

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Identificação de marcadores moleculares ligados
ao gene de resistência ao míldio, *PpALG1* em
Brassica oleracea var *trunchuda***

(Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica)

CLÁUDIA SOFIA ARIEIRA ALABAÇA

FARO
2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**Identificação de marcadores moleculares ligados
ao gene de resistência ao míldio, *PpALG1* em
Brassica oleracea var *tronchuda***

(Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica)

CLÁUDIA SOFIA ARIEIRA ALABAÇA

ORIENTADOR : PROF. DOUTOR JOSE MANUEL PEIXOTO TEIXEIRA LEITÃO

FARO, MARÇO DE 2009

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor :

(Cláudia Sofia Arieira Alabaça)

Resumo

O míldio das Crucíferas, causado pelo oomicete *Hyaloperonospora Constant. parasitica* (Pers. Ex Fr.) (Constantinescu e Fatehi, 2002), é uma doença que afecta a família *Brassicaceae*, sobretudo as espécies do género *Brassica*. Anteriormente, tinha sido identificada uma linha de Couve Algarvia (*Brassica oleracea* var *trunchuda*) resistente ao míldio na fase adulta cuja resistência se demonstrou ser controlada por um único gene dominante, designado *PpALG1* (Monteiro et al., 2005). Este trabalho teve como objectivo a identificação de marcadores moleculares ligados ao gene *PpALG1*. Utilizando a estratégia de “Bulked Segregant Analysis” (BSA) para testar marcadores mapeados ao longo do mapa genético de *B. oleracea* concluiu-se que o gene *PpALG1* se encontra ligado no mesmo grupo de ligamento (LG3) onde se encontra localizado o gene de resistência ao míldio, *Pp523*, identificado numa linha de brócolo. A estratégia de BSA foi novamente utilizada para testar marcadores seleccionados deste grupo, bem como para identificar novos marcadores RAPD ligados ao gene em estudo. Paralelamente foram testados marcadores STS provenientes de clones BAC de *B. oleracea*, pertencentes a um contig que abarca a região genómica do locus *Pp523*. No total foram analisados 14 marcadores moleculares polimórficos que aparentavam ligação ao gene *PpALG1* nos 97 indivíduos que constituem a população de mapeamento F2. A análise de segregação destes marcadores foi efectuada utilizando o software JoinMap3.0, da qual resultou um grupo de ligamento de seis marcadores ligados ao locus da resistência *PpALG1*. Actualmente, a interacção fenotípica hospedeiro-patógeno está a ser reavaliada na população F3, avaliação a partir da qual serão constituídos novos “bulks” de DNA que permitam identificar marcadores DNA em estreita ligação ao gene *PpALG1*, condição essencial ao seu isolamento via “map-based cloning”.

Palavras-chave: Míldio, *Brassica oleracea*, genes de resistência, marcadores moleculares, mapeamento genético.

Title: “Identification of molecular markers linked to the downy mildew resistance gene *PpALG1* in ‘Couve Algarvia’ (*Brassica oleracea* var. *tronchuda*)“

Abstract

Downy mildew is a disease incited by the oomycete *Hyaloperonospora* Constant. *parasitica* (Pers. Ex Fr.) that affects the *Brassicaceae* family, especially those of the genus *Brassica*. A line of Couve Algarvia (*Brassica oleracea* var. *tronchuda*) was found to be resistant to downy mildew in plant adult stage, and after its cross with a susceptible line, it was demonstrated that this resistance was controlled by a single dominant gene, *PpALG1*. The aim of the present work was to identify molecular markers linked to this resistance gene in ‘Couve Algarvia’. Using a Bulk Segregant Analysis (BSA) strategy to test RAPD markers linked in the linkage groups of the genetic map of *B. oleracea*, the locus *PpALG1* was found to be located in the same linkage group where, previously, the dominant adult-plant downy mildew resistance locus *Pp523*, identified in broccoli, was mapped. BSA strategy was used both to identify markers mapped in this group as well as new RAPD markers linked to the locus *PpALG1*. Simultaneously STS markers from *B. oleracea* BAC clones that belong to a contig that encompasses the genomic region of the locus *Pp523* were tested as well. A total of 14 markers were found that were apparently linked to the gene *PpALG1*, and its segregation was analyzed by the software JoinMap3.0, leading to a group of six molecular markers linked to the gene *PpALG1*. The host-pathogen interaction phenotype is presently being reevaluated and new bulks of genomic DNA will be constructed in order to find new markers linked to the gene, to create a fine map of the genomic region that encompasses the *PpALG1* locus, paving the way for further map-based cloning of this resistance gene.

Key-words - Downy mildew; *Brassica oleracea*; resistance genes; molecular markers, genetic mapping.

Índice geral

Resumo	iii
Abstract.....	iv
Abreviaturas	ix
Introdução	1
Estado actual dos conhecimentos	4
Resistência genética em plantas	4
Mecanismo molecular da resistência	5
Classes dos genes de resistência	6
Organização genómica dos genes de resistência	12
Clonagem de genes de resistência	13
Mapeamento genético em <i>Brassica</i>	15
O género <i>Brassica</i>	15
Mapas genéticos baseados em marcadores moleculares.....	16
Mapeamento genético em <i>Brassica oleracea</i>	19
Mapeamento de genes de resistência a doenças em <i>Brassica</i>	20
Resistência genética ao míldio	23
O oomicete <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	23
Mapeamento e clonagem de genes resistentes ao míldio na família <i>Brassicaceae</i>	24
Resistência genética ao míldio em <i>Brassica oleracea</i>	26
Mapeamento de genes de resistência ao míldio em <i>Brassica oleracea</i>	27
Materiais e Métodos	29
Material vegetal	29
Extracção e quantificação de DNA.....	29
Preparação de bulks de DNA para realização de BSA	30
Análises moleculares	30
Análise RAPD	30
Análise ISSR	32
Análise SCAR	32

Análise CAPS.....	33
Análise AFLP.....	34
Purificação e clonagem das bandas provenientes da análise AFLP	35
Transformação de bactérias <i>E.coli XL1blue</i> MRF' por choque térmico.....	37
Seleção e confirmação de transformantes	37
Purificação dos plasmídeos.....	38
Construção do mapa genético	39
Resultados	41
Identificação de marcadores ligados ao gene de resistência ao míldio <i>Pp523</i>	41
Análises de primers STS derivados da sequência de BAC ends	44
Identificação de marcadores ligados ao locus de resistência <i>PpALG1</i> por BSA.....	47
Análise AFLP	50
Análise de ligamento	54
Discussão	60
Conclusões e Perspectivas	64
Referências bibliográficas	66
 Anexos	

Índice de figuras

Figura 1.1 – Estrutura e localização dos produtos proteicos das diferentes classes de genes de resistência.	9
Figura 1.2 – Triângulo das espécies de <i>Brassica</i>	15
Figura 1.3 – Localização cromossômica dos genes de resistência RPP que se encontram clonados em <i>Arabidopsis</i>	25
Figura 1.4 – Comparação do grupo de ligamento que abrange o gene de resistência ao míldio em brócolo Pp523 com a região genômica do topo do braço do cromossoma 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
Figura 3.5 – Mapa genético de <i>Brassica oleracea</i>	40
Figura 3.6 – Padrão molecular do marcador CAPS ScJ19/PagI.....	42
Figura 3.3 – Grupo de ligamento 3 do mapa genético de <i>B. oleracea</i>	43
Figura 3.4 – Contig composto por 96 clones BAC, que aparentemente abrangem a região genômica do locus <i>Pp523</i>	44
Figura 3.5 – Amplificação do DNA dos progenitores com primers STS derivados de BAC ends.....	45
Figura 3.6 – Padrão do corte, com "bulks" de enzimas de restrição, de marcadores STS monomórficos.....	46
Figura 3.7 – Padrões moleculares resultantes da amplificação de vários primers RAPD nos "bulks" de DNA.....	48
Figura 3.8 – Marcador polimórfico RAPD OPAA111010y, identificado por BSA com o primer OPAA11.....	49
Figura 3.9 – Autoradiografia dos marcadores AFLP obtidos por BSA.....	51
Figura 3.10 – Re-amplificação do DNA dos progenitores e dos "bulks" com a combinação de primers E-AC/M-CAA.....	51
Figura 3.11 – Sequências dos fragmentos polimórficos obtidos através da combinação AFLP AC.CAA.....	52
Figura 3.12 – Amplificação do DNA dos progenitores com os primers SCAR ScAC.CAA11953	
Figura 3.13 – Grupo de ligamento do locus de resistência ao míldio PpALG1.....	55
Figura 3.14 – Grupo de ligamento 2.....	58
Figura 3.15 – Grupo de ligamento 3 do mapa de <i>B. oleracea</i> e dois grupos de ligamento construídos no decorrer desta tese.....	59

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Genes de resistência a doenças isolados em espécies vegetais.	7
Tabela 2.2 - Mistura reactiva para a análise RAPD por PCR.....	31
Tabela 2.2 - Composição dos bulks de enzimas.	34
Tabela 2.3 - Sequência nucleotídica dos adaptadores e dos primers de pré-amplificação AFLP35	
Tabela 2.4 - Composição da mistura reactiva para a clonagem dos fragmentos de DNA.....	36
Tabela 3.3 - Marcadores RAPD seleccionados dos nove grupos de ligamento principais do mapa genético de <i>B.oleracea</i>	41
Tabela 3.4 - Sequências nucleotídicas dos pares de primers SCAR desenhados com base na sequência dos fragmentos AFLP.	52
Tabela 3.5 - Segregação dos marcadores mapeados na população de Couve Algarvia, respectivos valores de qui-quadrado (χ^2), natureza do polimorfismo e tipo de ligação.....	54
Tabela 3.6 - Frequência de recombinação entre os marcadores e o gene <i>PpALG1</i> , distância a que se encontram, tipo de ligação e natureza do polimorfismo.....	55
Tabela 3.5 - Segregação dos marcadores DNA ligados ao gene <i>PpALG1</i> nos 97 indivíduos da população.....	56
Tabela 3.6 - Frequências de recombinação e distância (cM) entre os marcadores mapeados no grupo de ligamento do gene <i>PpALG1</i>	57
Tabela 3.7 - Frequências de recombinação entre os marcadores do grupo de ligamento 2 e respectivo LOD de agrupamento.....	58

Abreviaturas

AFLP – “Amplified fragment length polymorphism”

APS – Persulfato de amónio (“ammonium persulfate”)

ATP – Adenosina trifosfato

BAC – Cromossomas artificiais bacterianos (“Bacterial artificial chromosomes”)

BC – Retrocruzamento com um dos progenitores (“Back cross”)

BR – “Bulk” resistente

BS – “Bulk” susceptível

BSA – “Bulked segregant analysis”

CAPS – “Cleaved amplified polymorphism sequence”

CC – “Coiled-coil”

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (“complementary deoxyribonucleic acid”)

cM – CentiMorgan

CrGC – “Cruciferous Genetic Cooperative”

DH – Duplo-haplóide

DNA – Ácido desoxirribonucleico (“Deoxyribonucleic acid”)

dNTP – Desoxirribonucleótidos trifosfatados (“Deoxyribonucleotide triphosphate”)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetra-acético (“Ethylenediaminetetra-acetic acid”)

EST – “Expressed sequence tag”

Gene Avr – Gene de avirulência

Gene R – Gene de resistência

IPTG – “Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside”

ISSR – “Inter simple sequence repeat”

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LGMG – Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético

LOD – “Logarithm of odds”

LRR – “Leucine rich repeats”

LZ – “Leucine zipper”

NBS – “Nucleotide binding site”

PAC – Cromossomas artificiais derivados do fago P1 (“P1 derived artificial chromosomes”)

PCR – “Polimerase chain reaction”

PK – “Protein kinase”

PR – Progenitor resistente (Couve Algarvia)

PS – Progenitor susceptível (CrGC)
QTL – “Quantitative trait loci”
RAPD – “Random amplified polymorphic DNA”
RFLP – “Restriction fragment length polymorphism”
RGA – “Resistance gene analogues”
RIL – “Recombinant inbred lines”
RLK – “Receptor like kinases”
RLP – “Receptor like proteins”
SCAR – “Sequence characterized amplified region”
SDS – “Sodium dodecyl sulphate”
SRAP – “Sequence related amplified polymorphism”
SSR – “Simple sequence repeat” ou microsatélite
STS – “Sequence tag site”
TAE – Acetato tris-EDTA
TBE – Borato tris-EDTA
TE – Tris-EDTA
TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamino
TIR – “Toll interleukin – 1 region”
TM – Motivo transmembranar
Tris – Tris(hidroximetil)aminometano
YAC – Cromossomas artificiais de leveduras (“Yeast artificial chromosomes”)

Introdução

O género *Brassica* engloba espécies bastante diversas não só a nível morfológico, como também a nível da sua utilização, no qual se incluem oleaginosas, forrageiras, ornamentais, condimentares, plantas espontâneas e hortícolas com diferentes partes comestíveis. Pertencem a este género várias espécies com grande importância económica a nível mundial, do qual se destacam a *B. oleracea* e *B. rapa*, vulgarmente conhecidas como couves ou brássicas, e as oleaginosas *B. napus*, *B. juncea* e *B. carinata* (Labana e Gupta, 1993).

As diversas subespécies de *B. oleracea* são geralmente agrupadas em: couves de cabeça (couve-repolho, couve-lombarda, couve-chinesa e couve-de-bruxelas), couves de inflorescência (couve-flor e couve-brócolo) e as couves de folhas (couve-galega, couve-tronchuda, couve-nabo, couve-nabiça).

Embora as couves de folhas representem uma pequena fracção da produção de brássicas a nível mundial, em Portugal, a produção de couve-tronchuda é significativamente importante tanto na vertente comercial como na pequena horta familiar, ultrapassando as 20 mil toneladas por ano (Almeida, 2006).

O míldio das Crucíferas, causado pelo oomicete biotrófico obrigatório *Hyaloperonospora Constant. parasitica* (Pers. Ex Fr.) Fr (Constantinescu e Fatehi, 2002), é responsável por decréscimos na produção de brássicas (Channon, 1981), particularmente de *B. oleracea* (Lucas et al., 1995). Este patógeno pode danificar ou mesmo matar plântulas nos viveiros (fase cotiledonar) e reduzir drasticamente a qualidade e produtividade na fase de planta adulta.

Para controlar os ataques de *H. parasitica* são geralmente aplicados tratamentos intensivos com fungicidas ao longo do ciclo cultural (Verme e Thakur, 1989), no entanto, já foram isolados vários mutantes deste patógeno que apresentam resistência aos princípios activos dos fungicidas utilizados (Brophy e Laing, 1992; Vishunavat et al., 1998). Por outro lado, cada vez mais os consumidores preferem produtos que não

tenham sido expostos a tratamentos químicos, tanto por razões de saúde como por razões ambientais (Jensen et al., 1999).

Devido a estes factores, a resistência genética apresenta-se como a forma mais eficaz, tanto a nível económico como a nível ambiental, para limitar os danos provocados por esta doença (Branca et al., 2005).

Ao longo do tempo têm sido identificadas diversas fontes de resistência ao oomicete *H. parasitica* na espécie *Brassica oleracea*, tanto na fase cotiledonar (Natti et al., 1967; Mahajan et al., 1995; Jensen et al., 1999; Farnham et al., 2002) como na fase de planta adulta (Natti e Atkin, 1960; Barnes, 1968; Mahajan et al., 1995; Coelho e Monteiro, 2003a), potenciando o uso destes recursos no controlo da doença.

Coelho et al., (1998) identificaram uma acessão de brócolo (*B. oleracea* var *itálica*) resistente ao míldio em fase de planta adulta controlada por um único locus, *Pp523*, o qual já se encontra geneticamente mapeado (Farinhó et al., 2004). Recentemente, Coelho e Monteiro (2003) identificaram em Couve Algarvia, também designada de couve-tronchuda (*B. oleracea* var *tronchuda*), uma linha resistente ao míldio também na fase de planta adulta. Após estudos de hereditariedade, sob condições de infecção natural, constatou-se que a resistência é conferida por um único gene dominante (Monteiro et al., 2005), que se convencionou chamar *PpALG1*.

Utilizando a mesma população F2, Couve Algarvia x CrGC, foram anteriormente realizados dois trabalhos de identificação de marcadores DNA ligados ao gene *PpALG1* (Leitão, 2005 e Sousa, 2007), no Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG). No entanto foram detectados erros na avaliação fenotípica de vários indivíduos, o que levou a uma localização errónea deste gene no mapa de *B. oleracea* desenvolvido no mesmo laboratório. Mais recentemente decidiu-se avaliar a interacção hospedeiro-patogéneo na geração F3 de forma a obter uma avaliação fenotípica no que se refere à resistência ao míldio de todos os indivíduos da população.

A presente dissertação teve como objectivo a identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao míldio *PpALG1* identificado em Couve Algarvia (*B. oleracea* var *trunchuda*).

Numa primeira fase, marcadores RAPD mapeados ao longo dos nove grupos de ligamento principais do mapa de *Brassica oleracea* construído no LGMG (Farinhó et al., 2004) foram utilizados como ponto de referência para “percorrer” o genoma de Couve Algarvia por “Bulked Segregant Analysis” (BSA), e determinar a localização genómica do gene *PpALG1*.

Numa segunda fase, utilizou-se a estratégia de BSA tanto na identificação marcadores moleculares (RAPD, ISSR e STS derivados de AFLP) seleccionados do grupo de ligamento 3 do mapa genético de *B. oleracea*, como para a identificação de novos marcadores RAPD em ligação ao gene *PpALG1*. Paralelamente pretendeu-se também identificar marcadores STS polimórficos ligados ao mesmo gene, provenientes de clones BAC de *B. oleracea* que integram um contig que abarca a região genómica do locus *Pp523* (Carlier et al., em preparação).

1 - Estado actual dos conhecimentos

1.1 - Resistência genética em plantas

No ano de 1865, Gregor Johann Mendel apresentou os seus estudos sobre a hereditariedade em ervilhas-de-cheiro (*Pisum sativum*) e os princípios fundamentais de herança de características no congresso da Brünn Natural History Society, publicados em 1866. No entanto, os seus trabalhos só foram redescobertos em 1900 por Hugo de Vries, Carl Correns e Erich von Tschermack.

Poucos anos após a redescoberta dos estudos de Mendel, Biffen (1905) demonstrou a natureza genética da resistência a doenças em plantas. O seu estudo incidiu sobre a resistência à ferrugem amarela do trigo (*Triticum aestivum*), causada por *Puccinia striiformis*, demonstrando que esta era controlada por um único gene. Alguns anos mais tarde, Stackman et al. (1918) provaram que a resistência a doenças em plantas pode ser vencida por mutações no patogéneo. Esta descoberta foi feita no estudo da resistência do trigo à ferrugem provocada por *Puccinia graminis* pv. *tritici*. No ano seguinte, McRostie (1919) quando estudava a resistência a dois isolados da antracnose em variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*), verificou que uma variedade era resistente a um isolado e susceptível a outro, constatando então, que diferentes genes podem ser responsáveis pela resistência a diferentes raças de patogéneos.

Na década de quarenta, Harold Flor, estudou não só a herança da resistência em plantas como a virulência do patogéneo. Este estudo foi realizado ao observar as interações entre o linho (*Linum usitatissimum*) e o patogéneo responsável pela ferrugem nesta espécie, o fungo *Melampsora lini* (Flor, 1947). Uns anos mais tarde, a partir dessas observações, estabeleceu o modelo clássico de gene-a-gene (Flor, 1971). Este modelo propõe que para ocorrer resistência tem que existir um par de genes complementares, isto é, um gene dominante de resistência (gene R) no hospedeiro e um gene dominante de avirulência (gene Avr) no patogéneo, sendo que a perda ou a alteração do gene R no hospedeiro ou do gene Avr no patogéneo leva à doença. Assim, a planta será resistente e o crescimento do patogéneo irá parar apenas quando ambos os genes estiverem presentes e forem compatíveis (Ellis e Jones, 1998), sendo a sua interação muito específica (Meyers et al., 2005; Salvaudon e tal., 2005; Ohtsuki e Sasaki, 2006).

1.1.1 - Mecanismo molecular da resistência

Os genes de resistência são responsáveis pela interacção entre a planta e o patógeno, activando ou não as várias respostas de defesa. Apesar da caracterização e da clonagem de vários genes de resistência, o mecanismo através do qual estes activam as respostas de defesa, ainda não é totalmente compreendido. No entanto, dados obtidos tanto através da análise genética da interacção hospedeiro-patógeno como através da análise molecular, suportam o modelo no qual os produtos dos genes R actuam como receptores para os produtos directos ou indirectos do gene Avr do patógeno (Bent e Mackey, 2007).

A resistência gene-a-gene envolve duas etapas básicas. A primeira etapa, é a percepção do ataque do patógeno, envolvendo receptores codificados pelos genes R. Estes receptores são altamente específicos para as diversas estirpes de patógenos. A segunda etapa é composta por respostas que irão limitar a doença (Ellis et al., 2000).

Nos modelos mais simples, os produtos do gene R reconhecem o produto do gene Avr do patógeno. Este reconhecimento pode ser feito tanto por interacção directa com o produto proteico codificado pelo gene Avr, como através da interacção indirecta com o produto do gene Avr ligado a outras proteínas que existam na célula vegetal (Staskawicz et al., 1995). O reconhecimento através da interacção indirecta é também conhecido como *guard-hypothesis* (Van der Biezen e Jones, 1998; Dangl e Jones, 2001; Van der Hoorn et al., 2002; Jones e Dangl, 2006). Um exemplo de interacção directa é a que envolve o gene R *Pi-ta* do arroz (*Oryza sativa* L.) e o gene Avr *Pi-ta* de *Magnaporthe grisea*, em que a proteína codificada pelo gene R se liga directamente ao produto proteico do gene Avr (Jia et al., 2000). A interacção indirecta pode ser exemplificada através do mecanismo que descreve a resistência de *Arabidopsis thaliana* à bactéria *Pseudomonas syringae* (Mackey et al., 2002). Neste caso, os produtos do gene Avr do patógeno ligam-se à proteína do hospedeiro associada à membrana, RIN4. O gene *RPM1* (gene R) é activado em resposta ao complexo proteína Avr-RIN4 ou em resposta à degradação da proteína RIN4. A redução dos níveis de RIN4, conduz à não activação do gene R e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do patógeno.

Após ocorrer o reconhecimento do patógeno por parte do hospedeiro, são accionadas respostas de defesa, normalmente a resposta hipersensitiva. Quando ocorre este tipo de resposta, as células do hospedeiro entram em morte celular programada de modo a limitar a colonização pelo patógeno. A morte celular pode ocorrer numa única célula ou em agregados de células formando áreas de tecido necróticas (Hammond-Kosack e Jones, 1996). Outras características das respostas de defesa incluem a indução da síntese de metabolitos antimicrobianos, de enzimas que poderão ser prejudiciais para o patógeno e, por vezes, também ocorre o reforço das paredes celulares das células vegetais na área infectada (Bent, 1996).

1.1.2 - Classes dos genes de resistência

Os genes de resistência são muito polimórficos e têm especificidades de reconhecimento muito diversas (Pryor e Ellis, 1993). Nas últimas décadas foram isolados, clonados e caracterizados, vários genes de resistência em diversas espécies vegetais, sobretudo em culturas com interesse agronómico (Tabela 1.1).

Diversos genes de resistência foram isolados da espécie *Arabidopsis thaliana*, planta adoptada como modelo devido às suas dimensões reduzidas, ciclo vegetativo muito curto, descendências numerosas, reduzida dimensão do genoma com poucas sequências repetitivas e facilidade de transformação e de regeneração.

A caracterização dos genes de resistência revelou que a maioria destes genes, apesar de apresentarem um elevado grau de polimorfismo, codifica proteínas similares. Com base nos motivos proteicos os genes de resistência podem ser agrupados em quatro classes principais (Tabela 1.1 e Figura 1.1).

O primeiro gene R a ser clonado e caracterizado foi o gene *Hm1* do milho (*Zea mays* L.) que confere resistência ao fungo *Cochliobolus carbonum*. A resistência é conferida através da inactivação da toxina HC produzida pelo fungo (Johal e Briggs, 1992). No entanto, estudos sobre o *Hm1* revelam não haver qualquer estrutura ou função que sugira o modelo gene-a-gene, não se verificando o envolvimento de gene Avr do patógeno na resposta deste gene R (Bent, 1996).

Tabela 1.1 - Genes de resistência a doenças isolados em espécies vegetais.

