 3 = F_2 ; 4 = AFX005B-273-02; 5 = AFX005B-121-02; 6 = AFX005B-124-06; 7 = AFX005B-72-02; 8 = AFX005B-16-03; 9 = AFX005B-114-01; 10 = AFX005B-183-01; 11 = AFX005B-43-02.

Westerich et al. (2006) avaliou plantas de 7 populações F_2 , oriundas do cruzamento envolvendo as cultivares Regina 71, Grand Rapids e Elisa, de folhas lisas e resistentes aos nematóides das galhas. Concluiu que há possibilidades de obtenção de materiais resistentes ao pendoamento precoce. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2006) em Palmas-TO, avaliando linhagens F_7 .

Alzate-Marin et al. (2005) obteve linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com características agrônomicas de interesse da cultivar Rudá, contendo alelos de resistência à antracnose, ferrugem e mancha-angular, por meio da seleção assistida por marcadores. Esses alelos não estão presentes naquela cultivar. A aplicação de marcadores moleculares na seleção assistida durante o processo de piramidação de alelos de resistência vem sendo bastante utilizada para o desenvolvimento de cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Martins et al. (2004) observaram que o primer OP-15, no estudo de quatro genótipos de feijão, amplificou regiões de bandas de DNA presentes apenas nos resistentes ao fungo *Phaeoisariopsis griseola*. No estudo de Carvalho (2002) com a cultivar de soja UFV 91-61 o primer OPAB 19 gerou dois produtos de amplificação com tamanhos diferentes. Assim é possível distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos. Estes marcadores poderão ser ferramentas valiosas em programas de melhoramento que visem obter linhagens resistentes ao cancro da haste.

4. CONCLUSÃO

As linhagens que apresentaram maiores similaridade com a cultivar resistente ao nematóide das galhas raça 1, Salinas 88, foram: AFX005B-124-06, AFX005B-121-02, AFX005B-72-02 e AFX005B-114-01. O primer 10 é eficiente para diferenciar as linhagens resistentes das suscetíveis. No entanto, deve-se proceder a reprodutibilidade dos resultados para a confirmação da eficiência do primer.

TABELA 4. Representação das bandas polimórficas apresentadas por cada primer* testado, para os parentais, a geração F_2 e as 8 linhagens obtidas do cruzamento das cultivares de alface Regina 71 X Salinas 88. UFS, São Cristóvão-SE, 2009.

Primer	Bandas
	Resposta ao ataque por nematóide S R F ₂ R R R R S R S S
IDT - 01	1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-1 1-1-1-1-1-1-1-0-0-1-1
IDT - 03	1-1-0-1-1-1-1-1-1-0-1 1-1-0-1-0-1-0-1-0-0-1 1-1-0-1-1-1-0-1-1-1-1 1-1-0-1-1-1-1-1-1-1-1
IDT - 04	0-0-1-0-0-1-1-1-1-0-0-1 1-1-1-0-0-1-1-1-1-0-1 1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-1 1-0-1-0-1-1-1-1-0-0-1 1-0-1-1-1-1-1-1-1-1-0
IDT - 05	1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-1
IDT - 06	1-1-1-1-1-1-1-1-0-0-0 0-0-0-0-0-0-0-0-1-0-0 1-1-1-1-1-1-0-1-1-1-0
IDT - 07	0-0-0-0-1-0-0-0-0-0-0 0-0-0-0-1-0-0-0-0-0-0 1-1-1-1-1-1-1-1-0-0-0 0-1-1-1-1-1-0-1-0-0-0 0-1-1-1-1-0-0-1-0-0-0 1-1-1-1-1-1-1-1-0-0-0 1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-0 1-1-1-1-1-0-1-1-1-1-0
IDT - 08	0-1-0-0-1-1-1-0-0-0-1 1-1-1-1-1-1-1-0-1-0-1 1-1-1-1-1-1-1-0-1-0-1
IDT - 09	0-1-0-0-0-0-0-0-0-0-1 0-1-0-0-1-1-1-0-1-0-1 0-1-1-1-1-1-1-0-1-0-1 0-1-1-0-0-1-0-0-1-0-1 1-1-1-1-1-1-1-0-1-0-1
IDT - 10	0-1-1-1-1-1-1-0-1-0-0
IDT - 11	0-0-0-1-0-0-0-0-0-0-0
IDT - 12	0-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1
IDT - 14	0-0-0-0-1-0-0-0-0-0-1 1-1-1-1-1-1-1-0-1-1-0 0-1-1-0-1-1-1-0-1-1-1 1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-1
IDT - 15	0-1-0-0-1-1-1-1-1-0-1 0-1-0-0-1-1-1-0-1-0-1 0-0-0-0-1-1-0-1-0-0-0 1-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0 0-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1
IDT - 16	1-1-1-0-1-1-1-1-1-1-1 1-1-1-1-1-1-0-1-1-1-1 1-0-1-1-1-0-1-1-0-0-1 0-1-1-0-1-1-1-1-1-1-1
IDT - 17	0-1-1-0-1-1-1-1-1-0-1 0-1-1-0-1-1-1-1-1-0-1 1-1-1-1-1-1-1-1-1-0-1
IDT - 19	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-1 0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-1 0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-1 0-0-0-1-0-0-0-0-0-0-1 1-1-0-0-0-0-0-0-0-0-1 0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-1

* IDT = primers decâmeros; R= Resistente e S= Suscetível a Nematóide *M. incognita*

1. ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, n.4, Jul./ago., 2005.
2. BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. *Melhoramento de plantas*. 4.ed. Viçosa: UFV, 2005, p.441, 447, 510, 514.
3. CARVALHO FILHO, J. L. S. de. *Resistência da alface 'Salinas 88' a Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood*. 49f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
4. CARVALHO, G. A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, n.5, Set./out., 2002.
5. CHUNG, R. M. *Reação de linhagens e cultivares de alface ao Lettuce mosaic virus (patotipo IV)*. 43f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2005.
6. FILGUEIRA, F. A. R. *Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças*. 2.ed. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982, p.85
7. FIORINI, C. V. A.; GOMES, L. A. A.; LIBÂNIO, R. A. ; MALUF, W. R. ; CAMPOS, V. P. ; LICURSI, V. ; MORETTO, P. ; SOUZA, L. A. de. ; FIORINI, I. V. A. Identificação de famílias F_{2,3} de alface homozigotas resistentes aos nematóides das galhas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.25, n.4, Out./dez., 2007
8. FIORINI, S. GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R. ; FIORINI, I. V. A. ; DUARTE, R. de P. F. ; LICURSI, V. Avaliação de populações F₂ de alface quanto à resistência aos nematóides das galhas e tolerância ao florescimento precoce. *Horticultura Brasileira*, Brasília, V.23, n.2, Abr./jun., 2005.
9. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p.27.
10. MARTINS, L. S. S.; FALCÃO, T. M. M.; COELHO, R. S. B. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à mancha angular do feijoeiro comum. *Summa Phytopatologica*, Jaboticabal, v.30, n.2, p.234-237, 2004.
11. NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Madison, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.
12. ROHLF, F. J. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York, 2001.
13. WESTERICH, J. N.; GOMES, A. R. do V. A.; GOMES, C. C.; FERREIRA, S.; MASSAROTO, J. A.; GOMES, L. A. A.; MALUF, W. R.; LICURSI, V. Avaliação de populações F₂ de alface de folhas lisas quanto à tolerância ao florescimento precoce. *Horticultura Brasileira*, Goiânia. v.24, n.1, p.187, Jul., 2006