

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A UM GENE MUTADO DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO (*Erysiphe pisi* Syd.) EM ERVILHA (*Pisum sativum* L.)

(Tese para a obtenção do grau de doutor no ramo de Ciências Agrárias,
especialidade de Melhoramento de Plantas)

MARIA DA GRAÇA MENDONÇA PEREIRA

Orientador: Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão, Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Constituição do Júri:

Presidente: Reitor da Universidade do Algarve

Vogais: Doutora Olinda da Conceição Pinto Carnide, Professora Catedrática da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Doutor José António Santos Pereira de Matos, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação

Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão, Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Doutor Alfredo Jaime Morais Cravador, Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Doutora Deborah Mary Power, Professora Catedrática da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Licenciado Manuel Maria Tavares de Sousa, Investigador Coordenador da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas

FARO
2006

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Quadros	vii
Abreviaturas	ix
I. Introdução.....	1
II. Estado Actual dos Conhecimentos	5
II.1. A Mutagénesse Experimental no Melhoramento de Plantas	5
II.2. Agentes mutagénicos.....	8
II.3. A mutagénesse experimental nas espécies de leguminosas para grão.....	11
II.4. Indução de mutantes em <i>Pisum sativum</i> L.	14
II.5. Indução de mutantes para resistência a doenças	18
II.6. Mecanismos de resistência a doenças	20
II.7. Resistências ao oídio	25
II.8. Resistência ao oídio em <i>Pisum sativum</i> L.	28
III. Material e Métodos.....	31
III.1. Material vegetal	31
III.2. Sincronização das células dos meristemas apicais.....	31
III.3. Tratamentos mutagénicos	31
III.4. Avaliação dos mutantes resistentes ao oídio.....	33
III.5. Identificação de marcadores moleculares ligados ao gene mutado de resistência ao oídio	35
III.6. Extracção e quantificação de DNA.....	35
III.7. Análise de marcadores moleculares.....	36
III.7.1. Marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)	36
III.7.2. Marcadores ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”)	38
III.7.3. Marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”)	39

III.7.4. Marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”)	42
III.8. Conversão de marcadores RAPD e AFLP em marcadores SCAR	42
III.9. Construção de um mapa genético e mapeamento do gene de resistência ao oídio.....	44
IV. Resultados e Discussão	47
IV.1. Mutagênese induzida.....	47
IV.1.1. Efeito do tempo de exposição aos compostos mutagênicos	47
IV.1.2. Influência da fase do ciclo celular no efeito mutagênico	51
IV.1.3. Seleção de plantas mutantes.....	55
IV.1.3.1. Plantas mutantes com características morfológicas interessantes para o Melhoramento	55
IV.1.3.2. Plantas mutantes resistentes ao oídio.....	58
IV.2. Estudo da natureza genética da resistência ao oídio	61
IV.2.1. Reação dos progenitores ao oídio	61
IV.2.2. Natureza genética das resistências induzidas	61
IV.2.3. Relações alélicas entre os genes de resistência.....	64
IV.3. Identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao oídio....	66
IV.3.1. Linhas quase isogênicas.....	67
IV.3.2. Bulk Segregant Analysis (BSA)	74
IV.4. Mapeamento do locus de resistência ao oídio	75
IV.4.1. Seleção de marcadores moleculares.....	76
IV.4.2. Conversão dos marcadores RAPD e AFLP que flanqueiam o locus de resistência em marcadores SCARs	84
IV.4.2.1. Conversão do marcador AFLP em marcador SCAR.....	85
IV.4.2.2. Conversão do marcador RAPD em marcador SCAR	89
IV.4.3. Mapa genético preliminar de <i>Pisum sativum</i> L. e localização do locus de resistência ..	91
V. Discussão Geral	95
VI. Considerações Finais	101
VII. Referências Bibliográficas.....	103

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para levar a bom termo este trabalho.

Ao Professor Doutor José Leitão, na qualidade de orientador desta tese pela forma como me acolheu no Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade do Algarve, por ter acompanhado todas as fases deste trabalho e pelos conhecimentos que me transmitiu nas áreas de mutagénese experimental e marcadores moleculares.

Ao Investigador Coordenador Manuel Tavares de Sousa por me ter incentivado a realizar o trabalho de doutoramento, por ter disponibilizado os meios que permitiram as minhas deslocações à Universidade do Algarve e pelo interesse sempre demonstrado.

Aos bolsеiros e técnicos do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas pelo espírito de equipa demonstrado e pelos conhecimentos que partilharam ao longo do período que abrangeu a parte experimental desta tese.

Aos colegas e técnicos do Departamento de Forragens, Pastagens e Outras Culturas pela colaboração dada aos trabalhos inseridos no programa de melhoramento de ervilha, permitindo que estes continuassem a ser desenvolvidos durante os períodos em que estive ausente da ENMP.

Ao José Pereira, Mário Farinhó e Pedro Oliveira pela colaboração na revisão e formatação do trabalho escrito.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e apoiaram quero também deixar aqui o meu Muito Obrigada.

Os trabalhos aqui desenvolvidos foram financiados pelo projecto PIDDAC 412 “Utilização de novas mutações que conferem resistência ao oídio em ervilheira. Identificação de marcadores moleculares e mapeamento dos genes de resistência” e pelo projecto IAEA RC – 1076 “Mapping new mutated genes conferring resistance to powdery mildew in *Pisum sativum* L.”

NOME: Maria da Graça Mendonça Pereira

FACULDADE: Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais

ORIENTADOR: Prof. Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão

DATA: Junho 2006

TÍTULO DA TESE: Identificação de marcadores moleculares ligados a um gene mutado de resistência ao oídio (*Erysiphe pisi* Syd.) em ervilha (*Pisum sativum* L.)

Resumo

Este estudo teve como objectivos a obtenção de mutantes de ervilha (*Pisum sativum* L.) com interesse agronómico e o mapeamento genético de algumas mutações de maior relevância. Duas mutações conferindo resistência ao oídio (*Erysiphe pisi* Syd.) foram induzidas por tratamento das variedades Frilene e Solara com o agente mutagénico químico etilnitrosourea. Os estudos realizados sobre o mecanismo genético da resistência apresentada pelos dois novos mutantes permitiram confirmar tratar-se de duas mutações recessivas que afectaram o mesmo *locus*, e que, por outro lado, verificámos corresponder ao *locus er1* determinante das resistências naturais até hoje identificadas em ervilha. Com base na descendência F₂ do cruzamento entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante foi construído um mapa genético preliminar. O *locus* mutado *er1* aparece integrado num grupo de ligamento de 17 marcadores, flanqueado a 5 cM por um marcador AFLP e por um marcador RAPD, ambos transformados em marcadores SCAR. Estes marcadores poderão ser úteis nos programas de selecção assistida de plantas resistentes ao oídio e irão ser utilizados em trabalhos futuros para refinar a procura de marcadores moleculares fortemente ligados ao *locus* de resistência, permitindo avançar no isolamento do gene de resistência por clonagem baseada em mapas genéticos.

Palavras chave: *Pisum sativum* L., mutagénesse, *Erysiphe pisi* Syd., resistência, marcadores moleculares

Identification of molecular markers linked to a mutated gene conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe pisi* Syd.) in pea (*Pisum sativum* L.)

Abstract

The objectives of this study were to obtain novel mutant forms of pea (*Pisum sativum* L.) with agronomic interest and to localize the most relevant mutated genes in the pea genome. Two mutations conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe pisi* Syd) were induced via ethylnitrosourea treatments of cultivars Frilene and Solara. The genetic analysis of the two new mutant lines confirmed that resistance to powdery mildew in pea is monogenic and recessive. The two recessive mutations have shown to affect the same *locus*, *er1*, which determines all natural sources of powdery mildew resistance identified so far. The molecular analysis carried out on the F₂ progeny, arising from a Solara x Frilene mutant cross, permitted the construction of a preliminary genetic map. The *locus er1* is incorporated in a linkage group of 17 markers flanked at 5 cM by an AFLP and RAPD marker (converted into SCAR markers). These markers will be extremely useful for marker assisted selection in plant breeding programs and will be used to refine the search for molecular markers tightly linked to the resistance *locus*, paving the way for the isolation of the resistance gene via map based cloning.

Key-words: *Pisum sativum* L., mutagenic treatments, *Erysiphe pisi* Syd., resistance, molecular markers

Lista de Figuras

Figura 1 - Número de variedades obtidas por mutagênese induzida em diferentes grupos de cultura	6
Figura 2 - Planta mutante com entre-nós curtos induzida por tratamento com MNU (1 mM) na variedade Solara.....	57
Figura 3 - Planta mutante com número elevado de vagens e com porte erecto induzida por tratamento com ENU (5 mM) na variedade Frilene	57
Figura 4 - Planta anã induzida por tratamento de plântulas de Frilene com MNU (1 mM)	58
Figura 5 - Planta de crescimento determinado seleccionada após tratamento de plântulas de Solara com MNU (1 mM).....	58
Figura 6 - Plantas de Solara e de Solara mutante	59
Figura 7 – Plantas de Frilene e de Frilene mutante.....	59
Figura 8 – Padrões de amplificação da variedade comercial Frilene (F) e respectivo mutante (FM) obtidos com os “primers” RAPD OPL 13, OPM 04 e OPM 11.....	68
Figura 9 – Sequência de nucleótidos do fragmento OPL13_993 amplificado na variedade Frilene.....	69
Figura 10 – Padrões de amplificação do SCAR L13_993 nas variedades comerciais e respectivos mutantes (F-Frilene, FM-Frilene mutante, S-Solara, SM-Solara mutante)	70
Figura 11 – Padrão de amplificação gerado pelo “primer” RAPD OPAA04, utilizando a variedade Solara, a linha Frilene mutante, o “bulk” de DNA de plantas susceptíveis e o “bulk” de DNA de plantas resistentes	75
Figura 12 - Amplificação com o “primer” RAPD OPN02. A seta indica o marcador polimórfico OPN02_850 entre os dois progenitores (S-Solara e FM-Frilene mutante) e que segrega na descendência F ₂	78
Figura 13 - Amplificação com o “primer” ISSR 14. A seta indica um marcador polimórfico entre os dois progenitores e que segrega na descendência F ₂	79
Figura 14 - Amplificações obtidas com a combinação de “primers” E-AAC/M-CTC. As setas indicam alguns marcadores polimórficos observados entre os progenitores Solara e Frilene mutante e que segregam na descendência F ₂	81
Figura 15 – Amplificação do SCAR PD10_650 nos progenitores Solara (S) e Frilene mutante (FM).....	83

Figura 16 – Sequência do marcador AGG/CAA_125, presente no progenitor susceptível.....	85
Figura 17 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCAR AFLP_125 utilizando a variedade Solara e a linha Frilene mutante (FM).....	86
Figura 18 – Comparação das sequências nucleotídicas do SCAR AGG/CAA_125 na variedade Solara e na linha Frilene mutante. Os asteriscos representam as zonas de homologia entre os dois fragmentos.....	87
Figura 19 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCAR AFLP_2 utilizando a variedade susceptível Solara e a linha resistente Frilene mutante	88
Figura 20 - Sequência apresentada pelo marcador T06_480, presente na variedade susceptível Solara	89
Figura 21 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCART06 utilizando indivíduos susceptíveis (S) e resistentes (R) da descendência F ₂ proveniente do cruzamento Solara (Sol) x Frilene mutante (FM).....	91
Figura 22 – Mapa genético preliminar de <i>Pisum sativum</i> L. obtido a partir da população F ₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante. No lado esquerdo de cada grupo de ligamento encontra-se o valor da distância genética em cM, calculado através da função de Kosambi. Os marcadores identificados com * e ** apresentam uma segregação ligeiramente distorcida ($\chi^2_{0,05} < \chi^2 < \chi^2_{0,01}$) e muito distorcida ($\chi^2 > \chi^2_{0,01}$), respectivamente	92

Lista de Quadros

Quadro 1 – Classificação de alguns agentes mutagénicos químicos segundo o seu modo de acção	10
Quadro 2 - Número de variedades mutantes obtidas em diversas espécies pertencentes à família <i>Fabaceae</i> , após tratamentos mutagénicos.....	12
Quadro 3 - Características modificadas nas variedades mutantes obtidas em diversas espécies de leguminosas para grão	13
Quadro 4 – Algumas das mutações que influenciam a morfologia da planta de ervilha.....	16
Quadro 5 – Variedades de ervilha obtidas directamente por mutagénese experimental e suas características principais	18
Quadro 6 – Resistências a doenças obtidas em várias culturas, por mutagénese experimental	19
Quadro 7 – Variedades resistentes a diversas doenças obtidas por mutagénese experimental utilizadas na agricultura	20
Quadro 8 – Classes de genes de resistência.....	24
Quadro 9 – “Primers” RAPD testados nas análises por NILs	37
Quadro 10 – “Primers” RAPD testados nas análises por BSA.....	37
Quadro 11 – Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na análise de ISSR	39
Quadro 12 – Adaptadores e “primers” EcoRI e MseI	40
Quadro 13 – Efeito do tempo de exposição aos agentes mutagénicos etilnitrosoureia (ENU) e metilnitrosoureia (MNU) na geração M_1 utilizando plântulas da variedade Solara	48
Quadro 14 – Efeito dos compostos mutagénicos etilnitrosoureia (ENU) e metilnitrosoureia (MNU) na geração M_1 , utilizando plântulas da variedade Frilene, após uma hora de tratamento.....	49
Quadro 15 – Efeito do tempo de exposição de plântulas da variedade Solara aos agentes mutagénicos etilnitrosoureia (ENU) e metilnitrosoureia (MNU), na geração M_2	50
Quadro 16 – Espectro mutagénico observado nas famílias M_2 provenientes da variedade Solara, após diferentes períodos de exposição aos agentes mutagénicos etilnitrosoureia (ENU) e metilnitrosoureia (MNU)	51
Quadro 17 - Influência das diferentes fases do ciclo celular sobre a acção mutagénica do composto etilnitrosoureia (5 mM), na geração M_1 , utilizando plântulas da variedade Frilene.....	53
Quadro 18 - Influência das diferentes fases do ciclo celular sobre a acção mutagénica do etilnitrosoureia, utilizando plântulas da variedade Frilene, na geração M_2	54
Quadro 19 – Espectro mutagénico observado nas famílias M_2 provenientes dos tratamentos realizados ao longo do ciclo celular na variedade Frilene, utilizando etilnitrosoureia	55
Quadro 20 - Características das variedades e dos mutantes resistentes ao oídio.....	60

Quadro 21 – Reacção das plantas F ₁ e F ₂ ao fungo <i>E. pisi</i> nos diferentes cruzamentos realizados	62
Quadro 22 – Reacção das plantas F ₂ ao fungo <i>E. pisi</i> nos diferentes cruzamentos realizados.....	62
Quadro 23 - Segregação do tipo de folha observada nas descendências F ₂ provenientes do cruzamento Solara (folha semi-áfila) x Frilene mutante (folha normal)	64
Quadro 24 - Segregação observada em relação ao tipo de folha e à reacção ao oídio na descendência F ₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante.....	64
Quadro 25 – Reacção das plantas F ₁ e F ₂ ao fungo <i>E. pisi</i> nos diferentes cruzamentos realizados	65
Quadro 26 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR específico para o fragmento L13_993.....	70
Quadro 27 – Número de fragmentos obtidos após a amplificação das amostras de DNA de Solara/Solara mutante (S/SM) e das amostras de DNA de Frilene/Frilene mutante (F/FM), utilizando diferentes “primers” ISSR	71
Quadro 28 – “Primers” RAPD que originam fragmentos polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante	76
Quadro 29 – “Primers” RAPD utilizados na análise da descendência F ₂ Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos amplificados.....	77
Quadro 30 – “Primers” ISSR que originam marcadores polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante	78
Quadro 31 – “Primers” ISSR utilizados na análise da descendência F ₂ Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos amplificados.....	79
Quadro 32 – Número de marcadores polimórficos gerados pelas combinações de “primers” AFLP entre a variedade Solara e linha Frilene mutante	80
Quadro 33 – Combinações de “primers” AFLP utilizadas na análise da descendência F ₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos analisados.....	81
Quadro 34 - Número de “primers” RAPD, ISSR e AFLP testados na população F ₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante e número de marcadores obtidos.....	82
Quadro 35 - Sequência de nucleótidos dos “primers” SCAR específicos para amplificar o fragmento PD10_650.....	83
Quadro 36 – Frequência de recombinação entre o <i>locus er</i> e os marcadores T6_480 e AGG/CAA_125	84
Quadro 37 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR AFLP_125 específicos para amplificar o fragmento AGG/CAA_125	86
Quadro 38 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR AFLP_2 específico para o fragmento AGG/CAA_125.....	87
Quadro 39 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR específico para amplificar o fragmento T06_480	90

Abreviaturas

- AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism
- APS - Persulfato de amónio
- BSA - Bulked segregant analysis
- cM - centiMorgans
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
- DMSO - Sulfóxido de dimetilo
- dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato (deoxyribonucleotide triphosphate)
- EDTA - Ácido etilendiaminotetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)
- ENMP - Estação Nacional de Melhoramento de Plantas
- ENU - Etilnitrosoureia
- FAO - Food and Agriculture Organization
- F₁ - Primeira geração obtida após cruzamento de dois progenitores
- F₂ - Segunda geração obtida por autofecundação de uma F₁
- Gy - Gray
- IAEA - International Atomic Energy Agency
- ISSR - Inter Simple Sequence Repeat
- INRA - Institut National de la Recherche Agronomique, França
- LB - Meio de cultura Luria-Bertani
- LOD – Logarithm of odds
- LRR - Leucine rich repeats
- LZ - Leucine zipper
- M₁ - Primeira geração em mutagénese experimental
- M₂ - Segunda geração obtida de plantas M₁
- MNU - Metilnitrosoureia
- NBS - Nucleotide binding site
- NILs - Linhas quase isogénicas (Near isogenic lines)
- PCR - Reacção em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
- Pfu* - *Pyrococcus furiosus*
- PR - Pathogenesis related proteins
- RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

Abreviaturas

RNA - Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

Rnase - Ribonuclease

SCAR - Sequence Characterized Amplified Region

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SSR – Simple Sequence Repeats

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris borato EDTA

TE - Tris-EDTA

TEMED - Tetra (N,N,N,N, tetrametiletilenodiamina)

TIR - toll/interleukin1 receptor

I. Introdução

A actividade de Melhoramento de Plantas começou há cerca de dez mil anos, com o início da agricultura. Nessa época, o Homem começou a seleccionar as plantas mais favoráveis para a sua alimentação e para o seu vestuário. Vavilov definiu o Melhoramento de Plantas como “a evolução comandada pelo Homem”. Outros consideram esta actividade uma arte em vez de uma ciência. Em qualquer dos casos, o Melhoramento de Plantas envolve a acção humana e tem como finalidade a obtenção de variedades que possam satisfazer as exigências dos utilizadores (Harten, 1998). Em geral, as etapas fundamentais de um programa de melhoramento consistem na obtenção de variabilidade genética, na selecção de genótipos e na realização de testes comparativos para demonstração da superioridade dos materiais vegetais seleccionados (Simmonds, 1981).

É reconhecido que o êxito de um programa de melhoramento está fortemente dependente da variabilidade genética que o melhorador tem à sua disposição (Allard e Hansche, 1964). Os melhoradores recorrem a diversos meios para gerar variação genética nos materiais vegetais que estão a ser sujeitos ao processo de selecção. Podem aproveitar a variação natural já presente nas populações locais ou nos materiais exóticos introduzidos nas suas colecções de germoplasma. Quando a variabilidade genética natural é reduzida podem incrementá-la através de várias técnicas. Entre elas, a realização de hibridações artificiais para a obtenção de novas combinações genéticas e a indução de mutações para obtenção de novas formas alélicas são as mais frequentemente utilizadas.

No programa de melhoramento de ervilha (*Pisum sativum* L.) que se encontra a decorrer na Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP), a variabilidade existente nesta espécie resulta essencialmente da introdução de material proveniente de outras instituições de investigação e da realização de cruzamentos artificiais entre genótipos pertencentes à espécie *P. sativum*. Mais recentemente, incluiu-se a mutagénese induzida como fonte alternativa para produzir variabilidade genética nos materiais de ervilha.

A eficácia do processo de selecção de plantas superiores é um factor da maior importância no sucesso de um programa de melhoramento. Tradicionalmente, os melhoradores elegem as plantas com base no fenótipo apresentado pelos indivíduos. Esta estratégia é adequada para as características cuja expressão é independente das condições ambientais. Uma vez que a maioria das características sujeitas ao processo de melhoramento são influenciadas pelo ambiente, os materiais vegetais têm que ser avaliados durante vários anos. A utilização de marcadores moleculares durante a fase de eleição de plantas pode constituir uma ferramenta valiosa para os melhoradores. Contudo, a implementação de um programa de selecção assistida por marcadores só é possível após a identificação de marcadores fortemente ligados aos genes que controlam as características de interesse agronómico.

No melhoramento de plantas, os marcadores moleculares podem também ser utilizados para estudar a variabilidade genética existente nas colecções de germoplasma. Este conhecimento pode ser aplicado no planeamento de cruzamentos artificiais de forma a permitir a selecção de progenitores geneticamente mais afastados. Outra área de aplicação dos marcadores moleculares consiste na identificação varietal, importante na protecção de variedades comerciais. Em muitos casos, a identificação de variedades é feita com base em

descritores morfológicos. Nas espécies que possuem uma base genética estreita, como é o caso da soja, as variedades tendem a ser muito semelhantes dificultando a distinção entre as novas variedades e as já existentes, utilizando apenas características morfológicas. As técnicas moleculares poderão constituir nestes casos ferramentas importantes para fornecer a informação necessária para a distinção e o registo de variedades (Camlin, 2001).

O presente estudo insere-se no âmbito dos trabalhos de mutagénesse experimental que se encontram a decorrer na ENMP em colaboração com a Universidade do Algarve e teve como objectivos centrais:

1. A obtenção de formas mutantes de *Pisum sativum* L. com interesse agronómico.
2. O mapeamento genético de algumas das mutações de maior relevância.

No decorrer do trabalho experimental pretendeu-se:

- a) Definir a duração mais adequada dos períodos de exposição das plântulas aos agentes mutagénicos (etilnitrosourea e metilnitrosourea) para obtenção de uma eficiência mutagénica elevada e paralelamente, avaliar a influência das diferentes fases do ciclo celular no efeito mutagénico do etilnitrosourea.
- b) Estudar do ponto de vista genético a resistência ao fungo *E. pisi* apresentada por dois dos mutantes induzidos e analisar as relações alélicas entre os genes mutados.
- c) Mapear geneticamente o *locus* de resistência ao oídio e identificar marcadores moleculares fortemente ligados ao *locus* de resistência para utilização na selecção assistida por marcadores moleculares e que permitam avançar no isolamento do gene mutado por clonagem baseada em mapas genéticos.

II. Estado Actual dos Conhecimentos

II.1. A Mutagénese Experimental no Melhoramento de Plantas

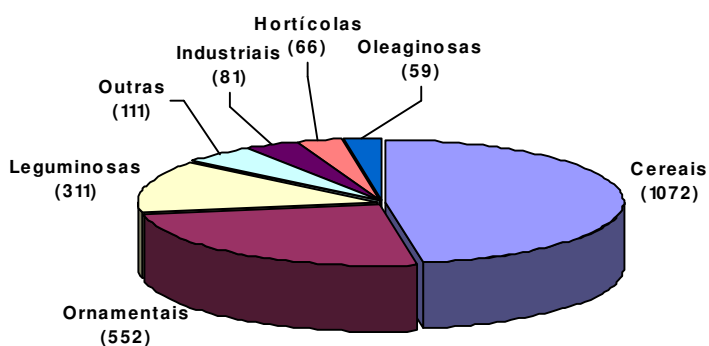
Hugo de Vries, professor de Botânica em Amsterdão, foi o primeiro a sugerir a indução artificial de mutações, no início do século XX. No entanto, só em 1927, após os trabalhos de H. J. Muller com *Drosophila*, é que ficou provado que as mutações podiam ser induzidas artificialmente (Micke, 1999). Os resultados das experiências de Muller com raios-X demonstraram que era possível obter variantes genéticas diferentes daquelas que ocorriam naturalmente. Esta descoberta constituiu o início dos estudos sobre mutagénese e foi recebida com muito interesse pela comunidade científica. Em 1928, L. J. Stadler comprovou que os raios X aumentavam a frequência das mutações em cevada. No entanto, a aplicação da mutagénese induzida no Melhoramento de Plantas não ocorreu de imediato, tendo sido necessário cerca de 30 anos para o desenvolvimento desta técnica até à fase em que podia ser utilizada com uma boa taxa de sucesso (Sigurbjörnsson, 1977).

Em 1950, apenas era conhecida uma variedade comercial obtida por mutagénese, a variedade de tabaco “Chlorina”, seleccionada pelo investigador holandês Tollenaar, na Indonésia. No início dos anos 60, o número de variedades registadas continuava ainda a ser reduzido, verificando-se apenas a existência de 15 variedades obtidas por este método (Sigurbjörnsson, 1977). A partir de 1964, após a formação da “Joint FAO/IAEA¹ Division”, a mutagénese induzida passou a ser utilizada com mais frequência nos programas de melhoramento de plantas e o lançamento de novas variedades começou a progredir

¹ Food and Agriculture Organization / International Atomic Energy Agency

rapidamente. Em 1970 existiam 72 variedades e em 1975 eram já 133. Em 2000, a informação mantida na base de dados da FAO/IAEA mostra que existem 2252 variedades obtidas com recurso à mutagénese experimental, metade das quais foram obtidas nos últimos 15 anos (Maluszynski *et al.*, 2000). A China é o país que mais tem contribuído para o lançamento de novas variedades (605), seguido da Índia (259), da ex-URSS/Rússia (204), da Holanda (176), da Alemanha (138) e dos EUA (125). Em Portugal, apenas existe o registo de uma variedade de arroz (Salir), obtida em 1983 por tratamento com raios γ .

A distribuição das variedades comerciais pelos principais grupos de plantas cultivadas evidencia a posição predominante dos cereais em relação às restantes culturas (Figura 1). De facto, verifica-se que neste grupo estão incluídas 48% do total de variedades obtidas por mutagénese induzida, reflectindo este número a relevância das culturas cerealíferas, a nível mundial.



Fonte: Maluszynski *et al.*, 2000

Figura 1 - Número de variedades obtidas por mutagénese induzida em diferentes grupos de cultura

A importância da mutagênese experimental no melhoramento de plantas traduz-se não só através do número de variedades lançadas mas também mediante o valor qualitativo destes materiais. Em muitos casos, o material vegetal seleccionado proporcionou a obtenção de níveis de produtividade mais elevados em várias espécies agrícolas e como consequência, a sua utilização na agricultura teve um forte impacto na economia de diversos países (Ahloowalia *et al.*, 2004). Por exemplo, a introdução das variedades de cevada Diamant e a de arroz Calrose 76 conduziram a acréscimos de produção superiores a 15% em relação às variedades tradicionais (Bouma e Ohnoutka, 1991; Rutger, 1991). Além disso, muitos genótipos de cevada e de arroz obtidos posteriormente contêm na sua constituição genética informação proveniente destas duas variedades.

Os trabalhos de mutagênese também têm contribuído para a obtenção de variedades que apresentam características superiores relacionadas com a qualidade das sementes e com a resistência das plantas a stresses bióticos. Assim, foram obtidas sementes de cevada com teores mais elevados de lisina (Jensen, 1991), sementes de várias espécies oleaginosas com teores mais altos de óleo e com percentagens mais baixas de factores antinutricionais (Röbbelen, 1991; Bathia *et al.*, 1999), plantas pertencentes a várias espécies com níveis mais elevados de resistência a doenças e a pragas (Jørgensen, 1991; MacDonald *et al.*, 1991; Nakai, 1991; Pathak, 1991).