Gene	Hospedeiro	Patogéneo	Referências
Classe PK			
<i>Pto</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Martin et al., 1993
Classe NBS-LRR			
Subclasse CC-NBS-LRR			
<i>Dm3</i>	Alface	<i>Bremia lactucae</i>	Meyers et al., 1998
<i>HRT</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Turnip Crinkle Virus</i>	Cooley et al., 2000
<i>RCY1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	Takahashi et al., 2002
<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i>	Grant et al., 1995
<i>RPP13</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Bittner-Eddy et al., 2000
<i>RPP8</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>H. parasitica</i>	McDowell et al., 1998
<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i>	Bent et al., 1994
<i>RPS5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i>	Warren et al., 1998
<i>Pi36</i>	Arroz	<i>Magnaporthe grisea</i>	Liu et al., 2007
<i>Pib</i>	Arroz	<i>M. grisea</i>	Wang et al., 1999
<i>Pi-ta</i>	Arroz	<i>M. grisea</i>	Bryan et al., 2000
<i>Xa1</i>	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Yoshimura et al., 1998
<i>Gpa2</i>	Batata	<i>Globodera pallida</i>	van der Vossen et al., 2000
<i>Hero</i>	Batata	<i>G. rostochiensis, G. pallida</i>	Ernst et al., 2002
<i>R1</i>	Batata	<i>Phytophthora infestans</i>	Ballvora et al., 2002
<i>R3a</i>	Batata	<i>P. infestans</i>	Huang et al., 2005
<i>Rx1</i>	Batata	<i>Potato virus X (PVX)</i>	Bendahmane et al., 1995
<i>Rx2</i>	Batata	<i>PVX</i>	Bendahmane et al., 2000
<i>Rpi-blb1</i>	Batata selvagem	<i>P. infestans</i>	van der Vossen et al., 2003
<i>Rpi-blb2</i>	Batata selvagem	<i>P. infestans</i>	van der Vossen et al., 2005
<i>Mla1</i>	Cevada	<i>Blumeria graminis</i>	Zhou et al., 2001
<i>Mla12</i>	Cevada	<i>B. graminis</i>	Shen et al., 2003
<i>Mla13</i>	Cevada	<i>B. graminis</i>	Halterman et al., 2004
<i>Mla6</i>	Cevada	<i>B. graminis</i>	Halterman et al., 2001
<i>Pl8</i>	Girassol	<i>Plasmopara halstedii</i>	Radwan et al., 2005
<i>Rp1</i>	Milho	<i>Puccinia sorghi</i>	Collins et al., 1999
<i>Bs2</i>	Pimento	<i>Xanthomonas campestris</i>	Tai et al., 1999
<i>I2</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ori et al., 1997
<i>Mi-1.2</i>	Tomate	<i>Meloidogyne incognita, M. arenaria e M. javanica</i>	Milligan et al., 1998
<i>Mi-9</i>	Tomate	<i>Meloidogyne javanica</i>	Jablonska et al., 2007
<i>Prf</i>	Tomate	<i>P. syringae</i>	Salmeron et al., 1996
<i>Sw-5</i>	Tomate	<i>Tomato Spotted Wilt Virus (Tospovirus)</i>	Brommonschenkel et al., 2000
<i>Tm2</i>	Tomate	<i>Tomato Mosaic Virus (ToMV)</i>	Lanfermeijer et al., 2005
<i>Tm2-2</i>	Tomate	<i>ToMV</i>	Lanfermeijer et al., 2003
<i>Lr10</i>	Trigo	<i>Puccinia triticina</i>	Feuillet et al., 2003
<i>Pm3b</i>	Trigo	<i>B. graminis f.sp. Tritici</i>	Yahiaoui et al., 2004
Subclasse TIR-NBS-LRR			
<i>RPP1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>H. parasitica</i>	Botella et al., 1998
<i>RPP4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>H. parasitica</i>	van der Biezen et al., 2002

(Continua na página seguinte)

(Continuação da Tabela 1.1)

<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>H. parasitica</i>	Parker et al., 1997
<i>RPS4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i>	Gassman et al., 1999
<i>WRR4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Albugo candida</i>	Borhan et al., 2008
<i>L</i>	Linho	<i>Melampsora lini</i>	Lawrence et al., 1995
<i>M</i>	Linho	<i>M. lini</i>	Anderson et al., 1997
<i>P</i>	Linho	<i>M. lini</i>	Dodds et al., 2001
<i>N</i>	Tabaco	<i>Tobacco Mosaic Virus (TMV)</i>	Whitham et al., 1994
<i>Bs4</i>	Tomate	<i>X. campestris</i>	Schornack et al., 2004
<i>Gro1-4</i>	Tomate	<i>L. rostochiensis</i>	Paal et al., 2004
+ WRKY			
<i>RRS1-R</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Deslandes et al., 2002
Subclasse NBS-LRR			
<i>Pi2</i>	Arroz	<i>Magnaporthe grisea</i>	Zhou et al., 2006
<i>Pi9</i>	Arroz	<i>M. grisea</i>	Qu et al., 2006
<i>Piz-t</i>	Arroz	<i>M. grisea</i>	Zhou et al., 2006
<i>Cre1</i>	Trigo	<i>Heterodera avenuae</i>	Majnik et al., 2003
<i>Cre3</i>	Trigo	<i>H. avenuae</i>	Lagudah et al., 1997
<i>Hero</i>	Tomate	<i>Globodera rostochiensis</i>	Ernst et al., 2002
<i>I2C</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ori et al., 1997
Classe LRR – TM			
<i>Cf-2</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	Dixon et al., 1996
<i>Cf-4</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	Thomas et al., 1997
<i>Cf-4A</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	Takken et al., 1998
<i>Cf-5</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	Dixon et al., 1998
<i>Cf-9</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	Jones et al., 1994
<i>Cf-9B</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	Parniske et al., 1997
<i>Ve1</i>	Tomate	<i>Verticillium dahliae</i>	Kawchuck et al., 2001
<i>Ve2</i>	Tomate	<i>V. dahliae</i>	Kawchuck et al., 2001
<i>HcrVf2</i>	Maçã	<i>Venturia inaequalis</i>	Belfanti et al., 2004
Classe LRR-TM-PK			
<i>RFO1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Diener e Ausubel, 2005
<i>Pi-d2</i>	Arroz	<i>M. grisea</i>	Chen et al., 2006
<i>Xa21</i>	Arroz	<i>X. oryzae</i>	Song et al., 1995
<i>Xa26</i>	Arroz	<i>X. oryzae</i>	Sun et al., 2004
Outras classes			
Estrutura TM-CC			
<i>Rpw8</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	Xiao et al., 2001
Estrutura kin-kin			
<i>Rpg1</i>	<i>Cevada</i>	<i>Puccinia graminis</i> pv <i>triticae</i>	Brueggeman et al., 2002
Estrutura TM			
<i>mlo</i>	<i>Cevada</i>	<i>E. graminis</i>	Büsches et al., 1997
Estrutura TFII A – Transcription factor			
<i>xa5</i>	Arroz	<i>X. oryzae</i>	Iyer e McCouch, 2004
Homologia com a Nodulina MtN3			
<i>Xa13</i>	Arroz	<i>X. oryzae</i>	Chu et al., 2006
Sem homologia conhecida			
<i>Xa27</i>	Arroz	<i>X. oryzae</i>	Gu et al., 2005

[Adaptado de Liu et al (2007)]

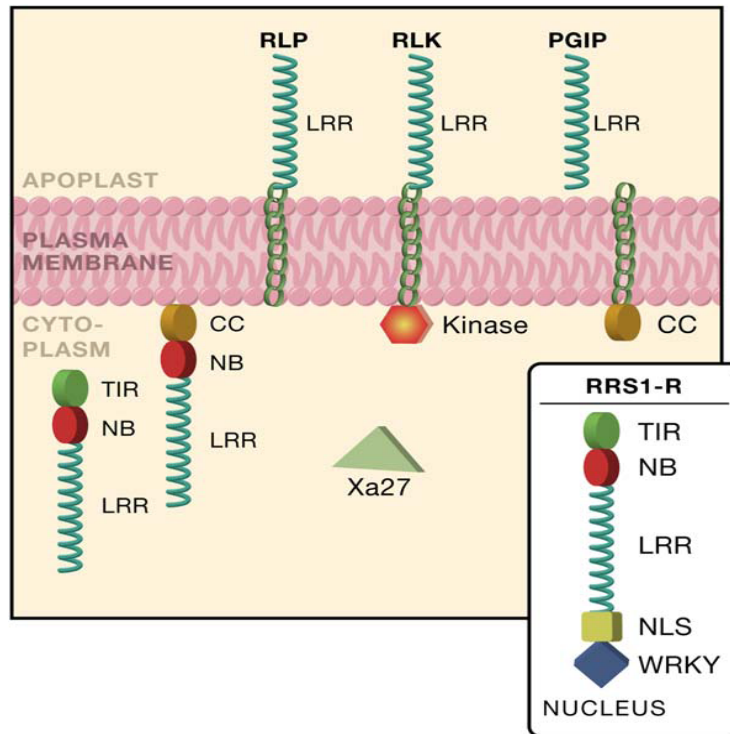


Figura 1.1 – Estrutura e localização dos produtos proteicos das diferentes classes de genes de resistência. **RLP** – “Receptor like proteins”; **RLK** – “Receptor like kinases” ; **PGIP** – “Polygalacturonase inhibiting Protein”; **TIR** - Toll-interleukin-1 receptor ; **NB** – “Nucleotide binding site”; **LRR** – “Leucine-rich repeat”; **CC** – “Coiled – coil” ; **NLS** – “Nuclear localization signal”; **WRKY** – “Plant-specific zinc-finger transcription factors”
[Adaptado de Chisholm et al. (2006)]

O primeiro gene de resistência específico para um gene *Avr* a ser isolado, que segue o modelo gene-a-gene, foi o gene *Pto* do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Martin et al, 1993), que confere resistência à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e é específico para os genes de avirulência *AvrPto* e *AvrPtoB* (Ronald et al, 1992; Kim et al, 2002).

O gene *Pto* é até ao momento o único representante da classe PK (“protein kinase”). Este gene codifica uma cinase serina-treonina citoplasmática capaz de realizar a autofosforilação requerida para ocorrer a interacção *Pto-AvrPto* (Loh et al., 1995). A proteína codificada pelo gene *Pto*, não apresenta nenhum domínio LRR (“leucine-rich repeat”) nem nenhum domínio NBS (“nucleotide binding site”), no entanto, para que o gene *Pto* desempenhe a sua função necessita do gene *Prf*. O gene *Prf* codifica uma proteína com domínios NBS, LRR e LZ (“leucine zipper”). As proteínas *Avr* interagem directamente com o gene *Pto*, enquanto este estabelece ligação com o N-terminal do gene *Prf* (Kim et al., 2002), no entanto, ainda é desconhecida a contribuição que este último gene tem na resistência mediada pelo gene *Pto* (Mucyn et al., 2006).

Os genes R isolados imediatamente após o gene *Pto*, não apresentam qualquer similaridade com este gene, no entanto, a grande maioria apresenta grandes similaridades entre si. As proteínas codificadas por estes novos genes, contêm um domínio NBS e uma região LRR, ambos citoplasmáticos, pertencendo como tal à classe NBS-LRR. Esta classe encontra-se dividida em três subclasses, consoante a sua região amino-terminal (N-terminal). Se esta região apresentar homologia com o domínio proteico do receptor Toll de *Drosophila* e com receptores “Interleucine-1” dos mamíferos, designa-se por TIR, e a subclasse é referida como TIR-NBS-LRR. Se, por outro lado, a região N-terminal apresentar estruturas “coiled-coil” (CC) ou “leucine zipper” (LZ), a subclasse designa-se por CC-NBS-LRR. A terceira subclasse é caracterizada pelo facto de não apresentar qualquer similaridade com os motivos TIR e CC. É como tal, designada por subclasse NBS-LRR. Em 2002, Deslandes et al. descreveram o gene *RRS1-R*, que confere resistência à bactéria *Ralstonia solanacearum*, em *Arabidopsis*. Este gene codifica uma proteína TIR-NBS -LRR, sendo invulgar pelo facto de apresentar na sua região carboxi-terminal (C-terminal) um motivo putativo NLS (“nuclear localization signal”) e um domínio WRKY (domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina). Este último domínio é altamente conservado, sendo composto por uma região de 60 aminoácidos que contêm no seu N-terminal a sequência WRKYGQK e um motivo “zinc-finger”, que desempenha um papel crucial na regulação das respostas de defesa das plantas (Eulgem et al., 1999; Journot-Catalino et al., 2006).

As proteínas codificadas pelos genes de resistência das classes acima descritas, não apresentam domínios transmembranares e pensa-se que todas elas se localizem no meio intracelular (Martín et al., 2003).

A classe de genes LRR-TM, também designada por RLP (“receptor-like proteins”), é caracterizada pela presença de uma região extracitoplasmática, de um domínio transmembranar (TM) e de uma pequena “tail” no seu C-terminal. Os primeiros genes desta classe a serem isolados foram os genes *Cf-X* do tomate (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9*), que conferem resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*. Posteriormente, foram também isolados do tomate os genes *Ve1* e *Ve2*, que conferem resistência ao *Verticillium dahliae* (Kawchuk et al., 2001), e que também pertencem a esta classe. Estes últimos diferem dos genes *Cf-X* pelo facto de possuírem na região N-terminal receptores que medeiam a endocitose (RME “receptor mediated endocytosis”).

Os genes pertencentes à classe LRR-TM-PK, também designada por classe RLK (“receptor-like kinases”), são caracterizados por codificarem proteínas que apresentam uma região LRR extracitoplasmática, um domínio TM e um domínio cinase citoplasmático. O primeiro gene a ser isolado pertencente a esta classe foi o gene *Xa21* do arroz que confere resistência à *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Este gene codifica uma proteína com uma região LRR extracitoplasmática, um domínio TM e um domínio cinase serina/treonina. A estrutura deste gene combina as características da classe LRR-TM e da classe do gene *Pto* do tomate. Recentemente foi incluído nesta classe o gene *Pi-d2* do arroz que confere resistência ao fungo *Magnaporthe grisea* (Chen et al., 2006). Este gene tem a particularidade de codificar uma proteína que em vez de apresentar a região LRR, apresenta um domínio lecRLK (“lectin-type”) extracitoplasmático.

Existem no entanto genes de resistência que não se enquadram em nenhuma das classes de resistência definidas até ao momento. Em *Arabidopsis*, o gene *RPW8*, que confere resistência ao oídio (*Erysiphe cruciferarum*), codifica uma proteína que não apresenta homologia com os restantes genes R. A proteína codificada por este gene é composta por um motivo CC e um domínio TM (Xiao et al., 2001). O gene *mlo* da cevada confere resistência recessiva, não específica e de largo espectro, ao oídio (*Erysiphe graminis* pv *hordei*). Este gene codifica uma proteína com uma estrutura TM (Büsches et al., 1997). Também em cevada, o gene *Rpg1*, que confere resistência ao fungo *Puccinia graminis* pv *triticae*, codifica uma proteína constituída por dois domínios cinase homólogos, não apresentando um domínio receptor evidente (Brueggeman et al., 2002). Em arroz foram identificados três genes que também não se enquadram em nenhuma das classes de genes de resistência, o gene *xa5*, *Xa13* e *Xa27*. Estes três genes têm em comum o facto de conferirem resistência ao mesmo patógeno, a *Xanthomonas oryzae*. O gene *xa5*, confere resistência recessiva e codifica uma pequena subunidade gama do factor de transcrição TFIIA γ , que é um factor eucariota ao qual não se conhece qualquer papel na resistência a doenças (Iyer e McCouch, 2004). O gene *Xa13* codifica uma proteína com homologia à nodulina MtN3 (Chu et al., 2006), e até ao momento não foi encontrada na base de dados uma proteína com homologia à proteína codificada pelo gene *Xa27* (Gu et al., 2005).

1.2 - Organização genómica dos genes de resistência

Existem diversas formas sob as quais os genes de resistência se podem encontrar organizados no genoma. Os loci R podem encontrar-se na sua forma mais simples, sendo compostos por um único gene com uma variação alélica pequena como sejam os genes de *Arabidopsis* *RPS2*, *RPM1* e *RPS4* (Ellis et al., 2000). Há alguns casos em que vários alelos distintos mapeiam num único locus e em que cada linha possui um único gene com uma especificidade de resistência distinta. Temos como exemplo o locus *L* do linho. Este locus é um dos mais estudados por ser constituído por um único gene, com treze alelos distintos, apresentando especificidades distintas de reconhecimento para diferentes raças do fungo *Melampsora lini* (Hulbert et al., 2001). No entanto, a forma de organização mais comum é em clusters complexos, formando famílias multi-gene diversas (Liu et al., 2007). O locus *Rp1* do milho é um exemplo clássico de um locus de resistência complexo. Foram identificados catorze genes dominantes que mapeiam no locus *Rp1*, conferindo resistência, com diferentes especificidades, ao fungo *Puccinia sorghi* (Richter e Ronald, 2000). Existem ainda alguns clusters de genes de resistência que contêm genes diferentes. Este é o caso do cluster ao qual pertence o gene de resistência *Pto* do tomate. Este gene pertence a um locus de cinco genes, que codificam cinases serina-treonina, e do gene *Prf*, que codifica uma proteína da classe NBS-LRR. Neste locus apenas foi mapeado um gene específico de resistência, o gene *Pto*. Tal facto, não vai de encontro aos outros loci resistentes, nos quais especificidades múltiplas de resistência ocorrem tanto como variantes alélicas de um único gene, ou como genes parálogos em clusters complexos (Lehmann, 2002).

A complexidade identificada na organização dos genes de resistência pode reflectir a evolução de diferentes especificidades a determinados patogéneos ou raças dos mesmos (Ellis et al., 1995).

Pensa-se que o maior mecanismo para a formação de novos genes de resistência e das suas especificidades de resistência engloba a duplicação e a recombinação genética, a selecção natural e a divergência de sequências nas regiões intergénicas (McDowell e Simon, 2006).

1.3 - Clonagem de genes de resistência

A maioria dos genes com interesse agronómico, incluindo os genes de resistência, apenas é conhecida pela influência que apresentam no fenótipo do indivíduo, não sendo conhecidos os seus produtos directos. Os métodos utilizados para o isolamento deste tipo de genes são dois: clonagem posicional ou baseada em mapas genéticos (“Positional cloning” ou “Map-based cloning”) e marcação com transposões ou com T-DNA (“Transposon tagging” ou “T-DNA tagging”).

O método de isolamento por marcação com transposões, baseia-se na capacidade que estes elementos de DNA possuem de se mover no genoma. Tanto a inserção do transposição como do T-DNA na sequência de um gene, provoca mutações e a inactivação deste último. A grande vantagem deste tipo de método é que o gene mutado pode ser depois facilmente clonado, utilizando como sonda a sequência conhecida do transposição ou do T-DNA, para identificar numa biblioteca genómica o clone que contém o gene de resistência alterado pela inserção do transposição. O gene *Hm1* do milho, que confere resistência ao fungo *Cochliobolus carbonum*, foi o primeiro gene de resistência a ser clonado por “transposon tagging” (Johal e Briggs, 1992). A utilização dos elementos de transposição do milho permitiu a clonagem de alguns genes de resistência, tais como, o gene *Cf-9* do tomate (Jones et al., 1994), o gene *N* do tabaco (Dinesh-Kumar et al., 1995), o gene *L6* do linho (Lawrence et al., 1995) e o gene *Rp1-D* do trigo (Collins et al., 1999). No entanto, embora esta estratégia seja eficiente, só pode ser aplicada num número reduzido de plantas, uma vez que requer um transposição bem caracterizado e que seja funcional na espécie de interesse.

O “map-based cloning” tem sido o método mais utilizado para a clonagem de genes de resistência em plantas. Este método tem por base o conhecimento prévio da localização do gene de interesse num mapa genético. Como tal, em primeiro lugar deve construir-se um mapa genético detalhado da região onde se encontra o gene alvo, saturado com marcadores moleculares estreitamente ligados a este último. Após a identificação dos marcadores moleculares são construídas bibliotecas genómicas de DNA. O gene de interesse poderá então ser localizado nestas bibliotecas por “chromosome walking”, utilizando os marcadores identificados anteriormente como pontos de referência no

genoma. O gene *Pto* do tomate, que confere resistência à bactéria *P. syringae*, foi o primeiro gene de resistência a ser isolado utilizando esta técnica (Martin et al., 1993). No entanto, a utilização de “chromosome walking” em plantas é difícil devido às grandes dimensões do genoma e ao facto deste apresentar elevada frequência de DNA repetitivo. Não obstante, a existência de mapas genéticos cada vez mais saturados, o aumento de informação sobre o genoma de plantas modelo, o mapeamento comparativo e o conhecimento da estrutura molecular de alguns genes de resistência, permitem uma abordagem cada vez mais específica. Assim sendo, estes aspectos permitem uma redução no “chromosome walking”, terminando por vezes no isolamento directo de clones genómicos que contêm o gene alvo. Este método é designado por “chromosome landing” (Tanksley et al., 1995).

A eficiência do “map based cloning” tem vindo a aumentar também devido ao aparecimento de vectores que permitem a clonagem de longos fragmentos de DNA. Tais como, cosmídeos (Collins et al., 1978), cromossomas artificiais de leveduras (“yeast artificial chromosome” – YAC) (Burke et al., 1987), cromossomas artificiais de bactérias (“bacterial artificial chromosomes” – BAC) (Shizuya et al., 1992) e derivados do fago P1 (“P1-derived artificial chromosome” – PAC) (Ioannou et al., 1994). Os vectores BAC, têm sido os vectores mais utilizados na construção de bibliotecas genómicas. Estes vectores apresentam algumas vantagens face aos outros tipos de vectores ao nível da estabilidade na preservação dos fragmentos de DNA, da baixa taxa de quimerismo clonal e da fácil manipulação (Tao et al., 1994).

Após o isolamento dos clones específicos contendo o gene de interesse, por hibridação com sondas ou através da amplificação directa de fragmentos de DNA por PCR, é necessária a comprovação do gene alvo. Esta comprovação é realizada por complementação genética em plantas transgênicas, por transformação mediante *Agrobacterium tumefaciens* ou pelo método de biolística.

1.4 - Mapeamento genético em *Brassica*

1.4.1 - O género *Brassica*

As espécies que se encontram englobadas no género *Brassica*, pertencem à mesma família Brassicaceae que inclui a planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Do género *Brassica* fazem parte várias espécies diplóides e anfidiplóides. Das cerca de quarenta espécies que o constituem, apenas seis são cultivadas. Nestas espécies estão incluídas algumas das culturas mais importantes a nível mundial, incluindo hortícolas, condimentos e sementes para obtenção de óleos.

As três espécies diplóides são a *B.rapa* (genoma AA, couve-chinesa, nabo), a *B.nigra* (genoma BB, mostarda negra) e a *B.oleracea* (genoma CC, couve-flor, brócolos, repolho, couve-de-bruxelas, couve-rábano, couve-tronchuda, etc.). As espécies anfidiplóides, originadas pelo cruzamento entre as primeiras três espécies, são a *B.junceae* (genoma AABB, mostarda castanha ou indiana), a *B.napus* (genoma AACC, colza, couve-nabo) e a *B.carinata* (genoma BBCC, mostarda da Etiópia). As relações cromossómicas entre estes genomas foram elucidadas através de cruzamentos inter-específicos e de análises meióticas (Morinaga, 1934; U, 1935) (Figura 1.2).

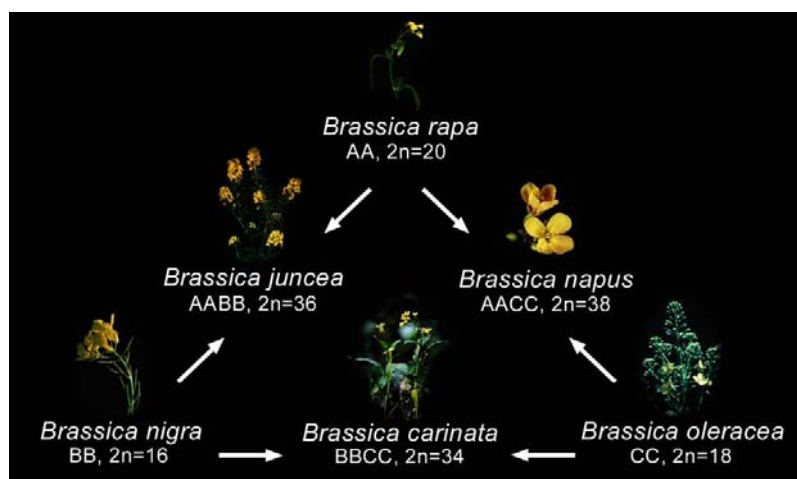


Figura 1.2 - Triângulo das espécies de *Brassica*, como foi descrito por U (1935), representando os genomas A, B e C e os anfidiplóides respectivos. [Adaptado de Snowdon, 2007]

1.4.2 - Mapas genéticos baseados em marcadores moleculares

O conceito de mapa genético foi apresentado pela primeira vez em 1913 por Alfred Sturtevant, ao ordenar de forma linear cinco factores ligados ao sexo, no cromossoma X de *Drosophila melanogaster*.

Os mapas genéticos têm por base os eventos de recombinação entre dois cromátídeos não irmãos de cada par de cromossomas homólogos, durante a meiose. As frequências de recombinação variam ao longo do cromossoma e são directamente proporcionais à distância entre o gene de interesse e os marcadores DNA mapeados.

Os recentes desenvolvimentos de diversas técnicas em biologia molecular, especialmente da “polymerase chain reaction” (PCR) (Mullis e Faloona, 1987), aumentaram significativamente a eficiência na construção de mapas genéticos e consequentemente o mapeamento de genes de resistência a doenças em plantas. A técnica de PCR permitiu o desenvolvimento de diversos marcadores DNA de alto rendimento amplificativo, tais como os “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) (Williams et al., 1990), “Inter Simple Sequence Repeats” (ISSR) (Zietkiewicz et al., 1994), “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP) (Vos et al., 1995) e “Simple Sequence Repeat” (SSR) (Gris et al., 1993). Esta técnica conjugada com a estratégia de “Bulked Segregant Analysis” (BSA) (Michelmore et al., 1991), permite a rápida identificação de marcadores em regiões específicas do genoma, por exemplo, em regiões onde residem os genes de interesse.

A estratégia por BSA tem por base a construção de dois “bulks” de DNA, um constituído pelo DNA de indivíduos resistentes (“bulk” resistente) e outro pelo DNA de indivíduos susceptíveis (“bulk” susceptível), sendo os indivíduos provenientes da mesma população segregante. Na construção dos bulks pretende-se assegurar que a única diferença entre estes seja a presença/ausência do locus do gene em estudo, de modo a que os marcadores que sejam polimórficos entre eles estejam geneticamente ligados ao gene de interesse.

Os mapas genéticos desempenham um papel importante em várias áreas da genética. Estes mapas são utilizados para localizar genes de interesse que regulam caracteres qualitativos e quantitativos (QTL - “Quantitative Trait loci”), para a sua clonagem e isolamento por “map-based cloning”, para melhoramento de variedades por selecção assistida por marcadores (MAS), e são utilizados para estudar a estrutura, origem e evolução dos genomas de várias espécies vegetais, como por exemplo das brássicas.

O mapeamento genético nas espécies do género *Brassica* tem sido fundamentalmente baseado em marcadores moleculares RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e microssatélites (SSR). Devido à proximidade entre a *A. thaliana* e as brássicas, também têm sido utilizados na construção de mapas genéticos marcadores ligados a locus de interesse e marcadores derivados de sequências de genes caracterizados nesta planta modelo. Os marcadores moleculares identificados em *Brassica*, ligados a loci de interesse, podem também ser localizados em *A. thaliana*, tendo por objectivo a localização da região genómica correspondente e seleccionar o locus mais provável de entre os genes candidatos. Juntamente com os marcadores moleculares, a informação proveniente da sequenciação completa e os dados da expressão genética disponíveis para a *A. thaliana*, existe um conjunto de dados com enorme potencial para serem aplicados na análise genética e no melhoramento das espécies do género *Brassica*. Actualmente mais de 900 marcadores moleculares disponíveis em *Brassica* e em *A. thaliana* encontram-se mapeados pelo menos em 15 mapas genéticos (Lim et al., 2007).

Para o mapeamento têm sido utilizadas principalmente populações F₂, no entanto, populações de linhas recombinantes (RILs), retrocruzamentos (BC) e linhas duplo-haplóides (DH), também têm sido utilizadas em vários trabalhos.

Actualmente existem diversos mapas genéticos para a maioria das espécies de *Brassica*.

Para *Brassica napus* existem pelo menos, 10 mapas genéticos, sendo a maioria baseada em marcadores RFLPs e na sua segregação em populações DH. O primeiro mapa genético baseado em marcadores RFLPs foi publicado por Landry et al., em 1991. Vários outros mapas foram publicados (Parkin et al., 1995; Sharpe et al., 1995; Lombard e Delourme, 2001 e Piquemal et al., 2005 entre outros), e alguns foram

alinhados entre si (Parkin et al., 2005 e Udell et al., 2005), sendo possível identificar os 10 grupos de ligamento do genoma A e os 9 grupos do genoma C. Recentemente Sun et al. (2007), construíram um mapa ultra denso desta espécie com base na segregação de marcadores SRAP (“Sequence Related Amplified Polymorphism”) numa população DH. Foram mapeados 13551 marcadores, distribuídos por 19 grupos de ligamento, 10 correspondentes ao genoma A e 9 correspondentes ao genoma C.

O primeiro mapa genético publicado de *Brassica rapa* baseado na segregação de marcadores RFLPs numa população F2, foi construído por Song et al., em 1991. Com base unicamente na segregação de marcadores RFLPs foram construídos 4 mapas (Chyi et al., 1992; Teutonico e Osborn, 1994; Matsumoto et al., 1998 e Kole et al., 1997), tendo sido também construído um mapa com marcadores RFLPs, RAPDs e isoenzimas (Nozaki et al., 1997) e um mapa integrando marcadores RFLPs, RAPDs e SSRs (Tanhuanpää et al., 1996). Recentemente, foram construídos mais dois mapas genéticos de *B. rapa*. Em 2006, Kim et al. construíram um mapa de ligamento detalhado baseado na segregação de 545 marcadores RFLPs (derivados de clones EST) e de 25 marcadores baseados em PCR numa população F2:3. Os marcadores encontram-se distribuídos por 10 grupos de ligamento com uma cobertura de 1287 cM. No ano seguinte, Choi et al. (2007) publicaram um mapa genético que serve de referência para o projecto de sequenciação de *B. rapa*. Foi utilizada uma população de 78 linhas DH. Um total de 556 marcadores dos quais 278 AFLPs, 235 SSRs, 25 RAPDs e 18 ESTs, STSs e CAPs, encontram-se mapeados e distribuídos por 10 grupos de ligamento.

São também vários os mapas genéticos publicados até ao momento de *Brassica juncea*. Utilizando populações DH foram construídos dois mapas genéticos, através da análise da segregação de marcadores RFLPs (Cheung et al., 1997b e Mahmood et al., 2003). Foi também construído um mapa com base na segregação de marcadores RAPD em 94 linhas recombinantes (RILs) (Sharma et al., 2002). Existem ainda dois mapas genéticos desta espécie, baseados em marcadores AFLPs (Lionneton et al., 2002 e Pradhan et al., 2003).

