



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lactucae* RAÇA 1 EM ALFACE: APLICAÇÃO
DE MARCADORES DO TIPO RGA E DE SNPs DERIVADOS
DE *GENOTYPING-BY-SEQUENCING***

CLÉIA SANTOS CABRAL

Brasília – DF

2016

CLÉIA SANTOS CABRAL

**ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*
RAÇA 1 EM ALFACE: APLICAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO RGA E DE SNPs
DERIVADOS DE *GENOTYPING-BY-SEQUENCING***

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Cabral, Cléia Santos.

Análise genética da resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface: Aplicação de marcadores do tipo RGA e de SNPs derivados de *Genotyping-by-sequencing*. /

Cléia Santos Cabral

Brasília, 2016.

Número de páginas 182p.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Lactuca sativa* L., murcha de fusário, marcadores moleculares, seleção assistida, QTLs e *Genotyping-by-sequencing*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Análise genética da resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface: Aplicação de marcadores do tipo RGA e de SNPs derivados de *Genotyping-by-sequencing*.

*A minha amada avó Francisca
Maria, mãe Terezinha Pereira e Tia Aurora (in memorian) pela força, ajuda,
paciência e apoio*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora pelo dom da vida, discernimento, sabedoria, paciência, força, foco, bênçãos e por sempre me guiar por caminhos retos.

A minha mãe, avós (Francisca Maria e Cleonice Cabral), irmãos, padrasto e pai pelo apoio, pela ajuda, pelo amor incondicional, compreensão e paciência. Apesar de todas as minhas dificuldades e obstáculos na vida, todos vocês estiveram ao meu lado nesses momentos.

A toda minha família, tios, primos, sobrinha (Maria Eduarda), cunhadas e madrinha Cláudia por todo o carinho, pelos momentos de descontração e pela harmonia.

Aos meus orientadores Dr. Leonardo Silva Boiteux minha eterna gratidão por acreditar no meu potencial, pela sua valiosa orientação, pelas críticas construtivas, por proporcionar a chance de desenvolver esse trabalho e pelo enorme aprendizado; a A Dr. Maria Esther pela credibilidade nas minhas idéias, disponibilidade, paciência e por compartilhar vários dos seus conhecimentos comigo.

Ao Dr. Richard Michelmore e Dr. Maria Truco pela valiosa colaboração na execução deste trabalho e por sempre estarem dispostos a me receber e me ajudar durante meu treinamento na University of California – Davis. Agradeço também ao Dr. Valter Oliveira (CNPq) pela ajuda nas análises genéticas do Cap. 2.

Ao Dr. Ailton Reis e ao Luis Galhardo pela amizade, incentivo, ensinamentos e pela cooperação.

Aos membros da banca examinadora, Adalberto Café Filho, Carlos Lopes, Hércio Costa e Robert Miller pela criteriosa avaliação deste trabalho

Aos meus colegas e amigos da Embrapa Hortaliças, Luana, Fabiana, Chico, Amanda, Fred, Edivânio, Jadir Borges e José Getúlio pela ajuda nos experimentos, momentos de alegria e uma prazerosa convivência.

Ao meu querido amigo americano Joe Burns pela hospitalidade, amizade, disponibilidade, suporte e incentivo.

Aos amigos de Davis, Aurea, Oscar, Lia, Pablo, Júlio, Hector, Pedro, Diego, Juliana, Mira pela receptividade, acolhimento durante a minha estadia na Califórnia.

Aos meus amados amigos Tatiane, Maurício, Kátia, Elenice, Rayane, Carolina Forcada, Rafaela, Carolina Bertuzzi, Débora, Raissa, Ivanildo, Sirlei, Geane, Niday, Priscila, Maíra, Roberta e Natália por sempre acreditarem na minha capacidade, pelo incentivo, carinho, amizade e palavras motivadoras nos momentos de superação durante essa tese.

Aos professores, funcionários e técnicos do curso de Pós-graduação em Fitopatologia.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação, Luiz, Maria do Desterro, João, Sara, Carina, Cristiano, Mônica e Sofya por todos os momentos de alegria e descontração.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro pelas atividades desenvolvidas.