As mutações induzidas ocorrem aleatoriamente no genoma. Na maioria dos casos, as mutações afectam apenas um dos alelos de um *locus* e são recessivas, sendo necessário encontrarem-se em homozigose para apresentarem expressão fenotípica (Micke, 1999). Por esta razão, é nas espécies autogâmicas que se observa uma maior eficiência mutagénica,

devido à maior facilidade em serem obtidos génotipos homozigóticos e conseqüentemente em serem identificadas as mutações. No entanto, têm sido publicados diversos estudos que provam o interesse da mutagénese induzida nas espécies alogâmicas como sejam por exemplo, os trabalhos que envolvem a esterilidade citoplasmática masculina em girassol (Jan e Rutger, 1988; Jan, 1992) ou a qualidade das sementes de espécies oleaginosas (Röbbelen, 1991; Vranceanu e Iuoras, 1991). Também nas espécies de propagação vegetativa tem-se obtido bons resultados, principalmente em plantas ornamentais (Datta, 1991). Nestas últimas, qualquer alteração que ocorra ao nível da cor e da forma da flor ou da folha tem valor comercial, podendo as plantas mutadas serem utilizadas directamente como novas variedades, sem ser necessário muito trabalho de selecção adicional. Aliás, este é o grupo de culturas que mais se tem expandido nos últimos anos, com o contributo forte da Holanda (Maluszynski *et al.*, 2000).

II.2. Agentes mutagénicos

Nos trabalhos de mutagénese experimental, os agentes mais utilizados podem ser classificados em dois grandes grupos: os agentes físicos e os agentes químicos (Briggs e Constantin, 1977; Heslot, 1977). Ao longo dos anos têm sido testados outros agentes para induzir mutações, como seja a aplicação de choques térmicos e o envelhecimento de sementes. No entanto, estes métodos demonstraram possuir uma baixa eficácia relativamente aos mutagénicos físicos e químicos, sendo por isso utilizados em pequena escala (Harten, 1998).

Os agentes físicos incluem as radiações ionizantes (raios X, raios γ , neutrões, prótons, partículas α e β) e as radiações não ionizantes (ultravioletas). A nível molecular, as radiações

ionizantes provocam numa primeira fase a quebra das ligações covalentes das moléculas originando a produção de iões positivos e electrões livres. Em soluções aquosas, as radiações polarizam as moléculas de água, dando origem à formação de radicais livres de H_2O^+ , H^+ e OH^- . Estes radicais reagem entre si, produzindo H_2 e H_2O_2 . Na presença de oxigénio, também se formam radicais HO_2 . Estes radicais e o peróxido de oxigénio reagem com as moléculas presentes nas soluções provocando alterações químicas. No caso do DNA, podem ser observadas perdas de bases e de grupos fosfato, quebras de uma ou das duas cadeias de DNA e ligações ilegítimas entre moléculas de DNA. Por outro lado, a radiação ultravioleta embora não possua energia suficiente para ionizar a molécula de DNA também causa danos, sendo o mais frequente a formação de dímeros de pirimidina (Ahnström, 1977).

Os raios γ e os raios X, são os agentes físicos mais usados nos trabalhos de mutagénesse, tendo sido utilizados na obtenção de 86% das variedades comerciais originadas por radiações (Maluszynski *et al.*, 2000).

Segundo Heslot (1977), existe um número elevado de compostos químicos que possuem actividade mutagénica e que podem ser distribuídos por 7 grupos de acordo com o seu modo de acção (Quadro 1). Os compostos mais utilizados para induzir mutações nas plantas pertencem na sua maioria ao grupo dos agentes alquilantes. Entre estes, destacam-se o etilmetanossulfonato (EMS), a etilenimina (EI), o metilnitrosoureia (MNU) e o etilnitrosoureia (ENU).

Os agentes alquilantes são constituídos por um ou dois grupos funcionais e têm a capacidade de reagir com as cadeias de DNA através da alquilação dos grupos fosfato ou das bases purinas e pirimidinas. A situação mais frequente envolve a formação da 7-alquil-

guanina. A alquilação do oxigénio na posição 6 da guanina vai contribuir para a ocorrência de erros durante a replicação, verificando-se o emparelhamento da guanina com a timina em vez da citosina, dando esta alteração origem a uma mutação do tipo transição. Se o agente mutagénico possuir acção despurinizante podem ser observadas mutações do tipo transversão. Neste caso, verifica-se a eliminação de bases purinas da cadeia do DNA, podendo o espaço deixado vago ser preenchido por qualquer das quatro bases.

Quadro 1 – Classificação de alguns agentes mutagénicos químicos segundo o seu modo de acção

Grupo	Composto
1. Análogos de bases	5-bromouracilo, 5-bromodesoxiuridina, 2-aminopurina, 8-etoxicafeína, metil ácido úrico
2. Antibióticos	azaserina, mitomicina, estreptonigrina, actinomicina D
3. Compostos alquilantes	
3.1. Mostardas de enxofre	gás mostarda
3.2. Mostardas nitrogenadas	
3.3. Epóxidos	
3.4. Etilenimina	etilenimina, acetil etilenimina
3.5. Sulfatos e Sulfonatos	dimetilsulfato, dietilsulfato, metilmetanosulfonato, etilmetanosulfonato, propilmetanosulfonato, isopropilmetanosulfonato, butilmetanosulfonato
3.6. Diazoalcanos	diazometano, diazoetano
3.7. Compostos nitrosos	metilnitrosourea, etilnitrosourea, metilnitrosouretano, etilnitrosouretano, metilnitronitrosoguanidina
4. Acridinas	laranja de acridina, ICR-170
5. Azida	azida
6. Hidroxilamina	hidroxilamina
7. Ácido nitroso	ácido nitroso

Fonte: Heslot, 1977

Os resultados das experiências mutagénicas com compostos químicos dependem de vários factores, tais como a concentração do agente mutagénico, a duração e as condições em

que são realizados os tratamentos (temperatura, pH, ...). Nos últimos anos, os melhoradores verificaram que, para atingirem os seus objectivos, não precisam observar frequências de mutação elevadas mas sim obter um número razoável de mutações úteis. Desta forma, evita-se a ocorrência de alterações drásticas na base genética dos materiais vegetais. Por esta razão, actualmente os tratamentos são realizados com doses mais baixas relativamente ao que era recomendado no passado, assim como, são utilizados períodos de tratamento mais reduzidos (Kamra e Brunner, 1977; Harten, 1998).

II.3. A mutagénese experimental nas espécies de leguminosas grão

As leguminosas para grão pertencem à família *Fabaceae* e incluem um número elevado de espécies. Apresentam como característica comum a capacidade de fixarem azoto atmosférico através da relação de simbiose que estabelecem com a bactéria *Rhizobium*. As sementes apresentam um elevado valor nutritivo devido aos altos teores de proteína (20-40%), assim como de hidratos de carbono (Bressani e Elias, 1988). Muitas destas espécies são cultivadas desde a antiguidade, estando relacionadas com o desenvolvimento de civilizações antigas. Sementes carbonizadas encontradas nos locais de origem da lentilha, da ervilha e do grão de bico revelam que estas culturas já eram utilizadas desde os anos 6000-7000 A.C. (Ladizinsky e Adler, 1976; Muehlbauer, 1992).

Nos últimos anos, as técnicas de mutagénese têm sido aplicadas com sucesso em quase todas as espécies cultivadas pertencentes à família *Fabaceae*. Como resultado deste processo, em 1986 encontravam-se registadas 100 variedades de 17 espécies cultivadas (Quadro 2). Em 1999, este número já tinha aumentado de forma significativa, verificando-se a existência de

265 variedades, em 32 países. Destas variedades, 147 foram obtidas directamente a partir dos mutantes induzidos. As restantes, foram desenvolvidas depois de ter sido realizada a selecção de materiais nas descendências provenientes de hibridações artificiais em que os novos mutantes foram incluídos como progenitores (Bhatia *et al.*, 2001). A espécie que tem contribuído com o maior número de variedades é a soja, seguindo-se o feijão, o amendoim e a ervilha.

Quadro 2 - Número de variedades mutantes obtidas em diversas espécies pertencentes à família *Fabaceae*, após tratamentos mutagénicos

Espécie	Até 1986	Até 1999
<i>Arachis hypogaea</i> L.	13	44
<i>Cajanus cajan</i> Millsp.	5	5
<i>Cicer arietinum</i> L.	6	10
<i>Dolichos lablab</i>	1	1
<i>Glycine max</i> L.	23	58
<i>Lathyrus sativus</i> L.	-	1
<i>Lens culinaris</i> Medik.	1	1
<i>Lupinus albus</i> L.	3	12
<i>Lupinus angustifolius</i> L.	1	1
<i>Lupinus cosentini</i> Guss.	1	1
<i>Lupinus luteus</i> L.	1	4
<i>Phaseolus coccineus</i> L.	-	1
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12	50
<i>Pisum sativum</i> L.	13	32
<i>Vicia faba</i> L.	2	13
<i>Vicia sativa</i> L.	-	3
<i>Vigna angularis</i> Willd.	1	1
<i>Vigna mungo</i> L.	2	4
<i>Vigna radiata</i> (L.) Wil.	8	14
<i>Vigna unguiculata</i> Walp.	7	9
Total	100	265

Fonte: Bhatia *et al.*, 2001

A selecção de génotipos com produções unitárias elevadas é uma das principais metas que se pretende atingir em qualquer programa de melhoramento. Este facto reflecte-se no número elevado de variedades lançadas a partir de materiais sujeitos a tratamentos

mutagénicos que apresentam características superiores relacionadas com os componentes do rendimento (Quadro 3). A arquitectura da planta é reconhecida também como um dos principais factores que influencia a produtividade das leguminosas para grão (Huyghe, 1998). Plantas com porte prostrado ou com tendência para acamar originam quebras de produção elevadas devido às perdas de semente que ocorrem durante a colheita mecânica. Daí que, se tenha procedido à selecção de plantas no sentido de encontrar materiais com estatura baixa e com porte erecto.

Quadro 3 - Características modificadas nas variedades mutantes obtidas em diversas espécies de leguminosas para grão

Tipo de característica	Características melhoradas	Nº de variedades
Rendimento	Produção de semente elevada	57
	Nº elevado de vagens	12
	Sementes de calibre elevado	9
	Vagens indeiscentes	2
	Sementes de calibre pequeno	1
	Maior capacidade de fixação de azoto	1
Tipo de planta	Plantas anãs	17
	Resistência à acama	17
	Plantas erectas	8
	Índice de colheita elevado	2
Duração do ciclo	Maturação precoce	39
	Maturação uniforme	4
	Insensibilidade ao fotoperíodo	2
Qualidade	Qualidade das sementes	7
	Teores mais elevados de proteína	4
	Teores baixos em alcalóides	3
	Teores elevados em óleo	2
Resistência	Resistência a doenças	26
	Resistência a afídeos	3
	Resistência a nemátodos	1
Tolerância	Tolerância à secura	7
	Tolerância ao frio	3
	Tolerância a solos ácidos, alcalinos e salinos	2

Fonte: Micke, 1995

Também, a duração da fase vegetativa e da fase reprodutiva são duas características que têm sido modificadas em diversas variedades de grão de bico, soja e feijão (Bathia *et al.*, 2001), permitindo a sua adaptação a diversas condições ambientais. Outras características melhoradas nas novas variedades estão relacionadas com a qualidade das sementes, a eficiência de fixação de azoto atmosférico e a tolerância das plantas a vários factores bióticos e abióticos.

II.4. Indução de mutantes em *Pisum sativum* L.

A ervilha (*Pisum sativum* L.) é uma das poucas leguminosas para grão que é amplamente utilizada na agricultura e simultaneamente é considerada como uma planta modelo em diversas áreas da Biologia. Esta planta apresenta determinadas características que permitiram a Mendel o desenvolvimento do seu modelo genético e que em diversos trabalhos de investigação fosse eleita como material de estudo, durante várias décadas. Entre as várias características destacamos uma clara dicotomia na variação de características morfológicas, tais como flor branca *vs* flor violeta, semente lisa *vs* semente enrugada, semente de cor verde *vs* semente de cor amarela; a facilidade em realizar cruzamentos artificiais devido ao tamanho das flores que são emasculadas sem dificuldade, a capacidade de obter com sucesso descendências F₁ e a existência de elevada variabilidade genética quer de origem natural quer induzida (Ellis, 1993; Świącicki *et al.*, 2001).

O género *Pisum* pertence à tribo *Vicieae* da família *Fabaceae*. Presentemente, considera-se que este género é constituído por apenas duas espécies (Hoey *et al.*, 1996): a espécie cultivada *Pisum sativum* L. e a espécie selvagem *Pisum fulvum* Sibth. e Sm., ambas

diploides, com $2n=14$. A espécie *P. sativum* engloba as variedades *sativum* e *arvense*, sendo tanto uma como outra utilizadas na agricultura. Apesar da elevada variabilidade morfológica presente na espécie *P. sativum*, a ervilha pode ser descrita como uma planta anual, de crescimento indeterminado que apresenta caules herbáceos, angulosos e ocos, com uma altura variável entre os 25 cm e os 3 metros. As folhas são alternas, parifolioladas, com estipulas maiores que os folíolos e terminadas em gavinhas. Os folíolos podem ser inteiros ou ligeiramente dentados, apresentando forma oval ou elíptica (Gritton, 1986). A ervilha é uma planta autogâmica com flores tipicamente papilionáceas. A cor da corola pode ser branca ou violeta. Cada nó reprodutivo tem usualmente duas flores que originam duas vagens. Estas apresentam cor amarela ou acastanhada e contêm em média 4 a 8 sementes dependendo da variedade e das condições ambientais. As sementes podem ser lisas ou rugosas (Franco, 1971).

A variabilidade genética na ervilha é conhecida desde longa data e a obtenção de mutantes nesta espécie tem fornecido a base experimental para o desenvolvimento da genética moderna. O número de mutantes morfológicos já descritos excede os 400, podendo estes ser agrupados de acordo com o processo biológico que influenciam: a forma da folha, o alongamento dos entre-nós, a floração, o tipo de ramificação, o desenvolvimento das sementes e a senescência (Murfet e Reid, 1993).

Existe um número elevado de mutações que influenciam a forma e a estrutura da folha (Quadro 4). Em 1912, foi descrito o primeiro destes mutantes que apresentava folhas do tipo acácia (Murfet e Reid, 1993). Neste tipo de mutação, observa-se a substituição das gavinhas que estão presentes nas plantas de folha normal por folíolos. Assim, as plantas com este tipo de mutação possuem folhas constituídas apenas pelas estipulas e pelos folíolos.

Quadro 4 – Algumas das mutações que influenciam a morfologia da planta de ervilha

Mutação	Fenótipo	Mutação	Fenótipo
<i>tl</i>	acácia, gavinhas transformadas em folíolos	<i>lv</i>	entre-nós longos
<i>st</i>	estímulas muito reduzidas	<i>lw</i>	entre-nós curtos
<i>td</i>	estímulas e folíolos com margens dentadas	<i>na</i>	planta anã
<i>uni</i>	unifoliata, folhas só com um folíolo que substitui os pares de folíolos e as gavinhas	<i>coch</i>	estímulas substituídas por folíolos com pecíolo
<i>af</i>	áfila, folíolos transformados em gavinhas	<i>veg-1</i>	plantas sem nós reprodutivos
<i>sil</i>	folíolos e estímulas com margens onduladas	<i>fn fna</i>	planta com mais de 3 flores por nó
<i>cri</i>	folíolos e estímulas enrugados	<i>det</i>	planta do tipo determinado
<i>apu</i>	folíolos com pecíolo	<i>rms</i>	número elevado de ramos
<i>sln</i>	ramos com espessura reduzida	<i>gap</i>	ramificações nos nós basais e superiores separados por uma zona sem ramos

Fonte: Murfet e Reid, 1993

Outra mutação que afecta a estrutura da folha é a do tipo *af* que transforma todos os folíolos da folha em gavinhas, originando plantas semi-áfílas. A nível agronómico, a incorporação deste gene nas variedades comerciais tem uma importância significativa. Embora se observe uma redução da área fotossintética nas plantas, a produção de sementes não é afectada negativamente. Dados experimentais mostram que a superfície foliar encontra-se correlacionada negativamente com o rendimento (Cousin *et al.*, 1985). A competição pela repartição de assimilados entre a parte vegetativa e a parte reprodutiva das plantas é maior quando a produção de biomassa é elevada, conduzindo a um decréscimo no rendimento em semente. O gene *af* está também directamente relacionado com a resistência das plantas à acama. Com efeito, nas variedades semi-áfílas, as plantas apoiam-se umas nas outras através das gavinhas e conseguem manter a posição vertical até ao fim do ciclo vegetativo, com maior facilidade. As plantas semi-áfílas resistentes à acama permitem a realização da colheita

mecânica e proporcionam acréscimos de rendimento que podem atingir valores próximos de 20% em relação aos genótipos de folha normal (Cousin, 1997).

Outro tipo de mutação que está bem estudado refere-se à mutação *st* que reduz drasticamente o tamanho da estipula da folha devido à perda ou ao não funcionamento dos meristemas responsáveis pela sua formação (Murfet e Reid, 1993). A presença simultânea do gene *af* e *st* dá origem a folhas apenas com gavinhas como se observa nas variedades áfilas.

A mutagénesse experimental também tem fornecido mutantes interessantes para os estudos que têm como objectivo analisar a relação de simbiose que ocorre entre o *Rhizobium* e a ervilha (Sagan *et al.*, 1991; Sidorova, 1991). A utilização destes mutantes já permitiu a identificação de 30 genes específicos que controlam o desenvolvimento e o funcionamento dos nódulos presentes nas espécies leguminosas (Brewin *et al.*, 1993; Sagan *et al.*, 1993; Men *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2002).

Além dos materiais que têm sido obtidos e utilizados nos estudos genéticos (Gottschalk, 1965; Wellensiek, 1965; Molchova *et al.*, 1987; Smirnova, 2002), a mutagénesse induzida tem proporcionado a selecção de mutantes com rendimentos elevados (Vassileva *et al.*, 1987; Mehandjiev *et al.*, 1998b), com alterações no grau de precocidade da floração e da maturação (Mehandjiev e Mihov, 1995), com resistência a doenças (Bathia *et al.*, 2001) e com teores mais elevados de proteína (Mehandjiev *et al.*, 1998a). No Quadro 5, apresentam-se algumas variedades de ervilha obtidas directamente após a aplicação de tratamentos mutagénicos e as suas principais características. Muitas outras variedades têm sido obtidas a partir da descendência de mutantes que foram incluídos como progenitores nos esquemas de hibridações artificiais desta espécie (Bathia *et al.*, 2001; Sidorova *et al.*, 2002).

Quadro 5 – Variedades de ervilha obtidas directamente por mutagénese experimental e suas características principais

Variedade	Ano de obtenção	País	Tratamento mutagénico	Características melhoradas
Stral-ärt	1954	Suécia	Raios-X 15 krad; sementes	Rendimento
Moskovsky	1974	Rússia	Dietil sulfato (DES) 0,03%	Tamanho da semente e teor de proteína
Hans	1979	Índia	Etilenimina (EI)	Rendimento
Wasata	1979	Polónia	Raios-X, 50 krad	Precocidade, produção, resistência à acama
Esedra	1980	Itália	Raios-X 7,5 Gy; pólen	Porte adequado para a colheita mecânica
Caoyuan 10	1980	China	Raios-X 200 Gy; sementes	Tamanho das folhas, espessura do caule
Navona	1980	Itália	Raios-X 7,5 Gy; pólen	Número de vagens, altura da planta
Streletski 11	1985	Rússia	EI, 0.01%, 12 horas; sementes	Resistência à acama, precocidade
Pirro	1988	Itália	Raios gama 100 Gy; sementes	Tipo , vagens grandes
Priamo	1988	Itália	Raios gama 100 Gy; sementes	Tipo determinado, rendimento
Paride	1988	Itália	Raios gama, 100 Gy, sementes	Tipo determinado, precocidade, produção
Kwestor	1991	Polónia	Raios gama, 100 Gy, sementes	Número de vagens

Fonte: Bathia *et al.*, 2001

II.5. Indução de mutantes para resistência a doenças

Segundo diversas estimativas, aproximadamente um terço da produção total agrícola é perdida devida a pragas e a doenças (Harten, 1998). A aplicação de pesticidas pode proteger de forma eficaz as culturas mas a sua utilização pode ficar comprometida se for realizada em condições ambientais adversas ou se surgirem novas raças de patogéneos. Por isso, a obtenção de variedades resistentes é a melhor alternativa para controlar as doenças, sendo esta uma das metas que o melhoramento de plantas pretende atingir nas várias espécies cultivadas (Ranalli e Cubero, 1997; Tavares-de-Sousa, 1999).

As mutações induzidas podem ser uma fonte importante de variabilidade adicional em caracteres para os quais a variabilidade existente é reduzida ou inexistente. Este pode ser o caso da resistência a diversos patogéneos. A primeira referência à indução de mutantes para a resistência a doenças deve-se ao trabalho de Freisleben e Lein que em 1942 isolaram um

mutante de cevada resistente a três raças de oídio (Favret *et al.*, 1977). A partir desta data, principalmente após os anos 50, muitos mutantes resistentes a doenças foram seleccionados em diversas espécies (Quadro 6).

Ainda hoje, a selecção dos mutantes de cevada resistentes ao oídio (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*), após tratamento com raios X, continua a ser um dos casos de maior sucesso da mutagénesse induzida aplicada à resistência a doenças. A resistência manifestada por estes mutantes é controlada por um gene recessivo, *mlo*, cuja presença confere resistência a praticamente todos os isolados do fungo e parece ser durável apesar da utilização intensiva das variedades resistentes em vários países da Europa. Presentemente, muitos materiais cultivados de cevada possuem o *locus mlo* na sua constituição genética (Jørgensen, 1991; Schulze-Lefert e Vogel, 2000).

Quadro 6 – Resistências a doenças obtidas em várias culturas, por mutagénesse experimental

Cultura	Patogéneo	Ano
Amendoim	<i>Sclerotium rolfsii</i>	1956
Arroz	<i>Piricularia oryzae</i>	1960
Aveia	<i>Puccinia graminis</i>	1954, 1955, 1956
	<i>Puccinia coronata</i>	1956, 1959, 1960
	<i>Helminthosporium victoriae</i>	1956, 1961
Cevada	<i>Erysiphe graminis</i>	1942, 1951, 1956
	<i>Puccinia hordei</i>	1960
	<i>Puccinia graminis</i>	1954
	<i>Ustilago nigra</i>	1961
Linho	<i>Melampsora lini</i>	1956
Milho	<i>Sclerospora maydis</i>	1958
Tabaco	<i>Virus y</i>	1962
Tomate	<i>Phytophthora infestans</i>	1961
Trigo	<i>Puccinia graminis</i>	1955, 1956, 1959
	<i>Puccinia recondita</i>	1956, 1960

Fonte: Favret *et al.*, 1977

Presentemente, as variedades resistentes que têm origem em descendências de plantas que foram sujeitas a tratamentos mutagénicos continuam a desempenhar um papel importante na agricultura (Quadro 7). Por exemplo, a variedade de grão de bico CM 88, desenvolvida a partir de radiações γ , ocupa 70% da área dedicada a esta cultura na Índia (Haq *et al.*, 2001), a variedade Zhefu 802 ocupa 30% da área total de arroz cultivada na Costa Rica e ocupou 10.6 milhões de hectares na China durante o período compreendido entre 1986-1994 (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Quadro 7 – Variedades resistentes a diversas doenças obtidas por mutagénese experimental utilizadas na agricultura

Cultura	Variedades	Patogéneo
Amendoim	MH-2	<i>Cercospora personata</i>
Arroz	Camago 8, PNR-381, Zhefu 802,	<i>Pyricularia grisea</i>
Cevada	Florida 500, Florida 501	<i>Helminthosporium victoriae</i>
Colza	Abasin-95	<i>Peronospora parasitica</i>
Feijão	Ouray	Vírus do mosaico do tabaco
Feijão-frade	Cowpea 88	Vírus do mosaico amarelo
Grão de bico	CM-88, CM-98, Nifa-95	<i>Ascochyta rabiei</i>
Soja	Liadou 3	<i>Sclerophthora macrospora</i>
Trigo	Soghat 90	<i>Puccinia recondita</i>
<i>Vigna radiata</i> L. Wilczek	MUM 2	Vírus do mosaico do tabaco
<i>Vigna mungo</i> L. Hepper	Vamban 2, Sarla B-14-4	Vírus do mosaico do tabaco

Fonte: Maluszynski *et al.*, 2000; Ahloowalia *et al.*, 2004

II.6. Mecanismos de resistência a doenças

Os estudos sobre a genética da resistência manifestada pelas plantas cultivadas parecem indicar que esta é transmitida na maioria dos casos como uma característica

dominante. No entanto, nas populações naturais verifica-se que a resistência é herdada com frequência como uma característica recessiva. O predomínio de genes de resistência dominantes nas espécies cultivadas pode ser consequência da actividade de melhoramento que tende a favorecer a selecção de resistências dominantes ou codominantes (de Witt, 1992). Esta situação ocorre porque os genes de resistência dominantes são facilmente detectados na geração F_1 , enquanto que, os genes de resistência recessivos só são detectados em fases mais avançadas dos programas de melhoramento, em genótipos homocigóticos (Simmonds, 1981).

Na maioria das resistências controlada por genes dominantes, a resposta das plantas face ao ataque dos agentes patogénicos está de acordo com o modelo clássico gene-a-gene proposto por Flor (1971). Este autor ao estudar a infecção de plantas de linho (*Linum usitatissimum* L.) ocasionada pelo fungo da ferrugem (*Melampsora lini*), constatou existir uma interacção genética entre o hospedeiro e o agente patogénico. Segundo esta teoria, a cada gene que condiciona a resistência no hospedeiro corresponde um gene que condiciona a patogenicidade no parasita. Neste modelo, os produtos dos genes dominantes de resistência actuam como receptores para os produtos dos genes de avirulência e muitas vezes as medidas de defesa traduzem-se no desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade. Estudos realizados por van der Biezen e Jones (1998), sugerem a existência de um outro modelo que pode explicar o desenrolar da reacção de resistência nas plantas. Segundo este modelo (“guard hypothesis”), nas células vegetais existem proteínas que funcionam como “sentinelas”. Os genes de resistência só são activados quando os produtos dos genes de avirulência interagem com estas “sentinelas”, não se observando assim uma acção directa entre o produto do gene de resistência e o produto do gene de avirulência (McDowell e Woffenden, 2003). Este é o

mecanismo que descreve a resistência da *Arabidopsis thaliana* à *Pseudomonas syringae* (Mackey *et al.*, 2002). O gene *RPM1* confere resistência a esta bactéria mas para ser activado necessita da presença da proteína RIN4. A redução dos níveis de RIN4 conduz à inibição da resposta de hipersensibilidade, permitindo o desenvolvimento do agente patogénico.

Entre as várias respostas de defesa desencadeadas pelas plantas face ao ataque de agentes patogénicos, a reacção de hipersensibilidade e a resistência sistémica adquirida (SAR) são aquelas que ocorrem com maior frequência (Frye e Innes, 1998).

A reacção de hipersensibilidade caracteriza-se por uma morte localizada de células do hospedeiro, desencadeada em resposta à infecção. Foi identificada pela primeira vez por Stakman em 1915 ao estudar a resistência do trigo à *Puccinia graminis* (Kombrink e Schmelzer, 2001). Nas interacções com organismos patogénicos obrigatórios, caso dos fungos responsáveis pelo oídio nas plantas, a morte das células constitui um processo eficaz para inibir o crescimento destes organismos que necessitam de células vivas para a obtenção de nutrientes. Nas interacções com outros tipos de agentes patogénicos, a desagregação dos tecidos vegetais leva à libertação das substâncias antimicrobianas que se encontram armazenadas nos vacúolos das células e que se acumulam nos locais de infecção impedindo o desenvolvimento dos organismos invasores (Osbourn, 1996). Com efeito, a resposta de hipersensibilidade pode ocorrer como consequência da activação de vários mecanismos bioquímicos que levam à formação de radicais livres e outros compostos tóxicos. Assim, nas células atacadas, pode-se observar a acumulação de peróxido de hidrogénio, de iões O_2^- e OH^- , a perda de iões de potássio, a síntese de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a

patogenicidade (proteínas PR²), como as 1,3-β-glucanases e as quitases (Staskawicz *et al.*, 1995; Hammond-Kosack e Jones, 1996). No local de infecção também pode ocorrer deposição de lenhina e de glicoproteínas contendo hidroxiprolina, responsáveis pelo fortalecimento das paredes celulares (Hammond-Kosack e Jones, 1996).