Da espécie *Brassica nigra* foram publicados dois mapas genéticos, ambos contendo essencialmente marcadores RFLP. Um dos mapas para além dos marcadores RFLP tem marcadores RAPD e isoenzimas, e foi construído com base da segregação destes numa

população F2 (Truco e Quiros, 1994). O outro mapa tem por base a segregação de marcadores RFLP numa população proveniente de um retrocruzamento (Lagercrantz e Lydiate, 1995).

1.4.3 - Mapeamento genético em *Brassica oleracea*

Desde a construção do primeiro mapa de ligamento de *Brassica oleracea*, baseado em loci de isoenzimas (Arus e Orton, 1983), foram construídos vários mapas utilizando a segregação de diversos marcadores moleculares.

Em 1990, Slocum et al. construíram o primeiro mapa genético desta espécie baseado em marcadores RFLP. Para a construção do mapa foi analisada a segregação de 258 marcadores RFLP, numa população F2 de *B. oleracea* var *italica* (brócolos) x *B. oleracea* var *capitata* (repolho). No ano de 1992, Kianian e Quiros, construíram um mapa genético composto por marcadores RFLPs, isoenzimas e caracteres morfológicos. A segregação dos marcadores foi analisada em quatro populações F2, três provenientes de cruzamentos intraespecíficos e uma proveniente de um cruzamento interespecífico. Neste mesmo mapa foram integrados 31 marcadores SSR específicos de *B. napus* (Saal et al., 2001) e 212 marcadores RFLP derivados de sondas EST (Babula et al., 2003). A segregação dos marcadores foi analisada em ambos os casos em populações F2.

Ramsay et al. (1996), publicaram um mapa genético baseado numa população proveniente de um retrocruzamento com o progenitor 'A12' de uma geração F1 entre duas linhas duplo-haplóides: 'A12' (*B. oleracea* var *alboglabra*) e GD33 (*B. oleracea* var *italica*). Estas duas linhas duplo haplóides foram também utilizadas por Bohuon et al. (1996), para a construção de um mapa genético contendo 303 RFLPs. Este mapa foi comparado com o mapa de *B. napus*, publicado por Parkin et al. (1995), sendo observada uma enorme colinearidade entre os grupos de ligamento de *B. oleracea* e os grupos de ligamento do genoma C de *B. napus*.

O mapeamento do gene de resistência ao mildio na fase de planta adulta, *Pp523*, por Farinhó et al. (2004), levou à construção de um mapa genético que compreende, para além do locus de resistência e do locus responsável pela cor da flor, 301 marcadores

AFLP, 55 marcadores RAPD, 46 marcadores ISSR, 3 marcadores SSR e 4 marcadores PCR. A sua construção teve por base a segregação destes marcadores numa população F₂, e o mapa compreende 9 grupos principais de ligamento.

Mais recentemente foi construído um mapa genético com 1257 marcadores, tendo por base a segregação destes numa população F₂ de brócolos x couve-flor (Gao et al., 2007). Os marcadores encontram-se distribuídos por 9 grupos de ligamento, que incluem um total de 1062 marcadores SRAP genómicos, 155 marcadores SRAP cDNA, 26 marcadores SSR, 3 sequências de BAC ends e 11 genes conhecidos do brócolo, incluindo o gene de resistência ao míldio em fase cotiledonar.

Um mapa genético de *B. oleracea* var *botrytis* foi publicado muito recentemente por Gu et al. (2008). Este mapa foi construído baseado na segregação de 234 marcadores AFLP e de 21 marcadores NBS (sequências conservadas NBS da classe de genes de resistência NBS-LRR), numa população F₂. Os marcadores foram mapeados em nove grupos de ligamento, sendo que cada grupo contém entre 12 a 47 loci. Os marcadores AFLP mapearam nos 9 grupos de ligamento e os marcadores NBS em oito grupos, apresentando uma organização por clusters, indicando que muitos deles podem ser RGAs (“Resistance Gene Analogues”).

1.4.4 - Mapeamento de genes de resistência a doenças em *Brassica*

As plantas encontram-se sob ameaça contínua de infecção por parte de diferentes patogéneos (fungos, oomicetes, bactérias e vírus) que utilizam diversas estratégias para as colonizar. Nos últimos anos foram construídos vários mapas genéticos, tendo por objectivo o mapeamento de genes de resistência às principais doenças em espécies vegetais.

As espécies do género *Brassica* são principalmente afectadas pelas doenças do cancro do colo, a hérnia ou potra, a podridão negra, a ferrugem branca e o míldio. Assim sendo, uma das principais aplicações dos mapas genéticos em *Brassica* é o mapeamento dos genes que conferem resistência a estas doenças.

Leptosphaeria maculans

O cancro do colo é provocado pelo fungo *Leptosphaeria maculans*, contra o qual as espécies de *Brassica* que contém o genoma B (*B. nigra*, *B. juncea* e *B. carinata*) apresentam uma resistência elevada (Rimmer e van den Berg, 1992). Como esta é uma das principais doenças que afectam a espécie *B. napus*, o mapeamento do gene de resistência a esta doença é prioritário, pelo que, existem vários mapas genéticos onde se encontram mapeados genes de resistência ao cancro do colo (Dion et al., 1995; Ferreira et al., 1995a e Pilet et al., 1998a, b, 2001).

Keri et al. (1997) utilizaram uma linha susceptível de *B. juncea* e estudaram a herança das resistências presentes em 3 acessões desta espécie, tendo concluído que a resistência é controlada por dois genes, um dominante e um recessivo. Recentemente, Christianson et al. (2006) utilizaram a mesma linha susceptível, que foi cruzada com uma linha resistente para obter uma população segregante F₂, utilizada para mapear os dois genes que controlam a resistência.

Em *B. napus* foram identificados vários genes dominantes que conferem resistência na fase cotiledonar (Ferreira et al., 1995; Mayerhofer et al., 1997 e Rimmer et al., 1999) e dois genes que conferem resistência na fase cotiledonar e na fase adulta (Zhu e Rimmer, 2003). Os estudos de mapeamento evidenciam que muitos dos genes identificados em *B. napus*, que conferem resistência a *L. maculans*, se encontram agrupados em regiões genómicas específicas.

Plasmodiophora brassicae

O fungo *Plasmodiophora brassicae* Worton é responsável por uma doença conhecida por hénria ou potra. Esta doença afecta sobretudo a espécie *B. oleracea*, cujo nível de resistência é geralmente menor que nas espécies *B. rapa* e *B. napus* (Crisp et al., 1989).

Em *B. oleracea* existem no mínimo 6 mapas genéticos, desenvolvidos com o objectivo de mapear os genes que conferem resistência a este fungo (Landry et al., 1992; Figdore et al., 1993; Grandclément e Thomas, 1996; Voorrips et al., 1997; Moriguchi et al., 1999 e Rocherieux et al., 2004). A resistência a *P. brassicae* nesta espécie parece ser

regulada quantitativamente, sob controlo poligénico, verificando-se na maioria dos casos que a resistência é regulada por um número limitado de QTLs.

Em *B. napus* considera-se que a resistência é controlada por um único locus. Kugiuchi et al. (1997) e Matsumoto et al. (1998) mapearam um único locus que regula a resistência a isolados de *P. brassicae*. Um gene dominante *Pb-Bn1* envolvido na resistência à hérnia, foi mapeado por Manzanares-Douleux et al. (2000), para esta espécie.

Em *B. rapa* foram identificados dois loci independentes que controlam a resistência à hérnia (Suwabe et al., 2003). Dois novos genes de resistência a esta doença, foram mapeados por Hirai et al. e Piao et al. (2004).

Xanthomonas campestris pv campestris

Até ao momento, existem três mapas genéticos que visam o mapeamento de genes que conferem resistência, à podridão negra provocada pela bactéria *Xanthomonas campestris pv campestris*. Em 1995, Camargo et al., publicaram um em *B. oleracea* e em 2000, Ignatov et al., mapearam um gene de resistência a esta doença em *B. rapa*. Em *B. napus*, Vicent et al. (2002) mapearam o gene de resistência *Xca4*, num grupo de ligamento pertencente ao genoma A, indicando que a resistência provém da espécie *B. rapa*.

Albugo candida

As fontes de resistência à ferrugem branca, provocada pelo oomicete *Albugo candida*, são na sua maioria reguladas por genes únicos e dominantes (Tiwari et al., 1988 e Kole et al., 1996). Encontram-se até ao momento mapeados quatro genes de resistência dominantes em *B. juncea*, que conferem resistência a diferentes variantes de *A. candida*, o gene *Acr* (Cheng et al., 1998), o gene *Ac2₁* (Prabhu et al., 1998), o gene *Ac2_t* (Mukherjee et al., 2001) e o gene *Ac2VI* (Somers et al., 2002).

O locus *ACA1*, que controla a resistência a isolados de *A. candida* raça 2, foi mapeado em *B. napus* (Ferreira et al., 1995) e em *B. rapa* (Kole et al., 1996).

1.5 - Resistência genética ao míldio

1.5.1 - O oomicete *Hyaloperonospora parasitica*

A grande maioria dos organismos pertencentes à classe Oomicota, são patogéneos com a capacidade de induzir infecções graves que devastam espécies vegetais com interesse agronómico e ecossistemas naturais (Hardham, 2007). Os oomicete incluem vários patogéneos biotróficos obrigatórios, tais como, míldios (*Bremia lactucae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Plasmopara viticola*) e ferrugem branca (*Albugo spp*), hemibiotróficos (*Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*) e necrotóxicos (*Phytophthora cinnamomi*, *Phythium spp*). Estes patogéneos estabelecem estreitas ligações com os seus hospedeiros, formando haustórios intracelulares, que são utilizados para obter nutrientes da planta. Desta forma, os patogéneos conseguem redireccionar o metabolismo do hospedeiro e suprimir as suas defesas (Thör, 2008).

O oomicete *Hyaloperonospora* Constant. *parasitica* (Pers. Ex. Fr.)Fr. (Constantinescu e Fatehi, 2002), anteriormente designado por *Peronospora parasitica*, é o causador do míldio na família *Brassicaceae*. O míldio afecta sobretudo plantas em fase cotiledonar, embora também possa afectar e causar sérios estragos em plantas em fase adulta (Lucas et al., 1995).

Em fase cotiledonar os ataques de *H. parasitica* manifestam-se pelo aparecimento de pequenas manchas amareladas sobre os cotilédones. No caso do hospedeiro ser susceptível, as infecções dos cotilédones tornam-se sistémicas, resultando na maioria das vezes na morte das plântulas. Devido a este facto, são necessários tratamentos intensivos com fungicidas, de modo a produzir plântulas saudáveis para transplantação (Verme e Thakur, 1989).

Nas plantas em fase adulta, os ataques manifestam-se nas folhas inferiores, com o aparecimento de pequenas pontuações no local de inoculação. No caso da infecção ser baixa, os ataques podem restringir-se às pontuações iniciais. No entanto, se o hospedeiro for muito susceptível, e a infecção for muito severa, as folhas apresentam

manchas cloróticas irregulares, a doença acaba por progredir na planta e as folhas superiores são infectadas pelo inoculo formado nas folhas inferiores.

O míldio provoca o enfraquecimento, a redução da adaptação das plantas hospedeiras, e consequentemente a diminuição da qualidade da produção destas. Devido a estes decréscimos é importante caracterizar a resistência genética ao oomicete *H. parasitica*, para que o conhecimento que daí advenha possa ser utilizado no controlo da doença. Tal, poderá ser a melhor solução a nível económico e ambiental (Branca et al., 2005).

1.5.2 - Mapeamento e clonagem de genes resistentes ao míldio na família *Brassicaceae*

As espécies do género *Brassica* encontram-se geneticamente próximas da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, para a qual se completou a sequenciação de todo o genoma (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), e da qual têm sido mapeados e clonados vários genes de resistência (Holub, 1997). Esta proximidade coloca as brassicas numa posição privilegiada. Geralmente é possível encontrar uma homologia de 80 a 90% entre os exões dos genes ortólogos em *A. thaliana* e *Brassica*, o que vem realçar o quão importante é o conhecimento da planta modelo para o isolamento de genes de interesse e para a caracterização das espécies de *Brassica* (Snowdon e Friedt, 2004).

A interacção *H. parasitica/A. thaliana* tem servido como modelo para o estudo das interacções hospedeiro-patógeno (Holub, 2008). Actualmente encontram-se mapeados vários genes que conferem resistência ao míldio em *A. thaliana*, encontrando-se alguns já isolados e clonados. Estes genes de resistência, designados por *RPP* (Recognition to *Peronospora parasitica*) (Crute et al., 1993) são na sua maioria genes únicos e dominantes.

O primeiro gene de resistência *RPP* a ser mapeado foi o gene *RPP5*, por Parker et al. (1993). Actualmente encontram-se mapeados 18 genes *RPP*, conferindo resistência a vários isolados de *H. parasitica* em diversas acessões de *A. thaliana* (Tör et al., 1994; Holub, 1994; Joos et al., 1996; Reignault et al., 1996; Holub e Beynon, 1997; Bittner-Eddy et al., 1999). Os genes mapeados encontram-se distribuídos por todos os

cromossomas de *A. thaliana*, no cromossoma 1 estão mapeados os genes *RPP7* (Tör et al., 1994) e *RPP9*, no cromossoma 2 o gene *RPP6*, no cromossoma 3 os genes *RPP10* (Holub e Beynon, 1996), *RPP14* (Reignault et al., 1996), o gene *RPP11* (Joos et al., 1996) e o gene *RPP13* (Bittner-Eddy et al., 1999) que foi mapeado no mesmo locus que o *RPP11*, tendo sido demonstrado por Bittner-Eddy et al. (2000), que estes dois últimos eram alélicos e que apresentavam diferentes especificidades de resistência. Os genes de resistência *RPP12* e *RPP2* (Tör et al., 1994), encontram-se mapeados no cromossoma 4, enquanto que o gene *RPP21* se encontra mapeado no cromossoma 5.

Encontram-se clonados e caracterizados 5 genes de resistência *RPP*, todos pertencentes à classe NBS-LRR, e que se distribuem pelas subclasses TIR-NBS-LRR e CC-NBS-LRR (Tabela 1). O primeiro gene a ser clonado foi o gene *RPP5* (Parker et al., 1997), seguido dos genes *RPP1* (Botella et al., 1998) e *RPP8* (McDowell et al., 1998). Aquando da clonagem do gene *RPP1*, constatou-se que no locus existiam três especificidades ligadas e agrupadas geneticamente, a que correspondem os genes alélicos *RPP1*, *RPP10* e *RPP14*. No ano de 2000, Bittner-Eddy et al., clonaram o gene de resistência *RPP13*, e dois anos depois, van der Biezen et al. (2002), clonaram o gene *RPP4*. Os genes clonados encontram-se distribuídos pelos cromossomas 3 (*RPP1* e *RPP13*), 4 (*RPP4* e *RPP5*) e 5 (*RPP8*) (Figura 1.3).

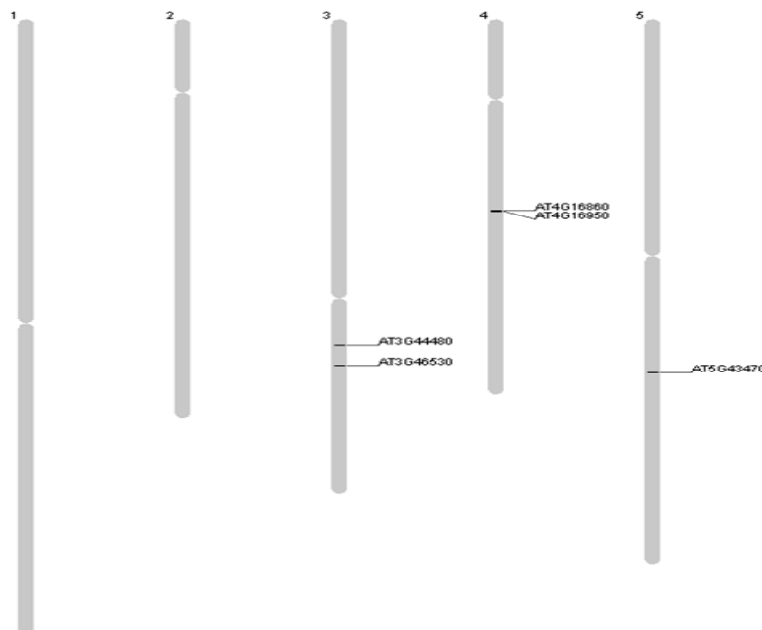


Figura 1.3 – Localização cromossômica dos genes de resistência *RPP1* (AT3G44480), *RPP13* (AT3G46530), *RPP5* (AT4G16860), *RPP4* (AT4G16860) e *RPP8* (AT5G43470) que se encontram clonados em *Arabidopsis*.

Nas espécies do género *Brassica* foram descritas algumas fontes de resistência ao míldio, no entanto não existe qualquer trabalho de mapeamento destes genes de resistência. Foram identificados genes de resistência específica ao míldio em *B. napus*, onde a resistência aparenta ser controlada por um único gene dominante (Lucas et al., 1988) ou por um ou dois genes independentes parcialmente dominantes (Nashaat et al., 1997), dependendo do genótipo do hospedeiro. Em *B. juncea*, num estudo que envolveu a infecção com diversos isolados de *H. parasitica*, Nashaat et al. (2004), concluíram que a espécie era resistente a alguns isolados, e que a resistência era conferida de forma independente por um gene único e dominante. Niu et al. (1983), constatou que a resistência, em *B. rapa*, ao *H. parasitica* é controlada por um único gene e que a resistência se manifesta através da redução da esporulação.

1.5.3 - Resistência genética ao míldio em *Brassica oleracea*

Ao longo dos tempos foram encontradas diversas fontes de resistência ao míldio em *B. oleracea* tanto na fase cotiledonar como na fase adulta.

Em 1967, Natti et al., estudaram duas fontes de resistência ao míldio em *B. oleracea* var *italica* (brócolo) em fase cotiledonar e concluíram que aparentemente a resistência era controlada por um gene único dominante. Outros estudos vieram demonstrar que a resistência em fase cotiledonar aparentava ser controlada deste modo (Mahajan et al., 1995; Jensen et al., 1999; Farnham et al., 2002). Existem no entanto estudos onde se demonstra que a resistência ao míldio em fase cotiledonar é conferida por mais do que um gene (Hoser-Krauze et al., 1995, Carvalho e Monteiro, 1996) ou então por um gene recessivo (Hoser-Krauze et al., 1987). Por exemplo, em couve-flor a resistência é regulada por dois - três genes dominantes (Moss et al., 1988) e em Couve Algarvia é conferida por dois genes dominantes (Monteiro et al., 2005).

Na fase de planta adulta também foram encontradas diversas fontes de resistência ao míldio. Foram encontradas várias acessões resistentes controladas por um gene único dominante, em brócolo (Natti e Atkin, 1960; Barnes, 1968; Coelho e Monteiro, 2003a), em repolho (Barnes, 1968), em Couve Algarvia (Monteiro et al., 2005) e em couve-flor

(Mahajan et al, 1995). Também em couve-flor foi encontrada uma acessão resistente, cuja resistência é controlada por um gene recessivo epistático (Mahajan et al., 1995).

Estudos de hereditariedade realizados por Coelho e Monteiro (2003b) em plantas adultas da linha resistente de brócolo 'OL87125', vieram confirmar que a resistência é controlada por um gene único dominante, o qual foi designado por *Pp523*.

Após a identificação da linha resistente ao míldio de Couve Algarvia (Coelho e Monteiro, 2003) foram efectuados cruzamentos com uma linha auto fecundada S3 desta planta e uma linha duplo haplóide de uma brassica de ciclo curto susceptível (CrGC). Através da análise da descendência proveniente deste cruzamento, constatou-se que a resistência é conferida por um gene único dominante (Monteiro et al., 2005), a que se convencionou chamar *PpALG1*. Foram realizados testes de complementação, onde se cruzou a linha resistente de Couve Algarvia com a linha resistente de brócolo. Os resultados deste estudo revelaram que o gene de resistência ao míldio em Couve Algarvia e o gene *Pp523* são loci diferentes (Coelho et al., dados não publicados).

1.6 - Mapeamento de genes de resistência ao míldio em *Brassica oleracea*

Os primeiros grupos de ligamento que compreendiam um locus de resistência ao míldio, foram comunicados por Farinhó et al. (2000) e por Agnola et al. (2000). Em 2002, Giovanelli et al., publicaram o primeiro grupo de ligamento que incluía um gene de resistência ao míldio em fase cotiledonar em brócolo. O grupo foi construído com base na segregação de marcadores RAPD identificados por BSA, numa população F2. Dos marcadores testados oito ficaram ligados no grupo de ligamento do gene e desses marcadores foram seleccionados dois que posteriormente foram convertidos em marcadores SCAR. Estes marcadores SCAR ficaram ligados ao locus resistente a uma distância de 6.7 e de 3.3 cM.

O primeiro gene de resistência ao míldio, na fase adulta, a ser mapeado foi o gene *Pp523* em brócolo (Farinhó et al., 2004). O grupo de ligamento que contém o gene de

resistência tem 73.2 cM, encontrando-se o gene de resistência flanqueado por seis marcadores moleculares que delimitam uma região genómica de 4.7 cM.

Mais recentemente, Farinhó et al. (2007) flanquearam o gene *Pp523* com marcadores moleculares SCAR e CAPS e, através de análises *in silico*, concluíram que as cinco sequências dos marcadores que se encontravam mais próximos do locus de resistência correspondiam a uma região genómica de *A. thaliana* conservada no topo do braço do cromossoma 1 (Fig.1.4).

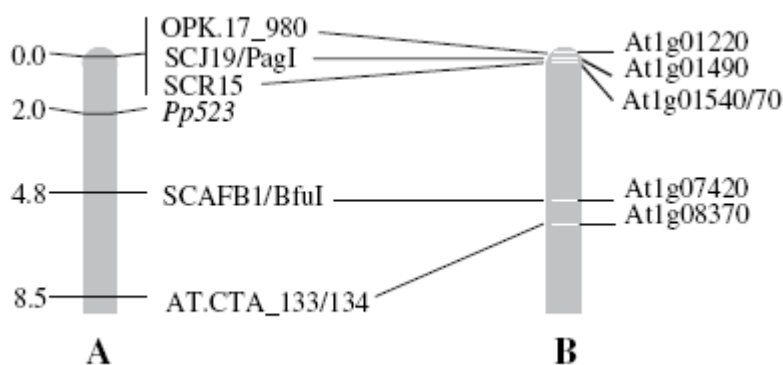


Figura 1.4 – A- Grupo de ligação que abrange o gene de resistência ao míldio em brócolo *Pp523* com um tamanho de 8,5 cM. B- Região genómica do topo do braço do cromossoma 1 de *Arabidopsis thaliana*.

[Adaptado de Farinhó et al., 2007]

Partindo de 4 marcadores que delimitam a região genómica do locus da resistência, e utilizando duas bibliotecas genómicas de *B. oleracea* do laboratório do Plant Genome Mapping Institute, University of Georgia (EUA), foram isolados alguns clones BAC aparentemente formando um contig que abrange a região genómica de interesse, onde se localiza o locus *Pp523*. Este contig encontra-se actualmente em fase de consolidação por sequenciação terminal dos clones BAC, com o intuito de um posterior isolamento e clonagem do gene *Pp523* (Leitão et al., em preparação).

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Material vegetal

No presente trabalho utilizou-se uma população de 97 plantas F2, resultantes do cruzamento entre uma linha de Couve Algarvia (PCA 12.111-2), resistente ao míldio, e uma linha duplo haplóide de ciclo curto (CrGC) susceptível a esta doença (GK97362) (gentilmente cedida pelo Dr. Graham King).

Os 97 indivíduos foram avaliados fenotipicamente em termos de resistência/susceptibilidade ao míldio, na fase de planta adulta. Estas avaliações foram realizadas em ensaios de campo efectuados na região da Batalha, e as plantas infectadas com o isolado P523 do oomicete *Hyaloperonospora parasitica*.

Os cruzamentos, a propagação e as avaliações fenotípicas ao nível da resistência foram efectuados pela equipa do Prof. Dr. António Monteiro (Instituto Superior de Agronomia, Lisboa).

2.2 - Extracção e quantificação de DNA

O DNA das 97 plantas foi extraído de amostras foliares, segundo o protocolo que tem por base a utilização de fenol e de clorofórmio (Sambrook et al., 1989), optimizado para *B. oleracea*.

Num almofariz macerou-se aproximadamente 1 g de tecido de folhas frescas em azoto líquido. O macerado foi depois adicionado a 5 ml de tampão de extracção (200mM Tris pH 8.0, 250mM de NaCl, 25 mM de EDTA pH 8.0 e 1% de SDS), e sujeito a um tratamento para eliminação de RNA, por incubação a 37°C durante 1 hora com 20 µg/ml de RNase (Ribonuclease A, Sigma). Após centrifugação durante 10 minutos a 5000 r.p.m à temperatura ambiente, o sobrenadante foi submetido a três extracções sucessivas com igual volume de fenol, fenol:chisam e chisam (mistura de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico).

Para a precipitação de DNA foi adicionado ao sobrenadante igual volume de isopropanol, invertendo o tubo cuidadosamente várias vezes até à formação de um novelo de DNA, procedendo-se depois a uma nova centrifugação a frio (10 minutos, 5000 r.p.m., 4°C). Posteriormente descartou-se o sobrenadante, e adicionou-se ao DNA precipitado etanol a 75%, seguindo nova centrifugação. O precipitado foi então seco no excicador ligado a sistema de vácuo, e ressuspenso em TE (10mM de Tris e 1mM de EDTA a pH 8.0).

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria de UV, a um comprimento de onda de 260nm (Sambrook et al., 1989). Foram preparadas diluições de trabalho a uma concentração final de 4 ng/µl.

2.3 - Preparação de bulks de DNA para realização de “Bulked Segregant Analysis” (BSA)

Prepararam-se dois bulks de DNA, com o intuito de se proceder à identificação de marcadores por “Bulked segregant analysis” (BSA) (Michelmore et al., 1991). Numa primeira fase do trabalho para preparar os “bulks” juntaram-se as amostras de DNA de 16 indivíduos F2 resistentes (“bulk” de DNA resistente) e de 16 indivíduos F2 susceptíveis (“bulk” de DNA susceptível).

Para as análises AFLP, foram elaborados dois novos “bulks”, a partir de DNA pré-amplificado de nove indivíduos resistentes e oito indivíduos susceptíveis. Numa segunda fase do trabalho, estes novos “bulks” foram também utilizados com outras técnicas de marcadores DNA: RAPD e ISSR.

2.4 - Análises moleculares

2.4.1 - Análise RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

Com o intuito de serem identificados marcadores RAPD polimórficos entre os “bulks” de DNA foram utilizados primers de 10 nucleótidos (decâmeros) e primers não convencionais com mais de 10 nucleótidos.

Os primers de 10 nucleótidos utilizados são comercializados pela “Operon Technologies” (Alameda, CA, USA). Cada kit contém 20 primers, tendo sido testados 11 kits OP completos (AA, AB, AC, AD, AE, AK, AL, AM, AN, AO e Z), e 11 primers do kit OPY (Anexo I).

Foram também testados primers RAPD de 10 nucleótidos, que amplificaram marcadores mapeados no grupo de ligamento 3 (Figura 1.4), onde se encontra o locus *Pp523* de resistência ao míldio.

As reacções de amplificação utilizando os primers convencionais foram realizadas num termociclador Biometra® UNOII. O programa de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 1 minuto e 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de “annealing” a 36°C, 1 minuto de alongamento a 72°C e um ciclo final de extensão a 72°C durante 10 minutos.

Como primers não convencionais foram utilizados primers longos (16- 21 nucleótidos) desenvolvidos no laboratório para outros trabalhos (Anexo II). As reacções de amplificação utilizando primers não convencionais foram realizadas num termociclador Biometra® T-gradient. O programa de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo inicial de desnaturação durante 2 minutos e 30 segundos a 94°C, seguido de 5 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de “annealing” a 42°C e 30 segundos de alongamento a 72°C. Após estes 5 ciclos são realizados mais 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de “annealing” a 54°C, 30 segundos de alongamento a 72°C e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C. As reacções de amplificação foram realizadas num volume total de 15µl da mistura reactiva, cuja composição se encontra descrita na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Mistura reactiva para a análise RAPD por PCR.

Mistura reactiva	Volume (µl)	Concentração final
DNA genómico (4 ng/µl)	5	20ng
Primer (10µM)	1	0,67µM
Taq Buffer Green (5x)	3	1x
MgCl ₂ (25mM)	1	1,67mM
dNTPs (10mM)	0,2	0,13mM
Taq DNA Polimerase (5U/µl)	0,1	0,03U
Água MilliQ esterilizada	4,7	-
Total	15	

Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose de 2% (p/v), usando como electrólito uma solução de Tris -Ácido acético -EDTA (TAE) 1x a pH 8, a uma diferença de potencial de 5 V/cm. Os géis foram revelados por imersão sucessiva numa solução de brometo de etídeo e em água desionizada. Foram depois fotografados com uma câmara digital “Kodak EDAS 120” sob transiluminação com radiação Ultravioleta. As imagens foram então visualizadas em computador através do software “1D Analysis Software” v.2.0.1 (Eastman Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, US). O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi estimado utilizando o marcador de peso molecular “Gene Ruller DNA Ladder Mix” (MBI, Fermentas).

2.4.2 - Análise ISSR (“Inter Simple Sequence Repeat”)

Foram analisados marcadores ISSR que se encontram mapeados no mapa de *B. oleracea* (Farinhó et al., 2004), no grupo de ligamento onde se encontra o gene de resistência ao míldio, *Pp523*. As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador Biometra® T-Gradient, e o programa de amplificação utilizado composto por um ciclo inicial de 4 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos desnaturação de a 94°C, 45 segundos de “annealing” a 52°C, 2 minuto de alongamento a 72°C e um ciclo final de extensão com a duração de 7 minutos a 72°C. A composição da mistura reactiva é igual à utilizada nas reacções de amplificação de primers RAPD.

A separação, coloração e visualização dos fragmentos gerados foi efectuada como o descrito para a análise RAPD.

2.4.3 - Análise SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”)

Para esta análise foram utilizados primers de marcadores SCAR anteriormente mapeados em *Brassica oleracea* (Farinhó et al., 2004), primers SCAR mapeados em trabalhos anteriores de Couve Algarvia (Sousa, 2007) e primers derivados das sequências terminais de clones BAC de duas bibliotecas genómicas de *B. oleracea*. As análises foram efectuadas em três etapas. Numa primeira fase, os primers foram testados com DNA dos progenitores, Couve Algarvia e CrGC, de modo a identificar marcadores

polimórficos. Numa segunda fase, os primers que amplificaram marcadores polimórficos, foram testados com o DNA de 10 indivíduos resistentes e de 10 indivíduos susceptíveis, de forma a obter uma primeira indicação da ligação dos marcadores ao locus da resistência. Numa terceira fase os primers que aparentemente amplificaram marcadores geneticamente ligados à resistência, foram utilizados para amplificar toda a população F2.

As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador Biometra® UNOII, utilizando o seguinte programa de amplificação: 1 ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de “annealing” a 55-65°C, 1 minuto de alongamento a 72°C e um ciclo final de extensão com a duração de 10 minutos a 72°C. A composição da mistura reactiva é igual à utilizada na amplificação de primers RAPD.

A separação, coloração e visualização dos fragmentos amplificados foi efectuada de forma similar ao descrito para a análise RAPD, à excepção da percentagem de gel de agarose que para a análise de alguns marcadores foi de 3% ou 4% (p/v).

2.4.4 - Análise CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”)

Nos casos em que os primers SCAR amplificaram fragmentos de DNA monomórficos entre os progenitores, procedeu-se ao corte destes fragmentos com bulks de enzimas de restrição. Os cortes enzimáticos foram realizados com o intuito de gerar marcadores CAPS polimórficos.

As enzimas de restrição (Fermentas – Life Sciences) foram organizadas em “bulks” tendo em conta o tampão de reacção que estas necessitam, conjugado com a temperatura e tempo de incubação específicos para cada uma. A constituição dos bulks encontra-se descrita na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição dos bulks de enzimas.

Bulks de enzimas	Enzimas de restrição
Bulk I	Alu I
	RSA I
Bulk II	Bcu I
	Nhe I
	Hinc II
	Bsu 15I
Bulk III	Bfu I
	Mlu I
	Not I
	Mbo I

Para proceder às reacções de corte adicionou-se 1 µl de produto de PCR (quantidade que pode variar consoante a intensidade do fragmento amplificado), 0,15 µl de cada enzima (10U), 3 µl ou 6 µl de tampão (10x) consoante as necessidades das enzimas (1x ou 2x, respectivamente), perfazendo até ao volume total de 30 µl com água MilliQ esterilizada. As reacções enzimáticas foram incubadas a 37°C durante pelo menos 1 hora e 30 minutos (condições que podem variar consoantes as especificações das enzimas). Após a incubação, as misturas reactivas foram precipitadas com 3 volumes de etanol 100% gelado e incubadas a -20°C “over-night”. Após a incubação a frio, centrifugaram-se a 4°C, durante 15 minutos a 14 000 r.p.m.. Após secagem à temperatura ambiente o “pellet” foi ressuspenso em 10 µl de água MilliQ esterilizada e adicionou-se 1 µl de tampão com azul de bromofenol. Os fragmentos derivados dos cortes enzimáticos foram avaliados por electroforese em gel de agarose 3% (p/v), nas condições anteriormente descritas para este tipo de géis.

2.4.5- Análise AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism)

As análises AFLP foram realizadas utilizando os kits “AFLP™ Analysis System I e II” produzidos e comercializados pela Life Technologies, Invitrogen. Todo o processo de restrição, ligação dos adaptadores, pré-amplificação e amplificação foi efectuado seguindo os procedimentos standardizados do fabricante (Vos et al., 1995). As amostras de DNA dos progenitores e dos indivíduos pertencentes aos bulks de DNA (BSA), foram digeridas pelas enzimas de restrição EcoRI (5' – G[↓]AATTC – 3') e MseI (5' – T[↓]TAA – 3'). Os fragmentos de DNA obtidos na digestão, foram então ligados a

adaptadores específicos e posteriormente pré-amplificados com os primers EcoRI+A e MseI+C (Tabela 3.4).

Tabela 2.3 - Sequência nucleotídica dos adaptadores e dos primers de pré-amplificação AFLP.

Adaptador EcoR I	5' – CTCGTAGACTGCGTACC – 3' 3' – CATCTGACGCATGGTTAA – 5'
Adaptador Mse I	5' – GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT – 5'
Pré-amp. primer EcoRI +A	5' – GACTGCGTACCAATTCA – 3'
Pré-amp. primer MseI +C	5' – GATGAGTCCTGAGTAAC – 3'

Foram testadas duas combinações de primers, a combinação E-AA/M-CTG e a combinação E-AA/M-CAA, por “Bulked Segregant Analysis”. Para detecção por autorradiografia, os primers EcoRI foram marcados na extremidade 5' com radioactividade, por transferência de [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP a 370 MBq/ml (10 mCi/ml) (Amersham Biosciences), segundo o protocolo descrito no kit pelo fabricante (Invitrogen).

Os produtos amplificados foram separados em condições desnaturantes, por electroforese em gel de poliacrilamida (7.5 M de ureia, TBE 1x e 6% de poliacrilamida (Page I SGS, Long Range, Cambrex Bio Science), polimerizado com 3,3 mM APS e 0,07% TEMED), em tina vertical a 45W durante 2 horas e 30 minutos. Posteriormente os géis foram secos a 80°C durante 1 hora sobre papel 3MM (Whatman), sob vácuo num secador de géis e postos em contacto com uma chapa de raio X (X-OMAT AR5, Kodak), durante 24 – 72 horas, dependendo do sinal radioactivo. As chapas foram reveladas com revelador e fixador Kodak GBX.

2.4.5.1 - Purificação e clonagem das bandas provenientes da análise AFLP

Após o período de exposição, as chapas autorradiográficas e os géis foram perfurados simultaneamente em diferentes pontos antes de serem retirados das cassetes, para marcar a sua posição relativa de modo a posição exacta. Após observação das autorradiografias em mesa de luz branca, as bandas polimórficas entre os bulks, foram alinhadas com o respectivo gel de poliacrilamida, e com auxílio de um alfinete

delimitaram-se as tiras de gel correspondentes ao polimorfismo encontrado. Em seguida, estas foram cortadas com um bisturi e submersas em 50µl de TE (10 mM Tris e 0,1mM EDTA, pH 8) a 4°C, durante a noite.

Os fragmentos polimórficos foram re-amplificados com as combinações de primers que lhes deram origem. A reacção de amplificação foi realizada para um volume de 50µl, contendo tampão Taq 1x, 1,67mM de MgCl₂, 0,13mM de dNTP's, 0,03 U de Taq polimerase, 27,8 ng de primer EcoRI, 26,8 ng de primer MseI e 5 µl de amostra de DNA. O termociclador Biometra (T-Gradient), foi programado para um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C, e os produtos de PCR resultantes foram purificados utilizando o kit Perfectprep®Gel Cleanup da Eppendorf.

Uma alíquota do DNA purificado, foi analisada por electroforese em gel de agarose 1,4% (p/v), com o objectivo de confirmar o tamanho dos fragmentos purificados e a qualidade da purificação.

A ligação dos produtos de PCR purificados no vector “pGEM[®]-T-Easy” (Promega) foi realizada na presença de T4 DNA ligase over-night a 4°C, segundo o protocolo “pGEM[®]-T-Easy and pGEM[®]-T-Easy Vector Systems” (Promega), utilizando a mistura reactiva descrita na Tabela 2.3. Este vector contém o gene *lacZ*, cuja sequência ao ser interrompida pela ligação do “insert”, torna o gene inoperacional permitindo proceder à selecção branco (transformadas) /azul (não transformadas) das colónias na presença de β – galactosidase, de IPTG e do substrato X-gal.

Tabela 2. 4- Composição da mistura reactiva para a clonagem dos fragmentos de DNA.

Mistura reactiva	Reacção normal	Controlo positivo	Controlo padrão
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	5 µl	5 µl	5 µl
“pGEM [®] -T-Easy Vector” (50ng)	1 µl	1 µl	1 µl
Produto PCR	3 µl	-	-
“Control insert DNA”	-	2 µl	-
T4 DNA ligase (3U/ml)	1 µl	1 µl	1 µl
Água MilliQ esterilizada	-	1 µl	3 µl
Total	10 µl	10 µl	10 µl

2.4.5.2 – Transformação de bactérias *E.coli XL1blue* MRF' por choque térmico

Para a transformação de bactérias utilizou-se 5 µl de produto da reacção de ligação que foi adicionado a 50 µl de células competentes *E.coli XL1blue* MRF', mantidas em gelo, e misturou-se suavemente. Incubou-se a mistura durante 20 minutos em gelo e ao fim desse tempo transferiu-se rapidamente a mistura para o banho-maria a 42°C durante 90 segundos, transferindo-se de seguida para o gelo durante 2 minutos. Após este tempo, adicionou-se 900 µl de meio SOC à temperatura ambiente e incubou-se durante 1 hora a 37°C sob agitação.

Plaquarem-se 100 µl de cada cultura de transformação em placas de Petri, preparadas previamente com meio sólido LB, ampicilina (50µg/ml), tetraciclina (25 µg/ml), IPTG e X-Gal, e incubaram-se “over-night” a 37°C.

2.4.5.3 – Selecção e confirmação de transformantes

A selecção das colónias que continham o vector de clonagem realizou-se tendo por base a resistência à ampicilina que é conferida pelo gene de resistência presente no vector de clonagem. Para diferenciar as colónias que continham o plasmídeo com o fragmento inserido das que continham o plasmídeo sem o fragmento inserido observou-se a coloração das colónias, branca (com “insert”) e azul (sem “insert”).

A confirmação das colónias que continham o “insert” de interesse realizou-se através de amplificação PCR, directamente das colónias seleccionadas, utilizando os primers que deram origem aos fragmentos de interesse. Para tal, picou-se a colónia e transferiu-se para tubos PCR, onde se adicionou a restante mistura reactiva.

A presença e a dimensão esperada dos “inserts” clonados, foi avaliada em electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

2.4.5.4 – Purificação dos plasmídeos

A purificação dos plasmídeos contendo o fragmento de interesse foi realizada através do método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Para a realização deste método as colónias foram cultivadas “overnight” em 10 ml de meio LB com ampicilina, a 37°C sob agitação, até atingirem a densidade óptica adequada ($DO_{600}=1.5$ a 2). Quando tal aconteceu, centrifugaram-se os 10 ml de cultura bacteriana a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante, e ressuspendeu-se o “pellet” em 200µl de solução I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA, pH 8.0) arrefecida em gelo usando o vortex. A mistura foi então transferida para um tubo “eppendorf” esterilizado e adicionou-se 400µl de solução II (0.2 N NaOH e 1% SDS) preparada no momento, misturaram-se as soluções invertendo o tubo cinco vezes e guardou-se em gelo. Adicionou-se 300µl de solução III (5 M de Acetato de Potássio, Ácido acético glacial e água) arrefecida em gelo e com o tubo invertido, misturaram-se as soluções usando o vortex durante 10 segundos, guardando-os de imediato em gelo durante 5 minutos. Centrifugou-se a frio (13000 rpm, 5 minutos a 4°C), o sobrenadante transferiu-se para um tubo arrefecido, adicionou-se RNase A, a uma concentração final de 250 µg /ml e incubou-se em estufa a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se igual volume de uma solução de fenol:chisam e centrifugou-se a frio (13000 rpm, 2 minutos a 4°C) o sobrenadante foi transferido para um novo tubo “eppendorf” arrefecido, adicionou-se igual volume de chisam seguindo-se nova centrifugação, e voltando a transferir o sobrenadante para um novo tubo “eppendorf”. Para a precipitação do DNA adicionou-se dois volumes de etanol à temperatura ambiente, misturou-se usando o vortex, deixou-se repousar em gelo 10 a 15 minutos. Centrifugou-se a frio (13000 rpm, 10 minutos a 4°C), descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o “pellet”. Após a secagem, o “pellet” foi lavado com 1 ml de etanol fresco (75%), removendo o sobrenadante como referido anteriormente. Quando o “pellet” secou, ressuspendeu-se em 50 µl de água MilliQ esterilizada e conservou-se a -20°C.

2.5 - Construção do mapa genético

A segregação dos marcadores foi analisada através da fotografia dos géis de agarose, e os dados introduzidos num ficheiro Excel de acordo com a nomenclatura utilizada pelo software JoinMap 3.0 (van Ooijen and Voorrips, 2001):

- A: Homozigótico para o progenitor susceptível (CrGC)
- B: Homozigótico para o progenitor resistente (Couve Algarvia)
- H: Heterozigótico
- C: Não homozigótico para o progenitor susceptível (CrGC)
- D: Não homozigótico para o progenitor resistente (Couve Algarvia)
- : Genótipo desconhecido

A análise de ligamento entre os marcadores e a ordenação dos marcadores em cada grupo de ligamento foi efectuada com o programa JoinMap 3.0. A concordância entre o padrão de segregação observado em cada marcador e o padrão de segregação esperado mendeliano (3:1, no caso de marcadores dominantes e de 1:2:1, no caso de marcadores codominantes), foi determinada através do teste estatístico do qui quadrado (χ^2). Os grupos de ligamento foram estabelecidos com um LOD ≥ 2 , e as distâncias genéticas entre os marcadores foram calculadas usando a função de Kosambi (1944), em centiMorgans (cM).

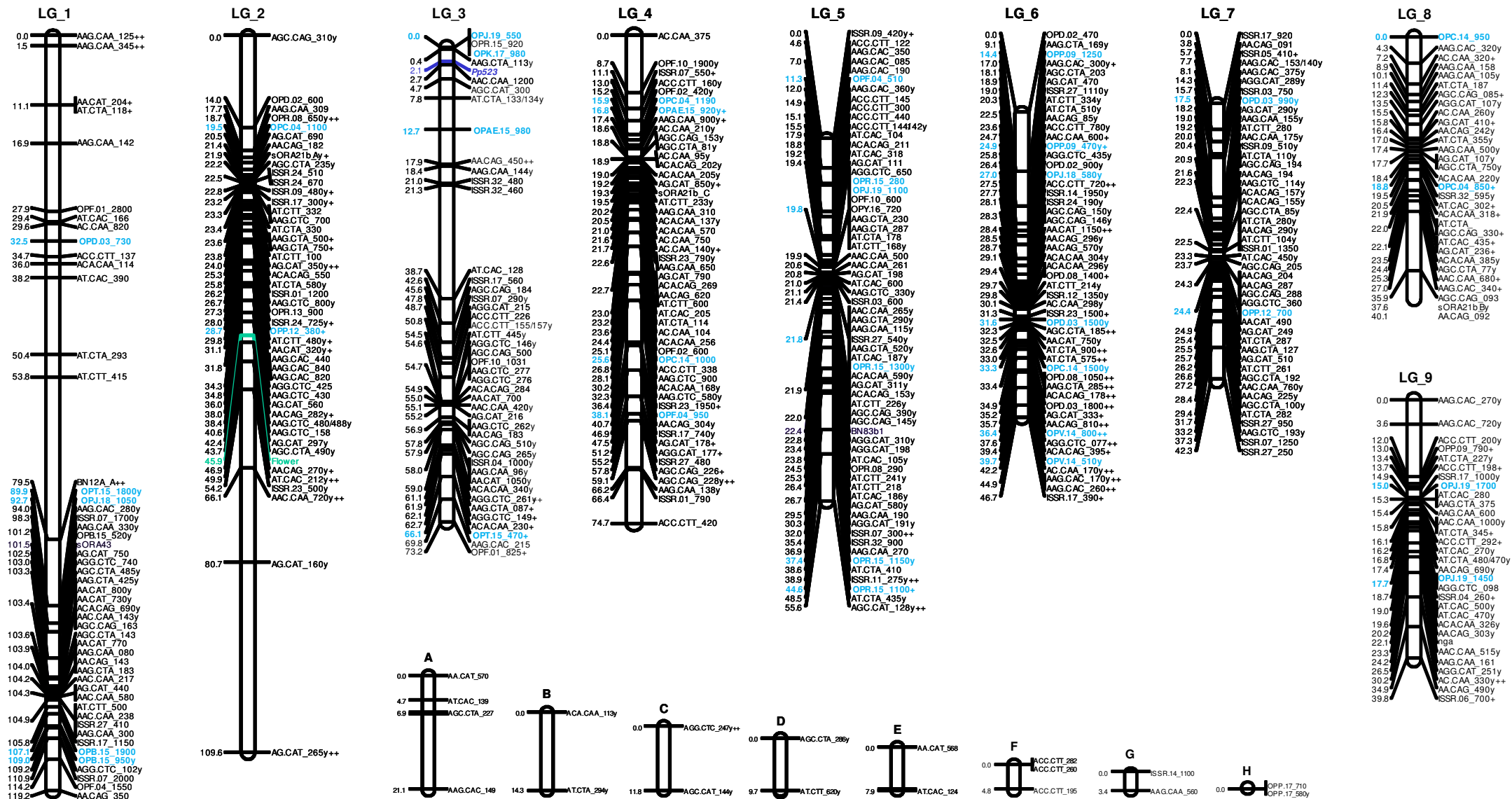


Figura 3.1 - Mapa genético de *Brassica oleracea*, composto por nove grupos de ligamento principais (LG_1-LG_9) e oito secundários (A-H). Note-se que no grupo de ligamento 3 (LG3) se encontra mapeado o gene de resistência ao míldio em brócolo *Pp523*. A azul encontram-se os marcadores seleccionados para serem testados por BSA para eventual ligação ao gene *PpALG1*. (Adaptado de Farinhó et al., 2004)

3 - Resultados

3.1 - Identificação de marcadores ligados ao gene de resistência ao míldio

Pp523

Para iniciar a identificação de marcadores ligados ao gene de resistência ao míldio em Couve Algarvia, *PpALG1*, utilizamos o mapa genético de *Brassica oleracea*, desenvolvido no Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (Farinhó et al, 2004) no qual seleccionamos vários marcadores moleculares ao longo dos nove grupos de ligamento principais (Fig. 3.1. e Tab. 3.1).

Para evitar a análise de segregação de todos marcadores seleccionados na população F2 (Algarvia x CRGC) estes foram, numa primeira fase, testados em dois “bulks” de DNA genómico, um “bulk” de DNA de plantas resistentes e um segundo “bulk” de DNA de plantas susceptíveis, seguindo uma estratégia de “Bulked Segregant Analysis” (BSA) (Michelmore et al., 1991).

Tabela 3.1 - Marcadores RAPD seleccionados dos nove grupos de ligamento principais do mapa genético de *B.oleracea* (Farinhó et al., 2004), para serem testados em Couve Algarvia, grupos de ligamento onde se encontram mapeados e primers que os geraram.

Primer	Marcadores	Grupo de ligamento	Primer	Marcadores	Grupo de ligamento
OPAE15	OPAE15 ₉₈₀	LG3	OPJ19	OPJ19 ₁₇₀₀	LG9
	OPAE15 _{920y}	LG4		OPJ19 ₁₄₅₀	
OPB15	OPB15 ₁₉₀₀	LG1		OPJ19 ₁₁₀₀	LG5
	OPB15 _{950y}			OPJ19 ₅₅₀	LG3
OPC04	OPC04 ₁₁₀₀	LG2	OPK17	OPK17 ₉₈₀	LG3
	OPC04 ₁₁₉₀	LG4	OPP09	OPP09 ₁₂₅₀	LG6
	OPC04 ₈₅₀	LG8		OPP09 ₇₉₀	LG9
OPC14	OPC14 ₁₀₀₀	LG4	OPP12	OPP09 _{470y}	LG6
	OPC14 _{1500y}	LG6		OPP12 ₇₀₀	LG7
	OPC14 ₉₅₀	LG8	OPP12 ₃₈₀	LG2	
OPD03	OPD03 ₇₀₃	LG1	OPR15	OPR15 ₁₁₀₀	LG5
	OPD03 _{1500y}	LG6		OPR15 ₂₈₀	
	OPD03 _{990y}	LG7		OPR15 _{1300y}	
OPF04	OPF04 ₁₅₅₀	LG1		OPR15 _{1150y}	
OPF04	OPF04 ₉₅₀	LG4	OPT15	OPT15 ₄₇₀	LG3
	OPF04 ₅₁₀	LG5		OPT15 _{1800y}	LG1
OPJ18	OPJ18 ₁₀₅₀	LG1	OPV14	OPV14 ₈₀₀	LG6
	OPJ18 _{580y}	LG6		OPV14 _{510y}	

Esta análise prévia permitiu identificar o marcador RAPD OPJ19₅₅₀ que amplificou no “bulk” de DNA de plantas resistentes e se encontrava ausente no “bulk” de DNA de plantas susceptíveis. Este marcador foi em seguida analisado em toda a população F₂, apresentando-se ligado ao gene *PpALG1* com o qual exibe uma frequência de recombinação de 0,251.

O marcador RAPD OPJ19₅₅₀ tinha sido previamente identificado (Farinhó et al, 2004) em estreita ligação ao gene *Pp523*, que confere resistência ao míldio em brócolo, e mais tarde transformado (Farinhó et al., 2007) no marcador co-dominante CAPS ScJ19/PagI que se encontra localizado a 1.1 cM deste gene de resistência.

Tendo-se verificado que o marcador co-dominante CAPS ScJ19/PagI se apresentava polimórfico entre os progenitores Couve Algarvia e CrGC (Fig. 3.2a), este foi em seguida analisado em todos os indivíduos da população F₂ (Fig. 3.2b). Este marcador encontra-se ligado ao gene *PpALG1* com uma frequência de recombinação de 0,226.

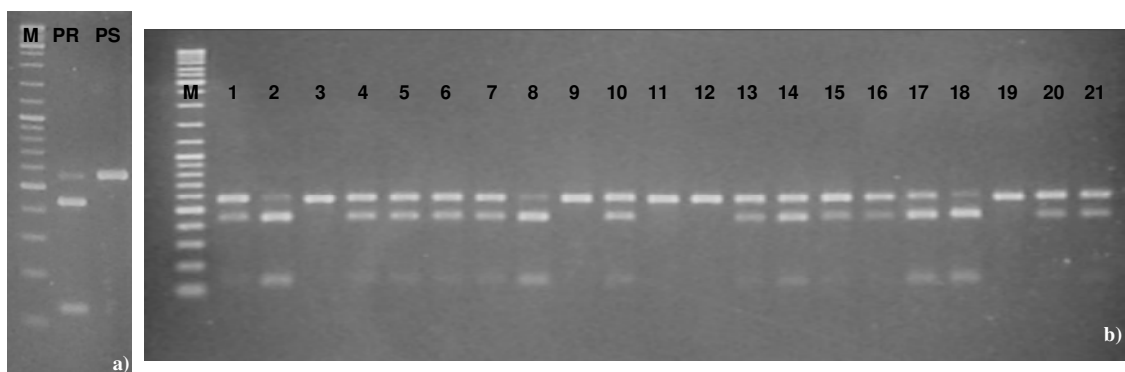


Figura 3.2 - Padrão molecular do marcador CAPS ScJ19/PagI nos progenitores (a) e em alguns indivíduos da população (b). **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC, **1-21**- Indivíduos da população F₂ e **M**- Marcador molecular de 100 pb.(gel de agarose 3% (p/v))

Tendo por base esta análise preliminar, a procura de marcadores polimórficos adicionais ligados ao gene de resistência *PpALG1* focou-se no grupo de ligamento 3 do mapa genético de *B. oleracea* (Fig. 3.3). Neste grupo de ligamento foram seleccionados 5 marcadores RAPD, 4 marcadores ISSR e 2 marcadores STS derivados de marcadores AFLP, para serem analisados inicialmente nos progenitores, Couve Algarvia e CrGC, e nos dois “bulks” de DNA genómico.

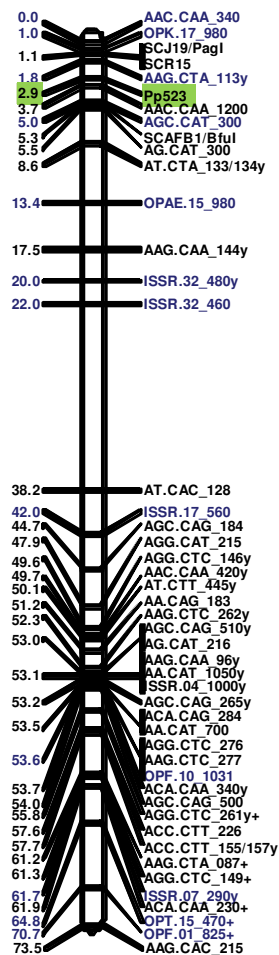


Figura 3.3 - Grupo de ligação 3 do mapa genético de *B. oleracea*, onde se encontra mapeado o gene de resistência ao míldio em brócolo, *Pp523*. A azul encontram-se identificados os marcadores seleccionados para serem testados em Couve Algarvia. Note-se que este grupo de ligação se encontra mais saturado que o publicado por Farinhó et al., 2004, uma vez que tem sofrido constantes actualizações.

Da análise dos marcadores RAPD OPF01₈₂₅, OPF10₁₀₃₁, OPK17₉₈₀, OPT15₄₇₀ e OPAE15₉₈₀, o marcador OPT15₄₇₀ foi identificado como polimórfico entre os dois “bulks” de DNA. Os primers OPT15 e OPF01 amplificaram um novo marcador polimórfico cada, OPT15₉₈₀ e OPF01₈₂₀, respectivamente, tendo sido avaliados nos 97 indivíduos da população segregante (69 indivíduos resistentes e 28 indivíduos susceptíveis), juntamente com o marcador OPT15₄₇₀. No entanto, não se confirmou a ligação de qualquer um dos três marcadores ao gene *PpALG1*.