A resistência sistêmica adquirida é observada após a formação localizada de lesões necróticas nos tecidos vegetais, provocadas pela presença de agentes patogênicos. Foi observado que as plantas podiam adquirir resistência após tratamento com formas atenuadas de agentes patogênicos ou com indutores químicos. As plantas tratadas apresentavam um crescimento limitado da doença e conseqüentemente, uma diminuição da extensão e severidade dos sintomas (Ryals *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 2001). Esta resposta envolve em muitos casos a presença de ácido salicílico. Estudos realizados em tabaco e em *Arabidopsis* indicam que as plantas que não têm a capacidade de acumular este ácido também não são capazes de induzir este tipo de resistência (Delaney *et al.*, 1994). O ácido jasmônico e o etileno também estão associados à regulação de respostas de resistência em plantas contra doenças, sendo responsáveis pelo aumento da produção de compostos antimicrobianos, como sejam as fitoalexinas e as proteínas PR (Clarke *et al.*, 2000). O ácido jasmônico é essencial nas respostas de defesa da *Arabidopsis* contra vários fungos, como seja *Phythium mastophorum* (Reymond e Farner, 1998). O tratamento de plantas de cevada com metil jasmonato também conduziu a um aumento do nível de resistência contra o oídio (Walters *et al.*, 2002).

O isolamento de genes de resistência tem revelado que estes partilham motivos estruturais semelhantes (Staskawicz *et al.*, 1995; Hammond-Kosack e Jones, 1997; Dixon *et al.*, 2000; Richter e Ronald, 2000). Assim, com base nestes motivos, a maioria dos genes

² Pathogenesis related proteins

podem ser divididos nos seguintes grupos: serina-treonina quinase, LZ-NBS-LRR³, TIR-NBS-LRR⁴, eLRR⁵, eLRR-quinase (Quadro 8).

Quadro 8 – Classes de genes de resistência (Martin *et al.*, 2003)

Classe de genes	Gene	Planta	Agente patogénico
Serina-treonina quinase	<i>Pto</i>	Tomateiro	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LZ-NBS-LRR	<i>I2</i> <i>Mla</i> <i>RPS2</i> <i>RPM1</i>	Tomateiro Cevada <i>Arabidopsis</i> <i>Arabidopsis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> <i>Blumeria graminis</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> <i>Pseudomonas syringae</i>
TIR-NBS-LRR	<i>L6</i> <i>N</i> <i>RPP5</i>	Linho Tabaco <i>Arabidopsis</i>	<i>Melampsora lini</i> Virús do mosaico do tabaco <i>Peronospora parasitica</i>
eLRR	<i>Cf-2</i> <i>Cf-4</i> <i>Cf-5</i> <i>Cf-9</i>	Tomateiro	<i>Cladosporium fulvum</i>
eLRR-quinase	<i>Xa21</i>	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Outras	<i>Hm1</i> <i>mlo</i>	Milho Cevada	<i>Cochliobolus carbonum</i> <i>Blumeria graminis</i>

LZ – “leucine zipper”; LRR – “leucine rich repeats”; NBS – “nucleotide binding site”; TIR – “toll/interleukin1 receptor”

Por exemplo, o gene *Xa21* que confere resistência em arroz contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* codifica uma proteína da membrana celular com um domínio LRR extracelular e um domínio quinase intracelular. Os genes *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9* que conferem resistência ao tomate contra o fungo *Cladosporium fulvum*, codificam também uma proteína da membrana que apresenta apenas um domínio extracelular LRR. O gene *Pto*, que confere resistência ao tomate contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, codifica uma proteína serina-

³ leucine zipper-nucleotide binding site-leucine rich repeats

⁴ toll/interleukin1-nucleotide binding site-leucine rich repeats

⁵ leucine rich repeats extracellular

treonina quinase intracelular enquanto que na *Arabidopsis* o gene *RPS2*, que confere resistência ao mesmo agente patogénico, codifica uma proteína localizada no citoplasma que apresenta o domínio LZ-NBS-LRR. O gene *L6* do linho, que confere resistência à ferrugem, codifica uma proteína intracelular TIR-NBS-LRR.

II.7. Resistências ao oídio

Os fungos responsáveis pelo oídio são ascomicetas que pertencem à ordem *Erysiphales*. Esta ordem contém apenas a família *Erysiphaceae* que é constituída por 5 tribos: *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*, *Cystothecaeae*, *Phyllactinieae* e *Blumerieae* (Hückelhoven, 2005). Estes fungos são parasitas obrigatórios que invadem apenas as células da epiderme. Após o aparecimento dos esporos na superfície dos tecidos vegetais, os fungos precisam penetrar a cutícula e a parede celular do hospedeiro. Para tal, formam apressórios que penetram na parede celular, desenvolvendo mais tarde dentro da célula epidérmica os haustórios. Estas estruturas transferem os nutrientes necessários do hospedeiro para o fungo.

Na cevada o mecanismo de resistência ao oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) conferida pelo gene dominante *Mla* está de acordo com o modelo gene a gene proposto por Flor (1971). No entanto, a resistência controlada pelo gene recessivo *mlo* aos isolados conhecidos deste fungo não segue este modelo. A proteína MLO localizada na membrana citoplasmática não possui nenhum dos motivos estruturais presentes nas proteínas-R que conferem resistência específica para um dado agente patogénico (Piffanelli *et al.*, 2002).

Fraser (1992) propôs um modelo que tenta explicar o funcionamento das resistências recessivas observadas nas plantas. Segundo este autor, a resistência resulta de um mecanismo

passivo que torna o hospedeiro resistente devido à falta de algum factor específico na planta necessário para que o agente patogénico se desenvolva nos tecidos vegetais. A resistência recessiva reflectiria assim, uma falta de interacção entre o hospedeiro e o gene responsável pela virulência do agente patogénico, resultando no insucesso do estabelecimento da doença, tal como se observa na resistência da ervilha ao PSbMV⁶ (Johansen *et al.*, 2001). Estudos realizados em tabaco demonstraram que a resistência ao vírus PVY⁷ conferida pelo gene *va* é devido a deleções no *locus Va* que controla a susceptibilidade a este vírus (Noguchi *et al.*, 1999).

As resistências recessivas também podem envolver um mecanismo activo de defesa, tal como se observa em algumas resistências que envolvem fungos responsáveis pelo oídio. Os estudos sobre a interacção entre plantas e fungos do oídio têm sido realizados principalmente nos cereais e na *Arabidopsis*. Nos cereais, o oídio é causado pelo fungo *Blumeria graminis* que possui várias *formae speciales* como f. sp. *tritici* no trigo e f. sp. *hordei* na cevada. Na *Arabidopsis* já foram isolados e caracterizados vários mutantes resistentes a várias espécies da família *Erysiphaceae* e cuja resistência é controlada por genes recessivos (Frye e Innes, 1998; Dewdney *et al.*, 2000; Schulze-Lefert e Vogel, 2000; Vogel e Somerville, 2000; Vogel *et al.*, 2004).

A resposta de defesa manifestada à infecção destes fungos é caracterizada muitas vezes pela acumulação de calose (Eckardt, 2002) que constitui uma barreira mecânica contra a penetração das hifas. Com efeito, um dos mecanismos envolvido na resistência da cevada ao fungo *B. graminis* f. sp. *hordei* controlada pelo gene *mlo* consiste na formação de papilas no

⁶ Pea seed-borne mosaic potyvirus

⁷ Potato Virus Y

local de penetração do agente patogénico (Heitefuss, 2001). Nos genótipos resistentes observa-se também acumulação de teores elevados da fitoalexina p-coumaroyl-hidroxiagmatina em resposta à inoculação do fungo. Esta fitoalexina tem actividade antifúngica sobre o oídio, contribuindo para a paragem do crescimento deste agente patogénico (von Röpenack *et al.*, 1998). Adicionalmente, verifica-se o aumento da lenhificação e acumulação de peróxido de oxigénio (Hückelhoven *et al.*, 1999).

Em *Arabidopsis*, a resistência ao fungo *Erysiphe cichoracearum* observada no mutante *edr1*⁸ está associada à acumulação de calose nas folhas e à morte das células nos locais de infecção (Frye e Innes, 1998), tal como se verifica nas plantas de cevada que possuem o gene *mlo*. No entanto, nos mutantes *edr1*, as respostas de defesa só são detectadas três dias após a inoculação do fungo permitindo esta situação o desenvolvimento de hifas secundárias nas células do mesófilo. Nas plantas que contêm o gene *mlo*, a resistência está associada à formação rápida de papilas que bloqueiam imediatamente a penetração do fungo nas células vegetais, inibindo a infecção logo nas fases iniciais.

Vogel e Somerville (2000) identificaram também vários mutantes de *Arabidopsis* resistentes ao fungo *E. cichoracearum* (*pmr1*, *pmr2*, *pmr3*, *pmr4*) que contrariamente ao observado no mutante *edr1* não formam lesões necróticas como resposta ao ataque do fungo. Estes mutantes *pmr*⁹ podem ser divididos em três grupos de acordo com as respostas de defesa observadas. Num grupo está incluído o mutante *pmr2* que não apresenta como resposta de resistência a formação de papilas, a morte de células ou a expressão de proteínas PR. Os resultados obtidos indicam que a impossibilidade do fungo *E. cichoracearum* crescer neste

⁸ Enhanced disease resistant 1

⁹ Powdery mildew resistant

mutante é devido à perda de um factor de susceptibilidade, tal como foi sugerido por Fraser (1992). O fungo consegue penetrar nas paredes celulares mas é incapaz de continuar o seu crescimento. O segundo grupo é constituído pelos mutantes *pmr1* e *pmr4* e a resposta de resistência parece estar associada ao aumento da expressão do gene PR1, sugerindo que neste caso o ácido salicílico desempenha a função de mediador da resistência. No entanto, o aumento dos níveis de PR1 é modesto, deixando em aberto a possibilidade de existir outro mecanismo responsável pela resposta de resistência. No terceiro grupo, representado pelos mutantes *pmr3*, a resistência pode estar dependente de outra via ainda não conhecida e que deve activar a resposta de resistência. Nestes mutantes observam-se apenas microlesões e a acumulação de teores reduzidos de proteína PR1 (Schulze-Lefert e Vogel, 2000).

Mais tarde, foram identificados em *Arabidopsis* mais dois mutantes, *pmr5* e *pmr6*, resistentes aos fungos *E. cichoracearum* e *E. orontii* (Vogel *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2004). Nestes mutantes, também não se verifica a activação da produção de ácido salicílico, ácido jasmónico ou de etileno. No entanto, observam-se alterações ao nível da composição das paredes celulares. Verifica-se a acumulação de pectinas devido à perda de actividade de *PMR5* e *PMR6* que apresentam similaridade com as pectinases. Esta situação provoca uma diminuição da disponibilidade de nutrientes da planta para o patógeno e esta ideia é consistente com o crescimento lento do fungo que é observado nestes mutantes.

II.8. Resistência ao oídio em *Pisum sativum* L.

Na ervilha, o oídio é causado pelo fungo *Erysiphe pisi* Syd. A resistência parece estar associada à dificuldade apresentada pelo fungo em formar haustórios nos genótipos

resistentes. Com efeito, nestes materiais apenas se observa o desenvolvimento de um número reduzido de haustórios e hifas (Singh e Singh, 1983). Estudos bioquímicos realizados por Kalia e Sharma (1988) revelaram que a resposta de resistência das plantas à infecção do fungo *E. pisi* está relacionada com a actividade da peroxidase. As plantas resistentes apresentam níveis mais elevados de peroxidases relativamente às plantas susceptíveis assim como teores elevados de fenóis.

A resistência ao oídio apresentada pelas plantas de ervilha tem sido referida, na maioria dos estudos realizados, como sendo controlada por um ou dois genes recessivos. Harland (1948) descreve que a resistência apresentada pelos génotipos analisados originários do Peru é conferida por um gene recessivo, que denominou por *er*. Cousin (1965) também demonstrou que a resistência apresentada pelas variedades Mexique 4 e Stratagem é controlada apenas por um gene recessivo. Mais tarde, Heringa *et al.* (1969) após estudarem várias linhas resistentes provenientes de diferentes regiões geográficas, em condições de campo e de ambiente controlado, concluíram que a resistência encontrada nas plantas podia ser conferida por dois genes recessivos, que designaram por *er₁* e *er₂*. A presença do gene recessivo *er₁* originava resistência completa nas plantas enquanto que o gene *er₂* apenas conferia resistência ao nível das folhas. Conclusões semelhantes foram obtidas nos trabalhos realizados por Tiwari *et al.* (1997a). Por outro lado, Kumar e Singh (1981) após analisarem as descendências F₂ e F₃ de diferentes cruzamentos realizados entre linhas susceptíveis e resistentes, chegaram à conclusão que era necessário a presença simultânea de dois genes recessivos (*er₁* e *er₂*) para que os materiais vegetais apresentassem resistência ao oídio. Existem também alguns trabalhos sobre a natureza genética da resistência ao oídio que revelaram ser necessário a presença de um

sistema poligénico para controlar o oídio. Hammerlund (1925) realizou um estudo exaustivo sobre os diversos tipos de oídio e analisou a resposta das plantas de várias espécies a esta doença, tendo incluído neste trabalho a ervilha e o fungo *E. pisi*. O padrão de segregação que obteve nas descendências F₂ de ervilha levou este autor a afirmar que a resistência era controlada por 4 genes com efeitos cumulativos. Também, Gupta *et al.* (1995) referem que a resistência é controlada por um sistema poligénico. Trabalhos mais recentes confirmam que a resistência das plantas de ervilha ao oídio é conferida por apenas um gene recessivo (*er*). Vaid e Tyagi (1997) analisaram, em ambiente controlado, oito variedades resistentes de ervilha, entre as quais se encontrava a Mexique 4, que foram inoculadas com isolados de *E. pisi* provenientes de 5 zonas geográficas distintas. Verificaram que no mecanismo de controlo da resistência ao oídio apenas estava envolvido um gene recessivo. Liu *et al.* (2003) avaliaram 21 genótipos resistentes e 8 susceptíveis e os resultados obtidos suportam também a hipótese de que a resistência é controlada por um gene recessivo. Conclusões idênticas foram obtidas nos estudos realizados por Sharma (2003), Janila e Sharma (2004) e Ek *et al.* (2005).

As diferenças observadas nos diversos trabalhos realizados sobre a natureza genética da resistência ao oídio em ervilha podem ser explicadas através da diversidade de genótipos utilizados assim como na possibilidade de existir variabilidade nas populações do fungo *Erysiphe pisi* (Tiwari *et al.*, 1997b).

III. Material e Métodos

III.1. Material vegetal

Nos estudos realizados no âmbito desta tese utilizaram-se as variedades comerciais Frilene e Solara que se caracterizam, respectivamente, por apresentarem folha do tipo normal e sementes amarelas de calibre médio e folhas semi-áfílas e sementes verdes de calibre grande.

No decorrer do trabalho de investigação, foram também utilizadas duas linhas mutantes obtidas a partir das duas variedades comerciais e a linha E835, cedida pelo INRA-Versailles, França. Analisaram-se ainda descendências F_1 e F_2 de cruzamentos realizados entre as linhas mutantes e entre estas e as variedades Frilene, Solara e a linha E835.

III.2. Sincronização das células dos meristemas apicais

Para estudar a influência da fase do ciclo celular no processo de mutagénese, procedeu-se à sincronização das células dos meristemas apicais das plântulas da variedade Frilene. As células foram sincronizadas com hidróxido de ureia de acordo com o método descrito por Leitão *et al.* (1986). As plúmulas permaneceram em contacto com uma solução de hidróxido de ureia a 0,015% e as raízes ficaram imersas numa solução a 0,03%, durante 24 horas à temperatura de 24°C. Após este período, as plântulas foram sujeitas a várias lavagens durante 30 minutos com água da torneira previamente aquecida à temperatura de 24°C.

III.3. Tratamentos mutagénicos

Para a obtenção de plântulas para tratamentos mutagénicos, foram seleccionadas sementes com o calibre característico de cada uma das variedades em estudo, eliminando-se

aquelas que apresentavam sintomas de doenças ou de ataque de pragas. As sementes foram desinfectadas com uma solução a 10% de lixívia comercial e 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio) durante 5 minutos e após lavagem em água corrente foram imersas em água durante 3 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas a germinar em placas de petri, numa estufa sem iluminação, a 24°C, durante 3 dias. Após este período, as plântulas apresentavam a plúmula com o desenvolvimento necessário para iniciar os tratamentos mutagénicos.

Como agentes mutagénicos foram utilizados dois compostos químicos alquilantes, o etilnitrosourea (ENU, Sigma Chemical Co) e o metilnitrosourea (MNU, Sigma Chemical Co). Após pesagem da quantidade requerida de ENU e de MNU, os agentes mutagénicos foram dissolvidos respectivamente, em sulfóxido de dimetilo (DMSO) e em etanol a 100%, e levados à concentração pretendida (5mM ENU e 1mM MNU) com água destilada, imediatamente antes do início dos tratamentos.

Durante os tratamentos mutagénicos, apenas as plúmulas ficaram imersas nas soluções de ENU e de MNU. Para o efeito, as plântulas foram colocadas, em posição invertida, em copos de vidro que, após a adição da solução mutagénica foram tapados com parafilme.

Nos ensaios de tempo de exposição aos agentes mutagénicos, as plúmulas das plântulas da variedade Solara permaneceram imersas nas soluções de ENU e de MNU durante períodos de 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas. Nos ensaios em que foi estudada a influência da fase do ciclo celular no efeito mutagénico final, as plântulas da variedade Frilene, cujos meristemas apicais caulinares tinham sido sujeitos a sincronização prévia, foram submetidas a imersão na solução de ENU durante 1 hora. Os tratamentos referentes às fases S, G2, M e G1

foram realizados, respectivamente, 2, 7, 8.30 e 13 horas após a conclusão do período de sincronização.

Terminado o período de tratamento mutagénico, as plântulas foram imersas numa solução de tiosulfato de sódio a 1% durante 5 minutos, seguindo-se 3 lavagens em água corrente, durante 30 minutos, para eliminação dos resíduos mutagénicos. As plântulas foram transplantadas directamente para o campo. Como controlo utilizaram-se plântulas imersas apenas em água destilada.

Na geração M_1 , efectuou-se a contagem do número total de plantas adultas e do número de plantas com vagens e sem vagens. A partir destes valores, determinou-se a taxa de sobrevivência e da percentagem de esterilidade observada em cada tratamento. As plantas M_1 foram colhidas individualmente, tendo sido cada uma avaliada em relação às seguintes características: altura total, número de vagens por planta, número de sementes por vagem e comprimento da vagem. A descendência de cada planta M_1 originou uma família M_2 .

Registaram-se as mutações morfológicas e clorofílicas apresentadas pelas plantas M_2 , de modo a calcular a percentagem de famílias com mutações e a percentagem de famílias com mutações múltiplas. Procedeu-se à selecção de plantas mutantes que apresentavam características interessantes para serem integradas no programa de melhoramento da ervilha.

III.4. Avaliação dos mutantes resistentes ao oídio

Para estudar o mecanismo genético da resistência ao oídio (*Erysiphe pisi* Syd.) apresentada pelos mutantes, realizaram-se vários tipos de cruzamentos artificiais entre 5 progenitores (Solara, Solara mutante, Frilene, Frilene mutante e linha E835). A técnica de

hibridação consistiu na emasculação das flores do progenitor feminino e na transferência imediata para o estigma destas flores de pólen proveniente de anteras maduras de flores pertencentes ao progenitor masculino. As anteras das flores do progenitor feminino tinham que estar completamente fechadas, de modo a que o processo de autofecundação ainda não tivesse ocorrido. As flores polinizadas artificialmente foram identificadas com uma etiqueta que continha a informação sobre os progenitores utilizados.

Após a maturação, as vagens foram colhidas e cada vagem originou uma linha de plantas F_1 . As plantas F_1 no final do ciclo foram colhidas individualmente tendo a descendência de cada planta originado uma população de plantas F_2 .

As descendências F_1 e F_2 foram sempre instaladas no campo experimental da Universidade do Algarve, Gambelas, em sementeira de Primavera. Esta época de sementeira proporciona condições de temperatura e de humidade favoráveis para o desenvolvimento da infecção, em condições naturais. Para facilitar o aparecimento da doença e aumentar a quantidade de inóculo, semeou-se também material sensível entre as descendências. Dado que no local do ensaio, os níveis de infecção foram sempre muito elevados, não foi necessário proceder a inoculações artificiais.

Nas descendências F_1 e F_2 , observou-se a reacção das plantas ao oídio e registou-se o tipo de folha de cada planta. As plantas foram classificadas individualmente como resistentes ou susceptíveis, no final da frutificação. A partir desta fase as plantas sensíveis ficam fortemente atacadas pelo fungo, permitindo uma diferenciação clara entre os 2 tipos de materiais. Utilizou-se o teste χ^2 para verificar se a segregação observada do tipo de folha e da

reação das plantas ao oídio nas descendências F_2 estava de acordo com o padrão de segregação mendeliano monogênico de 3:1.

III.5. Identificação de marcadores moleculares ligados ao gene mutado de resistência ao oídio

No estudo de identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao oídio, procedeu-se, numa primeira fase, à comparação dos perfis de amplificação de cada linha mutante com a respectiva linha susceptível. As linhas resistentes mutantes foram consideradas como linhas quase isogénicas (NILs - “near isogenic lines”) das suas formas originais (susceptíveis). Mais tarde, quando já se dispunha de uma população F_2 segregante, efectuaram-se também análises moleculares utilizando a metodologia BSA (“bulked segregant analysis”) descrita por Michelmore *et al.* (1991). Para o efeito, um “bulk” de DNA genómico de 15 indivíduos resistentes e um “bulk” de DNA genómico de 15 indivíduos susceptíveis foram comparados entre si.

III.6. Extracção e quantificação de DNA

O DNA genómico foi extraído de folhas recém-expandidas de plantas jovens que estavam em avaliação no campo experimental da Universidade do Algarve. De cada progenitor, colheu-se material vegetal de 6 indivíduos. Foi igualmente extraído DNA de 255 plantas individuais pertencentes à descendência F_2 do cruzamento Solara x Frilene mutante.

As folhas foram maceradas em azoto líquido até à obtenção de um pó fino. Ao macerado obtido adicionou-se 900 µl de tampão de extracção (200mM Tris-HCl pH 8,0;

250mM NaCl; 25mM de EDTA pH 8,0 e 0,5% de SDS) e 10 µl de Rnase A (10 mg/ml). As amostras foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos para digestão do RNA. Em seguida, procedeu-se a uma extracção com fenol-clorofórmio, e a duas extracções com clorofórmio. O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol 100%, lavado com etanol 80% e ressuspensão em 50 µl TE (10mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA).

A quantificação e a pureza do DNA extraído foram determinadas por comparação visual de cada amostra com padrões de DNA de concentração conhecida em gel de 1% de agarose e por espectrofotometria, por leitura da absorvância a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1987). As amostras de DNA de trabalho foram obtidas por diluição com água destilada até à concentração final de 20 ng/µl.

III.7. Análise de marcadores moleculares

III.7.1. Marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

A técnica de RAPD permite a amplificação de fragmentos de DNA a partir de um único “primer” com sequência de nucleótidos arbitrária, constituído por 10 bases (Williams *et al.*, 1990).

As amplificações foram realizadas num volume de 25 µl contendo 1x tampão de reacção (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 0,16 mM de cada dNTP; 0,4 µM de “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda) e 20 ng de DNA. As reacções de amplificação efectuaram-se num termociclador Biometra UNO II, programado do seguinte modo: um ciclo

inicial de 94°C durante 90s, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 36°C, 120s a 72°C, finalizando com 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 0,5X, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Para determinar o tamanho das bandas de DNA amplificadas, utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Gene Ruler DNA ladder, MBI, Fermentas).

Foram testados 500 “primers” (Quadro 9) utilizando a estratégia por NILs e 160 “primers” (Quadro 10) utilizando a metodologia BSA.

Quadro 9 – “Primers” RAPD testados nas análises por NILs

Kits*				
OPA	OPF	OPK	OPP	OPU
OPB	OPG	OPL	OPQ	OPV
OPC	OPH	OPM	OPR	OPX
OPD	OPI	OPN	OPS	OPY
OPE	OPJ	OPO	OPT	OPZ

*- Cada kit é constituído por 20 “primers”

Quadro 10 – “Primers” RAPD testados nas análises por BSA

Kits*			
OPAA	OPAC	OPAE	OPAM
OPAB	OPAD	OPAK	OPAO

*- Cada kit é constituído por 20 “primers”

Os marcadores encontrados foram denominados pelas letras que compõem o nome dos “primers” seguidas pelo número do “primer” e dimensão do fragmento amplificado. Assim,

por exemplo, o fragmento de 850 pares de bases obtido com o “primer” OPN02 foi designado por N02_850.

III.7.2. Marcadores ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”)

A técnica ISSR requer a utilização de um único “primer” composto por uma sequência repetitiva e/ou por uma sequência arbitrária de 1 a 3 nucleótidos, numa das extremidades (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

As reacções de amplificação foram realizadas num volume de 20 µl contendo 1x tampão de reacção (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de “primer” e 40 ng de DNA. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo a 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 48-56°C (temperatura dependente do “primer” em análise), 2 minutos a 72°C, finalizando com 7 minutos a 72°C. Tal como na técnica RAPD, os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de 2% de agarose, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

No total, foram testados 32 “primers” ISSR, encontrando-se as suas sequências nucleotídicas no Quadro 11. Os marcadores obtidos foram denominados pelas letras IS seguidas pelo número do “primer” e dimensão do fragmento amplificado. Assim, por exemplo, o fragmento de 490 pares de bases obtido com o “primer” ISSR04 foi designado por IS04_490.

Quadro 11 – Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na análise de ISSR

“Primer”	Sequência (5’- 3’)	T (°C)	“Primer”	Sequência (5’- 3’)	T (°C)
ISSR 01	(CA) ₈ RG	52	ISSR 17	(GA) ₈ T	52
ISSR 02	(CA) ₈ RY	52	ISSR 18	(GA) ₈ C	52
ISSR 03	(GA) ₈ YT	52	ISSR 19	(GA) ₈ A	48
ISSR 04	(GA) ₈ YC	51	ISSR 20	(GT) ₈ C	52
ISSR 05	(GA) ₈ YG	56	ISSR 21	(TC) ₈ C	56
ISSR 06	(AG) ₈ YT	52	ISSR 22	(TC) ₈ G	52
ISSR 07	(AG) ₈ YC	56	ISSR 23	(CT) ₈ RC	52
ISSR 08	(AC) ₈ YA	52	ISSR 24	(CT) ₈ RG	52
ISSR 09	(AC) ₈ YG	52	ISSR 25	(TG) ₈ RC	52
ISSR 10	(GT) ₈ YC	52	ISSR 26	(CT) ₆	52
ISSR 11	(GT) ₈ YG	54	ISSR 27	BDB(CA) ₇	52
ISSR 12	(AG) ₈ YG	54	ISSR 28	DBD(AC) ₇	52
ISSR 13	(AC) ₈ YT	54	ISSR 29	VHV(GT) ₇	52
ISSR 14	(AG) ₈ T	52	ISSR 30	HVH(TG) ₇	52
ISSR 15	(AG) ₈ C	56	ISSR 31	(AG) ₈ VC	52
ISSR 16	(AG) ₈ G	52	ISSR 32	CCC(GT) ₇	52

B=T ou G ou C; D=A ou T ou G; H=A ou T ou C; R=purina; Y=pirimidina; V=A ou C ou G

III.7.3. Marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”)

Na técnica AFLP, tal como as anteriores, não é necessário ter informação prévia sobre a sequência de DNA que vai ser amplificada. Os AFLPs baseiam-se na amplificação de fragmentos obtidos após a digestão das amostras de DNA por duas enzimas de restrição, uma de corte mais frequente e outra de corte mais raro e posterior ligação de adaptadores de sequência conhecida a cada uma das extremidades coesivas dos fragmentos gerados (Vos *et al.*, 1995).

As análises foram realizadas utilizando o kit fornecido pela Life Technologies “AFLP™ Analysis System I” (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo indicado no manual e de acordo com o procedimento descrito por Vos *et al.* (1995).

As amostras de DNA foram cortadas com as enzimas de restrição *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte frequente), e ligadas a adaptadores específicos (Quadro 12). Na pré-amplificação,

usaram-se “primers”, complementares aos adaptadores, com um nucleótido selectivo. Nesta etapa, as amostras de DNA foram amplificadas durante 30 ciclos programados do seguinte modo: 30s a 94°C, 60s a 56°C e 60s a 72°C. O resultado do corte e da pré-amplificação foram verificados através de electroforese em gel de agarose 2%. As amostras pré-amplificadas foram diluídas 50x. A partir desta diluição efectuaram-se as amplificações selectivas. Estas reacções foram realizadas com “primers” constituídos por 3 nucleótidos, num volume de 10 µl contendo 1x tampão de reacção (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5mM MgCl₂; 50 mM KCl); 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 2,5 ng de “primer” EcoRI, 15 ng de “primer” MseI e 2,5 µl de amostra diluída de DNA pré-amplificada. As amplificações foram programadas para um ciclo inicial de 30s a 94°C, 30s a 65°C e 60s a 72°C, seguidos de 12 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 65°C e 60s a 72°C e em que a temperatura de “annealing” decresce 0,7°C em cada ciclo. A amplificação continua com 23 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C e 60s a 72°C.

Quadro 12 –Adaptadores e “primers” EcoRI e MseI

	Sequência
Adaptador EcoRI	5'- CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Adaptador MseI	5'- GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'
“Primer” EcoRI	5'-GACTGCGTACC AATTC NNN
“Primer” MseI	5'-GATGAGTCCTGAG TAA NNN

N – Nucleotídeo

Fonte: Vos *et al.*, 1995

Os “primers” EcoRI foram marcados com [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Por cada amostra, 0,09 µl de “primer” EcoRI (27,8 ng/µl) foram incubados

com 0,1 unidade de T4 quinase, 1x tampão de reacção (350 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 500 mM KCl e 5 mM 2-mercaptoetanol); 0,05 µl de [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP (370 MBq/ml), num volume final de 0,25 µl, durante 1 h a 37°C. Para inactivar a enzima, o “primer” marcado foi colocado a 70°C durante 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em géis desnaturantes de 6% de poliacrilamida (19:1 acrilamida:bisacrilamida; 8,3 M de ureia, 1x TBE, 300 µl APS 10%, 32µl de TEMED). A electroforese foi realizada em tampão 1x TBE. Como padrão das dimensões das bandas de DNA amplificadas, utilizaram-se dois marcadores de dimensões moleculares: “30-300 bp AFLP DNA Ladder” (Life Technologies, Invitrogen) e “Gene Ruler DNA Ladder Mix” (MBI, Fermentas), previamente marcados com [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP. Para o efeito, a cada 2 µl de marcador adicionou-se 1 µl de [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP (370 MBq/ml) e 10 unidades de T4 quinase. A reacção é feita a 37°C durante 10 minutos e é parada por inactivação da enzima a 65°C durante 15 minutos. No final, adicionou-se 5 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 0,1mM EDTA) e 2,5 µl de formamida e incubou-se 5 minutos a 70°C.

Após a corrida, os géis foram secos a 80°C, sob vácuo (secador GD40/50, Gibco, Life Technologies) e autoradiografados (HyperfilmTM MP, Amersham Bioscience), à temperatura ambiente. O tempo de exposição variou em função da intensidade do sinal de radioactividade. A chapa fotográfica foi revelada de acordo com as instruções do fabricante (Kodak GBX).

Os marcadores AFLP foram designados pelas letras que compõem a combinação de “primers” seguidas do tamanho do fragmento amplificado. Assim, por exemplo o fragmento de 235 pares de bases obtido com a combinação de “primers” E-AAC/M-CAG foi designado por AAC/CAG_235.

III.7.4. Marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”)

Nesta técnica, utilizam-se pares de “primers” que amplificam fragmentos genómicos de DNA específicos previamente isolados e sequenciados.

As reacções de amplificação foram realizadas num volume de 25 µl contendo 1x tampão de reacção (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 0,16 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada “primer” e 20 ng de DNA. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 90s a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C, 60s a 72°C, finalizando com 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de 2% de agarose, visualizados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

III.8. Conversão de marcadores RAPD e AFLP em marcadores SCAR

Para conversão de um marcador RAPD, a banda de DNA que se pretende isolar é excisada do gel de agarose (2%) e purificada com o kit “ConcertTM Gel Extraction Systems” (Life TechnologiesTM) seguindo as indicações do fornecedor. Após purificação, o DNA obtido foi novamente amplificado com o mesmo “primer” e analisado em gel de agarose, de modo a confirmar as dimensões da banda polimórfica.

Para isolamento de marcadores AFLP, após a revelação da chapa fotográfica, esta foi novamente colocada sobre o gel de poliacrilamida seco, na mesma posição em que tinha sido exposta e procedeu-se ao corte do fragmento seleccionado com um bisturi. Para a eluição do DNA correspondente à banda cortada, os fragmentos do gel foram submersos em 100µl de TE

a 37°C, durante a noite. Após este período de difusão, procedeu-se a uma centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado com 3 volumes de etanol a 100%, durante 4 horas, a -20°C. Realizou-se nova centrifugação a 13 000 rpm durante 10 minutos, a 4°C e ressuspendeu-se o DNA em 10 µl de TE.

O DNA obtido foi amplificado novamente com a enzima *Pfu* DNA polimerase (Stratagene). A reacção de amplificação foi realizada num volume 50 µl, contendo 1x tampão de reacção (20 mM Tris-HCl pH 8,8; 2 mM MgSO₄; 10 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂ SO₄; 1% Triton® X-100; 0,1 mg/ml nuclease-free BSA); 2,5 unidades de *Pfu* DNA polimerase; 0,24 mM de dNTP's; 0,4 µM de “primer” EcoRI e de “primer” MseI e 2 µl de amostra de DNA. O produto da reacção de amplificação foi separado através de electroforese em gel 2% de agarose. Cortou-se a banda e seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para purificar o fragmento RAPD. Após a purificação das amostras, adicionaram-se adeninas na extremidade 3' para garantir bons resultados na fase seguinte de clonagem. Para o efeito, incubou-se as amostras de DNA com uma unidade de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) a 72° durante 10 minutos.

Os fragmentos purificados foram clonados utilizando o “TOPO TA Cloning® kit for sequencing” (Invitrogen-Life Technologies). Os produtos de PCR foram ligados ao vector pCR 4-TOPO e bactérias competentes de *Escherichia coli* TOP 10 foram transformadas por choque térmico. A selecção das colónias transformadas que apresentavam o fragmento desejado foi realizada por PCR utilizando os “primers” universais M13. As reacções de amplificação foram efectuadas num volume de 20 µl contendo 1x tampão de reacção (10 mM

Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 0,32 mM de cada dNTP; 0,4 μM de cada “primer”. Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de 1,5% de agarose. As colónias que amplificaram um fragmento com o tamanho pretendido foram seleccionadas e preparadas para a sequenciação. Os plasmídeos foram extraídos com o kit “Wizard® Plus Minipreps DNA purification System” (Promega, EUA).

Os fragmentos foram sequenciados no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) utilizando os “primers” universais M13. As sequências obtidas foram alinhadas com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999). Com base na análise dos dados de sequenciação desenharam-se dois “primers” específicos (“forward” e “reverse”) para cada um dos fragmentos em análise. Os “primers” foram sintetizados pela Invitrogen.

III.9. Construção de um mapa genético e mapeamento do gene de resistência ao oídio

Para construção de um mapa genético contendo o *locus* de resistência ao oídio e o *locus* do tipo de folha, analisou-se a segregação do fenótipo resistente e de marcadores dominantes RAPD, ISSR e AFLP em 94 indivíduos duma população segregante F₂ obtida do cruzamento entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante, com cujos resultados se construiu uma matriz binária. A ausência de um determinado marcador molecular e a presença dos fenótipos recessivos (resistência ao oídio e folha semi-áfila) foi codificada com o algarismo “0”. A presença de um marcador molecular e dos fenótipos dominantes (susceptibilidade ao oídio e folha normal) foi codificada com o algarismo “1”. O teste de χ^2 foi

utilizado para determinar a concordância do padrão de segregação observada em cada marcador e o padrão de segregação mendeliana 3:1.

A análise de ligamento factorial e a construção dos respectivos grupos foi realizada com o auxílio do programa JoinMap 3.0 (Van Ooijen e Voorrips, 2001). As distâncias entre marcadores estão expressas em centiMorgans (cM) e foram calculadas utilizando a função de Kosambi a partir dos valores de frequência de recombinação. A cobertura do mapa foi estimada como a fracção entre a soma das distâncias abrangidas por todos os grupos de ligamento aos quais foram adicionados, em ambas as extremidades, a distância média entre dois marcadores adjacentes (Marques *et al.*, 1998).

IV. Resultados e Discussão

IV.1. Mutagênese induzida

IV.1.1. Efeito do tempo de exposição aos compostos mutagênicos

Neste conjunto de ensaios pretendeu-se comparar os efeitos mutagênicos dos compostos químicos metilnitrosourea e etilnitrosourea e estudar o efeito do tempo de exposição das plântulas da variedade Solara a estes dois agentes mutagênicos, de modo a determinar a duração mais adequada dos períodos de tratamento.

Em qualquer dos tratamentos efectuados, verificou-se que as percentagens de sobrevivência foram sempre muito elevadas, próximas de 100% (Quadro 13), tal como foi verificado por Leitão *et al.* (1987b). Estes valores diferem dos resultados obtidos em experiências anteriores realizadas por Leitão *et al.* (1987a) que observaram taxas de letalidade próximas de 50% nos materiais de ervilha tratados com ENU. No entanto, nestes últimos trabalhos foram utilizadas sementes como material de partida para os tratamentos mutagênicos, assim como, tempos de exposição aos compostos mutagênicos mais elevados. No presente estudo, também foi observado um número reduzido de plantas estéreis em todos os tratamentos que envolveram o composto ENU. O agente mutagénico MNU apenas originou percentagens elevadas de esterilidade nos períodos de exposição superiores a 3 horas. Estes resultados confirmam que nesta espécie, a utilização de plântulas recém germinadas como material de partida para a realização dos tratamentos mutagênicos, aliada ao procedimento de imergir apenas as plúmulas nas soluções mutagénicas, constitui uma metodologia eficaz para obter uma taxa elevada de sobrevivência das plantas M_1 e um baixo valor de esterilidade.

Em relação à capacidade reprodutiva das plantas, os valores registados nos tratamentos com o etilnitrosourea e com o metilnitrosourea revelam que existem diferenças entre a acção destes dois agentes. O composto MNU provocou um efeito mais depressivo sobre a produção de semente relativamente ao composto ENU. Este resultado está de acordo com diversos trabalhos que indicam que os agentes alquilantes metil são mais reactivos do que os compostos etil (Kamra e Brunner, 1977). Estes últimos são menos tóxicos, tolerando as plantas doses mais elevadas, tal como aconteceu no nosso estudo. Embora se tivesse utilizado uma concentração de ENU (5mM) cinco vezes superior à concentração de MNU (1mM), o efeito depressivo exercido pelo etilnitrosourea sobre a capacidade reprodutiva das plantas foi mais baixo.

Quadro 13 – Efeito do tempo de exposição aos agentes mutagénicos etilnitrosourea (ENU) e metilnitrosourea (MNU) na geração M₁ utilizando plântulas da variedade Solara

Composto mutagénico	Tratamento	Taxa de sobrevivência (%)	Esterilidade (%)	Altura das plantas (cm)	Nº de vagens por planta	Nº de sementes por planta	Nº de sementes por vagem
ENU (5 mM)	Controlo	100	0,0	37,8 c	21,8 a	82 a	3,8 a
	1 hora	99	0,0	39,4 bc	18,3 ab	59 b	3,2 b
	2 horas	91	0,0	42,3 ab	20,2 ab	44 c	2,2 c
	3 horas	100	2,1	38,5 c	18,3 ab	62 b	3,3 b
	4 horas	100	5,0	43,6 a	17,2 b	31 d	1,8 d
MNU (1 mM)	1 hora	100	0,0	40,4 b	15,0	30 a	2,0
	2 horas	100	2,9	41,0 b	n.d.	21 b	n.d.
	3 horas	92	20,8	39,4 b	n.d.	15 c	n.d.
	4 horas	89	30,8	41,6 b	n.d.	11 c	n.d.

a, b, c, d – agrupamentos obtidos através do teste de Duncan ($\alpha=0,05$)

n.d. – não disponível

Resultados semelhantes foram observados noutro ensaio preliminar em que se utilizaram plântulas da variedade Frilene (Quadro 14). Também, nesta variedade, o tratamento com metilnitrosourea, realizado durante uma hora, provocou uma maior redução da

fertilidade das plantas, que se traduziu numa diminuição drástica do número de vagens e de sementes obtidas por cada planta.

Quadro 14 – Efeito dos compostos mutagénicos etilnitrosourea (ENU) e metilnitrosourea (MNU) na geração M1, utilizando plântulas da variedade Frilene, após uma hora de tratamento

Variedade	Composto mutagénico	Nº de vagens por planta	Nº de sementes por planta	Nº de sementes por vagem
Frilene	Controlo	8,8 a	38,3 a	4,3 a
	ENU (5 mM)	8,7 a	20,7 b	2,4 b
	MNU (1 mM)	5,4 b	7,3 c	1,3 c

a, b, c – agrupamentos obtidos através do teste de Duncan ($\alpha=0,05$)

Em relação à duração dos tratamentos efectuados com os compostos ENU e MNU, os resultados obtidos indicam que o efeito destes compostos sobre a capacidade reprodutiva das plantas varia em função do tempo de exposição. Nos tratamentos que envolveram o composto MNU, verificou-se que o aumento do tempo de exposição conduziu a uma redução progressiva e acentuada do número de sementes por planta. Os tratamentos que incluíram o composto ENU, originaram uma resposta diferente. Neste caso, observou-se que a acção tóxica exercida sobre a capacidade de produção de vagens foi semelhante, quer os tempos de exposição tenham sido 1 hora, 2 horas ou 3 horas. Só se verificou uma redução drástica do número total de sementes por planta no tratamento correspondente a 4 horas, devido ao número reduzido de sementes existente em cada vagem.

Embora a redução da estatura das plantas após um tratamento mutagénico seja um fenómeno frequente em muitas espécies (Özbek *et al.*, 1991; Vranceanu e Iuoras, 1991), neste estudo, o tamanho das plantas de ervilha não foi afectado de forma negativa. Aliás, registou-se

um ligeiro aumento da altura das plantas tratadas relativamente às plantas pertencentes ao controlo, em qualquer dos tratamentos realizados.

Na geração M₂, a percentagem de famílias com mutações atingiu o valor máximo nos tratamentos correspondentes a duas horas de exposição quer utilizando o etilnitrosoureia quer o metilnitrosoureia (Quadro 15). No entanto, para cada um dos períodos de exposição (1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas), os tratamentos realizados com o composto ENU apresentaram sempre frequências mutagénicas mais elevadas relativamente aos tratamentos realizados com o composto MNU. Também, o maior número de famílias com mutações múltiplas foi registado nos tratamentos em que as plântulas estiveram expostas durante 2 horas às soluções mutagénicas. Períodos de exposição mais longos provocaram a redução do número de famílias com mutações assim como de famílias com mutações múltiplas. Estes resultados indicam que nesta variedade os tratamentos mutagénicos não devem ter duração superior a 2 horas, uma vez que a eficiência mutagénica decresce nos tratamentos mais prolongados.

Quadro 15 – Efeito do tempo de exposição de plântulas da variedade Solara aos agentes mutagénicos etilnitrosoureia (ENU) e metilnitrosoureia (MNU), na geração M₂

Composto mutagénico	Tratamento	Nº de famílias analisadas	% de famílias com mutações	% de famílias com mutações múltiplas
ENU (5 mM)	1 hora	79	20,2	2,6
	2 horas	76	39,3	13,5
	3 horas	60	20,8	1,8
	4 horas	60	22,3	0,0
MNU (1 mM)	1 hora	36	16,6	0,0
	2 horas	32	37,4	4,7
	3 horas	34	14,6	2,9
	4 horas	34	11,6	0,0

Em todos os tratamentos realizados foram encontradas plantas que apresentavam alterações clorofílicas e morfológicas (Quadro 16). Verificou-se também que foi no período de 2 horas de exposição das plântulas às soluções mutagênicas que se obteve um espectro mutagênico mais alargado, quer nos tratamentos com o composto ENU quer com o composto MNU. Para cada um dos períodos de exposição estudados, o etilnitrosourea proporcionou sempre o aparecimento de um maior número de mutações diferentes relativamente ao metilnitrosourea.

Quadro 16 – Espectro mutagênico observado nas famílias M₂ provenientes da variedade Solara, após diferentes períodos de exposição aos agentes mutagênicos etilnitrosourea (ENU) e metilnitrosourea (MNU)

Tipo de mutação	ENU (5 mM)				MNU (1 mM)			
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
Clorofílicas								
Clorina		✓	✓	✓	✓	✓		
Clorótica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Xanta	✓	✓						
Albina	✓	✓	✓	✓		✓		
Costata				✓				
Morfológicas								
Incerata	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Entre-nós longos			✓					
Entre-nós curtos	✓	✓						
Flores anormais		✓						
Plantas anãs		✓		✓				
Hábito determinado		✓						
Resistência a doenças								
Oídio		✓						

IV.1.2. Influência da fase do ciclo celular no efeito mutagênico

O ciclo celular compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até à sua própria divisão em duas células filhas. A fase de divisão denominada por mitose ou fase M é separada da divisão seguinte pela interfase. A observação de que a duplicação dos

cromossomas ocorre durante um período específico da interfase originou a sua divisão em três etapas. O período de síntese do DNA foi denominado por fase S, o período que o antecede por fase G1 e o período entre a fase S e a mitose seguinte por fase G2 (Howard e Pelc, 1953).

Neste conjunto de ensaios, pretendeu-se avaliar o efeito mutagénico do composto etilnitrosourea ao longo das diferentes fases do ciclo celular. Os tratamentos mutagénicos foram realizados após a sincronização das células dos meristemas apicais caulinares das plântulas da variedade Frilene com hidróxido de ureia de acordo com o protocolo descrito por Leitão *et al.* (1986). Realizaram-se 4 tratamentos nos períodos correspondentes às quatro fases do ciclo celular, ou seja, 2 horas (Fase S), 7 horas (Fase G2), 8 horas e 30 minutos (Fase M) e 13 horas (Fase G1), após a conclusão do processo de inibição da síntese de DNA. As plúmulas foram expostas à solução mutagénica de etilnitrosourea durante 1 hora. Trabalhos prévios realizados com esta variedade (Leitão *et al.*, 1998), indicavam que períodos de exposição das plântulas à solução de ENU, durante 1 hora, originavam taxas suficientemente elevadas de mutações na geração M₂, tendo-se optado por efectuar tratamentos com este período de duração.

Tal como no estudo anterior, a taxa de sobrevivência das plantas na geração M₁ foi sempre muito elevada, independentemente da fase do ciclo celular em que decorreu o tratamento mutagénico (Quadro 17). A esterilidade também apresentou valores muito baixos (0-2,9%) e, contrariamente ao que foi observado por Leitão *et al.* (1987b), não se detectou uma fase que apresentasse valores mais elevados relativamente às restantes. Estes autores tinham verificado que a percentagem de esterilidade era mais elevada quando as células da zona axial do meristema apical caulinar eram tratadas com o composto ENU durante a fase S

em comparação com as restantes fases. Neste estudo apenas foram encontradas plantas estéreis no tratamento realizado durante a fase G2.

Quadro 17 - Influência das diferentes fases do ciclo celular sobre a acção mutagénica do composto etilnitrosoureia (5 mM), na geração M₁, utilizando plântulas da variedade Frilene

Variedade	Tratamento	Taxa de sobrevivência (%)	Esterilidade (%)	Altura da plantas (cm)	Nº de vagens por planta	Nº de sementes por planta	Comprimento das vagens (cm)
Frilene	Controlo	100	0,0	37,0 a	25,3 a	109,6 a	5,8 a
	Hidróxido de ureia	100	0,0	36,2 a	25,2 a	107,6 a	5,9 a
	Fase S	100	0,0	35,1 a	17,7 b	69,1 b	5,9 a
	Fase G2	100	2,9	30,6 b	15,9 b	54,5 bc	5,8 a
	Fase M	94	0,0	35,0 a	18,4 b	66,1 b	5,8 a
	Fase G1	100	0,0	30,0 b	11,9 c	47,7 c	5,9 a

a, b, c – agrupamentos obtidos através do teste de Duncan ($\alpha=0,05$)

Os tratamentos mutagénicos provocaram sempre uma redução do número de vagens e de sementes obtido por cada planta relativamente ao tratamento controlo. Os valores mais baixos foram observados no tratamento realizado durante a fase G1. De acordo com os resultados obtidos, não se observou uma redução contínua do número de vagens e do número de sementes à medida que avançou o ciclo celular. Verificou-se uma diminuição do número de vagens e do número de sementes da fase S para a fase G2, um aumento da fase G2 para a fase M, e novamente uma diminuição da fase M para a fase G1.

O hidróxido de ureia, composto utilizado para sincronizar as células, não afectou os parâmetros analisados na geração M₁. Os valores encontrados nas plantas que apenas foram sujeitas a sincronização não diferiram estatisticamente dos valores apresentados pelas plantas pertencentes ao controlo.

Na geração M₂, o número de famílias com mutações variou em função da fase do ciclo celular em que se realizou o tratamento mutagénico. A percentagem mais elevada de famílias

com mutações e com mutações múltiplas foi observada na fase G2, seguida pela fase M (Quadro 18). Os valores mais baixos foram obtidos nos tratamentos efectuados durante a fase G1. Nesta fase, obteve-se aproximadamente apenas metade da percentagem de famílias com mutações em relação às que foram observadas na fase G2 e na fase M.

O hidróxido de ureia também demonstrou possuir efeito mutagénico sobre as plantas, embora este seja de reduzida intensidade relativamente ao etilnitrosoureia.

Quadro 18 - Influência das diferentes fases do ciclo celular sobre a acção mutagénica do etilnitrosoureia, utilizando plântulas da variedade Frilene, na geração M₂

Variedade	Tratamento	Nº de famílias analisadas	% de famílias com mutações	% de famílias com mutações múltiplas
Frilene	Hidróxido de ureia	70	6,0	0,0
	Fase S	75	39,8	6,8
	Fase G2	79	57,9	15,0
	Fase M	80	53,2	11,4
	Fase G1	85	27,1	0,1

O composto ENU originou em todas as fases do ciclo celular o aparecimento de plantas com alterações clorofílicas ou com alterações morfológicas (Quadro 19). O espectro mutagénico mais alargado foi observado no tratamento realizado durante a fase G2.

Os resultados observados neste estudo indicam que a intensidade do efeito mutagénico do composto etilnitrosoureia depende não só da duração dos tratamentos mutagénicos, como foi verificado anteriormente, mas também da fase do ciclo celular em que se encontram as células meristemáticas no momento do tratamento mutagénico. Por outro lado, os dados obtidos parecem sugerir que a fase G2 constitui a fase do ciclo celular mais sensível aos tratamentos mutagénicos com ENU. Com efeito, foi nesta fase que se obteve o maior número

de famílias com mutações, o maior número de famílias com mutações múltiplas e o espectro mutagénico com o maior número de tipos diferentes de mutações.

Quadro 19 – Espectro mutagénico observado nas famílias M_2 provenientes dos tratamentos realizados ao longo do ciclo celular na variedade Frilene, utilizando etilnitrosourea

Fase do ciclo celular / Tipo de mutação	Hidróxido de ureia	Fase S	Fase G2	Fase M	Fase G1
Clorofílicas					
Clorina	✓	✓	✓	✓	✓
Clorótica		✓	✓	✓	✓
Xanta		✓		✓	✓
Albina		✓	✓		✓
Morfológicas					
Incerata		✓	✓	✓	
Entre-nós longos			✓	✓	✓
Entre-nós curtos		✓	✓	✓	✓
Folhas acácias					✓
Plantas anãs	✓				
Flores anormais			✓		
Resistência a doenças					
Oídio			✓		

IV.1.3. Selecção de plantas mutantes

IV.1.3.1. Plantas mutantes com características morfológicas interessantes para o Melhoramento

O êxito de um programa de melhoramento de plantas está fortemente dependente da variabilidade genética que se encontra disponível nas primeiras etapas do processo de selecção. Neste sentido, os trabalhos de mutagénese experimental tiveram como objectivo inicial originar maior variabilidade genética nos materiais de ervilha que estão a ser utilizados

no programa de melhoramento desta espécie, na Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP). Nesta leguminosa para grão, os principais objectivos do trabalho de melhoramento consistem na obtenção de variedades semi-precoces com elevado potencial produtivo. As plantas devem apresentar porte erecto a semi-erecto, 60 a 70 cm de altura e resistência à acama.

Como resultado dos tratamentos mutagénicos realizados nas plântulas das variedades Frilene e Solara, foi possível seleccionar várias plantas nas descendências M_2 que apresentavam pelo menos uma das seguintes características, consideradas importantes para o desenvolvimento de novas variedades de ervilha (Tavares-de-Sousa, 1999): entre-nós curtos, caules espessos, porte erecto, estatura reduzida, número elevado de nós reprodutivos e número elevado de vagens.

A nível agronómico, a acama é uma problema grave que dificulta a realização da colheita mecânica das plantas e provoca quebras significativas de produção de semente. Daí a importância em seleccionar plantas que se mantenham erectas até ao final do ciclo vegetativo, evitando a ocorrência de perdas de semente durante a colheita. As plantas com entre-nós mais curtos (Figura 2) ou caules mais espessos têm menor tendência para acamar. Por isso, plantas com estas características foram seleccionadas na geração M_2 e as suas descendências foram avaliadas nas gerações seguintes quanto à resistência à acama.

As plantas que na geração M_2 mostraram ter um número elevado de vagens (Figura 3), foram observadas nos anos seguintes e aquelas que mantiveram estas características e simultaneamente exibiram porte erecto, passaram para a fase seguinte do programa de melhoramento, que consiste na realização de ensaios preliminares de produção.

Presentemente, estes mutantes estão em avaliação nos ensaios experimentais que se encontram a decorrer na ENMP.



Figura 2 - Planta mutante com entre-nós curtos induzida por tratamento com MNU (1 mM) na variedade Solara



Figura 3 - Planta mutante com número elevado de vagens e com porte erecto induzida por tratamento com ENU (5 mM) na variedade Frilene

As plantas anãs (Figura 4) são progenitores interessantes para os esquemas de cruzamentos artificiais que têm como principal objectivo a redução da altura total apresentada pelas plantas que, embora com boa capacidade produtiva, têm tendência para acamar devido a possuírem entre-nós longos.