Dos dois marcadores STS derivados de marcadores AFLP testados nos progenitores, ScAAC.CAA₃₄₀ e ScAAG.CTA_{113y}, apenas o primeiro se apresentou polimórfico, e com segregação dominante, encontrando-se ligado ao gene de interesse com uma frequência de recombinação de 0,246.

As sequências terminais da maioria dos BACs pertencentes a este contig foram entretanto obtidas e depositadas na base de dados pública do NCBI (www.ncbi.nih.gov) com os códigos de entrada ET051994-ET052047 e FI569200-FI569243, e com base nestas sequências foram desenhados pares de primers para as transformar em marcadores STS.

Utilizando os progenitores, Couve Algarvia e CrGC foram testados 88 pares de primers STS derivados de BAC ends (Fig. 3.5) (Anexo III).

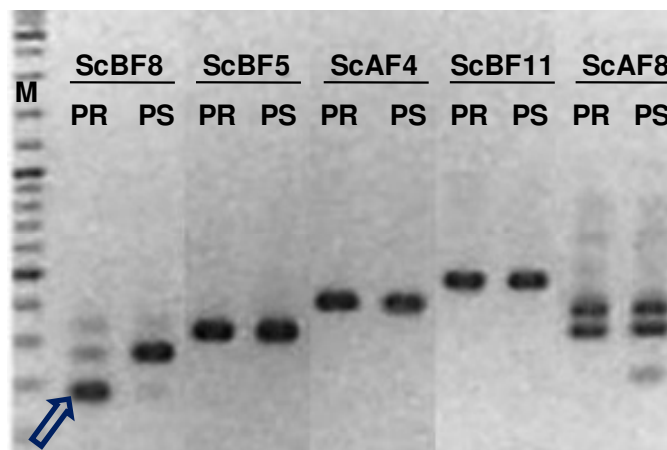


Figura 3.5 - Amplificação do DNA dos progenitores com primers STS derivados de BAC ends. **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC e **M**- Marcador molecular de 100 bp (gel de agarose 2% (p/v)).

Nos casos em que se identificaram marcadores polimórficos entre os progenitores, estes foram avaliados em alguns indivíduos resistentes e susceptíveis, de modo a constatar se aparentavam alguma ligação ao gene *PpALG1*. Foram identificados 8 marcadores polimórficos, cinco dominantes: ScBF8_{300y}, ScAH9_{610y}, ScBA8_{720y}, ScAA4_{544y} e ScAD10_{800y}; e três co-dominantes: ScAG12, ScAG10 e ScAF7. A análise prévia destes marcadores nos indivíduos constantes dos “bulks” de DNA revelou que os marcadores ScAD10_{800y} e ScAA4_{544y} não se encontravam ligados ao gene de interesse. O marcador ScAH9_{610y} foi excluído da análise dado ser muito difícil de analisar.

Os marcadores que aparentavam ligação ao gene *PpALG1* foram então analisados em todos os indivíduos da população. Constatou-se então, que os marcadores ScAF7 e ScAG12 não se encontravam ligados ao gene de interesse, encontrando-se no entanto ligados entre si com uma frequência de recombinação de 0,040.

Os restantes marcadores, ScBA8₇₂₀, ScBF8_{300y} e ScAG10, encontram-se ligados ao gene *PpALG1*. Os dois primeiros marcadores apresentam frequência de recombinação nula com o gene de resistência por se encontrarem ligados a este em repulsão, enquanto o marcador ScAG10 se encontra ligado ao gene de interesse com uma frequência de recombinação de 0,221.

Tendo por objectivo a obtenção de marcadores polimórficos a partir de marcadores monomórficos STS estes últimos foram submetidos a cortes com enzimas de restrição de forma a convertê-los em marcadores CAPS.

Para os cortes enzimáticos foram testados 18 marcadores monomórficos utilizando três “bulks” de enzimas de restrição diferentes, que originaram dois marcadores CAPS derivados dos marcadores ScBF11 (Fig. 3.6a) e ScAG11.

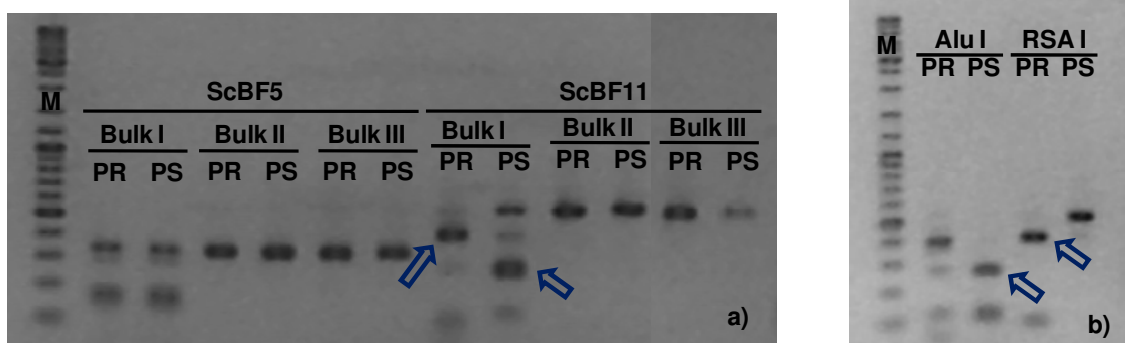


Figura 3.6 - Padrão do corte, com "bulks" de enzimas de restrição, de marcadores STS monomórficos (a) e teste das enzimas do “bulk”I, que deram origem ao polimorfismo observado no marcador ScBF11 (b). **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC, **BulkI-III**- “Bulks” de enzimas de restrição e **M**- Marcador molecular de 100 bp (gel de agarose 2% (p/v)).

As enzimas que constituíam os “bulks” que originaram os marcadores polimórficos foram testadas por separado, de modo a identificar a(s) enzima(s) responsável (eis) pelo polimorfismo de interesse. Constatou-se que duas enzimas, AluI e RSAI, identificavam polimorfismos no marcador ScBF11 (Fig 3.6b) enquanto a enzima MboI identifica polimorfismos na sequência do marcador ScAG11.

Da análise dos novos marcadores CAPS_ScBF11/RSAI e CAPS_ScAG11/MboI em alguns indivíduos resistentes e susceptíveis, verificou-se ser o segundo marcador de análise difícil nos indivíduos. O marcador CAPS_ScBF11/RSAI foi analisado em todos os indivíduos da população, no entanto concluiu-se que a sua avaliação de modo co-

dominate era difícil, dado não ser clara a distinção entre os indivíduos que apresentavam os dois alelos (um de cada progenitor) e os que apresentavam só o alelo do progenitor resistente, originando demasiadas falhas na avaliação. Decidiu-se então analisar o marcador CAPS_ScBF11/RSAI_{44y} como dominante, não se conseguindo no entanto colmatar as falhas na avaliação, como tal decidiu-se retirar este marcador da análise.

Recentemente foi mapeado no grupo de ligamento 3 do mapa genético de *B. oleracea* desenvolvido no LGMG, o marcador CAPS_AF5/BstXI. Este marcador foi amplificado nos progenitores (Couve Algarvia e CrGC) e a sua segregação avaliada em todos os indivíduos da população, apresentando uma segregação codominante similar à do marcador ScAF7, ao qual se encontra ligado com uma frequência de recombinação de 0,072. Tal facto era esperado, uma vez que, estes marcadores se apresentam ligados, distanciados 2,2 cM, quando avaliados na população brócolo x CRGC.

3.3 - Identificação de marcadores ligados ao locus de resistência *PpALG1* por “Bulked Segregant Analysis” (BSA)

Paralelamente aos testes dos primers que já se encontravam mapeados no mapa genético do *B. oleracea* (Farinhó et al., 2004), foi utilizada a estratégia de “Bulk Segregant Analysis” (BSA) (Michelmore et al., 1991), com o intuito de se identificarem marcadores DNA estreitamente ligados ao locus de resistência *PpALG1*. Para tal, foram formados dois “bulks” de DNA, um constituído por 16 indivíduos resistentes (“bulk” resistente – BR) e outro constituído por 16 indivíduos susceptíveis (“bulk” susceptível – BS), pertencentes à mesma população F2 segregante.

Com o objectivo de se identificarem marcadores polimórficos entre os “bulks” resistente e susceptível, foram testados 231 primers RAPD convencionais com 10 nucleótidos (kits AA, AB, AC, AD, AE, AK, AL, AM, AN, AO, Z e primers OPY09-Y19, da Operon Technologies, Inc) e 249 primers RAPD não convencionais com mais de 10 nucleótidos. Na Figura 3.8 podem ser observados alguns exemplos de padrões moleculares resultantes da amplificação com primers RAPD convencionais, em gel de agarose 2% (p/v).

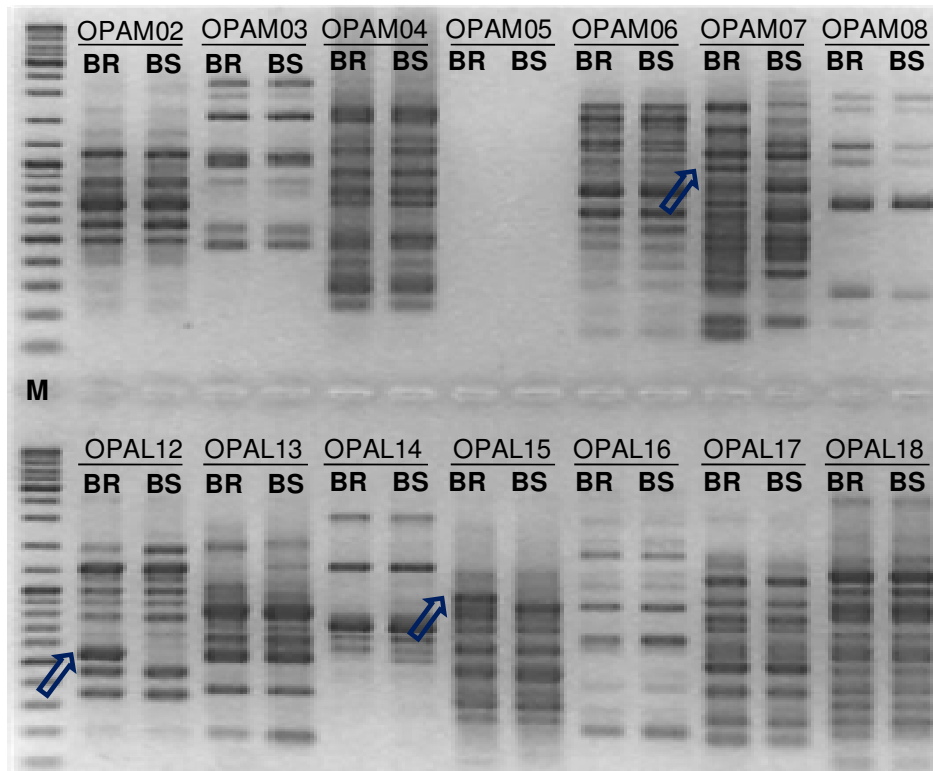


Figura 3.7 - Padrões moleculares resultantes da amplificação de vários primers RAPD nos "bulks" de DNA de plantas resistentes e de plantas susceptíveis. Note-se a similaridade de amplificação entre os dois "bulks" de DNA e a amplificação de três polimorfismos entre os "bulks" com os primers OPAM07, OPAL12 e OPAL15. **BR** - "Bulk" de DNA genómico de plantas resistentes, **BS**- "Bulk" de DNA genómico de plantas susceptíveis e **M**- Marcador molecular de 100 bp (gel de agarose 2% (p/v)).

Dos 231 primers RAPD convencionais testados, 202 amplificaram um total de 1400 marcadores moleculares. Foram seleccionados 49 primers que aparentemente geraram marcadores polimórficos entre os "bulks" (Fig. 3.7) e que para confirmação foram novamente testados nos "bulks" e nos dois progenitores (Couve Algarvia e CrGC). Na amplificação de confirmação verificou-se que dos primers testados apenas 4 amplificaram os polimorfismos anteriormente identificados, verificando-se nos restantes 45 a presença ou ausência simultânea desses marcadores em ambos os "bulks". Estes 4 primers (OPAA11, OPAA18, OPAB04 e OPAL12) originaram 5 marcadores polimórficos confirmados: OPAA11_{1010y}, OPAA18₄₀₀, OPAA18₇₂₀, OPAB04_{1450y} e OPAL12_{900y}. Na figura 3.8, encontra-se um exemplo do teste com o primer OPAA11 nos progenitores e "bulks", onde se pode observar a reconfirmação da amplificação do marcador polimórfico OPAA11_{1010y}, nos progenitores e nos dois "bulks" de DNA genómico.

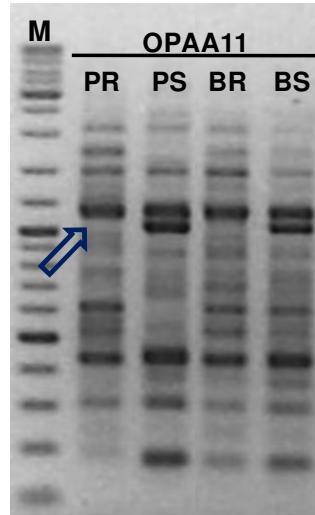


Figura 3.8 - Marcador polimórfico RAPD OPAA11_{1010y}, identificado por BSA com o primer OPAA11. **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC, **BR**- "Bulk" de DNA resistente, **BS**- "Bulk" de DNA susceptível e **M**- Marcador molecular de 100 bp (gel de agarose 2% (p/v)).

A segregação dos cinco marcadores polimórficos foi avaliada previamente nos indivíduos que constituem os “bulks” de DNA, de modo a obter uma primeira avaliação da sua ligação ao locus da resistência *PpALG1*. O marcador OPAA11_{1010y} foi amplificado em 15 dos 16 indivíduos pertencentes ao “bulk” susceptível e em 8 indivíduos pertencentes ao bulk resistente, indicando que a ligação ao gene de resistência deverá ser fraca. No entanto a sua segregação foi avaliada em todos os indivíduos da população, e a sua análise revelou que este marcador não se encontra ligado ao gene de resistência, encontrando-se, no entanto, ligado aos marcadores ScAF7, ScAF5/BstXI e ScAG12 com frequências de recombinação de 0,040, 0,089 e 0,062, respectivamente.

O marcador OPAB04_{1450y}, foi identificado em dois indivíduos que constituem o bulk resistente e em todos os indivíduos que constituem o bulk susceptível, indicando deste modo ligação em repulsão ao gene de resistência *PpALG*. Após a análise deste marcador em todos os indivíduos da população constatou-se que este se encontrava ligado ao gene de interesse com uma frequência de recombinação de 0,312.

Os restantes marcadores não foram avaliados em todos os indivíduos da população uma vez que através da primeira avaliação da sua segregação não demonstraram estar ligados ao locus *PpALG1*. O marcador OPAA18₄₀₀ foi identificado em 13 dos 16 indivíduos resistentes em que foi avaliado e em 14 dos 16 indivíduos susceptíveis. Por sua vez, o

marcador OPAA18₇₂₀, encontrou-se presente em 7 indivíduos pertencentes ao “bulk” resistente e em 7 indivíduos do “bulk” susceptível, não sendo possível avaliá-lo em 8 indivíduos (4 de cada “bulk”). O marcador OPAL12_{900y} foi identificado em 9 indivíduos do “bulk” resistente e em 11 indivíduos do “bulk” susceptível.

Dos 249 primers RAPD não convencionais testados, 54 não geraram nenhum marcador e 195 primers amplificaram um total de 1002 marcadores moleculares. Destes primers foram seleccionados 31 para serem novamente testados nos bulks e também nos progenitores, dado aparentemente amplificarem marcadores moleculares polimórficos entre os bulks. No entanto, esta segunda análise não permitiu confirmar nenhum dos polimorfismos, uma vez que, os marcadores ou estavam ausentes nos dois bulks ou eram monomórficos entre os bulks e entre os progenitores.

Análise AFLP

Para a análise AFLP foram utilizadas duas combinações de primers, E-AA/M-CTG e E-AC/M-CAA, nos progenitores, Couve Algarvia e CrGC, e nos “bulks” resistente e susceptível. Através desta análise foram identificados dois marcadores polimórficos, ambos gerados pela combinação E-AC/M-CAA. Dos dois fragmentos polimórficos, um com cerca de 180 bp foi identificado no progenitor susceptível e no “bulk” susceptível e o outro com aproximadamente 140 bp, foi identificado no progenitor resistente e no “bulk” resistente (Fig. 3.9).

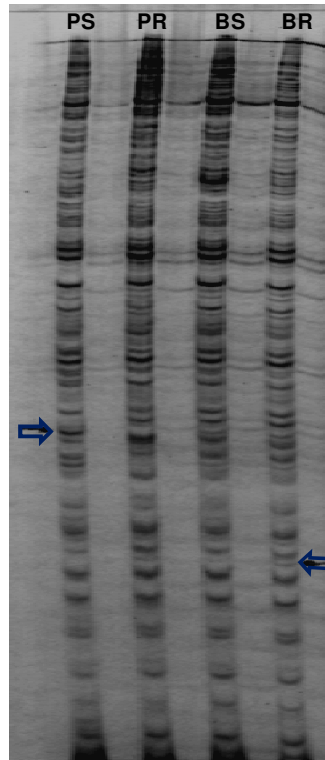


Figura 3.9 – Autoradiografia dos marcadores AFLP obtidos por BSA com a combinação de primers E-AC/M-CAA. As setas indicam os marcadores polimórficos identificados. **PR** - Couve Algarvia, **PS** - CrGC, **BR**- “Bulk” DNA de plantas resistentes e **BS**- “Bulk” DNA de plantas susceptíveis.

As bandas foram excisadas e reamplificadas por PCR com a combinação de primers AFLP que lhes deu origem, (Fig. 3.10).

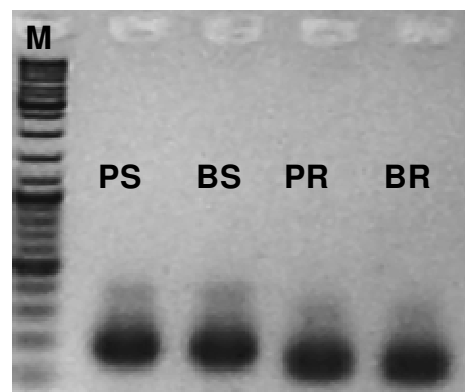


Figura 3.10 – Re-amplificação do DNA dos progenitores e dos “bulks” com a combinação de primers E-AC/M-CAA. **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC, **BR**- “Bulk” DNA de plantas resistentes, **BS**- “Bulk” DNA de plantas susceptíveis e **M**- Marcador molecular de 100 bp (gel de agarose 1,4% (p/v)).

Os fragmentos confirmados foram então clonados e sequenciados. Na figura 3.11, encontram-se indicadas as sequências dos dois fragmentos polimórficos identificados.

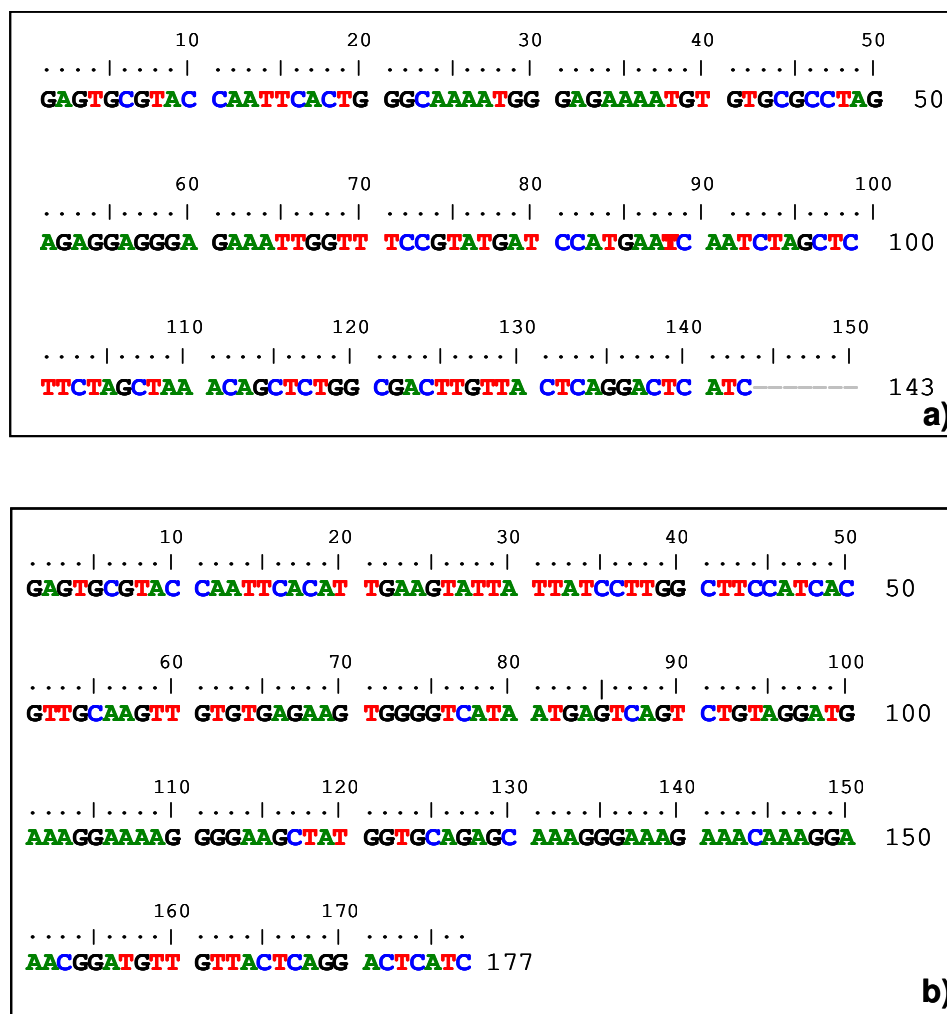


Figura 3.11- Sequências dos fragmentos polimórficos obtidos através da combinação AFLP AC.CAA. A primeira sequência (a) é referente ao fragmento polimórfico identificado no progenitor resistente (Couve Algarvia) e a segunda sequência (b) é referente ao fragmento polimórfico identificado no progenitor susceptível (CrGC).

Com base nas sequências dos fragmentos identificados foram desenhados pares de primers específicos. Na tabela 3.2 encontram-se identificadas as sequências forward e reverse destes primers, bem como o tamanho do fragmento que é esperado estes gerarem.

Tabela 3.2 - Sequências nucleótídicas dos pares de primers SCAR desenhados com base na sequência dos fragmentos AFLP gerados e tamanho do fragmento esperado em pares de bases (pb).

Marcador SCAR		Sequência 5'→3'	Fragmento esperado (pb)
ScAC.CAA ₁₁₉	ScAC.CAA ₁₁₉ F	GAATTCAGTGGGCAAATGG	119
	ScAC.CAA ₁₁₉ R	AACAAGTCGCCAGAGCT	
ScAC.CAA _{148y}	ScAC.CAA _{148y} F	CACATTGAAGTATTATTATCCTTGG	148
	ScAC.CAA _{148y} R	AACAACATCCGTTTCCTTGG	

Estes pares de primers foram então testados nos dois progenitores para verificar se originavam os polimorfismos esperados (Fig. 3.12).

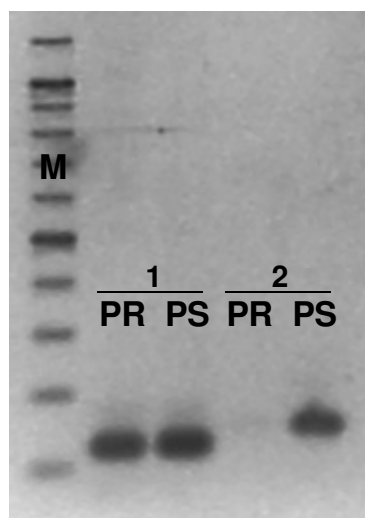


Figura 3.12 – Amplificação do DNA dos progenitores com os primers SCAR ScAC.CAA₁₁₉ (1) e ScAC.CAA_{148y} (2). **PR**- Couve Algarvia, **PS**- CrGC e **M**- Marcador molecular 100bp (gel de agarose 2% (p/v)).

O par de primers ScAC.CAA₁₁₉ não gerou qualquer marcador polimórfico, no entanto, numa continuação deste trabalho poderão ser utilizadas enzimas de restrição de forma a converter este marcador num marcador CAPS polimórfico. Também é possível clonar e purificar o fragmento amplificado no progenitor susceptível, para que através da sua sequenciação se possam detectar possíveis diferenças entre as sequências dos dois fragmentos.

O marcador ScAC.CAA_{148y} revelou-se polimórfico, amplificando unicamente no progenitor susceptível, como esperado, no entanto ao ser avaliado nos indivíduos constantes dos bulks não apresentou ligação ao gene de resistência ao míldio *PpALG1*.

Foram testados dois marcadores SCAR, ScAN12 e ScK04_{450y}, identificados anteriormente em Couve Algarvia (Sousa, 2007) em todos os indivíduos da população de mapeamento. Estes marcadores não apresentaram ligação ao gene *PpALG1*, o que era de esperar uma vez que, alguns indivíduos da população utilizada para o seu anterior mapeamento não se encontravam bem caracterizados relativamente à resistência. Estes marcadores foram então testados na população de mapeamento brócolo x CrGC, ficando então mapeados no grupo de ligamento 6 de *B. oleracea*.

3.4 Análise de ligamento

Os dados resultantes da segregação de todos os marcadores identificados ao longo deste trabalho foram transferidos para uma matriz em formato Excel e introduzidos no software JoinMap 3.0 para a realização da análise de ligamento entre os marcadores moleculares e entre estes e o gene *PpALG1*. No total foram mapeados 10 marcadores moleculares polimórficos dos quais, 2 marcadores RAPD, 6 marcadores SCAR e 2 marcadores CAPS. Na tabela 3.3 encontram-se identificados os marcadores mapeados, bem como a sua segregação, tipo de ligação, natureza do polimorfismo e os respectivos valores do teste do qui-quadrado (χ^2). O teste do qui-quadrado foi utilizado para determinar a concordância da segregação de cada marcador com a razão da segregação mendeliana esperada (3:1 no caso de marcadores dominantes e 1:2:1 no caso de marcadores co-dominantes).

Tabela 3.3 - Segregação dos marcadores mapeados na população de Couve Algarvia, respectivos valores de qui-quadrado (χ^2), natureza do polimorfismo e tipo de ligação.

Marcadores	A	H	B	C	D	χ^2	Natureza do polimorfismo
ScAF5/BstXI	18	52	27			2,2	Co-dominante
ScJ19/PagI	24	57	16			4,3	Co-dominante
ScBF8 _{300y}			14		83	5,8	Dominante
ScAG10	28	55	13			6,7	Co-dominante
ScBA8 _{720y}			12		82	7,5	Dominante
ScAF7	17	50	27			2,5	Co-dominante
ScAG12	19	47	27			1,4	Co-dominante
ScAAC.CAA ₃₄₀	21			76		0,6	Dominante
OPAA11 _{1010y}			28		67	1,0	Dominante
OPAB04 _{1450y}			18		77	1,9	Dominante

Através da análise no software JoinMap dos dados da segregação destes marcadores, verificou-se que estes se distribuíram por três grupos de ligamento distintos.

No primeiro grupo de ligamento, encontram-se ligados 6 marcadores moleculares (ScAAC.CAA₃₄₀, ScJ19/PagI, ScBF8_{300y}, ScAG10, ScBA8_{720y} e OPAB04_{1450y}) ao gene de resistência ao míldio *PpALG1* (Fig. 3.13). Na tabela 3.5 é apresentada a segregação destes marcadores em todos os indivíduos da população segregante. O ligamento genético entre os marcadores foi estabelecido com um LOD de agrupamento igual a 5 e de ordenamento igual a 4.

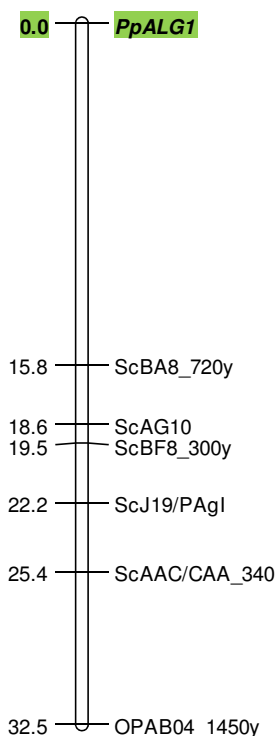


Figura 3.13- Grupo de ligação do locus de resistência ao míldio *PpALG1*

Na tabela 3.4 encontram-se indicadas as frequências de recombinação entre os marcadores moleculares mapeados no grupo de ligação 1 e o gene de resistência ao míldio *PpALG1*, bem como a distância à qual estes se encontram do locus da resistência, o tipo de ligação e a natureza do polimorfismo.

Tabela 3.4 - Frequência de recombinação entre os marcadores e o gene *PpALG1*, distância a que se encontram, tipo de ligação e natureza do polimorfismo.

Locus 1	Locus 2	Frequência de recombinação	Distância (cM)	Tipo de ligação
<i>PpALG1</i>	OPAB04 _{1450y}	0,312	32,5	Repulsão
<i>PpALG1</i>	ScAAC/CAA ₃₄₀	0,246	25,4	Acoplamento
<i>PpALG1</i>	ScJ19/PagI	0,226	22,1	Acoplamento
<i>PpALG1</i>	ScBF8 _{300y}	0,000	19,5	Repulsão
<i>PpALG1</i>	ScAG10	0,221	18,5	Acoplamento
<i>PpALG1</i>	ScBA8 _{720y}	0,000	15,8	Repulsão

Tabela 3.5 - Segregação dos marcadores DNA ligados ao gene *PpALG1* nos 97 indivíduos da população.

	R	S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>PpALG1</i>	C	A	C	A	C	C	C	C	C	C	C	A	A	C	A	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
ScBA8 _{720y}	B	D	D	D	B	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	B	D	B	B	D	D	D	D	D	D	D
ScAG10	B	A	H	A	B	A	A	H	H	B	H	A	A	H	A	H	H	B	A	A	A	B	H	B	H	H	H	H	H	H	H	H
ScBF8 _{300y}	B	D	D	D	B	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	B	D	B	D	D	D	D	D	D	D	D
ScJ19/PagI	B	A	B	A	B	A	A	H	H	B	H	A	A	B	A	H	H	B	A	A	H	B	H	B	H	H	H	H	H	H	H	H
ScAAC/CAA ₃₄₀	C	A	C	A	C	A	A	C	C	C	C	A	A	C	A	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
OPAB04 _{1450y}	B	D	D	D	-	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	B	D	B	B	D	D	D	D	D	B	B

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
<i>PpALG1</i>	C	C	A	A	C	A	A	C	C	A	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	A	C	A	A	A	C	C	C	A	C	C
ScBA8 _{720y}	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D
ScAG10	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	A	H	H	H	H	B	A	H	H	H	H	A	H	B	A	H	A	H	A
ScBF8 _{300y}	D	B	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D
ScJ19/PagI	H	B	H	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	A	H	H	H	H	A	H	B	A	H	A	H	A
ScAAC/CAA ₃₄₀	C	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	A	C	C	A	C	A	C	A
OPAB04 _{1450y}	B	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	B	D	B	D	D	B	D	D	D	D	D

	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
<i>PpALG1</i>	A	A	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	A	A	C	C	C	A	C	C	C	A	C	C	A	C	C	C	C	C	C	A
ScBA8 _{720y}	D	D	D	D	D	D	B	D	B	D	B	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B	-	-	D
ScAG10	A	A	H	H	A	-	B	H	B	H	B	A	H	A	A	A	B	H	H	H	H	A	H	H	H	H	H	H	B	B	H	A
ScBF8 _{300y}	D	D	D	D	D	D	B	D	B	D	B	D	D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B	B	D	D	
ScJ19/PagI	A	A	H	H	H	H	B	H	B	H	B	A	H	A	H	A	B	H	H	H	H	A	H	H	H	H	H	B	B	H	A	
ScAAC/CAA ₃₄₀	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C	A	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A
OPAB04 _{1450y}	D	D	D	D	D	B	B	-	D	D	D	D	D	D	D	D	B	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	B	B	D	D	

	95	96	97
<i>PpALG1</i>	C	C	C
ScBA8 _{720y}	-	D	D
ScAG10	H	H	H
ScBF8 _{300y}	D	D	D
ScJ19/PagI	H	H	H
ScAAC/CAA ₃₄₀	C	C	C
OPAB04 _{1450y}	D	D	D

A Homozigótico para o progenitor susceptível B Homozigótico para o progenitor resistente C H ou B H Heterozigótico

A frequência de recombinação entre os marcadores do grupo de ligamento onde se encontra mapeado o gene *PpALG1* e a distância entre eles, encontra-se indicada na tabela 3.5. Note-se que estes marcadores se encontram bastante próximos uns dos outros, com baixas frequências de recombinação, indicando que a ligação entre eles é bastante forte.

Tabela 3.5 - Frequências de recombinação e distância (cM) entre os marcadores mapeados no grupo de ligamento do gene *PpALG1*.

Locus 1	Locus 2	Frequência de recombinação	Distância (cM)
ScAAC/CAA ₃₄₀	OPAB04 _{1450y}	0,000	7,1
ScAAC/CAA ₃₄₀	ScJ19/PagI	0,030	3,3
ScAAC/CAA ₃₄₀	ScBF8 _{300y}	0,000	5,9
ScAAC/CAA ₃₄₀	ScAG10	0,070	6,9
ScAAC/CAA ₃₄₀	ScBA8 _{720y}	0,000	9,6
ScJ19/PagI	ScBF8 _{300y}	0,023	2,4
ScJ19/PagI	ScAG10	0,037	3,7
ScJ19/PagI	ScBA8 _{720y}	0,063	5,2
ScJ19/PagI	OPAB04 _{1450y}	0,159	10,4
ScBF8 _{300y}	ScAG10	0,012	1,3
ScBF8 _{300y}	ScBA8 _{720y}	0,039	2,8
ScBF8 _{300y}	OPAB04 _{1450y}	0,145	13,0
ScAG10	ScBA8 _{720y}	0,026	1,5
ScAG10	OPAB04 _{1450y}	0,115	14,0
ScBA8 _{720y}	OPAB04 _{1450y}	0,139	16,7

O segundo grupo de ligamento (Fig. 3.14) é constituído por quatro marcadores moleculares (ScAF5/BstXI, OPAA11_{1010y}, ScAF7 e ScAG12), sendo que o marcador ScAF5/BstXI e o marcador ScAF7 se encontram mapeados no grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea* (brócolo x CrGC). Na tabela 3.6, encontram-se indicadas as frequências de recombinação entre os marcadores mapeados neste grupo de ligamento e o LOD até ao qual os marcadores permanecem ligados.

Tabela 3.6 - Frequências de recombinação entre os marcadores do grupo de ligamento 2 e respectivo LOD de agrupamento.

Locus 1	Locus 2	Frequência de recombinação	LOD
OPAA11 _{1010y}	ScAF5/BstXI	0.089	12.6
OPAA11 _{1010y}	ScAF7	0.040	17.9
OPAA11 _{1010y}	ScAG12	0.062	15.1
ScAF5/BstXI	ScAF7	0.072	20.6
ScAF5/BstXI	ScAG12	0.114	15.1
ScAF7	ScAG12	0.040	26.6

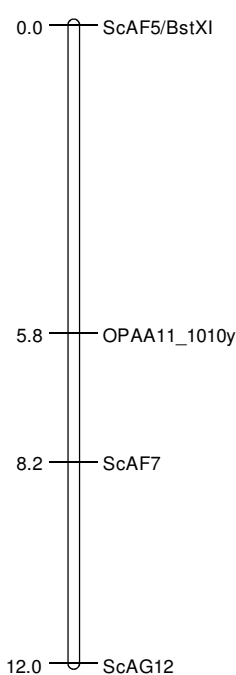


Figura 3.14 – Grupo de ligamento 2, LOD_{ord} =10 e LOD_{agrup} =10

Através da comparação do posicionamento dos marcadores em comum do grupo de ligamento onde se encontra o gene de resistência *PpALG1* e do grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea* (Fig. 3.16), verifica-se que o gene *PpALG1* se encontra acima do gene *Pp523*, isto é, o gene *PpALG1* poderá situar-se na extremidade do grupo de ligamento 3.

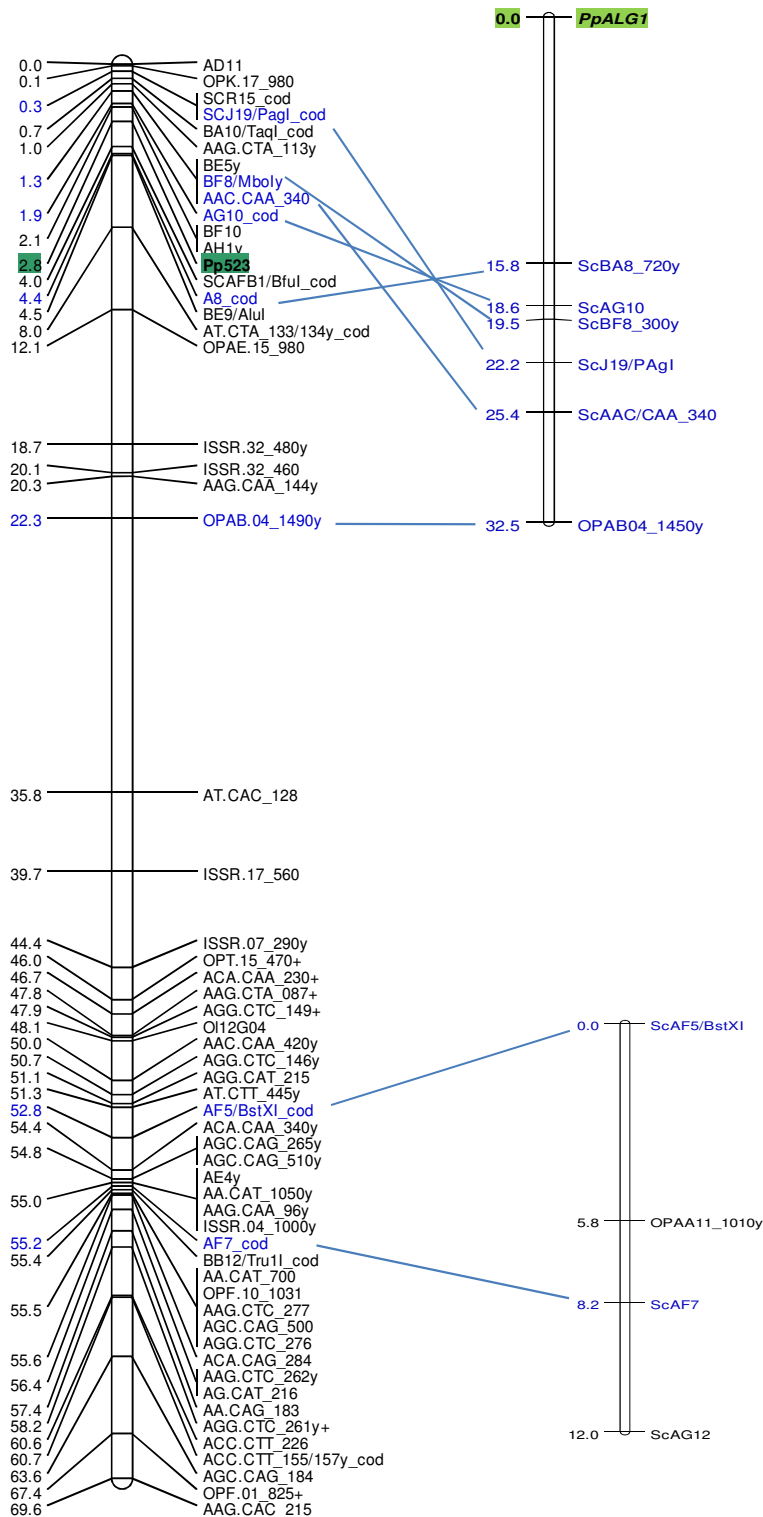


Figura 3.16 – Grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea* e dois grupos de ligamento construídos no decorrer desta tese. Note-se que o grupo de ligamento 3 se encontra mais saturado que o publicado por Farinhó et al., 2004, uma vez que continua a ser consolidado.

4 - Discussão

A identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao míldio em Couve Algarvia, foi efectuada mediante a estratégia de “Bulked Segregant Analysis” (BSA) (Michelmore et al., 1991).

Numa primeira fase deste trabalho, com o objectivo de localizar o gene *PpALG1* no mapa genético de *Brassica oleracea* (Farinhó et al., 2004), foram seleccionados marcadores RAPD mapeados ao longo dos nove grupos de ligamento principais deste mapa. Concluiu-se que o marcador OPJ19₅₅₀, mapeado no grupo de ligamento 3, onde está localizado o gene de resistência ao míldio em brócolo *Pp523*, se encontra ligado ao gene *PpALG1* com uma frequência de recombinação de 0,251. Foi então realizada nova análise por BSA para testar 11 marcadores seleccionados deste grupo ligamento (LG3) com o objectivo de identificar mais marcadores ligados ao locus *PpALG1*. Destes, apenas se o marcador ScAAC.CAA₃₄₀ se apresentou polimórfico e após análise verificou-se estar ligado ao gene de resistência com uma frequência de recombinação de 0,246.

Paralelamente, foram testados 480 primers RAPD para identificar novos marcadores polimórficos ligados ao gene de interesse, tendo sido identificado o marcador OPAB04_{1450y} ligado ao gene com uma frequência de recombinação de 0,312.

A estratégia de BSA tem sido utilizada em vários trabalhos de mapeamento de genes de resistência em espécies do género *Brassica* (Giovannelli et al., 2002; Piao et al., 2002; Hughes et al., 2003, Farinhó et al., 2004 e Varshney et al., 2004). Esta estratégia apresenta a vantagem de ser de fácil e rápida aplicação, estando contudo o seu sucesso essencialmente dependente de dois factores importantes: o grau de polimorfismo entre os progenitores e as avaliações fenotípicas.

Os progenitores utilizados para a obtenção da população de mapeamento, Couve Algarvia e CrGC, foram seleccionados tendo em conta a sua distinta reacção ao míldio. A acessão de Couve Algarvia (*Brassica oleracea* var *tranchuda*) PCA 12.111, apresenta resistência à raça P523 do patógeno *Hyaloperonospora parasitica*, e como progenitor resistente foi utilizada uma linha S3 (auto polinizada três vezes) PCA 12.111-2. Como

progenitor susceptível ao *H. parasitica* foi utilizada uma linha duplo-haploide, completamente homozigótica de CrGC (*Brassica oleracea* L.), que apresenta um ciclo vegetativo curto como vantagem adicional. O nível de polimorfismo entre estes dois progenitores é elevado, tendo sido avaliado com marcadores RAPD em cerca de 29%. Embora pertençam à mesma espécie apresentam diferenças significativas a nível morfológico e em alguns caracteres fisiológicos, como por exemplo, a duração do ciclo vegetativo, tamanho da planta e cor da flor.

As avaliações fenóticas são um factor crucial para o sucesso da identificação de marcadores moleculares ligados ao locus da resistência seguindo o método de BSA. A avaliação da interacção hospedeiro-patogéneo na fase de planta adulta e em condições naturais de infecção é bastante complexa. Esta interacção está dependente de factores não controlados como sendo as condições ambientais e as flutuações na população do patogéneo, que condicionam o desenvolvimento da planta e a progressão da infecção por parte do patogéneo, sendo determinantes na classificação fenotípica dos indivíduos.

Tendo-se verificado que anteriores ensaios de campo não permitiram uma avaliação absolutamente correcta da interacção hospedeiro-patogéneo das plantas F2, foi necessário avaliar as plantas da geração F3. Esta nova avaliação tem como objectivo a comprovação das avaliações fenóticas e a determinação do genótipo dos indivíduos F2 relativamente ao gene *PpALG1*. O presente estudo foi realizado com base nestas avaliações.

Não obstante, no decorrer deste trabalho apenas se identificou um novo marcador RAPD, OPAB04_{1450y}, ligado ao locus de resistência ao míldio. Este marcador foi também testado na população de mapeamento de brócolo x CrGC, apresentando-se também ligado ao gene de resistência ao míldio *Pp523*.

Numa continuação deste trabalho irão ser realizados novos “bulks”, constituídos pelo DNA de 8 indivíduos cada para se realizar nova análise por BSA e tentar identificar novos marcadores RAPD ligados ao gene de interesse. Embora a utilização de “bulks” constituídos por um número reduzido de indivíduos levar à geração de falsos polimorfismos, a probabilidade da sua ocorrência continua a ser bastante baixa (2×10^{-6} , segundo Michelmore et al., 1991).

Neste estudo foi realizada a análise por BSA com marcadores AFLP, tendo por objectivo a identificação de marcadores AFLP polimórficos que estivesse ligados ao gene de resistência *PpALG1*. Os dois marcadores detectados como polimórficos foram convertidos em marcadores SCAR, ScAC.CAA₁₁₉ e ScAC.CAA_{148y}, apresentando-se o primeiro monomórfico e o segundo polimórfico. No entanto este último marcador não demonstrou encontrar-se ligado ao gene de resistência.

Paralelamente à estratégia de BSA, e após ficar demonstrada a ligação do gene *PpALG1* a marcadores mapeados no grupo de ligamento 3, onde se encontra mapeado o gene de resistência ao míldio em brócolo, *Pp523*, decidiu-se testar primers STS provenientes de clones BAC, pertencentes a um contig que abarca a região genómica deste último locus.

As sequências terminais de clones BAC podem ser bastante úteis no desenvolvimento de marcadores moleculares, que podem posteriormente ser utilizados para saturar mapas genéticos, clonar genes via “map-based cloning”, para análise genómica e para mapeamento comparativo, encontrando-se no momento desenvolvidas sequências terminais de clones BAC para diversas espécies com interesse agronómico, como sendo a papaia (Lai et al. 2006), o trigo (Paux et al. 2006), a banana (Cheung and Town, 2007) e a soja (Nelson and Shoemaker, 2006).

O contig ao qual pertencem os marcadores STS analisados neste trabalho é bastante específico (<5 cM). Através da análise destes marcadores, foram identificados três marcadores STS com ligação ao gene *PpALG1*, ScAG10, ScBF8_{300y} e ScBA8_{720y} que também se encontram ligados ao gene *Pp523*. A ligação destes marcadores ao locus *PpALG1*, vem consolidar a ideia de que os dois genes se encontram no mesmo grupo de ligamento e através da análise da posição de todos os marcadores mapeados em comum no grupo de ligamento destes genes o gene *PpALG1* deverá situar-se acima do gene *Pp523*, no entanto de forma a consolidar esta hipótese deverão ser testados mais marcadores de forma a saturar a região do locus de resistência ao míldio em Couve Algarvia.

Ensaio de complementação genética realizados entre as duas variedades de *B. oleracea*, *B. oleracea* var *trunchuda* e *B. oleracea* var *itálica*, demonstraram que os genes

PpALG1 e *Pp523* são genes diferentes, ainda que ligados factorialmente (Coelho et al., dados não publicados).

Ao longo deste trabalho foram mapeados mais 4 marcadores, que embora não se ligando ao gene de resistência, formaram um grupo de ligamento, onde se situam dois marcadores mapeados no grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea* (Farinhó et al., 2004) mas que se encontram mais afastados do gene *Pp523*. O facto de estes marcadores não integrarem o grupo de ligamento do gene *PpALG1*, dever-se-á ao número reduzido de marcadores mapeados na região genómica que os separa.

5 - Conclusões e Perspectivas

Até à data encontram-se mapeados dois genes de resistência ao míldio em *Brassica oleracea*, um na fase cotiledonar num grupo de ligamento com 69 cM (Giovanelli et al., 2002), e outro na fase adulta num grupo de ligamento de 73cM (Farinhó et al., 2004).

O objectivo central deste estudo foi o de identificar marcadores moleculares ligados ao gene *PpALG1*, que confere resistência ao míldio, em Couve Algarvia (*Brassica oleracea* var *tronchuda*) na fase de planta adulta. Neste sentido foi utilizado o método de “Bulked Segregant Analysis” tanto para identificar marcadores mapeados no grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea* (Farinhó et al., 2004) como para identificar novos marcadores RAPD. Adicionalmente foram também testados marcadores STS provenientes de clones BAC de *B. oleracea* pertencentes a um contig que abarca a região genómica do gene *Pp523*.

O mapa genético de *Brassica oleracea* (Farinhó et al., 2004) desenvolvido no Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético, revelou-se uma ferramenta crucial para localizar a região onde se poderá encontrar gene *PpALG1*, realçando que um mapa genético não é só necessário para a detecção e mapeamento de genes com interesse agronómico, mas também para estudar a estrutura, organização e evolução do genoma da planta. O facto de este gene se encontrar no mesmo grupo de ligamento que o gene *Pp523*, e de partilharem marcadores bastante próximos permitiu que se identificassem marcadores STS derivados de BAC ends provenientes de um contig que abarca a região genómica do gene de resistência *Pp523*.

Através da comparação das frequências de recombinação e das posições dos marcadores DNA que se encontram mapeados tanto nos grupos de ligamento obtidos neste trabalho como no grupo de ligamento 3 do mapa de *B. oleracea*, podemos aferir que os genes não se encontram no mesmo locus e que muito provavelmente o gene *PpALG1* se encontra mais próximo da extremidade do grupo de ligamento, no entanto conclusões significativas só poderão ser retiradas quando a região do locus *PpALG1*, apresentar um maior número de marcadores DNA estreitamente ligados ao gene de resistência.

Na continuação deste trabalho e com base em avaliações recentes (2009) da geração F3, serão elaborados novos “bulks” de DNA utilizando para tal indivíduos homozigóticos, resistentes versus susceptíveis, de forma a identificar novos marcadores DNA polimórficos estreitamente ligados ao gene *PpALG1*. Em paralelo, será construída uma biblioteca BAC do genótipo resistente, da qual serão seleccionados com base em marcadores em estreita ligação ao gene *PpALG1* clones BAC que formarão um contig que abarque a região genómica deste locus.

A existência de um projecto (em estado avançado) de isolamento do gene de resistência ao míldio em brócolo Pp523, que ao que tudo indica se encontrará próximo do gene *PpALG1*, permitirá que a informação por ele gerada possa ser utilizada para avançar no caminho da clonagem posicional deste último gene de resistência.

6 - Referências bibliográficas

- Agnola B, Silue D, Boury S (2000) Identification of RAPD markers of downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance gene in broccoli (*Brassica oleracea var italica*). In: (King GJ) Abstr 3rd Int Symp Brassicas. HRI, Wellesbourne, Reino Unido. Poster 64
- Almeida D (2006) Manual de Culturas Hortícolas. Editorial Presença 1: 242-258
- Anderson PA, Lawrence GJ, Morrish BC, Ayliffe MA, Finnegan EJ, Ellis JG (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of the repeat unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* 9: 641-651
- Arus, P. & Orton, T. J. (1983). Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in *Brassica oleracea*. *Journal of Heredity* 74: 405-412.
- Babula D, Kaczmarek M, Barakat A, Delseny M, Quiros CF, Sadowski J (2003) Chromosomal mapping of *Brassica oleracea* based on ESTs from *Arabidopsis thaliana*: complexity of the comparative map. *Mol Genet Genomics* 268: 656-665
- Ballvora A, Ercolano MR, Weiss J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamine F, Gebhardt C (2002) The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 30:361– 371
- Barnes WC (1968) Development of downy mildew resistant broccoli, cabbage, and collards. *Hortsci* 3:78
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarim S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S (2004) The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *PNAS* 101: 886-889
- Bendahmane A, Kohn BA, Dedi C, Baulcombe DC (1995) The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J.* 8:933–941
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.* 21:73–81
- Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856–1860

Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, effectors and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathology* 45: 399-436

Bent, AF (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771

Biffen, RH (1905) Experiments with wheat and barley hybrids, illustrating Mendel's Laws of heredity. *J Roy Agric Soc* 65:337-345

Bittner-Eddy P, Can C, Gunn N, Pinel M, Tör M, Crute I, Holub EB, Beynon J (1999) Genetic and physical mapping of the *RPP13* locus, in *Arabidopsis*, responsible for specific recognition of several *Peronospora parasitica* (downy mildew) isolates. *Mol Plant Microbe Interact* 12:792–802

Bittner-Eddy PD, Crute IR, Holub EB, Beynon JL (2000) *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant J* 21: 177–188

Bohuon EJ, Keith DJ, Parkin IAP, Sharpe AG, Lydiate DJ (1996) Alignment of the conserved C genomes of *Brassica oleracea* and *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 93:833–839

Borhan MH, Gunn N, Cooper A, Gulden S, Tor M, Rimmer SR, Holub EB (2008) WRR4 encodes a TIR-NB-LRR protein that confers broad-spectrum white rust resistance in *Arabidopsis thaliana* to four physiological races of *Albugo candida*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 757-768

Botella MA, Parker JE, Frost LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, Jones JDG (1998) Three genes of the *Arabidopsis RPP1* complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 10: 1847– 1860

Branca F, Bahcevandziev K, Peticone V, Monteiro A (2005) Sources of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.) in Sicilian germplasm of cauliflower and broccoli. *Biodiversity and Conservation* 14: 841-848

Brommonschenkel SH, Frary A, Tanksley SD (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13:1130–1138

Brophy TF, Laing MD (1992) Screening of fungicides for the control of downy mildew on container grown cabbage seedlings. *Crop Protect* 11:160–164

Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Killian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002) The barley stem-rust resistance gene *Rpg1* is a novel disease resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9328-9833

Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2033– 2046

Büsches R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolters M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schultze-Lefert P (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705

Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812

Camargo LEA, Williams PH, Osborn TC (1995) Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* in the field and greenhouse. *Phytopathology* 85:1296-1300

Carvalho T, Monteiro AA (1996) Preliminary study on the inheritance of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.) at cotyledon stage in Tronchuda cabbage ‘Algarvia’. *Cruciferae Newslett* 18:104–105

Channon AG (1981) Downy mildews of *Brassicaceae*. In: Spencer DM (ed.), The downy mildews. Academic Press, p. 321–339

Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y (2006) A β -lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J* 46: 794-804

Cheung F, Town CD (2007) A BAC end view of the *Musa acuminata* genome. *BMC Plant Biol* 7:29

Cheung WY, Friesen L, Rakow GFW, Seguin-Swartz G, Landry BS (1997b) A RFLP-based linkage map of mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. and Coss.]. *Theor Appl Genet* 94:841–851

Cheung WY, Gugel RK, Landry BS (1998) Identification of RFLP markers linked to the white rust resistance gene (*Acr*) in mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. and Coss.). *Genome* 41:626–628

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz B (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814

Choi SR, Teakle GR, Plaha P, Kim JH, Allender CJ, Beynon E, Piao ZY, Soengas P, Han TH, King GJ, Barker GC, Hand P, Lydiate DJ, Batley J, Edwards D, Koo DH, Bang JW, Park BS, Lim YP (2007) The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theor Appl Genet* 115: 777-792

Christianson JA, Rimmer SR, Good AG, Lydiate DJ (2006) Mapping genes for resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica juncea*. *Genome* 49: 30-41

Chu Z, Yuan M, Yao J, Ge XJ, Yuan B, Xu CG, Li XH, Fu BY, Li ZK, Bennetzen JL, Zhang QF, Wang SP (2006) Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Gene Dev* 20: 1250-1255

Chyi YS, Hoenecke ME, Semyk JL (1992) A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Genome* 35: 746-757

Coelho PS, Leckie D, Bahcevandziev K, Valério L, Astley D, Boukema I, Crute IR, Monteiro A (1998) The relationship between cotyledon and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in *Brassica oleracea*. *Acta Hort* 459:335-342

Coelho PS, Monteiro A (2003) Inheritance of downy mildew resistance in mature broccoli plants. *Euphytica* 131: 65-69

Coelho PS, Monteiro A (2003a) Expression of resistance to downy mildew at cotyledon and adult plant stages in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 133:279-284

Collins J, Hohn B (1978) Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage-1 heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995

Collins N, Drake J, Ayliffe M, Sun Q, Ellis J, Hulbert S, Pryor T (1999) Molecular characterization of the maize *Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell* 11:1365-1376

Constantinescu O, Fatehi J (2002) *Peronospora*-like fungi (Chromista, *Peronosporales*) parasitic on *Brassicaceae* and related hosts. *Nova Hedwigia* 74:291-338

Cooley MB, Pathirana S, Wu HJ, Kachroo P, Klessig DF (2000) Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* 12:663-676

Crisp P, Crute IR, Sutherland RA, Angell SM, Bloor K, Burgess H, Gordon PL (1989) The exploitation of genetic resources of *Brassica oleracea* in breeding for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*). *Euphytica* 42: 215-226

Crute IR (1985) The genetic basis of relationships between microbial parasites and their hosts. In: R.S.S. Fraser (Ed), Mechanism of resistance to plant disease, pp. 80-142. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht

Crute IR, Holub EB, Tör M, Brose E, Beynon JL (1993) The identification and mapping of loci in *Arabidopsis thaliana* for recognition of the fungal pathogens *Peronospora parasitica* (downy mildew) and *Albugo candida* (white blister). In Advances in the Molecular Genetics of Plant–Microbe Interactions (Nester EW and Verma DPS, eds), Vol. 2:437–444. Kluwer Academic Press

Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833

de Majnik J, Ogonnaya FC, Moullet O, Lagudah ES (2003) The Cre1 and Cre3 nematode resistance genes are located at homeologous loci in the wheat genome. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1129-1134

Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:2404–2409

Diener, AC; Ausubel, FM (2005) Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171: 305-321

Dinesh-Kumar SP, Whitham S, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1995) Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene *N*: its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4175-4180.