Também foi seleccionada uma planta mutante na geração M_2 proveniente do tratamento de plântulas da variedade Solara com o composto MNU (1mM) que apresenta como atributo interessante ser de hábito determinado (Figura 5). A incorporação desta característica nos genótipos em fase avançada de selecção irá permitir que o processo de maturação das vagens decorra de forma sincronizada.



Figura 4 - Planta anã induzida por tratamento de plântulas de Frilene com MNU (1 mM)



Figura 5 - Planta de crescimento determinado seleccionada após tratamento de plântulas de Solara com MNU (1 mM)

IV.1.3.2. Plantas mutantes resistentes ao oídio

Uma das linhas de trabalho do programa de melhoramento de ervilha (*Pisum sativum* L.) a decorrer na Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP) envolve também a selecção de genótipos tolerantes às principais doenças que atacam esta espécie, nas condições edafo-climáticas em que a cultura vai ser instalada. Entre estas, destacamos o oídio, causado pelo fungo *Erysiphe pisi* Syd., responsável por perdas elevadas de produção, em particular nos casos em que se utilizam variedades de ciclo vegetativo longo ou se instala a cultura em épocas de sementeira mais tardias. A infecção pode ocorrer em qualquer fase do ciclo vegetativo das plantas, porém quanto mais cedo se verificar o início da doença, maior será o efeito negativo sobre a produção e a qualidade das sementes. O oídio é um parasita obrigatório que se desenvolve na parte aérea das plantas, podendo os sintomas ser observados nos caules, folhas e vagens (Smith *et al.*, 1996). As zonas afectadas apresentam uma fina camada branca

constituída por micélio e esporos (Kaiser *et al.*, 2000). O desenvolvimento da doença é favorecido por dias quentes seguidos de noites frias que permitem a formação de orvalho. Estas condições climáticas podem ocorrer com frequência durante a Primavera. O controlo do oídio pode ser realizado através da aplicação de fungicidas (Warkentin *et al.*, 1996). No entanto, por razões económicas e ambientais, a utilização de variedades resistentes é a melhor estratégia para controlar esta doença (Porta-Puglia e Aragona, 1997).

Um severo ataque de oídio que ocorreu durante o ciclo vegetativo e reprodutivo das plantas pertencentes às gerações M₂ instaladas no campo experimental da Universidade do Algarve, permitiu que fossem detectadas e seleccionadas duas plantas mutantes resistentes a este fungo. Uma das plantas foi seleccionada na descendência da variedade Solara tratada com etilnitrosoureia durante 2 horas, tendo sido designada por Solara mutante (Figura 6). A outra planta, denominada por Frilene mutante (Figura 7), foi obtida após plântulas da variedade Frilene terem sido tratadas com etilnitrosoureia durante a fase G2 do ciclo celular.

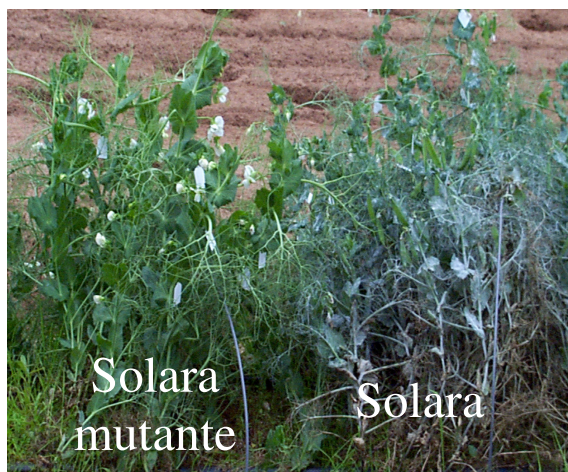


Figura 6 - Plantas de Solara e de Solara mutante



Figura 7 – Plantas de Frilene e de Frilene mutante

A Frilene mutante é uma planta morfológicamente semelhante à variedade original Frilene. Tal como a Frilene, apresenta folha do tipo normal, 2 a 3 ramos basais, sementes de cor amarela e boa capacidade produtiva. A duração do ciclo vegetativo é semelhante em ambos os materiais (Quadro 20).

Quadro 20 - Características das variedades e dos mutantes resistentes ao oídio

Variedade ou Linha mutante	Cor da semente	Altura total (cm)	Nº de dias até à maturação	Comprimento da vagem (cm)	Nº de sementes por vagem	Peso de 100 sementes (g)	Reacção ao oídio
Frilene	Amarela	57,8	167	5,7	5,3	20,0	Susceptível
Frilene mutante	Amarela	62,2	170	6,3	5,0	21,3	Resistente
Solara	Verde	50,0	162	6,8	6,0	31,3	Susceptível
Solara mutante	Verde	53,8	180	5,9	3,3	23,1	Resistente

A Solara mutante além de diferir da variedade Solara em relação à reacção ao oídio, também apresenta diferenças ao nível da morfologia, duração do ciclo vegetativo e capacidade reprodutiva. É uma planta que apresenta um maior número de ramos basais (4 a 5) e que necessita de um maior número de dias para iniciar a floração e atingir a maturação. Além disso, é uma planta que produz um número reduzido de sementes de calibre mais pequeno relativamente às sementes da variedade original. Este mutante é interessante para o programa de melhoramento da ervilha apenas como fonte de resistência ao oídio.

Nos anos seguintes, das duas plantas mutantes foram obtidas linhas uniformes e homogéneas. Estas linhas constituíram o material de partida para os estudos realizados nas etapas seguintes do presente trabalho.

IV.2. Estudo da natureza genética da resistência ao oídio

IV.2.1. Reação dos progenitores ao oídio

Ao longo do ciclo vegetativo, as plantas das variedades comerciais Solara e Frilene exibiram um ataque muito severo de oídio quer nas folhas quer nas vagens. O oídio provocou o abortamento das vagens jovens e a interrupção do processo de desenvolvimento das sementes. Como consequência, a maioria das plantas produziu um número reduzido de sementes e estas apresentaram um calibre pequeno.

As plantas das linhas Solara mutante e Frilene mutante mostraram um comportamento completamente distinto em relação ao material original. Até ao início da fase de maturação, as plantas não apresentaram sintomas de ataque de oídio. Nestas plantas, só foi observado o aparecimento do micélio branco típico deste fungo, nas folhas basais que já estavam a entrar em senescência, no final do ciclo vegetativo. As plantas da linha resistente E835, entretanto solicitada ao INRA (França) para ser utilizada como controlo, apresentaram um comportamento semelhante ao verificado nas linhas mutantes resistentes.

IV.2.2. Natureza genética das resistências induzidas

Para estudar a natureza genética das mutações resistentes, realizaram-se cruzamentos artificiais entre os materiais susceptíveis (Solara e Frilene) e os materiais resistentes (Solara mutante e Frilene mutante).

A reacção ao oídio das descendências F_1 e F_2 provenientes destes cruzamentos pode ser analisada no Quadro 21 e no Quadro 22. Verificou-se que todas as plantas F_1 mostraram

ser susceptíveis ao oídio, indicando este resultado que a susceptibilidade é dominante em relação à resistência. As plantas F₁ originaram plantas F₂ que segregaram apenas em dois grupos distintos, constituídos por plantas susceptíveis ou por plantas resistentes, não se tendo observado casos intermédios que indiciem a presença de um sistema poligénico como foi observado por Hammerlund (1925) e Gupta *et al.* (1995).

Quadro 21 – Reacção das plantas F₁ e F₂ ao fungo *E. pisi* nos diferentes cruzamentos realizados

Tipo de cruzamento	Progenitores	Reacção ao oídio	
		Plantas F ₁	Plantas F ₂
Susceptível x Resistente	Frilene x Frilene mutante Solara x Frilene mutante Frilene x Solara mutante Solara x Solara mutante	Susceptíveis	Susceptíveis e Resistentes

Quando se compara o número de plantas susceptíveis e o número de plantas resistentes obtida nas descendências F₂, verifica-se que o padrão de segregação obtido não é idêntico em todos os cruzamentos efectuados (Quadro 22). A proporção observada varia em função do progenitor resistente utilizado.

Quadro 22 – Reacção das plantas F₂ ao fungo *E. pisi* nos diferentes cruzamentos realizados

Cruzamento	Nº total de plantas	Nº de plantas susceptíveis	Nº de plantas resistentes	Proporção observada	Proporção esperada	χ^2	p
F x FM	246	187	59	3:1	3:1	0,086	0,90-0,95
S x FM	569	438	131	3:1	3:1	1,080	0,25-0,50
S x SM	66	55	11	5:1	3:1	2,020	0,10-0,25
F x SM	80	67	13	5:1	3:1	3,520	0,05-0,10

S-Solara; F-Frilene; FM- Frilene mutante; SM-Solara mutante

Nas descendências F_2 do cruzamento Frilene x Solara mutante e Solara x Solara mutante verificou-se que o padrão de segregação apresenta um desvio significativo relativamente à proporção esperada 3:1, mas esta hipótese não pode ser rejeitada. O reduzido tamanho das populações analisadas, devido ao baixo índice de fertilidade apresentado pela linha Solara mutante, pode ser a explicação para esta discrepância.

Nas descendências F_2 derivadas dos cruzamentos Frilene x Frilene mutante e Solara x Frilene mutante constatou-se que a relação entre o número de plantas susceptíveis e de plantas resistentes está de acordo com o padrão de segregação correspondente a 3:1 (susceptíveis/resistentes). Este padrão de segregação indica que a resistência apresentada pela linha Frilene mutante é regulada por um gene recessivo, tal como já tinha sido verificado anteriormente, em outros materiais resistentes (Harland, 1948; Heringa *et al.*, 1969; Dirlewanger *et al.*, 1994; Tiwari *et al.*, 1997a; Vaid e Tyagi, 1997; Liu *et al.*, 2003; Sharma, 2003).

Em relação ao tipo de folha, o padrão de segregação apresentado pelas plantas F_2 provenientes do cruzamento entre Solara e Frilene mutante confirma que esta característica é controlada por um gene, sendo o tipo folha normal dominante relativamente à folha do tipo semi-áfila. Observou-se que todas as plantas F_1 apresentavam folhas do tipo normal e a descendência F_2 era constituída por plantas que segregavam na proporção 3:1 (folha normal/folha semi-áfila), tal como era esperado (Quadro 23).

Quando as plantas susceptíveis e as plantas resistentes foram classificadas em função do tipo de folha (Quadro 24), verificou-se que tanto os materiais resistentes como os materiais susceptíveis segregaram na proporção 3:1 no que se refere à segregação da forma da folha

(folha normal/folha semi-áfila). Estes resultados confirmam a independência da resposta das plantas ao oídio em relação ao tipo de folha, tal como já tinha sido constatado por Kumar e Singh (1981).

Quadro 23 - Segregação do tipo de folha observada nas descendências F₂ provenientes do cruzamento Solara (folha semi-áfila) x Frilene mutante (folha normal)

Cruzamento	Nº total de plantas	Nº de plantas com folha normal	Nº de plantas com folha semi-áfila	Proporção observada	Proporção esperada	χ^2	p
S x FM	314	237	77	3:1	3:1	0,016	0,90

S-Solara; FM- Frilene mutante

Quadro 24 - Segregação observada em relação ao tipo de folha e à reacção ao oídio na descendência F₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante

Reacção ao oídio \ Tipo de folha	Nº de plantas com folha normal	Nº de plantas com folha semi-áfila	Proporção observada	Proporção esperada	χ^2	p
Nº de plantas susceptíveis	170	52	3:1	3:1	0,22	0,5-0,75
Nº de plantas resistentes	56	18	3:1	3:1	0,00	0,99

IV.2.3. Relações alélicas entre os genes de resistência

Para estudar as relações alélicas dos genes de resistência presentes nas linhas Solara mutante, Frilene mutante e E835 efectuaram-se cruzamentos artificiais entre estes materiais.

Verificou-se que todas as descendências F₁ provenientes do cruzamento Solara mutante e Frilene mutante mostraram ser resistentes ao oídio e que estas originaram descendências F₂ também resistentes (Quadro 25). Obtiveram-se resultados idênticos nas descendências F₁ e F₂ dos cruzamentos realizados entre cada uma das linhas mutantes e a linha

controle resistente E835 (INRA, França). Como não se verificou um efeito de complementaridade entre os genes de resistência em estudo, pode-se concluir que se está na presença de um só *locus* que confere resistência às duas linhas mutantes e que este *locus* é o mesmo que confere resistência à linha E835.

Quadro 25 – Reacção das plantas F₁ e F₂ ao fungo *E. pisi* nos diferentes cruzamentos realizados

Tipo de cruzamento	Progenitores	Reacção ao oídio	
		Plantas F ₁	Plantas F ₂
Resistente x Resistente	Solara mutante x Frilene mutante Solara mutante x E835 Frilene mutante x E835	Resistentes	Resistentes

Como a linha E835 teve a sua origem na variedade Mexique 4 e esta última contém o gene *er₁* (Tiwari *et al.*, 1997a; Vaid e Tyagi, 1997), pode-se deduzir que a resistência que as linhas mutantes apresentam se deve a mutações recessivas no mesmo *locus er₁*. De facto, segundo vários autores (Heringa *et al.*, 1969; Tiwari *et al.*, 1997a) o grau elevado de resistência ao oídio apresentado pelas plantas é devido ao gene *er₁*, tal como foi observado nas linhas mutantes e nas suas descendências.

É de salientar, por outro lado, que os resultados obtidos parecem indicar que na ervilha existem poucas fontes de variabilidade para a resistência ao oídio, confirmando os resultados de Sakr e Muehlbauer (1996) e de Liu *et al.* (2003). Estes autores após analisarem vários genótipos resistentes provenientes de diversas origens, chegaram à conclusão que a resistência era sempre controlada pelo mesmo gene recessivo. Também, os resultados obtidos neste

estudo, indicam que as duas mutações induzidas terão afectado o funcionamento do mesmo gene que confere a resistência natural aos materiais de ervilha.

Segundo Fraser (1992), a resistência a doenças controlada por genes recessivos pode ser explicada através da ausência de algum receptor na planta que é essencial para iniciar a infecção, conferindo as resistências recessivas imunidade completa à planta. Esta parece ser a situação que se verifica nos dois mutantes de ervilha. De facto, as plantas resistentes ao oídio das linhas Frilene mutante e Solara mutante mostraram possuir um grau muito elevado de resistência ao ataque do fungo *E. pisi*. Provavelmente, as plantas tornaram-se resistentes porque algum factor requerido para a infecção foi eliminado ou a sua função alterada, impedindo o processo de reconhecimento do hospedeiro pelo fungo.

IV.3. Identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao oídio

Neste estudo pretendeu-se identificar marcadores moleculares ligados ao *locus* de resistência ao oídio presente nas duas linhas mutantes. Numa primeira etapa, a identificação de marcadores foi realizada através da comparação das variedades originais e as respectivas linhas mutantes, consideradas como linhas quase isogénicas (NILs – “Near Isogenic Lines”). Após a obtenção da população segregante F_2 , proveniente do cruzamento realizado entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante, passou-se a utilizar a metodologia BSA (“bulked segregant analysis”), descrita por Michelmore *et al.* (1991), para identificar marcadores moleculares ligados ao *locus* da resistência ao oídio.

IV.3.1. Linhas quase isogénicas

A análise comparativa de linhas quase isogénicas é uma estratégia eficaz para identificar marcadores ligados a um determinado gene, uma vez que os polimorfismos encontrados apresentam uma probabilidade elevada de estarem ligados ao gene em estudo (Muehlbauer *et al.*, 1988 e Young *et al.*, 1988).

A variedade Solara e a linha Solara mutante assim como a variedade Frilene e a linha Frilene mutante foram comparadas entre si através de marcadores RAPD, ISSR e AFLP.

Na ervilha, a técnica de RAPD tem sido utilizada com sucesso em estudos sobre as relações filogenéticas dos materiais pertencentes ao género *Pisum* (Hoey *et al.*, 1996), em análises de diversidade genética (Baranger *et al.*, 2004), em trabalhos relativos à caracterização de variedades comerciais (Samec *et al.*, 1998) e em estudos de mapeamento de genes relacionados com características morfológicas de interesse agronómico (Rameau *et al.*, 1998; Cheghamirza *et al.*, 2002; Weeden *et al.*, 2002; Tar'an *et al.*, 2003) e de genes de resistência a doenças (Hunter *et al.*, 2001; Okubara *et al.*, 2002; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002; Vijayalakshmi *et al.*, 2005), área onde se insere o presente trabalho.

No total foram testados 500 “primers” RAPD nas quatro amostras de DNA. Destes “primers”, 79 não originaram produtos de amplificação ou originaram amplificações fracas. Os restantes 421 “primers” produziram 2805 fragmentos na variedade Solara e 2848 fragmentos na variedade Frilene. O número de fragmentos obtidos por “primer” variou entre 2 e 11, sendo a média de bandas amplificada por “primer” de 6,7 na Solara e de 6,8 na Frilene. O tamanho dos produtos de amplificação variou entre 250 e 3000 pares de bases.

Ainda que o número de fragmentos obtido através desta técnica tenha sido elevado, esta não gerou marcadores polimórficos entre a variedade Solara e a respectiva linha mutante, tal como era pretendido. De facto, observou-se que todos os fragmentos amplificados na amostra de DNA de Solara também estavam presentes na amostra de DNA da Solara mutante.

Em relação à variedade Frilene e à linha Frilene mutante, a comparação dos perfis de amplificação obtidos nestes dois materiais permitiu a identificação de um fragmento polimórfico, com tamanho aproximado de 950 pares de bases. Este marcador foi obtido com o “primer” OPL 13 (5'-ACCGCCTGCT-3') e está presente na amostra de DNA da variedade Frilene e ausente na amostra de DNA da linha Frilene mutante (Figura 8).

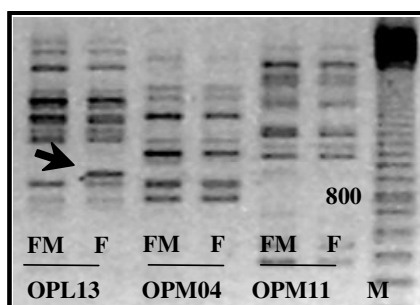


Figura 8 – Padrões de amplificação da variedade comercial Frilene (F) e respectivo mutante (FM) obtidos com os “primers” RAPD OPL 13, OPM 04 e OPM 11. A seta indica o marcador polimórfico presente na variedade Frilene e ausente na linha mutante

Este fragmento foi isolado, clonado e sequenciado. Após sequenciação, verificou-se que este marcador é constituído por 993 pares de bases (Figura 9) e foi denominado por L13_993. As primeiras e as últimas 10 bases do fragmento correspondem à sequência do “primer” OPL13.

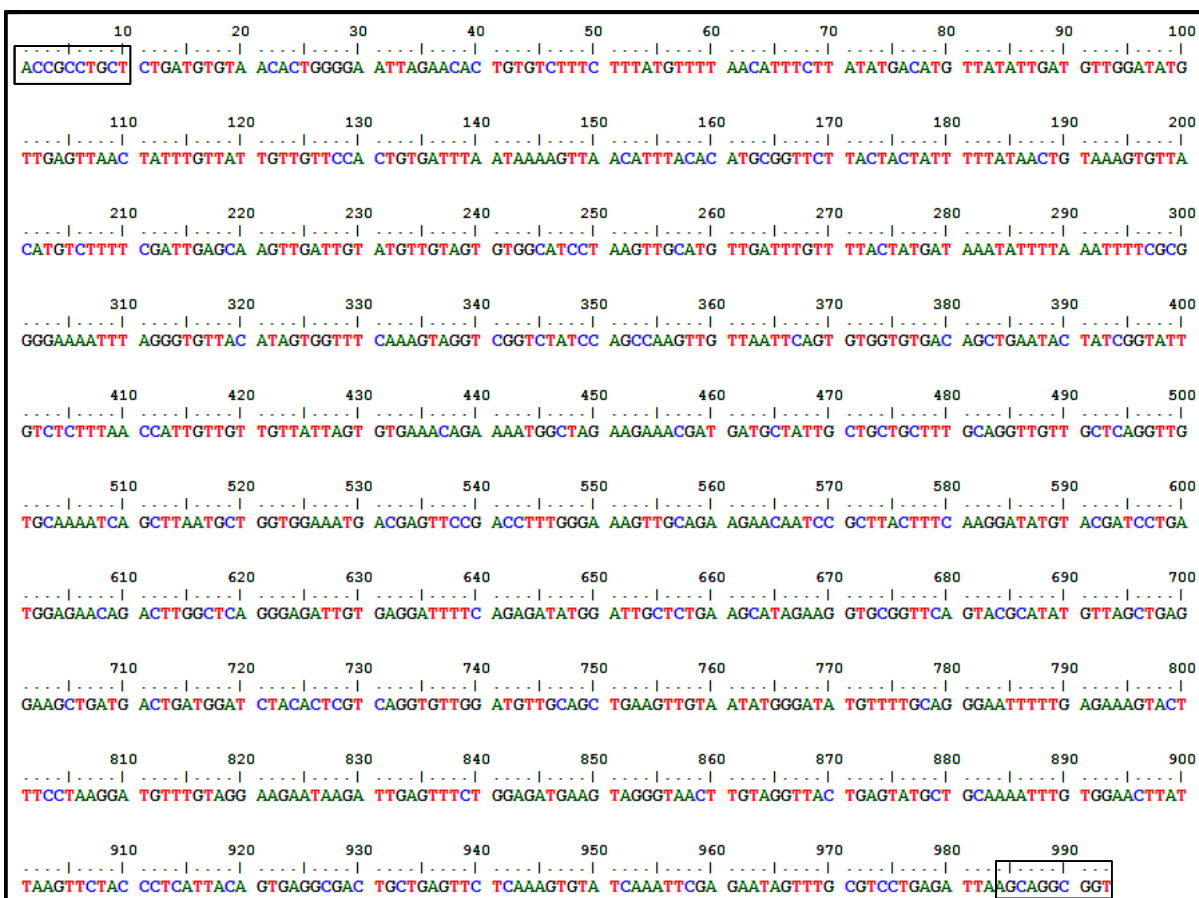


Figura 9 – Sequência de nucleótidos do fragmento OPL13_993 amplificado na variedade Frilene

Com base na análise dos dados de sequenciação foi desenhado e sintetizado um par de “primers” específico para amplificar o fragmento L13_993. Estes “primers” são constituídos por parte da sequência original do “primer” RAPD e mais 8 nucleótidos adicionais (Quadro 26). O par de “primers” SCAR desenhado foi testado nas amostras de DNA genômico da variedade susceptível Frilene e da linha resistente Frilene mutante. Contrariamente ao pretendido, este par de “primers” não originou um fragmento polimórfico entre a variedade

susceptível e a linha resistente. Este marcador SCAR revelou ser também monomórfico nas amostras de DNA da variedade Solara e Solara mutante (Figura 10).

Quadro 26 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR específico para o fragmento L13_993

SCAR L13_993	Sequência (5'-3')	Nº de bases
“Forward”	ACC GCC TGC TCT GAT GTG	18
“Reverse”	CGC CTG CTT AAT CTC AGG	18

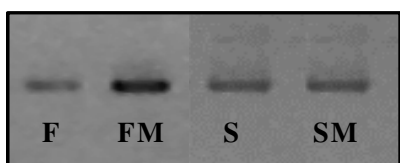


Figura 10 – Padrões de amplificação do SCAR L13_993 nas variedades comerciais e respectivos mutantes (F-Frilene, FM-Frilene mutante, S-Solara, SM-Solara mutante)

Os fragmentos amplificados na variedade Frilene e na linha Frilene mutante foram novamente isolados a partir de um gel de agarose, clonados e sequenciados. Após a obtenção das sequências, estas foram alinhadas e verificou-se que os dois fragmentos apresentavam sequências de nucleótidos idênticas. Como não se detectaram diferenças, não foi possível construir um novo par de “primers” específico que permitisse diferenciar estes dois tipos de material. Em trabalhos futuros será interessante testar o primer OPL13 numa descendência F₂ proveniente do cruzamento entre a variedade Frilene e a linha Frilene mutante.

As amostras de DNA genômico da variedade Solara e da linha Solara mutante e as amostras de DNA genômico da variedade Frilene e da linha Frilene mutante também foram comparadas entre si, utilizando 32 “primers” ISSR. Todos os “primers” analisados originaram

produtos de amplificação, tendo sido observado um total de 297 bandas nas amostras de DNA de Solara/Solara mutante e um total de 288 bandas nas amostras de DNA de Frilene/Frilene mutante. O número de bandas obtido variou entre 3 e 13, em função do “primer” utilizado. Em média cada “primer” originou 9,3 fragmentos nos materiais Solara/Solara mutante e 9,0 fragmentos nos materiais Frilene/Frilene mutante. Os “primers” ISSR 01, ISSR 06, ISSR 15, ISSR 16, ISSR 17 e ISSR 23 foram aqueles que originaram um maior número de fragmentos amplificados (Quadro 27).

Quadro 27 – Número de fragmentos obtidos após a amplificação das amostras de DNA de Solara/Solara mutante (S/SM) e das amostras de DNA de Frilene/Frilene mutante (F/FM), utilizando diferentes “primers” ISSR

“Primer”	Nº de fragmentos amplificados		“Primer”	Nº de fragmentos amplificados		“Primer”	Nº de fragmentos amplificados	
	S/SM	F/FM		S/SM	F/FM		S/SM	F/FM
ISSR 01	12	11	ISSR 12	8	7	ISSR 23	12	12
ISSR 02	10	10	ISSR 13	7	6	ISSR 24	8	8
ISSR 03	10	11	ISSR 14	10	9	ISSR 25	10	9
ISSR 04	9	8	ISSR 15	12	11	ISSR 26	9	9
ISSR 05	9	7	ISSR 16	13	12	ISSR 27	11	11
ISSR 06	12	12	ISSR 17	12	12	ISSR 28	8	8
ISSR 07	9	9	ISSR 18	3	3	ISSR 29	7	7
ISSR 08	11	11	ISSR 19	11	10	ISSR 30	6	6
ISSR 09	9	9	ISSR 20	11	11	ISSR 31	7	7
ISSR 10	11	11	ISSR 21	8	8	ISSR 32	6	6
ISSR 11	6	8	ISSR 22	10	9			

Esta técnica permitiu a obtenção de um número superior de bandas por cada reacção de amplificação efectuada relativamente à técnica RAPD, tal como já tinha sido verificado em diversos trabalhos referentes à análise de materiais vegetais através da utilização destas duas técnicas (Iruela *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2002 ; Reddy *et al.*, 2002).

Neste trabalho, não se verificou qualquer relação entre a constituição da sequência repetitiva do “primer” e a quantidade ou qualidade dos fragmentos obtidos, contrariamente ao observado em vários estudos (Reddy *et al.*, 2002; Rubeena *et al.*, 2003). Alguns autores referem que a sequência repetitiva (AT)_n é a mais frequente no genoma das plantas (Wang *et al.*, 1994). No entanto, os “primers” construídos com base nestes nucleótidos tendem a ligar-se entre si, não dando origem a amplificações. Os “primers” constituídos por sequências (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) e (CA) também originam níveis elevados de polimorfismos em várias espécies (Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 2002). Neste estudo, a média de fragmentos amplificados foi semelhante em qualquer tipos de sequências utilizadas.

A análise dos perfis de amplificação obtidos com os “primers” ISSR, tendo em vista a detecção de marcadores ligados ao *locus* de resistência ao oídio não revelou fragmentos polimórficos entre as variedades comerciais e as respectivas linhas mutantes. Com efeito, os fragmentos amplificados na amostra de DNA da Solara estão também presentes na amostra de DNA da Solara mutante assim como os fragmentos amplificados nas amostras de DNA da variedade Frilene estão presentes na amostras de DNA da linha Frilene mutante. Assim, esta técnica não revelou ser mais eficaz na detecção das alterações ocorridas no genoma devido à acção do agente mutagénico químico etilnitrosourea relativamente à técnica RAPD. Apesar dos resultados obtidos neste estudo não terem permitido a identificação de marcadores polimórficos entre as variedades originais e os respectivas linhas mutantes, a utilização desta técnica na espécie *Pisum sativum* tem originado bons resultados em diversas áreas tais como sejam em trabalhos sobre diversidade genética (Baranger *et al.*, 2004) ou na construção de mapas de ligamento (Irzykowska *et al.*, 2002; Pilet-Nayel, 2002).