Dion Y, Gugel RK, Rakow GFW, Seguin-Swartz G, Landry BS (1995) RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not.] in canola (*Brassica napus*). *Theor Appl Genet* 91: 1190-1194

Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, Harrison K, Jones JDG (1998) The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10:1915–1925

Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84: 451–459

- Dodds P, Lawrence G, Ellis J (2001) Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* 13:163–178
- Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3: 278-284
- Ellis J, Jones D (1998) Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 288-293
- Ellis JG, Lawrence GJ, Finnegan EJ, Anderson PA (1995) Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4185-4188
- Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos DU, Phillips MS, Ganai MW (2002) The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant J.* 31:127–136
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO* 18: 4689-4699
- Farinhó M, Carlier J, Svetleva D, Coelho P, Monteiro A, Leitão J (2004) Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar *italica*). *Theor Appl Genet* 109:1392-1398
- Farinhó M, Coelho P, Monteiro A, Leitão J (2007) SCAR and CAPS markers flanking the *Brassica oleracea* L. *Pp523* downy mildew resistance locus demarcate a genomic region syntenic to the top arm end of *Arabidopsis thaliana* L. chromosome 1. *Euphytica* 157: 215-221
- Farinhó MJ, Coelho PS, Monteiro AA, Leitão JM (2000) RAPD and AFLP markers linked to *Peronospora parasitica* resistance genes in broccoli. In: King (GJ) Abstr 3rd Int Symp Brassicas. Horticulture Research International, Wellesbourne, UK poster75
- Farnham MW, Wang M, Thomas CE (2002) A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. *Euphytica* 128:405–407
- Ferreira ME, Williams PH, Osborn TC (1995) Mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus* using molecular markers. *Phytopathology* 85:218–220

Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublat A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15253-15258

Figdore SS, Ferreira ME, Slocum MK, Williams PH (1993) Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L.. *Euphytica* 69: 33-44

Flor, HH (1947) Host-parasite interactions in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685

Flor, HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathology* 9: 275-296

Gao M, Li G, Yang B, Qiu D, Farnham M, Quiros C (2007) High-density *Brassica oleracea* linkage map: identification of useful new linkages. *Theor Appl Genet* 115: 277-287

Gassmann W, Hinsch ME, Staskawicz BJ (1999) The *Arabidopsis* *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease resistance genes. *Plant J.* 20:265–277

Giovanelli JL, Farnham MW, Wang M (2002) Development of sequence characterized amplified region markers linked to downy mildew resistance in broccoli. *J Amer Soc Hortic Sci* 127: 597-601

Grandclément C, Thomas G (1996) Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Worrton in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet* 93: 86-90

Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the *Arabidopsis* *RPML* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843–846

Grist SA, Firgaira FA, Morley AA (1993) Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 15: 304–309.

Gu KY, Yang B, Tian DS, Wu LF, Wang DJ, Sreekala C, Yang F, Chu ZQ, Wang GL, White FF, Yin ZC (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435: 1122-1125

Gu Y, Zhao QC, Sun DL, Song WQ (2008) A genetic linkage map base don AFLP and NBS markers in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*). *Bot Studies* 49: 93-99

Halterman D, Zhou F, Wei F, Wise RP, Schulze-Lefert P (2001) The *MLA6* coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. *Plant J*. 25:335–348

Halterman DA, Wise RP (2004) A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley *MLA6* and *MLA13* alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling. *Plant J* 38: 215-226

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791

Hardham AR (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology* 9: 31-39

Hirai M, Harada T, Kubo N, Tsukada M, Suwabe K, Matsumoto S (2004) A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor Appl Genet* 108:639–643

Holub EB (1997) Organization of resistance genes in Arabidopsis. In the gene-for-gene relationship in plant–parasite interactions (Crute IR, Holub EB and Burdon JJ, eds). Wallingford, UK. *CAB International*: 5–26

Holub EB (2008) Natural history of Arabidopsis thaliana and oomycete symbioses. *Eur J Plant Pathol* 122:91–109

Holub EB, Beynon JL, Crute IR (1994) Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 7:223–239

Holub EB, Beynon JL (1996) Symbiology of mouse ear cress(*Arabidopsis thaliana*) and oomycetes. *Adv. Bot. Res.* 24: 228-273.

Hoser-Krauze J, Lakowska-Ryk E, Antosik J (1987) The inheritance of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) leaf resistance to downy mildew – *Peronospora parasitica* (Pers.) ex Fr. *Genetica Polonica* 28:377-380

Hoser-Krauze J, Lakowska-Ryk E, Antosik J (1995) The inheritance of resistance of some *Brassica oleracea* L. cultivars and lines to downy mildew – *Peronospora parasitica* (Pers.) ex Fr.. *J Appl Genet* 36:27–33

Huang S, van der Vossen EA, Kuang H, Vleeshouwers VG, Zhang N, Borm TJ, van Eck HJ, Baker B, Jacobsen E, Visser RG (2005) Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant J* 42: 251-261

Hughes SL, Hunter PJ, Sharpe AG, Kearsey MJ, Lydiate DJ, Walsh JA (2003). Genetic mapping of the novel turnip mosaic virus resistance gene *TuRB03* in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*. 107: 1169-1173.

Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol* 39: 285:312

Ignatov, AN, Kuginuki Y, Suprunova TP, Pozmogova GE, Seitova AM, Dorokhov DB Hirai M (2000) RAPD-markers linked to the locus for resistance to the race 4 pathogen for black rot, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow. in *Brassica rapa* L. *Genetica* 36: 357–360.

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, Dejong PJ (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics* 6: 84-89

Iyer, AS; McCouch, SR (2004) The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1348-1354

Jablonska B, Ammiraju JSS, Bhattarai KK, Mantelin S, Ilarduya OM, Roberts PA, Kaloshian I (2007) The *Mi-9* gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi-1*. *Plant Physiol* 143: 1044-1054

Jensen BD, Hockenull J, Munk L (1999) Seedling and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower (*Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis*). *Plant Pathol* 48:604–612

Jia YL, Sean AM, Gregory TB, Howard PH, Barbara V (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19: 4004-4014

Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. *Science* 258: 985-987

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-793

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329

Joos HJ, Mauch-Mani B, Slusarenko AJ (1996) Molecular mapping of the Arabidopsis locus *RPP11* which conditions isolate-specific hypersensitive resistance against downy mildew in ecotype RLD. *Theor Appl Genet* 92:281–284

- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3289-3302
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G (2001) Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6511-6515
- Keri, M., van den Berg, C.J.G., McVetty, P.B.E., and Rimmer, S.R. 1997. Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica juncea*. *Phytopathology*, **87**: 594–598.
- Kianian SF, Quiros CF (1992) Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. *Theor Appl Genet* 84: 544-554
- Kim JS, Chung TY, King GJ, Jin M, Yang T-J, Jin Y-M, Kim H-I, ParkB-S (2006) A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics* 174:29–39
- Kim YJ, Lin NC, Martin GB (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the *Pto* kinase and activate plant immunity. *Cell* 109: 589-598
- Kole C, Teutonico R, Mengistu A, Williams PH, Osborn TC (1996) Molecular mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica rapa*. *Phytopathology* 86:367–369
- Kuginuki Y, Ajisaka H, Yui M, Yoshikawa H, Hida K, Hirai M (1997) RAPD markers linked to a clubroot resistance locus in *Brassica rapa* L. *Euphytica* 98:149–154
- Labana KS, Gupta ML (1993) Importance and Origin, in Breeding Oilseed Brassicas. Edited by Labana KS, Banga SS, Banga SK. Berlin Springer-Verlag Press: 1-20
- Lagercrantz U, Lydiate DJ (1995) RFLP mapping in *Brassica nigra* indicates differing recombination rates in male and female meioses. *Genome* 38: 255-264
- Lagudah ES, Moullet O, Appels R (1997) Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. *Genome* 40: 659-665
- Lai CW, Yu Q, Hou S, Skelton RL, Jones MR, Lewis KLT, Murray J, Eustice M, Guan P, Agbayani R, Moore PH, Ming R, Presting GG (2006) Analysis of papaya BAC end sequences reveals first insights into the organization of a fruit tree genome. *Mol Gen*

Landry BS, Hubert N, Crete R, Chang MS, Lincoln SE, Etoh T (1992) A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35: 409-420

Landry BS, Hubert N, Etoh T (1991) A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragments length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34: 543-552

Lanfermeijer FC, Dijkhuis J, Sturre MJG, de Haan P, Hille J (2003) Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-2(2)* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol Biol* 52: 1037-1049

Lanfermeijer FC, Warmink J, Hille J (2005) The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-2(2)* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *J Exp Bot* 56: 2925-2933

Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and tobacco viral resistance gene. *N. Plant Cell* 7:1195–1206

Lehmann P (2002) Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J Appl Genet* 43: 403-414

Leitão JV (2005) Mapeamento de um gene de resistência ao míldio em Couve Tronchuda. (Relatório de estágio – FERN, UAAlg)

Lim G, Jewell E, Li X, Erwin T, Love C, Batley J, Spangenberg G, Edwards D (2007) A comparative map viewer integrating genetic maps for *Brassica* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 7: 40

Lionneton E, Ravera S, Sanchez L, Aubert G, Delourme R, Ochatt S (2002) Development of an AFLP-based linkage map and localization of QTLs for seed fatty acid content in condiment mustard (*Brassica juncea*). *Genome* 45: 1203-1215

Liu J, Liu X, Dai L, Wang G (2007) Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics* 34: 765-776

Liu X, Lin F, Wang L, Pan Q (2007) The *in silico* map based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. *Genetics* 176: 2541-2549

- Loh YT, Martin GB (1995) The disease-resistance gene *Pto* and the fenthion-sensitivity gene *Fen* encode closely related functional protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4181-4184
- Lombard V, Delourme R (2001) A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.) construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theor Appl Genet* 103: 491-507
- Lucas JA, Crute IR, Sherriff C, Gordon PL (1988) The identification of a gene for race-specific resistance to *Peronospora parasitica* (downy mildew) in *Brassica napus* var. *oleifera* (oilseed rape). *Plant Pathol* 37:538–545
- Lucas JA, Hayter JBR, Crute IR (1995) The downy mildews: host specificity and pathogenesis. In K. Kohmoto, U.S. Singh, R.P. Singh (eds.). Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Volume II. Eukaryotes. UK: Pergamon Publishers, p. 217-238
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743-754
- Mahajan V, Gill HS, More TA (1995) Inheritance of downy mildew resistance in Indian cauliflower (group III). *Euphytica* 86:1–3
- Mahmood T, Ekuere U, Yeh F, Good AG, Stringam GR (2003) RFLP linkage analysis and mapping genes controlling the fatty acid profile of *Brassica juncea* using reciprocal DH population. *Theor Appl Genet* 107: 283-289
- Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, Baron F, Thomas G (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101:885–891
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Ann Rev Plant Biol* 54: 23-61
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chungwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle E, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-1436
- Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*). *Euphytica* 104: 79-86

- Mayerhofer R, Bansal VK, Thiagarajah MR, Stringam GR, Good AG (1997) Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*. *Genome* 40: 294-301
- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub E, Dangl JL (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1861–1874
- McDowell JM, Simon SA (2006) Recent insights into R gene evolution. *Mol Plant Pathology* 7: 437-448
- McRostie GP (1919) Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. *Phytopathology* 9: 141-148
- Meyers BC, Kaushik S, Nandety (2005) Evolving disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 8: 129-134
- Meyers BC, Shen KA, Rohani P, Gaut BS, Michelmore RW (1998) Receptor like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. *Plant Cell* 10:1833–1846
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (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. USA* 88: 9828-9832
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307-1319
- Monteiro AA, Coelho PS, Bahcevandziev K, Valério L (2005) Inheritance of downy mildew resistance at cotyledon and adult-plant stages in ‘Couve Algarvia’ (*Brassica oleracea* var. *tranchuda*). *Euphytica* 141:85–92
- Moriguchi K, Kimizuka-Takagi C, Ishii K, Nomura K (1999) A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Breed Sci* 49:257–265
- Morinaga T (1934) Interspecific hybridization in *Brassica*. IV. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytology* 6: 62-67
- Moss NA, Crute IR, Lucas JA, Gordon PL (1988) Requirements for analysis of host-species specificity in *Peronospora parasitica* (downy mildew). *Cruciferae Newslett* 13:114–116

- Mucyn TS, Clemente A, Andriotis VME, Balmuth AL, Oldroyd GED, Staskawicz BJ, Rathjen JP (2006) The tomato NBARC-LRR protein *Prf* interacts with *Pto* kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* 18: 2792-2806
- Mukherjee AK, Mohapatra T, Varshney A, Sharma R, Sharma RP (2001) Molecular mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in Indian mustard. *Plant Breed* 120:483-487
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Nashaat NI, Awasthi RP (1997) New genes for resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Plant Pathol* 46:964-968
- Nashaat NI, Heran A, Awasthi RP, Kolte SJ (2004) Differential response and genes for resistance to *Peronospora parasitica* (downy mildew) in *Brassica juncea* (mustard). *Plant Breeding* 123: 512-5
- Natti JJ, Atkin JD (1960) Inheritance of downy mildew resistance in broccoli. *Phytopathology* 50:241
- Natti JJ, Dickson MH, Atkin JD (1967) Resistance of *Brassica oleracea* varieties to downy mildew. *Phytopathology* 57:144-147
- Nelson RT, Shoemaker R (2006) Identification and analysis of gene families from the duplicated genome of soybean using EST sequences. *BMC Genomics* 7:204
- Niu X, Leung H, Williams PH (1983) Sources and nature of resistance to downy mildew and turnip mosaic in Chinese cabbage. *J Am Soc Hort Sci* 108:775-778
- Nozaki T, Kumazaki A, Koba T, Ishikawa K, Iekashi H (1997) Linkage analysis among loci for RAPDs, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L.. *Euphytica* 95: 115-123
- Ohtsuki A, Sasaki A (2006) Epidemiology and disease-control under gene-for-gene plant pathogen interaction. *J Theor Biol* 238: 780-794
- Ori N, Eshed Y, Paran I, Presting G, Aviv D, Tanksley S, Zamie D, Flur R (1997) The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* 9:521-532
- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menendez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance

to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on candidate gene approach. *Plant J* 38: 285-297

Parker JE, Coleman MJ, Dean C, Jones JDG (1997) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 9:879–894

Parker JE, Szabo V, Staskawicz BJ, Lister C, Dean C, Daniels MJ, Jones JDG (1993) Phenotypic characterization and molecular mapping of the *Arabidopsis thaliana* locus *RPP5*, determining disease resistance to *Peronospora parasitica*. *Plant J* 4:821–831

Parkin IAP, Gulden SM, Sharpe AG, Lukens L, Trick M, Osborn TC, Lydiate DJ (2005) Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171: 765-781

Parkin IAP, Sharpe AG, Keith DJ, Lydiate DJ (1995) Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* 38: 1122-1131

Parniske M, HammondKosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BBH, Jones JDG (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. *Cell* 91: 821-832

Paux E, Roger D, Badaeva E, Gay G, Bernard M, Sourdille P, Feuillet C (2006) Characterising the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-endsequencing on chromosome 3B. *Plant J* 48:463–474

Piao ZY, Park YJ, Choi SR, Hong CP, Park JY, Lim YP (2002) Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene into SCAR marker. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43: 653-659

Piao ZY, Deng YQ, Choi S R, Park YJ, Lim YP (2004) SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* 108:1458–1465

Pilet ML, Delourme N, Foisset N, Renard M (1998a) Identification of loci contributing to quantitative resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 96: 23-30

Pilet ML, Delourme N, Foisset N, Renard M (1998b) Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 97: 398-406

Pilet ML, Duplan G, Archipiano H, Barret P, Baron C, Horvais R, Tanguy X, Lucas MO, Renard M, Delourme R (2001) Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Sci* 41: 197-205

Piquemal J, Cinquin E, Couton F, et al. (2005) Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor Appl Genet* 111:1514–1523

Prabhu KV, Somers DJ, Rakow G, Gugel RK (1998) Molecular markers linked to white rust resistance in mustard *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet* 97:865–870

Pradhan AK, Gupta V, Mukhopadhyay A, Arumugam N, Sodhi YS, Pental D (2003) A high-density linkage map in *Brassica juncea* (Indian mustard) using AFLP and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 106: 607-614

Pryor T, Ellis J (1993) The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv. Plant Pathol* 10: 281-305

Qu SH, Liu GF, Zhou B, Bellizzi M, Zeng LR, Dai LY, Han B, Wang GL (2006) The broad-spectrum blast resistance gene Pi9 encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172: 1901-1914

Radwan O, Mouzeyar S, Nicolas P, Bouzidi MF (2005) Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii*. *J Experi Botany* 56: 567–575

Ramsay LD, Jennings DE, Bohuon EJR, Arthur AE, Lydiate DJ, Kearsey MJ, Marshall DF (1996) The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of QTL loci. *Genome* 39: 558-567

Reignault P, Frost LN, Richardson H, Daniels MJ, Jones JDG, Parker JE (1996) Four *Arabidopsis* RPP loci controlling resistance to the Noco2 isolate of *Peronospora parasitica* map to regions known to contain other RPP recognition specificities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 464–473.

Richter TE, Ronald PC (2000) The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42: 195-204

Rimmer SR, Borhan MH, Zhu B, Somers D (1999) Mapping resistance genes in *Brassica napus* to *Leptosphaeria maculans*. Proc 10th Int Rapeseed Congress, Canberra, Australia. Poster 262

Rimmer, S.R., and van den Berg, C.G.J. 1992. Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 56–66

- Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, Manzanares-Dauleux MJ (2004) Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108:1555–1563
- Ronald PC, Salmeron JM, Carland FM, Staskawicz BJ (1992) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bacteriol* 174: 1604-1611
- Saal B, Plieske QJ, Hu J, Quiros CF, Struss D (2001) Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* II. Assignment of rapessed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet* 102: 695-699
- Salmeron JM, Oldroyd GED, Rommens CMT, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* 86: 123–133
- Salvaudon L, Heraudet V, Shykoff JA (2005) Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interaction in a plant-pathogen system. *Evol Int J Org Evol* 59: 2518-2524
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schornack S, Ballvora A, Grlebeck D, Peart JR, Baulcombe DC, Ganai M, Baker B, Bonas U, Lahaye T (2004) The tomato resistance protein *Bs4* is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of *AvrBs4* and over expressed *AvrBs3*. *Plant J* 37: 46-60
- Sharma R, Aggarwal RAK, Kumar R, Mohapatra T, Sharma RP (2002) Construction of an RAPD linkage map and localization of QTLs for oleic acid level using recombinant inbreds in mustard (*Brassica juncea*). *Genome* 45:467-472
- Sharpe AG, Parkin IAP, Keith DJ, Lydiate DJ (1995) Frequent nonreciprocal translocations in amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* 38: 1112-1121
- Shen QH, Zhou F, Bieri S, Haizel T, Shirasu K, Schulze-Lefert P (2003) Specificity and RAR1/SGT1 Dependence in Barley *Mla* Disease Resistance Genes to the Powdery Mildew Fungus. *Plant Cell* 15: 732-744
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in

Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8794-8797

Slocum MK, Figdore SS, Kennard WC, Suzuke JY, Osborn TC (1990) Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 80: 57-64

Snowdon RJ (2007) Cytogenetics and genome analysis in *Brassica* crops. *Chromosome Research* 15: 85-95

Snowdon RJ, Friedt W (2004) Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123: 1-8

Somers DJ, Rakow G, Rimmer SR (2002) *Brassica napus* DNA markers linked to white rust resistance in *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet* 104:1121–1124

Song KM, Suzuki JY, Slocum MK, Williams PH, Osborn TC (1991) A linkage map of *Brassica rapa* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci. *Theor Appl Genet* 82: 296-304

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270: 1804-1806

Sousa N (2007) Identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao míldio PpALG1, em *Brassica oleracea* var *trunchuda* (Relatório de estágio – FERN, UAIG)

Stackman EC, Parker JH, Piemeisel FJ (1918) Can biologic forms of stem rust on wheat change rapidly enough to interfere with breeding for rust resistance? *J Agric Res* 14: 111-123

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667

Sun XL, Cao YL, Yang ZF, Xu CG, Li XH, Wang SP, Zhang QF (2004) *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J* 37: 517-527

Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka S, Matsumoto S, Hirai M (2003) Identification of two *loci* for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet* 107: 997–1002

Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14153–14158

Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Sukamto, Takada M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y, Dinesh-Kumar SP (2002) *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J* 32:655-667

Takken FLW, Schipper D, Nijkamp HJJ, Hille J (1998) Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant J* 14: 401-411

Tanhuanpää PK, Vilkki JP, Vilkki HJ (1996) A linkage map of spring turnip rape based on AFLP and RAPD markers. *Agric Food Sci Finl* 5: 209-217

Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB (1995) Chromosome landing: A paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* 11: 63-68

Tao Q, Zhao H, Qiu L, Hong G (1994) Construction of a full bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Oryza sativa* genome. *Cell Res* 4: 127-133

Teutonico RA, Osborn TC (1994) Mapping of RFLP and qualitative trait *loci* in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea*, and *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 89:885–894

Thomas CM, Jones DA, Parniske M, Harrison K, Balint-Kurti PJ, Hatzixanthis K, Jones JD (1997) Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell* 9:2209–2224

Tiwari AS, Petrie GA, Downey RK (1988) Inheritance of resistance to *Albugo candida* race 2 in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.]. *Can J Plant Sci* 68:297–300

Tör M (2008) Tapping into molecular conversation between oomycete plant pathogens and their host. *Eur J Plant Pathol* 122: 57-69

Tör M, Holub EB, Brose E, Muskar R, Gunn N, Can C, Crute IR, Beynon JL (1994) Map positions of three *loci* in *Arabidopsis thaliana* associated with isolate-specific recognition of *Peronospora parasitica* (downy mildew). *Mol Plant Microbe Interact* 7: 214–222

Truco MJ, Quiros CF (1994) Structure and organization of the B genome based on linkage map in *Brassica nigra*. *Theor Appl Genet* 89: 590-598

U N (1935) Genomic analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* 7: 387-452

van der Biezen EA, Freddie CT, Kahn K, Parker JE, Jones JD (2002) *Arabidopsis RPP4* is a member of the *RPP5* multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signaling components. *Plant J*. 29:439–51 184

van der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-456

van der Hoorn RAL, de Witt PJGM, Joosten MH AJ (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* 6: 67-71

van der Vossen EA, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S (2005) The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J* 44: 208-222

van der Vossen EA, Sikkema A, Hekkert BTL, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Allefs S (2003) An ancient R gene from the wild species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J* 36: 867-882

van der Vossen EA, van der Voort JN, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J*. 23:567–576

Varshney A, Mohapatra T, Sharma RP (2004) Development and validation of CAPS and AFLP markers for white rust resistance gene in *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet*. 109: 153-159

Verma TS and Thakur PC (1989) Comparative field resistance of cabbage collection to downy mildew at seedling stage. *Indian Journal of Plant Protection*, 17: 79–80

Vicente JG, Taylor JD, Sharpe AG, Parkin IAP, Lydiate DJ, King GJ (2002) Inheritance of Race-Specific Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* Genomes. *Phytopathol.*, 92: 1134-1141

Vishunavat K, Nashaat NI, Heran A, Kolte SJ (1998) Sensitivity to the racemic mixture and isomeric forms of metalaxyl in Indian and European homothallic and heterothallic isolates in *Peronospora parasitica* in *Brassica* species. *Crop Prot* 17: 543-546

Voorrips RE, Jongerius MC, Kanne HJ (1997) Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 94: 75-82

Vos P, Hogers R, Bleeker R, 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

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* 19:55–64

Warren RF, Henk A, Mowery P, Holub E, Innes RW (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 10:1439–1452

Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Barker B (1994) The product of the Tobacco Mosaic Virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535

Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* 291: 118-120

Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant J* 37: 528-538

Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1663–1668

Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1216-1228

Zhou F, Kurth J, Wei F, Elliott C, Vale G, Yahiaoui N, Keller B, Somerville S, Wise R, Schulze-Lefert P (2001) Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13:337–350

Zhu B, Rimmer SR (2003) Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in two accessions of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathol.* 25: 98-103

Zietkiewicz E, Rafaski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183

Anexo I

Tabela I – Primers OP convencionais de 10-mer utilizados na estratégia de BSA.