Nas análises por AFLPs, as amostras de DNA da Solara, Solara mutante, Frilene e Frilene mutante foram amplificadas em duplicado. As combinações de “primers” EcoRI e MseI originaram 3375 fragmentos nas amostras de DNA da Solara/Solara mutante e 3229 fragmentos nas amostras de DNA da variedade Frilene/Frilene mutante. A combinação de “primers” que produziu o maior número de bandas por reacção de amplificação foi a E-AAC/M-CAA que permitiu a obtenção de 114 bandas nas amostras de DNA de Solara /Solara mutante e 107 bandas nas amostras de DNA de Frilene/Frilene mutante.

Tal como se verificou na técnica ISSR, os marcadores obtidos revelaram ser monomórficos entre as variedades comerciais e as respectivas linhas mutantes.

No presente trabalho de identificação de marcadores moleculares ligados à resistência ao oídio, confirmou-se a dificuldade em encontrar marcadores polimórficos entre os materiais originais e os respectivos mutantes. De facto, experiências anteriores sugerem que a utilização de agentes químicos nos trabalhos de mutagénese induzida, tal como é o caso do nosso estudo em que os mutantes seleccionados foram obtidos após plântulas recém-germinadas terem sido tratadas com o composto etilnitrosourea, tendem a provocar na maioria das situações apenas pequenas deleções, inferiores a 50 pares de bases ou a substituição de pares de bases (Coté *et al.* 1986; Pastink *et al.*, 1989). Estas alterações são difíceis de detectar através das técnicas utilizadas. Por outro lado, os agentes mutagénicos físicos, tais como raios X e raios γ causam alterações maiores nos materiais tratados (IAEA, 2001) que podem ser mais facilmente detectadas, por exemplo utilizando a técnica de RAPD (Riesselmann e Jacobsen, 1995).

IV.3.2. Bulked Segregant Analysis (BSA)

O método de análise por BSA (“bulked segregant analysis”) facilita a identificação de marcadores moleculares localizados numa determinada região do genoma a partir de uma população segregante (Michelmore *et al.*, 1991). Esta análise baseia-se na constituição de dois grupos (“bulks”) de amostras de DNA de indivíduos F_2 . Os indivíduos que constituem cada grupo diferem entre si em relação a uma determinada característica para a qual se pretende identificar marcadores. Os marcadores polimórficos identificados têm uma forte probabilidade de se encontrarem ligados ao gene que controla a característica de interesse.

Nas análises por BSA foram utilizados 160 “primers” RAPD que ainda não tinham sido testados na análise por NILs. Procedeu-se à comparação dos perfis de amplificação das amostras de DNA de um “bulk” constituído por 15 plantas F_2 resistentes e de um “bulk” constituído por 15 plantas F_2 susceptíveis ao oídio, provenientes do cruzamento realizado entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante. Destes “primers”, 30 não originaram produtos de amplificação ou originaram amplificações fracas. Os restantes 130 “primers” geraram 657 fragmentos, sendo a relação de produtos amplificados por “primer” semelhante ao obtido anteriormente nas análises por NILs.

A análise dos perfis de amplificação correspondentes aos dois progenitores e aos dois “bulks” permitiu seleccionar apenas um fragmento de 580 pares de bases gerado pelo “primer” OPAA 04 (5'-AGGACTGCTC-3') que encontrando-se presente nas amostras de DNA do progenitor susceptível e do “bulk” de DNA de plantas susceptíveis, poderá localizar-se na zona em que se encontra o *locus* de resistência (Figura 11). Por esta razão, o “primer”

OPAA04 foi um dos “primers” RAPD seleccionado para a etapa seguinte deste trabalho, correspondente ao mapeamento do *locus* de resistência.

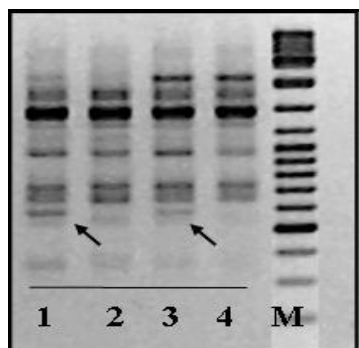


Figura 11 – Padrão de amplificação gerado pelo “primer” RAPD OPAA04, utilizando a variedade Solara (1), a linha Frilene mutante (2), o “bulk” de DNA de plantas susceptíveis (3) e o “bulk” de DNA de plantas resistentes (4). As setas indicam o marcador polimórfico AA04_580 presente na variedade Solara e “bulk” de DNA de plantas susceptíveis

O “bulk” de DNA de plantas F_2 resistentes e o “bulk” de DNA de plantas F_2 susceptíveis também foram comparados entre si pela amplificação com os 32 “primers” ISSR que já tinham sido utilizados previamente na análise por NILs. Os perfis de amplificação obtidos em ambos os “bulks” foram idênticos entre si, confirmando-se os resultados obtidos utilizando a estratégia por NILs em que não foi possível identificar marcadores ligados quer à resistência quer à susceptibilidade ao oídio.

IV.4. Mapeamento do *locus* de resistência ao oídio

O mapeamento do *locus* de resistência ao oídio foi efectuado utilizando uma população F_2 , constituída por 94 indivíduos, proveniente do cruzamento entre a variedade Solara e a linha resistente Frilene mutante. Esta população foi avaliada para a segregação do fenótipo de resistência ao oídio, do tipo de folha e de marcadores RAPD, ISSR e AFLP. Os marcadores

moleculares que ficaram localizados próximo do *locus* de resistência ao oídio foram confirmados e aferidos com maior precisão utilizando 255 indivíduos da mesma população F₂.

IV.4.1. Seleção de marcadores moleculares

A comparação dos perfis de amplificação das amostras de DNA da variedade Solara e da linha Frilene mutante obtidos nas análises moleculares realizadas na etapa anterior deste trabalho, permitiu identificar “primers” RAPD, ISSR e AFLP que geraram marcadores polimórficos entre estes dois genótipos. Com base nesta informação, seleccionaram-se “primers” para a construção de um mapa genético de *Pisum sativum* L. que englobasse o *locus* da resistência ao oídio induzido na variedade Frilene.

Do total de “primers” RAPD testados nas análises por NILs, 44 “primers” geraram marcadores polimórficos entre os dois progenitores (Quadro 28).

Quadro 28 – “Primers” RAPD que originam fragmentos polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante

“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos
OPA20	1	OPK08	1	OPO19	1	OPV12	1
OPB06	1	OPK14	2	OPP02	2	OPV18	1
OPB08	1	OPL07	1	OPP04	2	OPX04	1
OPB11	1	OPM14	1	OPP05	1	OPX06	2
OPC05	1	OPN02	1	OPP08	3	OPX12	1
OPC07	2	OPN16	1	OPP17	1	OPY02	1
OPC09	1	OPO04	2	OPS12	1	OPY04	1
OPC10	1	OPO06	1	OPS13	1	OPY05	1
OPD16	1	OPO07	1	OPT06	1	OPY06	1
OPE16*	1	OPO09	1	OPT07	1	OPY11	1
OPF13	1	OPO16	1	OPV04	2	OPY15	1

*- Os “primers” que se encontram a negrito foram seleccionados para a construção do mapa genético de ervilha

A maioria originou apenas um fragmento polimórfico, indicando este resultado a existência de um grau elevado de similaridade genética entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante. Com efeito, o índice de similaridade entre estes dois materiais calculado através dos dados obtidos com estes marcadores tem o valor de 0,97.

Dos “primers” RAPD que originaram polimorfismos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante, seleccionaram-se os “primers” (Quadro 28 e Quadro 29) que geraram marcadores fortes e bem definidos entre os progenitores e que segregavam na população F_2 , tal como pode ser observado na Figura 12 que representa o padrão de amplificação obtido com o “primer” OPN02. Também se incluiu neste estudo, o “primer” AA04 detectado nas análises por BSA que originou um marcador potencialmente associado com a susceptibilidade ao oídio.

Quadro 29 – “Primers” RAPD utilizados na análise da descendência F_2 Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos amplificados

“Primer”	Dimensão do fragmento polimórfico (pares de bases)	Designação do marcador
OPE16	650	E16_650
OPF13	750	F13_750
OPK08	650	K08_650
OPK14	980 1150	K14_980 K14_1150
OPN02	850	N02_850
OPN16	1050	N16_1050
OPO07	1220	O07_1220
OPP02	1160 1300	P02_1160 P02_1300
OPP08	650 750 1100	P08_650 P08_750 P08_1100
OPT06	480	T06_480
OPT07	1200	T07_1200
OPY11	2500	Y11_2500
AA04*	580	AA04_580

*- Marcador seleccionado nas análises por BSA

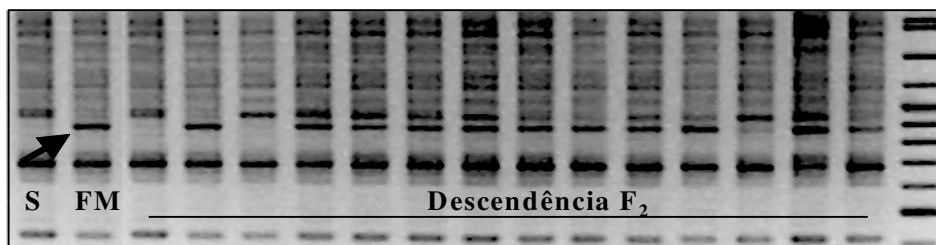


Figura 12 - Amplificação com o “primer” RAPD OPN02. A seta indica o marcador polimórfico OPN02_850 entre os dois progenitores (S-Solara e FM-Frilene mutante) e que segrega na descendência F₂

Dos 32 “primers” ISSR testados, 15 “primers” originaram fragmentos polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante (Quadro 30). Verificou-se, tal como na técnica RAPD, a obtenção de um número reduzido de fragmentos polimórficos por cada “primer” utilizado. O índice de similaridade calculado através dos marcadores ISSR foi de 0,95, confirmando a elevada semelhança genética que estes dois materiais vegetais apresentam entre si.

Quadro 30 – “Primers” ISSR que originam marcadores polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante

“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos	“Primer”	Nº de fragmentos polimórficos
ISSR01	1	ISSR07	2	ISSR14	1	ISSR19	1
ISSR03	1	ISSR11	2	ISSR15	1	ISSR22	1
ISSR04	1	ISSR12	1	ISSR16	1	ISSR25	1
ISSR05	3	ISSR13	1	ISSR17	2		

* - Os “primers” que se encontram a negrito foram seleccionados para a construção do mapa genético de ervilha

Para o mapeamento do *locus er1*, seleccionaram-se os “primers” ISSR que originaram marcadores polimórficos fortes e bem definidos entre os progenitores e que segregavam na população F₂ (Quadro 31).

Em média, os “primers” ISSR amplificaram 1,5 marcadores polimórficos por reacção, variando as dimensões dos fragmentos obtidos entre 450 e 2000 pares de bases. A Figura 13 representa o padrão de amplificação obtido com o primer ISSR 14, nos progenitores Solara e Frilene mutante e em 15 indivíduos F₂.

Quadro 31 – “Primers” ISSR utilizados na análise da descendência F₂ Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos amplificados

“Primer”	Sequência (5' – 3')	Dimensão do marcador (pares de bases)	Designação do marcador
ISSR04	(GA) ₈ YC	490	IS04_490
		1150	IS05_1150
ISSR05	(GA) ₈ YG	1200	IS05_1200
		2000	IS05_2000
ISSR11	(GT) ₈ YG	1000	IS11_1000
		1300	IS11_1300
ISSR12	(AG) ₈ YG	1220	IS12_1220
ISSR13	(AC) ₈ YT	500	IS13_500
ISSR14	(AG) ₈ T	650	IS14_650
ISSR17	(GA) ₈ T	450	IS17_450
		1000	IS17_1000
ISSR19	(GA) ₈	800	IS19_800

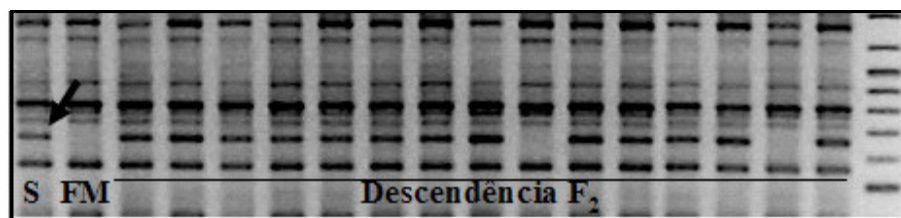


Figura 13 - Amplificação com o “primer” ISSR 14. A seta indica um marcador polimórfico entre os dois progenitores e que segrega na descendência F₂

A maioria das combinações de “primers” AFLP originaram marcadores polimórficos entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante (Quadro 32). O número de fragmentos polimórficos obtidos por cada combinação variou entre 1 e 17. Esta técnica apresentou uma

maior capacidade discriminatória para diferenciar os dois progenitores em estudo relativamente às duas técnicas anteriores, devido ao maior número de marcadores gerados por reacção de amplificação. Com efeito, o índice de similaridade calculado através dos marcadores AFLP foi de 0,94, sendo este valor menor em relação aos obtidos utilizando os dados dos marcadores RAPD e ISSR. A utilização da técnica AFLP permitiu aumentar de forma significativa o número de marcadores polimórficos encontrados por cada reacção de amplificação realizada, sendo por isso considerada como uma ferramenta útil para os trabalhos de mapeamento, tal como é referido em vários estudos (Coyne *et al.*, 2000; Irzykowska *et al.*, 2001).

Quadro 32 – Número de marcadores polimórficos gerados pelas combinações de “primers” AFLP entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante

“Primer”	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	7	5	5	4	-	8	4	-
E-AAG	3	4	8	5	-	5	7	3
E-ACA	5	5	4	1	11	8	-	5
E-ACC	-	-	-	7	2	11	6	-
E-ACG	5	3	1	5	-	5	1	4
E-ACT	5	2	5	5	-	4	4	1
E-AGC	5	6	9	2	3	3	-	7
E-AGG	17	5	6	6	3	5	4	3

*- Os marcadores que se encontram a negrito foram seleccionados para a construção do mapa genético de ervilha

As combinações de “primers” AFLP utilizadas no estudo da população F₂ e os tamanhos dos fragmentos polimórficos obtidos encontram-se indicados no Quadro 33. Seleccionaram-se para análise da população F₂ as combinações que originavam um número elevado de marcadores polimórficos e em simultâneo amplificavam marcadores fortes entre os

dois progenitores (Figura 14). As 14 combinações utilizadas permitiram a identificação de 99 marcadores, com tamanhos compreendidos entre 75 e 750 pares de bases.

Quadro 33 – Combinações de “primers” AFLP utilizadas na análise da descendência F_2 proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante e dimensão dos fragmentos polimórficos analisados

“Primer” E	“Primer” M	Designação dos marcadores	Dimensão do marcador polimórfico (pares de bases)
AAC	CAG	AAC/CAG	235, 380, 450, 480
	CTC	AAC/CTC	188, 215, 220, 230, 260, 350, 400, 420
AAG	CAG	AAG/CAG	150, 180, 210, 280, 410, 500, 740, 750
	CTG	AAG/CTG	125, 158, 160, 195, 225, 255, 380
ACA	CTA	ACA/CTA	95, 113, 128, 155, 223, 225, 238, 256, 330, 560, 580
	CTT	ACA/CTT	380, 520
ACC	CTC	ACC/CTC	75, 138, 158, 170, 232, 260, 340, 350, 400, 550, 630
ACG	CAT	ACG/CAT	130, 330, 350, 400, 500
	CTC	ACG/CTC	115, 143, 152, 200, 210
ACT	CAA	ACT/CAA	138, 180, 330, 480
	CAT	ACT/CAT	250, 360, 380
AGC	CAG	AGC/CAG	145, 148, 182, 195, 205, 212, 218, 580, 750
AGG	CAA	AGG/CAA	122, 125, 145, 200, 202, 210, 248, 252, 270, 300, 340, 350, 370, 380, 420, 440, 450
	CAG	AGG/CAG	180, 205, 265, 380, 480

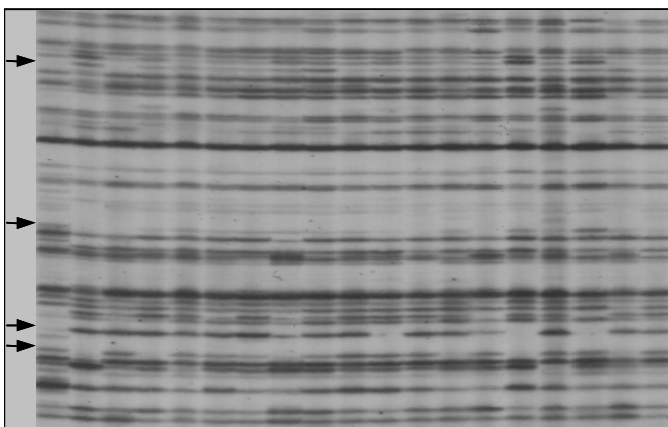


Figura 14 - Amplificações obtidas com a combinação de “primers” E-AAC/M-CTC. As setas indicam alguns marcadores polimórficos observados entre os progenitores Solara e Frilene mutante e que segregam na descendência F_2

No total, os 13 “primers” RAPD, os 8 “primers” ISSR e as 14 combinações de “primers” AFLP originaram 128 marcadores polimórficos (Quadro 34). Os “primers” RAPD contribuíram com 17 marcadores, os “primers” ISSR com 12 marcadores e as combinações de “primers” AFLP com 99 marcadores. Do total dos marcadores obtidos, 70 estão presentes na variedade susceptível Solara e 58 estão presentes na linha resistente Frilene mutante. Na matriz de dados incluiu-se também a informação referente ao tipo de folha apresentado pelas plantas da população segregante (folha normal vs folha semi-áfila).

Quadro 34 - Número de “primers” RAPD, ISSR e AFLP testados na população F₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante e número de marcadores obtidos

Técnica	Nº de “primers” ou combinações	Nº total de marcadores polimórficos	Nº de marcadores presentes na variedade Solara	Nº de marcadores presentes na linha Frilene mutante
RAPD	13	17	13	4
ISSR	8	12	9	3
AFLP	14	99	48	51
Total	35	128	70	58

A partir da informação existente em trabalhos anteriores realizados no âmbito de identificar marcadores moleculares ligados ao *locus* de resistência ao oídio em ervilha pretendeu-se integrar no mapa o marcador SCAR PD10_650 obtido por Timmerman *et al.* (1994) que utilizando uma população F₂ proveniente do cruzamento entre a variedade resistente Almota e a linha sensível 88V1.11, localizaram este marcador a uma distância de 2 cM do *locus er1*. Utilizando o par de “primers” que amplifica o marcador SCAR PD10_650 publicado por estes autores (Quadro 35), procedeu-se à amplificação do DNA genómico da variedade susceptível Solara e da linha resistente Frilene mutante. Este par de “primers”

originou o fragmento de 650 pares de bases previsto. No entanto, observou-se a sua presença em ambos os progenitores (Figura 15), pelo que não foi possível mapeá-lo.

Quadro 35 - Sequência de nucleótidos dos “primers” SCAR específicos para amplificar o fragmento PD10_650

SCAR PD10_650	Sequência (5'-3')	Nº de bases	T de “annealing” (°C)
“Forward”	GGTCTACACCTCATATCTTGATGA	24	65
“Reverse”	GGTCTACACCTAAACAGTGTCCGT	24	

Fonte: Timmerman *et al.* (1994)

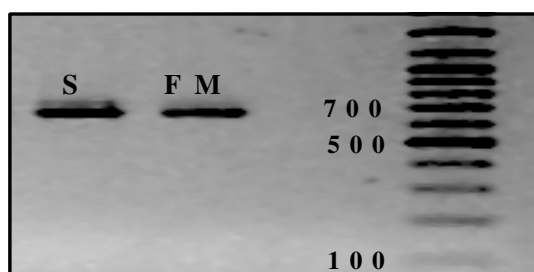


Figura 15 – Amplificação do SCAR PD10_650 (Timmerman *et al.*, 1994) nos progenitores Solara (S) e Frilene mutante (FM)

Tiwari *et al.* (1998) também identificaram dois marcadores RAPD, OPE16_1600 e OPO18_1200, ligados ao gene de resistência ao oídio presente na variedade Highlight. No entanto, estes dois “primers” não amplificaram os marcadores indicados por estes autores nas amostras de DNA de Solara e de Frilene mutante, não tendo sido por isso possível utilizá-los no presente estudo.

Jamila e Sharma (2004) analisaram também materiais de ervilha resistentes e susceptíveis ao fungo *E. pisi* e identificaram dois marcadores RAPD, OPO 02_1400 e OPU 17_1000 localizados, respectivamente, a 4.5 cM e a 10.3 cM do *locus er*. No entanto, estes

“primers” também não amplificaram os dois marcadores indicados não tendo sido possível também a sua inclusão no nosso estudo.

Estes resultados confirmam a dificuldade que existe em integrar dados provenientes de diversos cruzamentos artificiais, como foi também observado por Laucou *et al.* (1998).

IV.4.2. Conversão dos marcadores RAPD e AFLP que flanqueam o locus de resistência em marcadores SCARs

A análise de segregação dos marcadores moleculares revelou que os fragmentos T06_480 e AGG/CAA_125 apresentavam uma forte ligação com o gene de resistência ao oídio (Figura 16). A frequência de recombinação entre estes marcadores e o *locus er1* é baixa, tal como pode ser observada no Quadro 36.

Quadro 36 – Frequência de recombinação entre o *locus er1* e os marcadores T6_480 e AGG/CAA_125

<i>Locus</i>	Frequência de recombinação	LOD
<i>er1</i> – T6_480	0,0488	41,45
<i>er1</i> – AGG/CAA_125	0,0512	16,48
T6_480 – AGG/CAA_125	0,1252	9,85

De modo a ultrapassar os problemas associados aos marcadores RAPD (Paran e Michelmore, 1993) e a simplificar o processo de detecção dos marcadores AFLP em populações com um número elevado de indivíduos, o marcador T06_480 e o marcador

AGG/CAA_125 foram transformados em marcadores do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Para o efeito, os fragmentos de DNA correspondentes a estes dois marcadores foram isolados, clonados e sequenciados.

IV.4.2.1. Conversão do marcador AFLP em marcador SCAR

Procedeu-se ao isolamento, clonagem e sequenciação do marcador AFLP AGG/CAA_125, presente na variedade Solara. Este fragmento foi totalmente sequenciado e verificou-se que é constituído por 102 pares de bases (Figura 16), correspondendo as primeiras 9 bases e as últimas 7 bases a sequências do “primer” EcoRI e do “primer” MseI, respectivamente. A comparação da sequência do fragmento AGG/CAA_125 com outras sequências incluídas em bases de dados internacionais, utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) revelou um grau baixo de homologia em relação às sequências existentes.

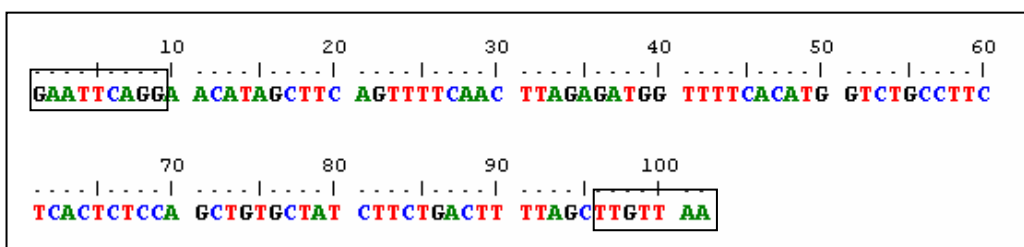


Figura 16 – Sequência do marcador AGG/CAA_125, presente no progenitor susceptível Solara

Com base na sequência do marcador AGG/CAA_125 foi desenhado e sintetizado um par de “primers” para amplificar especificamente o fragmento AGG/CAA_125. Estes “primers” apresentam na sua constituição nucleótidos da sequência original dos “primers” EcoRI e MseI e mais 8 a 10 nucleótidos adicionais (Quadro 37).

Quadro 37 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR AFLP_125 específicos para amplificar o fragmento AGG/CAA_125

SCAR AFLP_125	Sequência (5' - 3')	Nº de bases
”Forward”	GAATTCAGGAACATAGCTTC	20
”Reverse”	CAAGCTAAAAGTCAGAAG	18

Numa primeira fase, o par de “primers” SCAR desenhado foi testado apenas nas amostras de DNA genómico da variedade susceptível Solara e da linha resistente Frilene mutante. Contrariamente ao pretendido, este par de “primers” não originou um fragmento polimórfico entre os dois progenitores. De facto, observou-se no perfil de amplificação a existência de uma banda com cerca de 100 pares de bases, em ambos os materiais (Figura 17).

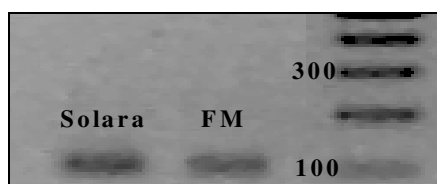


Figura 17 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCAR AFLP_125 utilizando a variedade Solara e a linha Frilene mutante (FM)

Os fragmentos amplificados na variedade susceptível e na linha resistente foram novamente isolados a partir de um gel de agarose, clonados e sequenciados. Após a obtenção

das sequências dos fragmentos, estas foram alinhadas com o auxílio do programa BioEdit e identificaram-se as diferenças existentes entre estes dois fragmentos. Como pode ser observado na Figura 18, as sequências apresentam uma percentagem elevada de homologia, diferenciando-se apenas em quatro nucleótidos.

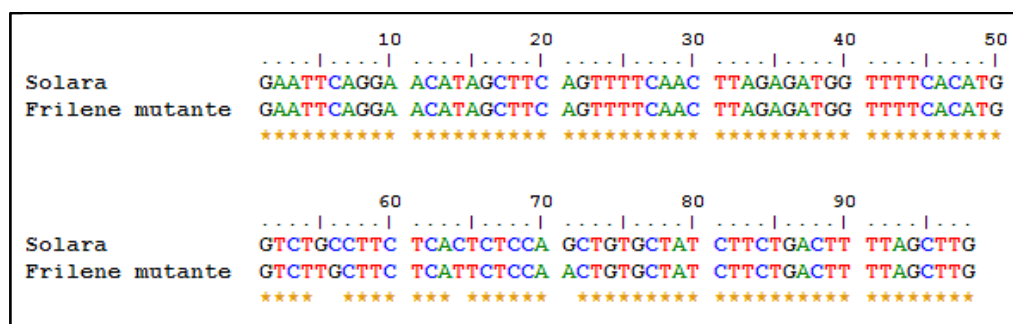


Figura 18 – Comparação das sequências nucleotídicas do SCAR AGG/CAA_125 na variedade Solara e na linha Frilene mutante. Os asteriscos representam as zonas de homologia entre os dois fragmentos

Tendo em conta as diferenças encontradas nas duas sequências foi desenhado um novo par de “primers” (Quadro 38) para amplificar o fragmento na amostra de DNA da linha Frilene mutante. Este par de “primers” foi testado novamente nas amostras de DNA genómico da variedade Solara e da linha Frilene mutante.