KitsOP	Sequências5'-3'	KitsOP	Sequências5'-3'
AA-01	5'-AGACGGCTCC-3'	AC-01	5'-TCCCAGCAGA-3'
AA-02	5'-GAGACCAGAC-3'	AC-02	5'-GTCGTCGTCT-3'
AA-03	5'-TTAGCGCCCC-3'	AC-03	5'-CACTGGCCCA-3'
AA-04	5'-AGGACTGCTC-3'	AC-04	5'-ACGGGACCTG-3'
AA-05	5'-GGCTTTAGCC-3'	AC-05	5'-GTTAGTGCGG-3'
AA-06	5'-GTGGGTGCCA-3'	AC-06	5'-CCAGAACGGA-3'
AA-07	5'-CTACGCTCAC-3'	AC-07	5'-GTGGCCGATG-3'
AA-08	5'-TCCGCAGTAG-3'	AC-08	5'-TTTGGGTGCC-3'
AA-09	5'-AGATGGGCAG-3'	AC-09	5'-AGAGCGTACC-3'
AA-10	5'-TGGTCGGGTG-3'	AC-10	5'-AGCAGCGAGG-3'
AA-11	5'-ACCCGACCTG-3'	AC-11	5'-CCTGGGTCAG-3'
AA-12	5'-GGACCTCTTG-3'	AC-12	5'-GGCGAGTGTG-3'
AA-13	5'-GAGCGTCGCT-3'	AC-13	5'-GACCCGATTG-3'
AA-14	5'-AACGGGCCAA-3'	AC-14	5'-GTCGGTTGTC-3'
AA-15	5'-ACGGAAGCCC-3'	AC-15	5'-TGCCGTGAGA-3'
AA-16	5'-GGAACCCACA-3'	AC-16	5'-CCTCCTACGG-3'
AA-17	5'-GAGCCCGACT-3'	AC-17	5'-CCTGGAGCTT-3'
AA-18	5'-TGGTCCAGCC-3'	AC-18	5'-TTGGGGGAGA-3'
AA-19	5'-TGAGGCGTGT-3'	AC-19	5'-AGTCCGCCTG-3'
AA-20	5'-TTGCCTTCGG-3'	AC-20	5'-ACGGAAGTGG-3'
AB-01	5'-CCGTCGGTAG-3'	AD-01	5'-CAAAGGGCGG-3'
AB-02	5'-GGAAACCCCT-3'	AD-02	5'-CTGAACCGCT-3'
AB-03	5'-TGGCGCACAC-3'	AD-03	5'-TCTCGCCTAC-3'
AB-04	5'-GGCACGCGTT-3'	AD-04	5'-GTAGGCCTCA-3'
AB-05	5'-CCCGAAGCGA-3'	AD-05	5'-ACCGCATGGG-3'
AB-06	5'-GTGGCTTGGA-3'	AD-06	5'-AAGTGCACGG-3'
AB-07	5'-GTAAACCGCC-3'	AD-07	5'-CCCTACTGGT-3'
AB-08	5'-GTTACGGACC-3'	AD-08	5'-GGCAGGCAAG-3'
AB-09	5'-GGGCGACTAC-3'	AD-09	5'-TCGCTTCTCC-3'
AB-10	5'-TTCCCTCCA-3'	AD-10	5'-AAGAGGCCAG-3'
AB-11	5'-GTGCGCAATG-3'	AD-11	5'-CAATCGGGTC-3'
AB-12	5'-CCTGTACCGA-3'	AD-12	5'-AAGAGGGCGT-3'
AB-13	5'-CCTACCGTGG-3'	AD-13	5'-GGTTCCTCTG-3'
AB-14	5'-AAGTGCGACC-3'	AD-14	5'-GAACGAGGGT-3'
AB-15	5'-CCTCCTTCTC-3'	AD-15	5'-TTTGCCCCGT-3'
AB-16	5'-CCCGGATGGT-3'	AD-16	5'-AACGGGCGTC-3'
AB-17	5'-TCGCATCCAG-3'	AD-17	5'-GGCAAACCCT-3'
AB-18	5'-CTGGCGTGTC-3'	AD-18	5'-ACGAGAGGCA-3'
AB-19	5'-ACACCGATGG-3'	AD-19	5'-CTTGGCACGA-3'
AB-20	5'-CTTCTCGGAC-3'	AD-20	5'-TCTTCGGAGG-3'

(Continua na página seguinte)

KitsOP	Sequências5'-3'	KitsOP	Sequências5'-3'
AE-01	5'-TGAGGGCCGT-3'	AL-01	5'-TGTGACGAGG-3'
AE-02	5'-TCG TTCACCC-3'	AL-02	5'-ACCCTGTGGG-3'
AE-03	5'-CATAGAGCGG-3'	AL-03	5'-CCCACCCTTG-3'
AE-04	5'-CCAGCACTTC-3'	AL-04	5'-ACAACGGTCC-3'
AE-05	5'-CCTGTCAGTG-3'	AL-05	5'-GACTGCGCCA-3'
AE-06	5'-GGGGAAGACA-3'	AL-06	5'-AAGCGTCCTC-3'
AE-07	5'-GTGTCAGTGG-3'	AL-07	5'-CCGTCCATCC-3'
AE-08	5'-CTGGCTCAGA-3'	AL-08	5'-GTCGCCCTCA-3'
AE-09	5'-TGCCACGAGG-3'	AL-09	5'-CAGCGAGTAG-3'
AE-10	5'-CTGAAGCGCA-3'	AL-10	5'-AAGGCCCTG-3'
AE-11	5'-AAGACCGGGA-3'	AL-11	5'-GTCACGTCCT-3'
AE-12	5'-CCGAGCAATC-3'	AL-12	5'-CCCAGGCTAC-3'
AE-13	5'-TGTGGACTGG-3'	AL-13	5'-GAATGGCACC-3'
AE-14	5'-GAGAGGCTCC-3'	AL-14	5'-TCGCTCCGTT-3'
AE-15	5'-TGCCTGGACC-3'	AL-15	5'-AGGGGACACC-3'
AE-16	5'-TCCGTGCTGA-3'	AL-16	5'-CTTTCGAGGG-3'
AE-17	5'-GGCAGGTTCA-3'	AL-17	5'-CCGCAAGTGT-3'
AE-18	5'-CTGGTGCTGA-3'	AL-18	5'-GGAGTGGACT-3'
AE-19	5'-GACAGTCCCT-3'	AL-19	5'-TCTGCCAGTG-3'
AE-20	5'-TTGACCCAG-3'	AL-20	5'-AGGAGTCGGA-3'
AK-01	5'-TCTGCTACGG-3'	AM01	5'-TCACGTACGG-3'
AK-02	5'-CCATCGGAGG-3'	AM02	5'-ACTTGACGGG-3'
AK-03	5'-GGTCCTACCA-3'	AM03	5'-CTTCCCTGTG-3'
AK-04	5'-AGGGTCGGTC-3'	AM04	5'-GAGGGACCTC-3'
AK-05	5'-GATGGCAGTC-3'	AM05	5'-GGGCTATGCC-3'
AK-06	5'-TCACGTCCCT-3'	AM06	5'-CTCGGGATGT-3'
AK-07	5'-CTTGGGGGAC-3'	AM07	5'-AACCGCGGCA-3'
AK-08	5'-CCGAAGGGTG-3'	AM08	5'-ACCACGAGTG-3'
AK-09	5'-AGGTCGGCGT-3'	AM09	5'-TGCCGGTTCA-3'
AK-10	5'-CAAGCGTCAC-3'	AM10	5'-CAGACCGACC-3'
AK-11	5'-CAGTGTGCTC-3'	AM11	5'-AGATGCGCGG-3'
AK-12	5'-AGTGTAGCCC-3'	AM12	5'-TCTCACCGTC-3'
AK-13	5'-TCCCACGAGT-3'	AM13	5'-CACGGCACAA-3'
AK-14	5'-CTGTCATGCC-3'	AM14	5'-TGGTTGCGGA-3'
AK-15	5'-ACCTGCCGTT-3'	AM15	5'-GATGCGATGG-3'
AK-16	5'-CTGCGTGCTC-3'	AM16	5'-TGGCGGTTTG-3'
AK-17	5'-CAGCGGTCAC-3'	AM17	5'-CCTAACGTCC-3'
AK-18	5'-ACCCGGAAAC-3'	AM18	5'-ACGGGACTCT-3'
AK-19	5'-TCGCAGCGAG-3'	AM19	5'-CCAGGTCTTC-3'
AK-20	5'-TGATGGCGTC-3'	AM20	5'-ACCAACCAGG-3'

(Continua na página seguinte)

KitsOP	Sequências5'-3'	KitsOP	Sequências5'-3'
AN-01	5'-ACTCCACGTC-3'	AO20	5'-GGCTTGCCTG-3'
AN-02	5'-CACCGCAGTT-3'	AO16	5'-CACAACGGGA-3'
AN-03	5'-AGCCAGGCTG-3'	AO17	5'-CCCATGTGTG-3'
AN-04	5'-GGCGTAAGTC-3'	AO18	5'-GGGAGCGCTT-3'
AN-05	5'-GGGTGCAGTT-3'	AO19	5'-GTTCTCGGAC-3'
AN-06	5'-GGGAACCCGT-3'	Z-01	5'-TCTGTGCCAC-3'
AN-07	5'-TCGCTGCGGA-3'	Z-02	5'-CCTACGGGGA-3'
AN-08	5'-AAGGCTGCTG-3'	Z-03	5'-CAGCACCGCA-3'
AN-09	5'-GGGGGAGATG-3'	Z-04	5'-AGGCTGTGCT-3'
AN-10	5'-CTGTGTGCTC-3'	Z-05	5'-TCCCATGCTG-3'
AN-11	5'-GTCCATGCAG-3'	Z-06	5'-GTGCCGTTCA-3'
AN-12	5'-AACGGCGGTC-3'	Z-07	5'-CCAGGAGGAC-3'
AN-13	5'-CTTCCAGGAC-3'	Z-08	5'-GGGTGGGTAA-3'
AN-14	5'-AGCCGGGTAA-3'	Z-09	5'-CACCCCAGTC-3'
AN-15	5'-TGATGCCGCT-3'	Z-10	5'-CCGACAAACC-3'
AN-16	5'-GTGTCGAGTC-3'	Z-11	5'-CTCAGTCGCA-3'
AN-17	5'-TCAGCACAGG-3'	Z-12	5'-TCAACGGGAC-3'
AN-18	5'-TGTCCTGCGT-3'	Z-13	5'-GACTAAGCCC-3'
AN-19	5'-ACCACGCCTT-3'	Z-14	5'-TCGGAGGTTC-3'
AN-20	5'-GAGTCCTCAC-3'	Z-15	5'-CAGGGCTTTC-3'
AO-01	5'-AAGACGACGG-3'	Z-16	5'-TCCCCATCAC-3'
AO-02	5'-AATCCGCTGG-3'	Z-17	5'-CCTTCCCACT-3'
AO-03	5'-AGTCGGCCCA-3'	Z-18	5'-AGGGTCTGTG-3'
AO-04	5'-AACAGGGCAG-3'	Z-19	5'-GTGCGAGCAA-3'
AO-05	5'-TGGAAGCACC-3'	Z-20	5'-ACTTTGGCGG-3'
AO-06	5'-AGGCAGCCTG-3'	Y-09	5'-AGCAGCGCAC-3'
AO-07	5'-GATGCGACGG-3'	Y-10	5'-CAAACGTGGG-3'
AO-08	5'-ACTGGCTCTC-3'	Y-11	5'-AGACGATGGG-3'
AO-09	5'-CCAGATGGGG-3'	Y-12	5'-AAGCCTGCGA-3'
AO-10	5'-GACATCGTCC-3'	Y-13	5'-GGGTCTCGGT-3'
AO-11	5'-GGGGGCTTGA-3'	Y-14	5'-GGTCGATCTG-3'
AO-12	5'-TCCCGGTCTC-3'	Y-15	5'-AGTCGCCCTT-3'
AO-13	5'-CCCACAGGTG-3'	Y-16	5'-GGGCCAATGT-3'
AO-14	5'-CTACTGGGGT-3'	Y-17	5'-GACGTGGTGA-3'
AO-15	5'-GAAGGCTCCC-3'	Y-18	5'-GTGGAGTCAG-3'
		Y-19	5'-TGAGGGTCCC-3'

AnexoII

Tabela II - Primers não convencionais com mais de 10-mer, utilizados no teste por BSA.

Nome	Sequência(5'...3')	Tamanho (pb)
33F	TCCACAGTGGGCGCAAAC	18
33R	AAAGGACATGAGGTAGGCC	19
34F	ACATTCCTCAGAGTGACCAGC	21
34R	GGGGGGAGAGAACTAGACTG	20
35F	GTATACCCCTCACCACCCAAG	21
35R	GCGCAATCCATAGCGCAAGTC	21
36F	AGGTGAAGGTGGAGCTCACC	20
36R	GTCGCCGTTAATCGACACGTG	21
37F	GCGTAGAAAGCTGCAGGCTGC	21
37R	CCACCTTGAGTACGGGGACAC	21
38F	TGATCATGGCGACGACCCAG	20
39F	TTGGAGCCGATATTATCGTCC	21
39R	ACGATCTCACAATGCTCCTCG	21
40F	TCGCGTATTATTCAAACAGCC	21
40R	ACTGAGGGGGTTCACGAG	18
41R	CCCTCGCTCTTTTAGTTGGGG	21
42F	TGTGTATGCGGTGTGTCTG	19
42R	ATGAATCACGCACAATGGG	19
43R	ACCGAACCTAACCTGACCC	19
44F	CCACTTCCCTTTGGTCCTCCC	21
44R	CGCCATTGATGGGTCCAAGC	21
45F	AGTTATGAGTTCGCTCGCAC	20
45R	GGAGGAGACGAAGACGAGG	19
46F	TGTCGCTGAAGTTCGGCGAG	20
46R	ACAGCGTCCACGGATCTCG	19
47R	GAGTGTGAGAAAGGGATGG	19
48F	TCATCACCCCGCGCCTTTGC	20
48R	TGCCAAGCCATCCTCAGACG	20
49F	ACATCGCACTGGGGAAAC	18
49R	ACTCTATCTCTACTCCTTC	19
50F	AGCTCCAAATGGCTGGAGG	19
50R	GGTCACAGAATACGGATGACG	21
51F	AGATGTTGGATGAGCACGTC	20
51R	CTAGCATTCTTTTGACCTCTC	21
52R	TTCACACCGAGAAAGCCCGG	20
53F	GAGTCACAGTTACTTCTCTGG	21
53R	TCCCTGCTAACAATGGTGCCC	21
54R	ACTAAAACGGCGCGAGCATGC	21
55R	TGAGCTACGACTGCTCGAAGC	21
56F	TGCTGGCTCTGTGGGATG	18
56R	TTAGGTTTTTCAGTGGAGAGAG	21
57F	TCTTTTTGGCCTCGCGGAGC	20

(Continua na página seguinte)

58F	TGGGAGCCATCTAATTGTTCC	21
58R	TCAGATGTGTATGCAGTCCTC	21
59F	CCCTTTCATTCCCTCTCTAC	20
59R	GTGGGATCATTAAAGCCACCAG	21
60F	TGTAGGCATATGGTGGGTCTG	21
60R	ATCTCTTAATCCAAGGGCCG	20
62F	GCCTCGAAAACACTGCTAGGC	21
122F	GACAATTTAAGGAGGTGGTGTAGG	24
122R	TCCTCACAAGGCCACCATCAT	21
235F	ATTTCGAGCCCTTGGTCG	18
235R	TTTATGGGGTCGCGTCGG	18
242R	TCTCAGGGCACACATCAC	18
287F	AGGGAAGCTTTGGAGGTGCAG	21
287R	TGCAATAGCGATGATAAACCCAG	24
330F	GTAACACAACACTCTACTCGGCA	24
330R	CCTCCTCCAATTAAGATCCCTCAA	24
374F	CGAGCAATGACGCTCGGG	18
403F	GGTCCGTGTTGCCGGG	17
403R	TCCTGAGAATCCAACCTCC	18
431F	CACATGTCCACGTATTGG	18
431R	GTAGCTCCACTCAGCCC	17
483F	GGAGAAACGGATCTAGGGCAC	21
513R	CGAACCGTTTGGACCGCC	18
521R	AGCATCAAGGGGTCCCGAGTT	21
607F	AGTGCATACCATTAACCC	18
607R	CGATATTCAGCAATCTCC	18
62R	GGTGTGTCAATTAGGCCTGAC	21
63F	AGAAATGCTTCCCGACGAACG	21
64F	AGTCACCAACCTCACTATCAC	21
64R	CTCAAACAAGAAGAGCAACAG	21
65F	TGAAGGTCATGCTTGACTCTC	21
65R	AGATGTCGGGCCATTGGG	18
66F	TGGTAAGCCATTTAATGAGC	20
66R	CATTTCACTCTGATACAACCC	21
68F	GCATATCTTCATTGGCTAGTC	21
68R	TAATTGTTGGCCACAGTGC	19
69F	TCCCCCTAATCATCGGAAGCC	21
70F	GAAGGCTCATCACCACCCGAC	21
70R	AATCCCTGGTGCATCAGC	18
71F	TGTCCTGCTAAACGCGCACC	20
71R	CCGAGAACTACTATTCTCGGG	21
72F	TGCTTCAGCTATGCACACAGC	21
73R	TCCTTGAAGAAATTGGCAG	19
755F	CTACTCTACTCGGGACC	17
755R	CTCAGATCCTCCTCCTC	17
75F	TCGGTAGAGATCGACATCGCG	21
75R	AGTGTTTCATGGCTCCAC	19

(Continua na página seguinte)

76F	ACCCAGCCATTGTCGTGCCTG	21
76R	AGTTTACAAGGCGCATAGG	19
77F	TCATTTAGGATGCTGCATGG	20
78F	CCCTACAGTAAGTTCAGCAC	20
790F	ACGAGTAAAGCGGTGTGG	18
790R	TCTTCCCAAAGTGCGTGG	18
797R	AGATCCCGCCGAGGCCG	17
79F	ACATGCATGAGGTCATGTGG	20
80F	TGAAATCCGTCCAGTGCGC	19
816F	CTCCTCAGCTTCGTCGCC	18
816R	GACGAGATTGGCGTATCCC	19
81F	ACATTCCTCAGAGTGACCAGC	21
81R	CACTAATCCTTGACCCAGACC	21
82F	CTAAGTTAAACCTGGATGAGC	21
82R	TCGCATGCAATGTGTGGGGTG	21
888F	CGCATCAGCGCCAAACGC	18
888R	GGAAGCGAAAGGAGATCG	18
G100R	CTCTGGATAACATAGTAAG	19
G43R	TTACTTGACCCAAACTC	17
731629F	AAGCGGAAGCGTGTTG	16
731629R	CCTCTACCTCGTTCACC	17
731803F	AGCTTCGACAAGAACTGG	18
731803R	GGAATGGATGTGTGAGAG	18
730928F	TTCTGCTCCGCTCTTCTTC	19
730928R	AATTGAGGCGATCGATGC	18
731498F	AAGAGGACGACGAAGAAACC	20
731498R	CCAATGGACACCAATTCG	18
732176F	CCCTTATACGCAGATTCG	18
732176R	CACTCACCAACAAAGCTG	18
730779F	CATACTCGATCTGCAAGC	18
730779R	GCTCATAACAACACGG	18
730908F	TTCTACTGCCACATGGTG	18
730908R	G TTCACACCACATCACGTAC	20
730886F	CTCATCTCACTCCATACC	18
730886R	CCATTCGATATCGCCTTC	18
731753F	CTTTTGGGCTATGTTGCG	18
731753R	TGCTAAAGTACCCACCAG	18
730771F	TAGTAGCAGCAGCAGTAG	18
730771R	GTCGATTCGCTAACGTC	18
731325F	CTTTGGTAACGCGTACAG	18
731325R	CTTCTCTGTAGTAGCTGG	18
731955F	AGAAGCAGGTGGTTATCG	18
731955R	AAATCTCGCGAAGCGATG	18
732283F	CAAACGACCCAACGAAGATC	20
732283R	GTAATGTGTGCAAGCAGTCG	20
730925F	CTAACTCCAGGATGTGTG	18
730925R	GTGTCTTTGTACTCCAGTCC	20

(Continua na página seguinte)

731137F	GGACTTGTATGTCTTCGC	18
731137R	ATCAACCACAAGGAACG	18
149881F	CTTAGGGTTGAATGGTCC	18
149881R	ATCTGAGACCCAAGTTCG	18
731094F	CTGCAAGACCATGTTGTG	18
731094R	TGTCGTGTGAACATGGAG	18
731711F	CACAATCGAACTCCGTC	17
731711R	CAGGAAGTAGCTCTTTGC	18
732017F	CGAGCGAAGAATCCGT	16
732017R	CTCTAGACGAAGGAGACGA	19
731132F	CGCAAACAACAACAGCAG	18
731132R	GGGTTTCTTACCTTCCATCG	20
731012F	GGGAATCGATGGAAGGTAAG	20
731012R	ATTCTGACCCTCAGCTC	17
SSRB01F	TGTCTGTTTGAGTAACCCGGTA	22
SSRB01R	TTGTTCAAACCCCTCACCAA	20
SSRB022F	ACTCACTTTTGTGGGCGTC	20
SSRB022R	GGAGCCGCTTTCTCTACCTT	20
SSRB031F	CATGCATACCGTCCAAACAG	20
SSRB031R	ATGCTGGTGATTTTCCTTGG	20
SSRB05F	GAGGCTGAATGGATGATTTTC	21
SSRB05R	CGGTTATGTTCCGGTTTGAT	20
SSRB024F	TCATCACCACCACCATCATC	20
SSRB024R	CGCTCGTTTCTTCGAATTGT	20
SSRB038F	GTAAGACCAGGTTTGCTGCC	20
SSRB038R	TCGGAACGAAACCTACCAC	20
SSRB08F	TGGGTCCCAGTTACAAGAGG	20
SSRB08R	GATCGACGGCCATTATGATT	20
SSRB025F	CACCTTCAGATTCCTTCCA	20
SSRB025R	CAACGCGGTCGTTTTAAGTT	20
SSRB039F	AACGCATCCATCCTCACTTC	20
SSRB039R	TAAACCAGCTCGTTCGGTTC	20
SORA21BF	TTCAGCACTAGCTCATGG	18
SORA21BR	TCCTTCTCAGGCACTCTT	18
SORA43F	GCGCGTGTGGGATCAGAA	18
SORA43R	CTTCTCCACCGTCGATCG	18
MB4F	TGTTTTGATGTTTCCTACTG	20
MB4R	GAACCTGTGGCTTTTATTAC	20
BN12AF	GCCGTTCTAGGGTTTGTGGGA	21
BN12AR	GAGGAAGTGAGAGCGGGAAATCA	23
NGA111F	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG	21
NGA111R	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	21
BN72AF	GCCCACCCACCTTCTTGTCACCT	23
BN72AR	CCCTTCATCCAAACTCCTCCTCGT	24
NGA248F	TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC	22
NGA218R	TACCGAACCAAAAACACAAAGG	22
BN83B1F	GCCTTCTTCACACCTGATAGCTA	24

(Continua na página seguinte)

BN83B1R	TCAGGTGCCTCGTTGAGTTC	20
BN35DF	GCAGAAGGAGGAGAAGAGTTGG	22
BN35DR	TTGAGCCGTAAAGTTGTACCT	22
LS107F	GTAAAGTGTGGCGTTAGAGG	20
LS107R	CCTTGGTACATGCCACTGAA	20
PSMPSAA374F	GTCAATATCTCCAATGGTAACG	22
PSMPSAA374R	GCATTTGTGTAGTTGTAATTTTCAT	24
PSMPSA5F	GTAAGCATAAGGGGATTCTCAT	23
PSMPSA5R	CAGCTTTTAACTCATCTGACACA	23
PSMPSAD60F	CTGAAGCACTTTTGACAACCTAC	22
PSMPSAD60R	ATCATATAGCGACGAATACACC	22
PSMPSAD51F	ATGAAGTAGGCATAGCGAAGAT	22
PSMPSAD51R	GATTAAATAAAGTTCGATGGCG	22
PSMPSAA369F	CCCTTCGCACACCATTCTA	19
PSMPSAA369R	AGTCGTTTTGGAGATCTGTTCA	22
UDP965F	GTAACGCTCGCTACCACAAA	20
UDP965R	CCTGCATATCACCACCAG	19
PS7A2F	CAGGGAAATAGATAAGATG	19
PS7A2R	TCTAATGGTGGTGTTCATT	19
PS9F8F	GGTCTTGGTTATTATGA	18
PS9F8R	ACATTTCTATGCAGAGTA	18
PS8E8F	CCAATGAACAACCTGCAT	18
PS8E8R	CATATCAATCACTGGGATG	19
BPPCT1F	AATTCCTAAAGGATGTGTATGAG	23
BPPCT1R	CAGGTGAATGAGCCAAAGC	19
BPPCT9F	ATTCGGGTCGAACTCCCT	18
BPPCT9R	ACGAGCACTAGAGTAACCCTCTC	23
BPPCT12F	ACTTCCATTGTCAGGCATCA	20
BPPCT12R	GGAGCAACGATGGAGTGC	18
BPPCT14F	TTGTCTGCCTCTCATCTTAACC	22
BPPCT14R	CATCGCAGAGAACTGAGAGC	20
BPPCT16F	GATTGAGAGATTGGGCTGC	19
BPPCT16R	GAGGATTCTCATGATTTGTGC	21
BPPCT21F	TGCATGAGAACTTGTGGC	19
BPPCT21R	CCAAGAGCCTGACAAAGC	18
BPPCT23F	TGCAGCTCATTACCTTTTGC	20
BPPCT23R	AGATGTGCTCGTAGTTCGGAC	21
BPPCT28F	TCAAGTTAGCTGAGGATGGC	20
BPPCT28R	GAGCTTGCCTATGAGAAGACC	21
BPPCT37F	CATGGAAGAGGATCAAGTGC	20
BPPCT37R	CTTGAAGGTAGTGCCAAAGC	20
BPPCT39F	ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC	23
BPPCT39R	GATGTCATGAAGATTGGAGAGG	22
PCHGMS1F	GGGTAAATATGCCCATTTGTGCAATC	25
PCHGMS1R	GGATCATTGAACTACGTCAATCCTC	25
PCHGMS3F	ACGGTATGTCCGTACACTCTCCATG	25
PCHGMS3R	CAACCTGTGATTGCTCCTATTAAC	25

(Continua na página seguinte)

PS12E2F	GCCACCAATGGTTCTTCC	18
PS12E2R	AGCACCAGATGCACCTGA	18
UDP97401F	TAAGAGGATCATTTTGCCTTG	21
UDP97401R	CCCTGGAGGACTGAGGGT	18
UDP97403F	CTGGCTTACAACCTCGCAACG	20
UDP97403R	CGTCGACCAACTGAGACTCA	20
UDP98409F	GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC	22
UDP98409R	CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	23
PCHGMS2F	GTCAATGAGTTCAGTGTCTACTC	25
PCHGMS2R	AATCATAACATCATTCAGCCACTGC	25
PCHGMS5F	CCAGTAGATTTCAACGTCATCTACA	25
PCHGMS5R	GGTTCACTCTCACATACACTCGGAG	25

Anexo III

Tabela III – Marcadores STS testados provenientes de clones BAC de *B. oleracea* e respectiva referência das sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Marcadores	Referência NCBI	Marcadores	Referência NCBI
ScAA2	ET052009	ScBF3	ET052012
ScBA2	ET052010	ScAF4	ET052013
ScAA4	FI569216	ScBF4	ET052014
ScBA4	FI569217	ScBF5	ET052016
ScAA6	ET051994	ScAF6	ET052017
ScAA8	FI569218	ScBF6	ET052018
ScBA8	FI569219	ScBF7	ET052020
ScBA10	FI569240	ScAF8	ET052021
ScBA11	ET051996	ScBF8	ET052022
ScAB1	FI569222	ScAF9	ET052007
ScBB1	FI569223	ScBF9	ET052008
ScAB2	ET051997	ScAF10	FI569234
ScBB2	ET051998	ScBF10	FI569235
ScAB3	FI569224	ScAF11	ET052047
ScBB3	FI569225	ScBF11	ET052023
ScAB4	ET051999	ScAF12	ET052024
ScBB4	ET052000	ScBF12	ET052025
ScAB7	ET052001	ScAG3	ET052026
ScBB7	ET052002	ScBG3	ET052027
ScAB9	ET052003	ScAG6	*
ScBB9	ET052004	ScBG6	ET052028
ScAB12	FI569220	ScAG10	FI569238
ScBB12	FI569221	ScBG10	FI569239
ScAC6	ET052005	ScAG11	ET052029
ScBC6	ET052006	ScBG11	ET052030
ScBC8	*	ScAG12	ET052031
ScAC9	FI569226	ScBG12	ET052032
ScBC9	FI569227	ScAH1	ET052033
ScAD2	FI569228	ScBH1	ET052034
ScBD2	FI569229	ScAH2	ET052035
ScAD4	FI569243	ScBH2	ET052036
ScAD5	FI569230	ScAH3	ET052037
ScBD5	FI569231	ScBH3	ET052038
ScAD10	FI569199	ScAH5	FI569207
ScBD10	FI569200	ScBH5	FI569208
ScBD11	FI569202	ScAH6	ET052041
ScAE4	FI569214	ScBH6	ET052042

(Continua na página seguinte)

ScAE5	ET052045	ScAH7	FI569209
ScBE5	ET052046	ScBH7	FI569210
ScAE8	FI569205	ScAH9	FI569211
ScBE9	FI569215	ScBH9	FI569212
ScAF2	FI569215	ScAH10	ET052043
ScBF2	FI569237	ScBH10	ET052044
ScAF3	ET052011		

* - Ainda não foi depositada no NCBI a sequência destes marcadores.