Quadro 38 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR AFLP_2 específico para o fragmento AGG/CAA_125

“Primer” SCAR AFLP_2	Sequência (5’-3’)	Nº de bases
“Forward“	GAATTCAGGAACATAG	16
“Reverse“	TAGCACAGTTGGAGAA	16

As reacções de amplificação geraram duas bandas de 95 e 210 pares de bases presentes em ambos os materiais (Figura 19). Várias temperaturas de “annealing” foram testadas (50°C-65°C), mas nenhum polimorfismo foi identificado, pelo que não foi possível transformar o marcador AGG/CAA_125 num marcador SCAR polimórfico.

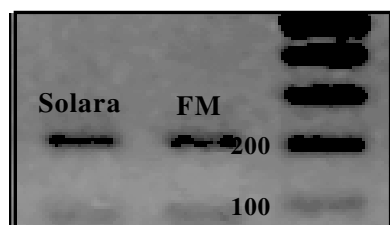


Figura 19 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCAR AFLP_2 utilizando a variedade susceptível Solara e a linha resistente Frilene mutante

A perda de polimorfismo que se observa quando se converte um marcador AFLP num marcador SCAR é um resultado que tem sido verificado por vários autores quer em trabalhos realizados em *Pisum sativum* L. (Stackelberg *et al.*, 2003) quer em outras espécies (Shan *et al.*, 1999; Evans e James, 2003). De acordo com Stackelberg *et al.* (2003), a selecção incorrecta de fragmentos de DNA que migram juntamente com a banda polimórfica de interesse pode ser a causa que explica a perda de polimorfismo revelada pelos marcadores SCAR. Shan *et al.* (1999) referem também que a perda de polimorfismo que se verifica após a transformação de um marcador AFLP em um marcador SCAR se deve à perda de especificidade que ocorre quando se desenham “primers” SCAR a partir das sequências internas dos “primers” AFLP. Quaisquer destas situações podem ter ocorrido no processo de conversão do fragmento AGG/CAA_125 num marcador SCAR.

IV.4.2.2. Conversão do marcador RAPD em marcador SCAR

O fragmento de DNA correspondente ao marcador T06_480, presente na variedade susceptível Solara, foi excisado de um gel de agarose a 2%. Após o processo de purificação, o DNA obtido foi novamente amplificado com o “primer” RAPD OPT06, tendo-se confirmado o tamanho da banda isolada.

Foram extraídos plasmídeos de 5 colónias para proceder à sequenciação do fragmento polimórfico. O fragmento T06_480 foi totalmente sequenciado nas 5 amostras. Verificou-se que este fragmento é constituído por 474 pares de bases (Figura 20). As primeiras e as últimas 10 bases do fragmento correspondem à sequência do “primer” OPT06.

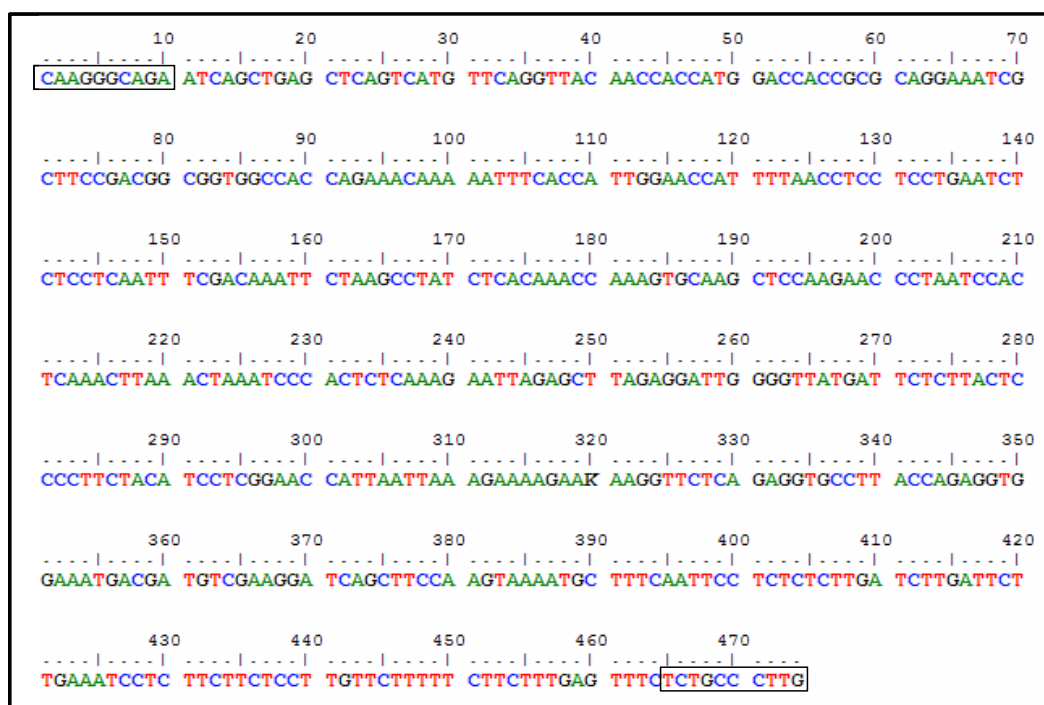


Figura 20 - Sequência apresentada pelo marcador T06_480, presente na variedade susceptível Solara

Tal como foi verificado para a sequência do fragmento AGG/CAA_125, a comparação desta sequência com outras sequências incluídas em bases de dados genómicas, utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) revelou que a sequência do fragmento T06_480 apresenta um grau baixo de similaridade relativamente às sequências disponíveis nas bases de dados.

Com base na análise dos dados de sequenciação foi desenhado e sintetizado um par de “primers” para amplificar especificamente o fragmento T06_480. Estes “primers” apresentam na sua constituição nucleótidos da sequência original do “primer” RAPD e mais 9 a 10 nucleótidos adicionais (Quadro 39).

Quadro 39 - Sequência de nucleótidos do par de “primers” SCAR específico para amplificar o fragmento T06_480

“Primer” SCART06	Sequência (5’-3’)	Nº de bases
“Forward”	GGGCAGAATCAGCTGAGCTC	20
“Reverse”	GAACAAGGAGAAGAAGAGG	19

Para testar se o par de “primers” SCAR desenhado originava um marcador polimórfico entre os materiais resistentes e os materiais susceptíveis, os “primers” foram inicialmente testados nas amostras de DNA genómico do progenitor susceptível e do progenitor resistente, utilizando uma temperatura de “annealing” de 55°C. Verificou-se que as reacções de amplificação com o par de “primers” SCART06 originaram uma banda polimórfica entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante e, tal como se observara nas reacções de amplificação que envolviam o “primer” OPT06, o par de “primers” SCAR amplificou o

fragmento pretendido, na variedade Solara (Figura 21). Analisaram-se os 255 indivíduos da população F₂ e os dados obtidos foram incluídos na matriz de dados.



Figura 21 – Padrão de amplificação obtido com o par de “primers” SCART06 utilizando indivíduos susceptíveis (S) e resistentes (R) da descendência F₂ proveniente do cruzamento Solara (Sol) x Frilene mutante (FM)

IV.4.3. Mapa genético preliminar de *Pisum sativum* L. e localização do locus de resistência

A análise de segregação dos marcadores moleculares e dos marcadores morfológicos (tipo de folha e resistência ao oídio) conduziu à construção de um mapa genético preliminar para a espécie *Pisum sativum* L.

A análise de segregação dos 128 marcadores moleculares revelou que 88 marcadores apresentavam um padrão de segregação concordante com o padrão de segregação mendeliano monogênico de 3:1. Dos restantes, 10 marcadores apresentavam uma segregação ligeiramente distorcida ($\chi^2_{0,05} < \chi^2 < \chi^2_{0,01}$) e 30 marcadores uma segregação muito distorcida ($\chi^2 > \chi^2_{0,01}$). O padrão de segregação do tipo de folha e do fenótipo de resistência está de acordo com o padrão de segregação mendeliano monogênico de 3:1.

O estabelecimento de grupos de ligamento foi efectuado com o programa JoinMap (Van Ooijen e Voorrips, 2001). Utilizando um valor de LOD 3, foram mapeados no total 97 marcadores, entre os quais 95 moleculares e dois morfológicos (*er1* e *af*), que se encontram distribuídos por 12 grupos de ligamento (Figura 22). O grupo maior possui 104 cM, enquanto que o mais pequeno possui apenas 3 cM.

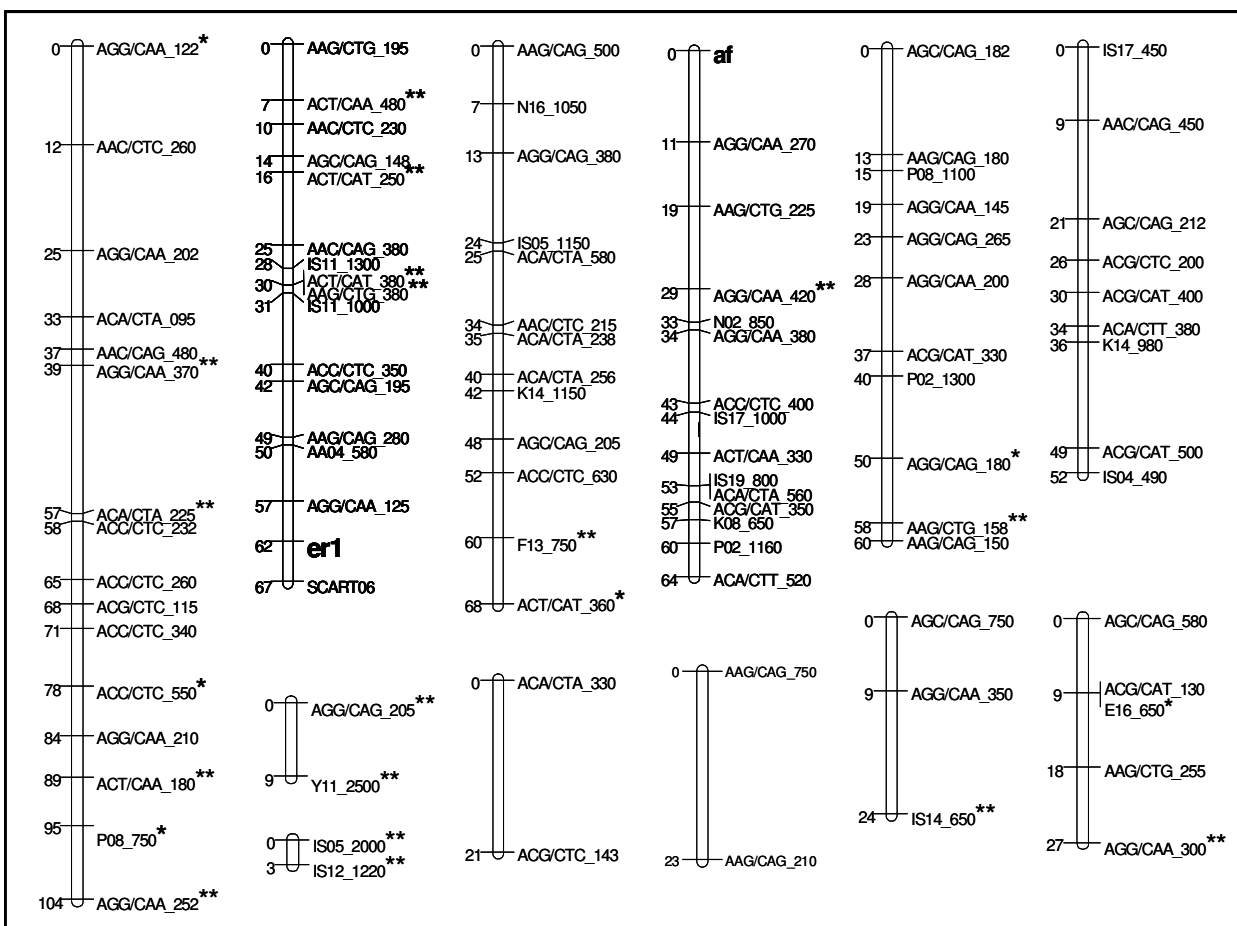


Figura 22 – Mapa genético preliminar de *Pisum sativum* L. obtido a partir da população F₂ proveniente do cruzamento Solara x Frilene mutante. No lado esquerdo de cada grupo de ligamento encontra-se o valor da distância genética em cM, calculado através da função de Kosambi. Os marcadores identificados com * e ** apresentam uma segregação ligeiramente distorcida ($\chi^2_{0,05} < \chi^2 < \chi^2_{0,01}$) e muito distorcida ($\chi^2 > \chi^2_{0,01}$), respectivamente

O presente mapa é constituído por um número de grupos superior ao número básico de cromossomas apresentado por esta espécie ($n=7$). A existência de grupos adicionais indica que há zonas do genoma que ainda não foram mapeadas, eventualmente devido ao número ainda reduzido de marcadores analisados. É muito provável que a análise desta população segregante com um número superior de marcadores, permita a integração destes grupos mais pequenos e origine um mapa com os 7 grupos previstos para a espécie *Pisum sativum* L. (Weeden *et al.*, 1998). No total conseguiu-se mapear uma região correspondente a 670 cM. A versão do mapa de ligamento de *P. sativum* L., designada por “consensus linkage map” abrange 772 cM (Weeden *et al.*, 1998). Este valor está de acordo com os resultados obtidos em estudos citogenéticos realizados por Hall *et al.* (1997) que estimaram o tamanho do mapa de ervilha, a partir da frequência de quiasmas por meiose, entre 700 e 800 cM. Outros mapas de *P. sativum* L. publicados apresentam tamanhos compreendidos entre 1000 cM e 1700 cM (Ellis *et al.*, 1992; Gilpin *et al.*, 1997; Laucou *et al.*, 1998; Ellis e Poyser, 2002; Lorigon *et al.*, 2005).

Após a análise da segregação dos marcadores observados nos indivíduos F_2 provenientes do cruzamento realizado entre o progenitor sensível Solara e o progenitor resistente Frilene mutante foi possível localizar o *locus er1*, num dos grupos de ligamento. Este *locus* encontra-se integrado num grupo constituído por 17 marcadores e está flanqueado pelo marcador SCART06 e pelo marcador AFLP AGG/CAA_125. Os marcadores SCART06 e AGG/CAA_125 encontram-se ambos a 5 cM do *locus er1*. A ligação destes três *loci* é muito forte, como foi referido anteriormente.

Nas análises realizadas utilizando a metodologia BSA (“bulked segregant analysis”) tinha sido seleccionado para o trabalho de mapeamento o marcador AA04_580 que se

encontrava presente no perfil de amplificação do “bulk” constituído por plantas susceptíveis e ausente no perfil de amplificação do “bulk” constituído por plantas resistentes. Como seria de esperar, este marcador ficou integrado no mesmo grupo de ligamento do *locus er1*, no entanto, numa posição mais afastada, a 12 cM daquele *locus*.

Em outros trabalhos de mapeamento em *P. sativum* L., o *locus* responsável pela resistência ao oídio tem sido identificado no grupo de ligamento 6 (Dirlewanger *et al.*, 1992; Dirlewanger *et al.*, 1994; Cousin *et al.*, 1995; Weeden *et al.*, 2000). Em estudos próximos seria interessante mapear marcadores já analisados neste grupo de modo a ser possível integrar os marcadores obtidos neste trabalho.

O *locus af* responsável pela transformação dos folíolos em gavinhas também foi mapeado num grupo de ligamento constituído por 15 marcadores e com 64 cM. O marcador mais próximo deste *locus*, AFLP AGG/CAA_270, encontra-se a 11 cM de distância. A localização do *locus af* e do *locus er1* em dois grupos de ligamento distintos, está de acordo com as observações de campo realizadas nas plantas F₂ provenientes do cruzamento Solara x Frilene mutante. Com efeito, nos mapas de ligamento propostos para a ervilha (Weeden *et al.*, 1998; Ellis e Poyser, 2002) os *loci af* e *er1* encontram-se localizados, respectivamente, no grupo de ligamento 1 e no grupo de ligamento 6.

V. Discussão Geral

Os trabalhos de mutagénesse experimental realizados no âmbito desta tese permitiram pela primeira vez obter mutantes de ervilha (*Pisum sativum* L.) resistentes ao oídio, doença causado pelo fungo *Erysiphe pisi* Syd.

O oídio é uma doença importante na cultura da ervilha. Em Portugal não existe informação sobre as quebras de rendimento resultantes da presença deste fungo mas estas, segundo alguns autores (Kumar e Singh, 1981; Tiwari *et al.*, 1997a) podem atingir valores estimados entre 25 e 50%. O ataque de oídio pode ser controlado através da aplicação de fungicidas, no entanto, a utilização de variedades resistentes constitui o método mais económico e eficiente de controlo desta doença. A obtenção de materiais geneticamente resistentes é particularmente importante para zonas em que se verifiquem Primaveras com dias quentes seguidas de noite frias e húmidas, condições estas que permitem o desenvolvimento de ataques severos de oídio e que ocorrem com frequência nas zonas do litoral do País.

Em algumas espécies cultivadas, como seja o trigo e a cevada, a resistência das plantas aos fungos responsáveis pelo oídio pode ser conferida por vários alelos diferentes. Até ao presente momento, já foram identificados 48 alelos de resistência no trigo (Huang e Röder, 2004). Na cevada, foram identificados 32 alelos do *locus* dominante *Mla* (Wei *et al.*, 2002) e 25 do *locus* recessivo *mlo* (Chelkowski *et al.*, 2003). Em ervilha, os trabalhos realizados sobre o controlo genético da resistência ao oídio revelam uma situação diferente. O estudo de génotipos resistentes provenientes de diferentes origens geográficas (Sakr e Muehlbauer, 1996; Vaid e Tyagi, 1997; Liu *et al.*, 2003) tem indicado que apenas um gene recessivo está envolvido no controlo da resistência ao fungo *E. pisi*. É de salientar também que, no nosso

trabalho as duas mutações obtidas em variedades comerciais diferentes, afectaram o mesmo *locus* e que, como demonstramos, este *locus* é o mesmo que determina as resistências naturais identificadas em ervilha.

Harland (1948) denominou o gene de resistência ao oídio por *er*. Mais tarde, Heringa *et al.* (1969) identificaram dois genes recessivos que denominaram por *er1* e *er2*. Segundo estes últimos autores e Tiwari *et al.* (1997), o gene *er1* confere resistência completa às plantas enquanto o gene *er2* confere resistência apenas aos caules e às folhas. Mais recentemente, Sharma (2003) e Sharma e Yadav (2003) referem que apenas está envolvido um gene recessivo (*er*) no mecanismo de resistência ao oídio na espécie *P. sativum*. Consideram que a referência à existência do gene *er2* se deve a erros de avaliação da resposta das plantas ao oídio. No nosso trabalho, não foi possível confirmar a hipótese de Sharma (2003). Apenas podemos afirmar que a resistência apresentada pelas duas linhas mutantes, Solara mutante e Frilene mutante, deve-se a mutações no mesmo *locus* que também confere resistência à linha E835 que contém um gene, referido como sendo o gene *er1*. Estudos adicionais envolvendo materiais referenciados como tendo na sua constituição o gene *er2* poderão esclarecer esta questão.

A selecção de plantas resistentes é efectuada tradicionalmente no campo ou em ambiente controlado após inoculação dos materiais com o fungo *E. pisi*. A identificação de marcadores moleculares ligados ao *locus* de resistência, em particular quando este é recessivo, constitui uma alternativa eficaz à selecção convencional. A selecção assistida por marcadores permite que a eleição de indivíduos seja efectuada em qualquer fase de desenvolvimento das

plantas, não sendo necessário expor os materiais vegetais ao contacto com o agente patogénico.

No presente estudo, localizámos o *locus er1* num grupo de ligamento, estando flanqueado a 5 cM pelo marcador SCAR T06 e à mesma distância, do lado oposto, pelo marcador AFLP AGG/CAA_125.

O *locus er1* foi mapeado em trabalhos anteriores. Dirlewanger *et al.* (1994) identificaram um marcador RFLP, p236, a uma distância genética de 9,8 cM do *locus er1* enquanto que Timmerman *et al.* (1994) identificaram o marcador RAPD PD10₆₅₀, mais próximo a 2,1 cM. Tal como no nosso trabalho, Jamila e Sharma (2004) também flanquearam o *locus er* a 10,3 cM e 4,5 cM, respectivamente, pelos marcadores RAPD OPU17₁₀₀₀ e OPO02₁₄₀₀. Estes marcadores RAPD não foram utilizados no nosso estudo porque não foram amplificados na variedade Solara e na linha Frilene mutante ou porque revelaram ser marcadores monomórficos nestes dois materiais. Ek *et al.* (2005) após analisarem 315 marcadores SSR, seleccionaram 3 marcadores, PSMPSAD60, PSMPSAA374 e PSMPA5, com ligação ao *locus* de resistência, do qual se encontram a 10.4, 11.6 e 14.9 cM de distância, respectivamente. Embora, estes últimos autores considerem que nenhum dos marcadores SSR deva ser utilizado isoladamente num programa de selecção assistida por marcadores, estimam que quando combinados em pares, estes marcadores permitirão identificar correctamente as plantas resistentes apenas com 1,6% de erro. A utilização simultânea dos dois marcadores identificados no nosso estudo levaria a erros inferiores 0,3%. No entanto, o marcador AFLP não foi transformado num marcador SCAR polimórfico, tornando difícil a sua utilização quando se pretende realizar análises de rotina por PCR. Em trabalhos futuros será necessário

encontrar um outro marcador que flanqueie o gene de resistência e que origine um SCAR polimórfico entre materiais resistentes e susceptíveis. Só assim os marcadores que estão a flanquear o gene poderão ser considerados como ferramentas úteis para incluir nos programas de selecção assistida de plantas resistentes ao oídio. No entanto, a identificação dos marcadores SCAR T06 e AGG/CAA_125 constitui um passo importante para definir as estratégias a seguir em trabalhos futuros que visem a clonagem do gene mutado.

O isolamento de genes de resistência com base em mapas genéticos (“map-based cloning”) é uma estratégia que tem sido utilizada com frequência em espécies como a *Arabidopsis thaliana*, o tomate e a cevada (Jander *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2002; Feuillet *et al.*, 2003). Os marcadores moleculares identificados como ligados aos genes de interesse são utilizados como ponto de partida para a clonagem da região que contém o gene de interesse.

A relação entre a distância genética e a distância física é muito importante quando se pretende isolar um gene. Estima-se que o genoma da ervilha possua $3,8-4,8 \times 10^9$ pares de bases (Ellis, 1993), ou seja 2800 a 6000 Mbp por cM. Como neste trabalho, os marcadores que flanqueiam o *locus* de resistência ainda estão a uma distância de 5 cM, será necessário prosseguir com o estudo de identificação de novos marcadores que estejam localizados mais próximos do gene. A selecção dos marcadores utilizando a estratégia por BSA (“bulked segregant analysis”), deverá ser futuramente refinada utilizando “bulks” de amostras de DNA constituídos por indivíduos homozigóticos para a susceptibilidade, o que só poderá ser avaliado na geração seguinte (F₃). Também deve ser confirmado os indivíduos homozigóticos para a resistência, o que sendo aparentemente óbvio por se tratar de uma característica recessiva, permite eliminar os sempre possíveis mas de ocorrência pouco provável de casos de

escape à infecção. Além disso, o “bulk” susceptível deverá conter apenas indivíduos que amplifiquem em simultâneo os marcadores já identificados e que limitam uma região genómica de 10 cM que envolve o *locus er1*. Os novos marcadores deverão ser avaliados em populações segregantes constituídas por um número elevado de indivíduos. Procedendo desta forma, poder-se-à avançar mais rapidamente no processo de detecção de novos marcadores ligados ao *locus* de resistência, utilizando a população segregante derivada da variedade Solara e linha Frilene mutante. Adicionalmente, poder-se-á obter uma outra população F₂ proveniente da linha Frilene mutante e de outro progenitor com um índice de similaridade genética menor em relação à linha mutante. Este objectivo poderá ser alcançado com a utilização de progenitores pertencentes à espécie *P. sativum* var. *arvense*. Estudos realizados para determinação da distância genética entre genótipos de *P. sativum* var. *sativum* e genótipos de *P. sativum* var. *arvense* indicaram que a distância genética entre estes materiais é igual a 0,81. Este valor é claramente inferior à distância genética observada entre a Solara e a Frilene mutante (0,95). A distância genética entre *P. sativum* var. *sativum* e *P. sativum* var. *arvense* permite antever a obtenção de uma fracção mais elevada de marcadores polimórficos entre estes materiais e conseqüentemente o aumento da probabilidade de obter marcadores mais próximos do *locus* em estudo.

VI. Considerações Finais

Neste estudo, confirmou-se que na espécie *P. sativum* L. a indução artificial de mutações é uma alternativa viável para aumentar a variabilidade genética dos materiais utilizados em programas de melhoramento desta espécie. Os tratamentos mutagênicos efectuados nas variedades comerciais Solara e Frilene com os agentes alquilantes metilnitrosourea e etilnitrosourea permitiram obter várias plantas mutantes com características morfológicas e agronômicas interessantes para os trabalhos de melhoramento de ervilha. Entre estas, destaca-se a selecção de duas plantas que estiveram na origem de duas linhas resistentes ao oídio (*Erysiphe pisi* Syd.). Com base nas experiências mutagênicas realizadas pode concluir-se que o tratamento de plântulas recém-germinadas combinada com exposições não muito longas (1 a 2 horas) ao agente mutagénico constitui uma metodologia adequada para atingir uma eficiência mutagénica elevada. Os resultados indicam também que a fase do ciclo celular mais própria à indução de mutação é a fase G2. Foi nesta fase que se obteve o maior número de famílias com mutações e o maior número de famílias com mutações múltiplas.

O mecanismo genético da resistência ao oídio apresentada pelos dois mutantes induzidos (Solara mutante e Frilene mutante) indicou que se trata de duas mutações recessivas que afectaram o mesmo *locus* e que este *locus* é o mesmo que confere a resistência natural aos materiais de ervilha. As duas linhas resistentes seleccionadas neste estudo, constituem fontes importantes de resistência ao oídio para o programa de melhoramento de ervilha.

As técnicas moleculares RAPD, ISSR e AFLP revelaram uma eficácia muito baixa para detectar diferenças entre as variedades originais e os respectivos mutantes. No entanto, a análise da população F_2 derivada do cruzamento realizado entre a variedade Solara e a linha Frilene mutante permitiu construir um mapa genético preliminar e flanquear o *locus er1* entre um marcador SCAR (SCART06) e um marcador AFLP (AGG/CAA_125), ambos localizados à distância de 5 cM.

A identificação de marcadores moleculares mais próximos do *locus* de resistência ao oídio com vista ao isolamento do gene por clonagem baseada em mapas genéticos, constituirá a etapa seguinte de futuros trabalhos.

VII. Referências Bibliográficas

- Ahloowalia, B. S.; Maluszynski, M.; Nichterlein, K. (2004) – Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135: 187-201.
- Ahnström, G. (1977) – Radiobiology. *In Manual on mutation breeding*. 2^a ed., IAEA, pp. 21-28.
- Allard, R.W.; Hansche, P.E. (1964) – Some parameters of population variability and their implications in plant breeding. *Advances in Agronomy*, 16: 281-325.
- Ali, S. M.; Sharma, B.; Ambrose, M. J. (1994) – Current status and the future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73: 115-126.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25 (17): 3389-3402.
- Baranger, A.; Aubert, G.; Arnau, G.; Lainé, A. L.; Deniot, G.; Potier, J.; Weinachter, C.; Lejaune-Hénaut, I.; Lallemand, J.; Burstin, J. (2004) – Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 1309-1321.
- Bathia, C. R.; Nichterlein, K.; Maluszynski, M (1999) – Oilseed cultivars developed from induced mutations and mutations altering fatty acid composition. *Mutation Breeding Review*, 11: 1-36.
- Bhatia, C. R.; Maluszynski, M; Nichterlein, K.; van Zanten, L. (2001) – Grain legumes cultivars derived from induced mutations, and mutations affecting nodulation. *Mutation Breeding Review*, 13: 1-44.
- Bouma, J.; Ohnoutka, Z. (1991) – Importance and application of the mutant Diamant in spring barley breeding. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.1, pp. 127-133.
- Bressani, R.; Elias, L. G. (1988) – Seed quality and nutritional goals in pea, lentil, faba bean and chickpea breeding. *In R. J. Summerfield (ed) World crops: cool season food legumes*. Kluwer Academic Publisher, pp. 381-404.
- Brewin, N. J.; Ambrose, M. J.; Downie, J. A. (1993) – Root Nodules, *Rhizobium* and nitrogen fixation. *In R. Casey e D. Davies (eds) Peas: Genetics, Molecular Biology and biotechnology*. CAB International, pp. 165-216.
- Briggs, R. W.; Constantin, M. J. (1977) – Radiation types and radiation sources. *In Manual on mutation breeding*. 2^a ed., IAEA, pp. 7-21.
- Camlin, M. S. (2001) – Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. *Acta Hort.*, 546: 289-296.
- Chakravarti, A.; Lasher, L. A.; Reefer, J. E. (1991) – A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics*, 128: 175-182.

- Cheghamirza, K.; Koveza, O.; Konovalov, F.; Gostimsky, S. (2002) – Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7: 649-655.
- Chelkowski, J.; Tyrka, M.; Sobkiewicz, A. (2003) – Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. *J. Appl. Genet.*, 44: 291-309.
- Clarke, J. D.; Volko, S. M.; Ledford, H.; Ausubel, F. M.; Dong, X. (2000) – Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in arabidopsis. *The Plant Cell*, 12: 2175-2190.
- Coté, B.; Bender, D.; Curtis, D.; Chovnick, A. (1986) – Molecular mapping of the *rosy* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 112: 769-783.
- Cousin, R. (1965) – Étude de la résistance à l'oidium chez le pois. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 15: 93-97.
- Cousin, R. (1997) – Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 53: 111-130.
- Cousin, R.; Messenger, A.; Vingere, A. (1985) – Breeding for yield in combining pas. In Hebblethwaite, Heath e Dawkins (eds) *Pea Crop. A basis for improvement*. Butterworths, London, pp. 115-129.
- Cousin, R.; Vingere, A.; Burghoffer, A.; Schmit, J. (1995) - Main disease resistances in pea (*Pisum sativum* L.). *2nd European Conference on Grain Legumes*, Copenhaga, pp. 105.
- Coyne, C. J.; Pilet, M. L.; Deniot, G.; Baranger, A.; Prioul, S.; McClendon, M. T. (2000) – Selected AFLP primer pairs for fine mapping in pea. *Pisum Genetics*, 32: 27-30.
- Datta, S. K. (1991) – Role of mutation breeding in floriculture. In *Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.1, pp. 273-281.
- De Witt, P. J. G. M. (1992) – Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 391-418.
- Delaney, T. P.; Uknes, S.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Weymann, K.; Negrotto, D.; Gaffney, T.; Gut-Rella, M.; Kessmann, H.; Ward, E.; Ryals, J. (1994) – A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266:1247-1250.
- Dewdney, J.; Reuber, T. L.; Wildermuth, M. C.; Devoto, A.; Cui, J.; Stutius, L. M.; Drummond, E.; Ausubel, F. M. (2000) - Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *The Plant Journal*, 24: 205-218.
- Dirlewanger, E.; Isaac, P.; Cousin, R.; de Vienne, D. (1992) - Molecular markers linked to the resistance genes to main pea diseases: fusarium wilt, powdery mildew, ascochyta blight and pea common mosaic. *1st European Conference on Grain Legumes*, Angers, pp. 129-130.

- Dirlewanger, E.; Isaac, P.; Ranade, S.; Belajouza, M.; Cousin, R.; de Vienne, D. (1994) - Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 17-27.
- Dixon, M. S.; Golstein, C.; Thomas, C.M.; Biezen, E. A.; Jones, J. D. (2000) – Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 97: 8807-8814.
- Eckardt, N. A. (2002) – Plant disease susceptibility genes? *The Plant Cell*, 14: 1983-1986.
- Ek, M.; Eklund, M.; von Post, R; Dayteg, C.; Henriksson, T.; P. Weibull, P.; Ceplitis, A.; Isaac, P.; Tuveesson, S. (2005) - Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Hereditas*, 142: 86-91.
- Ellis, T. H. N. (1993) – The nuclear genome. In R. Casey e D. Davies (eds) *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, pp. 13-47.
- Ellis, T. H. N.; Poyser, S. J. (2002) – An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist*, 153: 17-25.
- Ellis, T. H. N.; Turner, L.; Hellens, R. P.; Lee, D.; Harker, C. L.; Enard, C.; Domoney, C.; Davies, D. R. (1992) – Linkage maps in pea. *Genetics*, 130: 649-663.
- Evans, K. M.; James, C. M.; (2003) – Identification of SCAR markers linked to PI-w mildew resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1178-1183.
- Favret, E. A.; Konzak, C. F.; Micke, A. (1977) – Disease and pest resistance. In *Manual on mutation breeding*. 2ª ed., IAEA, pp. 180-188.
- Fernandez, M. E.; Figueiras, A. M.; Benito, C. (2002) – The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 845-851.
- Feuillet, C.; Travella, S.; Stein, N.; Albar, L.; Nublát, A.; Keller, B. (2003) – Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *PNAS*, 25:15253-15258.
- Flor, H. H. (1971) – Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9: 275-296.
- Franco, J. A. (1971) – Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lisboa, 648 pp.
- Fraser, R. S. S. (1992) – The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica*, 63: 175-185.
- Frye, C. A.; Innes, R. W. (1998) – An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *The Plant Cell*, 10: 947-956.

- Gilpin, B. F.; McCallum, J. A.; Frew, T. J.; Timmerman-Vaughan, G. M. (1997) – A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequences tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.*, 95:1289-1299.
- Gottschalk, W. (1965) – A chromosome region in *Pisum sativum* with an exceptionally high susceptibility to X-rays. In *The use of induced mutations in plant breeding*. FAO/ IAEA, Roma, pp. 386-391.
- Gritton, E. T. (1986) – Pea breeding. In *Breeding Vegetable Crops*, pp. 283-319.
- Gupta, V. P.; Rathore, P. K.; Singh, J. M. (1995) – Quantitative genetic analysis of powdery mildew resistance in pea. *2nd European Conference on Grain Legumes*, Copenhagen, pp. 202.
- Hall, T. A. (1999) – Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hammerlund, C. (1925) – Zur Genetik, Biologie und Physiologie einiger Erysiphagen. *Hereditas*, 6: 93-97.
- Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J. D. G. (1996) – Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J. D. G. (1997) – Plant disease resistance genes. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 575-607.
- Haq, M. A.; Hassan, M.; Sadiq, M. (2001) – “CM 88” a multiple disease resistant chickpea mutant variety. *Mutation Breeding Newsletter*, 45: 5-6.
- Harland, S. C. (1948) – Inheritance of immunity to mildew in peruvian forms of *Pisum sativum*. *Heredity*, 2: 263-269.
- Harten, A. M. (1998) – Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, United Kingdom, 353 pp.
- Heitefuss, R. (2001) – Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften*, 88: 273-283.
- Heringa, R. J.; van Norel, A.; Tazelaar, M. F. (1969) - Resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygona* D.C.) in peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 18: 163-169.
- Heslot, H. (1977) – Review of main mutagenic compounds. In *Manual on mutation breeding*. 2^a ed., IAEA, pp. 51-59.
- Hoey, B. K.; Crowe, K. R.; Jones, V. M.; Polans, N. O. (1996) – A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 92-100.
- Howard, A.; Pelc, S. R. (1953) – Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 6: 261-273.

- Huang, X.; Röder, M. S. (2004) - Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica*, 137: 203-203.
- Hückelhoven, R. (2005) – Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *Microbiology Letters*, 245: 9-17.
- Hückelhoven, R.; Fodor, J.; Preis, C.; Kogel, K. (1999) – Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.*, 119: 1251-1260.
- Hunter, P. J.; Ellis, N.; Taylor, J. D. (2001) – Association of dominant loci for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* with linkage groups II, VI and VII of *Pisum sativum*. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 129-135.
- Huyghe, C., (1998) – Genetics and genetic modification of plant architecture in grain legumes: a review. *Agronomie*, 18: 383-411.
- IAEA (2001) – Molecular characterization of mutated genes controlling important traits for seed crops. *Report of the second FAO/IAEA research co-ordination meeting*, Viena, 77 pp.
- Iruela, M.; Gil, J.; Rubio, J.; Millán, T.; Moreno, M. T. (2001) – Study of variability in desi and kabuli chickpea using RAPD and ISSR markers. 4th *European Conference on Grain Legumes*, Cracóvia, pp. 192-193.
- Irzykowska, L.; Wolko, B.; Świącicki, W. K. (2001) – The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers. *Pisum Genetics*, 33: 13-18.
- Irzykowska, L.; Wolko, B.; Świącicki, W. K. (2002) – Interval mapping of QTLs controlling some morphological traits in pea. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7: 417-422.
- Jan, C. C. (1992) – Inheritance and allelism of mitomycin C and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* , 32: 317-319.
- Jan, C. C.; Rutger, J. N. (1988) - Mitomycin C and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* , 28: 792-795.
- Jander, G.; Norris, S.; Rounsley, S.; Bush, D.; Levin, I.; Last, R. (2002) – Arabidopsis map-based cloning in the post genome era. *Plant Physiology*, 129: 440-450.
- Janila, P.; Sharma, B. (2004) – RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene *er* in pea. *Plant Breeding*, 123: 271-274.
- Jensen, J. (1991) – New high yielding, high lysine mutants in barley. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 2, pp. 31-41.

Johansen, I. E.; Lund, O. S.; Hjulsager, C. K.; Laursen, J. (2001) – Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *Journal of Virology*, 75: 6609-6614.

Jørgensen, J. H. (1991) – Mutations studies on cereal disease resistance. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 2, pp. 81-91.

Kaiser, W. J.; Ramsey, M. D.; Makkouk, K. M.; Bretag, T. W.; Açikgöz, N.; Kumar, J.; Nutler, F. W. (2000) – Foliar diseases of cool season food legumes and their control. *In R. Knight (ed) Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. Kluwer Academic Publishers, pp. 437-455.

Kalia, P.; Sharma, S. K. (1988) – Biochemical genetics of powdery mildew resistance in pea. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 795-799.

Kamra, O. P.; Brunner, H. (1977) – Chemical mutagens: mode of action. *In Manual on mutation breeding*. 2^a ed., IAEA, pp. 59-65.

Kombrink, E.; Schmelzer, E. (2001) - The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 69–78.

Kumar, H.; Singh, R. B. (1981) - Genetic analysis of adult plant resistance to powdery mildew in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 30: 147-151.

Ladizinsky, G.; Adler, A. (1976) – The origin of chickpea *Cicer arietinum* L.. *Euphytica*, 25: 211-217.

Laucou, V.; Haurogné, K.; Ellis, N.; Rameau, C. (1998) – Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based linkage map of *Pisum sativum*. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 905-915.

Leitão, J.; Pereira, G.; Tavares-de-Sousa, M. (1998) - A new powdery mildew (*Erysiphe pisi* Syd.) resistant mutant of *Pisum sativum* L. 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid, pp. 118-119.

Leitão, J.; Petkova, S. D.; Djondjurov, L. P. (1986) – A method for cell synchronization in apical shoot meristem of *P. sativum* L. *Comptes rendues de l'Académie bulgare des Sciences*, 39: 133-136.

Leitão, J.; Petkova, S.; Djondjurov (1987a) – Use of gamma-radiation and ethylnitrosourea independently and in combination in experimental mutagenesis in peas. II. Mutation rate and mutation spectrum in M₂ generation. Scientific works of the H.I.A. “Vassil Kolarov”, vol 32 (2): 123-132 (resumo em inglês).

Leitão, J.; Petkova, S.; Djondjurov, L.; Mehandjiev, A. (1987b) – N-Nitroso-N-ethylurea and ethyl methane sulphonate treatment of synchronized shoot apex cells of *Pisum sativum*. *II International Symposium in Experimental mutagenesis in plants*, pp. 341-346.

Loridon, K.; McPhee, K.; Morin, J.; Dubreuil, P.; Pilet-Nayel, M. L.; Aubert, G.; Rameau, C.; Baranger, A.; Coyne, C.; Lejeune-Hênaut, I.; Burstin, J. (2005) - Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 111: 1022-1031.

- Liu, S. M.; O'Brien, L.; Moore, S. G. (2003) – A single recessive gene confers effective resistance to powdery mildew of field pea grown in northern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43: 373-378.
- MacDonald, M. V.; Ahmad, I.; Menten, J. O. M.; Ingram, D. S. (1991) – Haploid culture and *in vitro* mutagenesis (UV light, X-rays, gamma rays) of rapid cycling *Brassica napus* for improved resistance to disease. In *Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 2, pp.129-138.
- Mackey, D.; Holt, B. F.; Wiig, A.; Dangl, J. F. (2002) – RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108: 743-754.
- Maluszynski, M.; Nichterlein, K.; van Zanten, L.; Ahloowalia, S. (2000) – Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA database. *Mutation Breeding Review*, 12: 1-83.
- Marques, C. M.; Araújo, J. A.; Ferreira, J. G.; Whetten, R.; O'Malley, D. M.; Liu, B. H.; Sederoff, R. (1998) – AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 727-737.
- McDowell, J. M.; Woffenden, B. J. (2003) – Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 21: 178-183.
- Martin, G. B.; Bogdanove, A.; Sessa, G. (2003) - Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:23–61.
- Mehandjiev, A.; Mihov, M. (1995) – Genetic improvement of peas using experimental mutagenesis. *2nd European Conference on Grain Legumes*, Copenhagen, p. 201.
- Mehandjiev, A.; Mihov, M.; Stoyanova, M.; Todorova, J. (1998a) – Induced mutations in pea - New results from combined mutagen treatment. *3rd European Conference on Grain Legumes*, Valladolid, p.198.
- Mehandjiev, A.; Noveva, S.; Kosturkova, G. (1998b) – Induced mutations and their application in genetic improvement of pea. *Pisum Genetics*, 30: 24-26.
- Men, A. E.; Borisov, A. Y.; Rozov, S. M.; Ushakov, K. V.; Tsyganov, V. E.; Tikhonovich, I. A.; Gresshoff (1999) – Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis-ineffective *sym31* mutation of pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 98: 929-936.
- Michelmore, R.; Paran, I.; Kesseli, R. V. (1991) – Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 88: 9828-9832.
- Micke, A. (1995) – Mutation breeding of grain legumes. In 14th IAEA/FAO interregional training course on advances in plant mutation techniques (C7-Int-5.135). IAEA, 51 pp.

- Micke, A. (1999) – Mutations in plant breeding. In Siddiqui e Khan (eds) *Breeding in crop plants: Mutations & in vitro mutation breeding*. Kalyani Publishers, India, pp. 1-19.
- Mohan, M.; Nair, S.; Bhagwat, A.; Krishna, T. G.; Yano, M. (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- Molchova, E.; Vassileva, M.; Michailova, M. (1987) – Morphological and cytoembriological studies on *cochleata* mutants of *Pisum sativum*. In *Experimental mutagenesis in plants*, Plovdiv, pp. 110-114.
- Muehlbauer, F. J. (1992) – Use of introduced germplasm in cool-season food legume cultivar development. In Shands e Weisner (eds) *Use of plant introductions in cultivar development*. Part2, CSSA Special Publication n°20, USA, pp. 49-73.
- Muehlbauer, G. L.; Specht, J. E.; Thomas-Compton, M. A.; Staswick, P. E.; Bernard, R. L. (1988) – Near-isogenic lines – a potential resource in the integration of conventional and molecular marker linkage maps. *Crop Science*, 28: 729-735.
- Murfet, I.C.; Reid, J. B. (1993) – Developmental Mutants. In R. Casey e D. Davies (eds) *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, pp. 165-216.
- Nakai, H. (1991) – Practical value of induced mutants of rice resistant to bacterial leaf blight. In *Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 2, pp. 113-127.
- Noguchi, S.; Tajima, T.; Yamamoto, Y.; Ohno, T.; Kubo, T. (1999) – Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY). *Mol. Gen. Genet.*, 262: 822-829.
- Oh, K.; Hardeman, K.; Ivanchenko, M.; Ellard-Ivey, M.; Nebenführ, A.; White, T.; Lomaw, T. (2002) – Fine mapping in tomato using microsynteny with the Arabidopsis genome: the Diageotropica (Dgt) locus. *Genome Biology*, 3: 1-11.
- Okubara, P. A.; Inglis, D. A.; Muehlbauer, F. J.; Coyne, C. J. (2002) – A novel RAPD marker linked to the Fusarium wilt race 5 resistance gene (Fwf) in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 34: 6-8.
- Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. (2001) - Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19–28.
- Osbourn, A. E. (1996) – Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8:1821-1831.
- Özbek, N.; Atila, A. S.; Yelin, D.; Oğuz, L.; Savaşkan, Ç. (1991) – Radiation induced mutations for yield and quality in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In *Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 2, pp. 157-161.
- Paran, I; Michelmore, R. (1993) – Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993.

- Pastink, A.; Vreeken, C.; Nivard, M.; Searles, L.; Vogel, E. (1989) – Sequence analysis of N-ethyl-N-nitrosourea induced *vermilion* mutation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 123: 123-129.
- Pathak, R. S. (1991) – Genetic evaluation of two aphid resistant cowpea mutants in Kenya. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.2, pp. 241-247.
- Piffanelli, P.; Zhou, F.; Casais, C. ; Orme, J. ; Jarosch, B. ; Schaffrath, U.; Collins, N.; Panstruga, R.; Schulze-Lefert, P. (2002)- The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stimuli. *Plant Physiol.*, 129: 1-10.
- Pilet-Nayel, M.; Muehlbauer, F.; McGee, R. ; Kraft, J. ; Baranger, A.; Coyne, C. (2002) – Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 440-449.
- Porta-Puglia, A.; Aragona, M. (1997) – Improvement of grain legumes. General part: diseases. *Field Crop Research*, 53: 17-30.
- Qian, W.; Ge, S.; Hong, D. Y. (2001) – Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 440-449.
- Rameau, C.; Dénoue, D.; Fraval, F.; Haurogné, K.; Josserand, J.; Laucou, V.; Batge, S.; Murfet, I. C. (1998) - Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 916-928.
- Ranalli, P.; Cubero, J. I. (1997) – Bases for genetic improvement of grain legumes. *Field Crops Research*, 53: 69-82.
- Ratnaparkhe, M. B.; Tekeoglu, M.; Muehlbauer, F. J. (1998) – Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 515-519.
- Reddy, M. P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. (2002) – Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.
- Reymond, P.; Farmer, E. (1998) - Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 404-411.
- Richter, T. E.; Ronald, P. C. (2000) – The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, 42: 195-204.
- Riesselmann, S.; Jacobsen, H. (1995) – Are RAPD markers suitable tools to identify single gene mutations? *In 2nd European Conference on Grain Legumes*, Copenhagen, pp. 448.
- Röbbelen, G. (1991) - Mutation breeding for quality improvement: a case study for oilseed crops. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.2, pp. 3-30.
- Rubeena; Ford, R.; Taylor, P. W. J. (2003) – Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). *Theor. Appl. Genet.*, 107: 28-39.

- Rutger, J. N. (1991) – Mutation breeding of rice in California and the United States of America. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.1, pp. 155-165.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H. Y., Hunt, M. D. (1996) - Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 8: 1809-1819.
- Sagan, M.; Duc, G.; Cornu, A. (1991) – Mutagenesis in pea (*Pisum sativum* L.) as a tool for studying plant Rhizobium symbiosis. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.1, pp. 469-474.
- Sagan, M.; Messenger, A.; Duc, G. (1993) – Specificity of Rhizobium-legume symbiosis obtained after mutagenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *New Phytol.*, 125: 757-761.
- Sakr, B.; Muehlbauer, J. F. (1996) – Inheritance and linkage relationships of resistance to powdery mildew of peas. *Al Awamia*, 94: 9-18.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1987) – Molecular Cloning: laboratory manuals. 2 ed.
- Samec, P.; Pošvec, Z.; Stejskal, J.; Našinec, V.; Griga, M. (1998) – Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes. *Biologia Plantarum*, 41: 39-48.
- Schneider, A.; Walker, S. A.; Sagan, M.; Duc, G.; Ellis, T. H. N.; Downie, J. A. (2002) – Mapping of the nodulation loci *sym9* and *sym10* of pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 1312-1316.
- Schulze-Lefert, P; Vogel, J. (2000) – Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, 5: 343-348.
- Shan, X.; Blake, T. K.; Talberg, L. E. (1999) – Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1072-1078.
- Sharma, B. (2003) – The *Pisum* genus has only one recessive gene for powdery mildew resistance. *Pisum Genetics*, 35: 22-27.
- Sharma, B.; Yadav, Y. (2003) – *Pisum fulvum* carries a recessive gene for powdery mildew resistance. *Pisum Genetics*, 35: 31.
- Sidorova, K. K. (1991) – Nitrogenase activity in pea mutants. *In Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol.1, pp. 445-447.
- Sidorova, K. K.; Shumny, V. K.; Vlasova, E.; Glianenko, M. N.; Mishchenko, T. M. (2002) – Inducing pea mutants by step mutagenesis. *Pisum Genetics*, 34: 20-22.
- Sigurbjörnsson, B. (1977) – Mutations in plant breeding programmes. *In Manual on mutation breeding*. 2^a ed., IAEA, pp. 1-6.
- Simmonds, N. W. (1981) – Principles of crop improvement. Longman Group Limited, New York, 408 pp.

- Singh, U. P.; Singh, H. B. (1983) – Development of *Erysiphe pisi* on susceptible and resistant cultivars of pea. *Transactions of the British Mycological Society*, 53:69-76.
- Smirnova, O. G. (2002) – Characteristics and inheritance of the leaf mutation *ins*. *Pisum Genetics*, 34: 34-35.
- Smith, P. H.; Foster, E. M.; Boyd, L. A.; Brown, J. K. M. (1996) – The early development of *Erysiphe pisi* on *Pisum sativum* L. *Plant Pathology*, 45: 302-309.
- Snoad, B. (1974) – A preliminary assessment of leafless peas. *Euphytica*, 23: 257-265.
- Stackelberg, M.; Lindemann, S.; Menke, M.; Riesselmann, S.; Jacobsen, H. J. (2003) – Identification of AFLP and STS markers closely linked to the *def* locus in pea. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1293-1299.
- Staskawicz, B. J.; Ausubel, F. M.; Baker, B. J.; Ellis, J. G.; Jones, J. D. J. (1995) – Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667.
- Święcicki, W. K.; Wolko, B.; Weeden, N. F.; Naganowski, B. A. (2001) – The *Pisum*, a model crop: from genetic mapping to breeding progress. 4th *European Conference on Grain Legumes*, Cracóvia, pp. 3-6.
- Tar'an, B.; Warkentin, T.; Somers, D. J.; Miranda, D.; Vanderberg, A.; Blade, S.; Woods, S.; Bing, D.; Xue, A.; Dekoeyer, D.; Penner, G. (2003) – Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1482-1491.
- Tavares-de-Sousa, M. M. (1999) – MEPRO: Programa de Melhoramento de Proteaginosas. Dissertação apresentada para concurso a investigador coordenador do INIA. ENMP, Elvas, 142 pp.
- Timmerman, G. M.; Frew, T. J.; Weeden, N. F.; Miller, A. L.; Goulden, D. S. (1994) – Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D. C.). *Theor. Appl. Genet.*, 88: 1050-1055.
- Timmerman-Vaughan, G. M.; Frew, T. J.; Weeden, N. F. (2000) – Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101: 241-247.
- Timmerman-Vaughan, G. M.; Frew, T. J.; Russel, A. C.; Khan, T.; Butler, R.; Gilpin, M.; Murray, S.; Falloon, K. (2002) – QTL mapping of partial resistance to field epidemics of *Ascochyta* blight of pea. *Crop Science*, 42: 2100-2111.
- Tiwari, K. R.; Penner, G. A.; Warkentin, T. D. (1997a) - Inheritance of powdery mildew resistance in pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 77: 307-310.
- Tiwari, K. R.; Penner, G. A.; Warkentin, T. D., Rashid, K. Y. (1997b) – Pathogenic variation in *Erysiphe pisi*, the causal organism of powdery mildew of pea. *Can. J. Plant Pathol.*, 19: 267-271.

- Tiwari, K. R.; Penner, G. A.; Warkentin, T. D. (1999) – Identification of AFLP markers for the powdery mildew resistance gene *er2* in pea. *Pisum Genetics*, 31: 27-29.
- Tiwari, K. R.; Penner, G. A.; Warkentin, T. D.; Rashid, K. Y.; Menzies, J. G. (1998) - Powdery mildew of pea: genetics of host pathogen interaction and identification of molecular markers for resistance. 3rd *European Conference on Grain Legumes*, Valladolid, pp. 120-121.
- Vaid, A.; Tyagi, P. D. (1997) - Genetics of powdery mildew resistance in pea. *Euphytica*, 96: 203-206.
- Van der Biezen, E. A.; Jones, J. D. G. (1998) – Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.*, 23: 454-456.
- Van Ooijen, J. W.; Voorrips, R. E. (2001) - JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- Vassileva, M.; Mehandjiev, A.; Naidemova, N.; Milanova, G. (1987) – Useful forms obtained by different mutagenic treatment in pea (*P. sativum*). In *Experimental mutagenesis in plants*, Plovdiv, pp. 46-49.
- Vijayalakshmi, S.; Yadav, K.; Kushwaha, C.; Sarode, S. B.; Srivastava, C. P.; Chand, R.; Singh, B. D. (2005) – Identification of RAPD markers linked to the rust (*Uromyces fabae*) resistance gene in pea (*Pisum sativum*). *Euphytica*, 144: 265-274.
- Vogel, J. P.; Raab, T. K.; Schiff, C.; Somerville, S. C. (2002) – *PMR6*, a pectase lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2995-2106.
- Vogel, J. P.; Raab, T. K.; Somerville, S. C. (2004) – Mutations in *PMR5* result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *The Plant Journal*, 40: 968-978.
- Vogel, J.; Somerville, S. (2000) – Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *PNAS*, 97: 1897-1902.
- Von Röpenack, E.; Parr, A.; Schulze-Lefert, P. (1998) - Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 9013-9022.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995) – AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- Vranceanu, A. V.; Iuoras, M. (1991) – Mutagenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding. In *Plant mutation breeding for crop improvement*. IAEA, Viena, Vol. 1, pp. 431-437.
- Walters, D.; Cowley, T.; Mitchell, A. (2002) – Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 53: 747-756.

- Wang, Z.; Weber, J. L.; Zhong, G.; Tanksley, S. D. (1994) – Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 1-6.
- Warkentin, T. D.; Rashid, K. Y.; Xue, A. G. (1996) - Fungicidal control of powdery mildew in field pea. *Can. J. Plant Sci.*, 76: 933-935.
- Weeden, N. F.; Brauner, S.; Przyborowski, A. (2002) – Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7: 657-663.
- Weeden, N. F.; Ellis, T. H. N.; Timmerman-Vaughan, G. M.; Swiecicki, W. K.; Rozov, S. M.; Berdnikov, V. A. (1998) – A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 30: 1-4.
- Weeden, N. F.; Ellis, T.H.N.; Timmerman-Vaughan, G. M.; Simon, C. J.; Torres, A. M.; Wolko, B. (2000) – How similar are the genomes of the cool season food legumes? In R. Knight (ed) *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. Kluwer Academic Publishers, pp. 397-410.
- Wellensiek, S. J. (1965) – The origin of early-flowering neutron-induced mutants in peas. In *The use of induced mutations in plant breeding*. FAO/ IAEA, Roma, pp. 393-397.
- Wei, F.; Wing, R.; Wise, R. (2002) – Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley. *The Plant Cell*, 14: 1903-1917.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. (1990) – DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Young, N. D.; Zamir, D.; Ganai, M. W.; Tanksley, S. D. (1988) – Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics*, 120: 579-585.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. (1994) – Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.