À Embrapa Hortaliças pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Leonardo Silva Boiteux**, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Análise genética da resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface:
Aplicação de marcadores do tipo RGA e de SNPs derivados de *Genotyping-by-Sequencing*.**

Cléia Santos Cabral

TESE APROVADA em 19/10/2016 por:



Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília - Examinador Interno



Dr. Carlos Alberto Lopes
Embrapa Hortaliças - Examinador Externo



Dr. Hélcio Costa
Incaper - Examinador Externo



Dr. Robert Neil Gerard Miller
Universidade de Brasília - Examinador Interno



Dr. Leonardo Silva Boiteux
Embrapa Hortaliças - Orientador - Presidente

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2016**

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Revisão de literatura

1. A CULTURA DA ALFACE.....	2
2. TIPOS VARIETAIS E O MERCADO BRASILEIRO DE ALFACE.....	3
3. HISTÓRICO DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE ALFACE NO BRASIL.....	5
4. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E BIOLOGIA FLORAL.....	7
5. DOENÇAS DA ALFACE.....	8
6. A MURCHA DE FUSÁRIO DA ALFACE.....	9
7. IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO.....	13
8. SISTEMAS DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	14
9. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS.....	19
10. RESISTÊNCIA BASAL E RESISTÊNCIA MEDIADA POR GENES R.....	21
11. MECANISMOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE GENES DE RESISTÊNCIA CARACTERIZADOS EM PLANTAS.....	25
12. OUTRAS CLASSES DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	28
13. GENES ANALÓGOS DE RESISTÊNCIA (RGAS): ESTRUTURA, FUNÇÃO & DIVERSIDADE.....	29
14. ANÁLISES DE GENES R CANDIDATOS E DE RGAS EM ALFACE.....	30
15. ABORDAGENS DE BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E RGAS EM GENOMAS VEGETAIS	31
16. MAPAS DE LIGAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE QTLs.....	32
17. MAPAS GENÉTICOS E FERRAMENTAS GENÔMICAS DISPONÍVEIS PARA <i>Lactuca sativa</i>	39
18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO 2 - Herança da resistência à murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. *sp. lactucae* raça 1) na cultivar de alface ‘Vanda’

RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO.....	70
2.1. Objetivos Gerais.....	70
2.2. Objetivos Específicos.....	70

3. MATERIAL & MÉTODOS.....	70
3.1. Cruzamentos entre parentais contrastantes para resposta a isolados FOLAC raça 1 e desenvolvimento de populações segregantes para estudos de herança da resistência	70
3.2. Extração de DNA genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes	71
3.3. Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de plantas híbridas no cruzamento ‘Gizele’ x ‘Vanda’ com uma coleção de primers RAPD	72
3.4. Validação com amostras dos parentais e da população F ₁ de marcadores RAPD-SCAR	72
3.5. Desenvolvimento de marcadores do tipo <i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> (SCAR).....	73
3.6. Sequenciamento dos amplicons clonados.....	74
3.7. Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação dos potenciais marcadores do tipo <i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> (SCAR).....	74
3.8. Caracterização fenotípica das linhagens parentais, híbridos F ₁ e populações segregantes para resposta a resistência um isolado de FOLAC raça 1.....	75
3.9. Avaliação da resposta dos materiais genéticos de alface ao isolado de FOLAC raça 1	76
3.10. Validação dos marcadores moleculares entre os parentais contrastantes	76
3.11. Emprego da estratégia de <i>Bulked segregant analysis</i> (BSA) para verificar potencial ligação com o(s) fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 dos marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes	77
4. RESULTADOS	77
4.1. Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de plantas híbridas entre ‘Gizele’ e ‘Vanda’	77
4.2. Padrão de segregação de resistência para FOLAC raça 1.....	77
4.3. <i>Bulked segregant analysis</i> (BSA) para verificar potencial ligação com o(s) fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 dos marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes	79
5. DISCUSSÃO.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPÍTULO 3 - Plataforma de marcadores DR analogs derivados de *clusters* gênicos do genoma da alface: Aplicação na localização de fatores de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (raça 1).

RESUMO	92
ABSTRACT	94
1. INTRODUÇÃO	96
2. OBJETIVOS.....	102
2.1. Objetivo Geral	102
2.2. Objetivos Específicos	102
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	103
3.1. Cruzamentos entre parentais contrastantes para resposta a FOLAC raça 1 e desenvolvimento de populações segregantes.....	103
3.2. Caracterização fenotípica das linhagens parentais e populações segregantes	103
3.3. Extração de DNA de genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes	104
3.4. Plataforma de marcadores do tipo <i>Disease Resistance Analogs</i> (DR analogs) em alface	105
3.5. Reação de PCR com <i>primers</i> anelando em regiões dos cromossomos 1, 2, 4, 7 & 8 contendo DR analogs	106

3.6. Reações de sequenciamento dos amplicons.....	107
3.7. Análise das sequências	107
3.8. Marcadores CAPS	107
4. RESULTADOS	108
4.1. Genotipagem das linhagens parentais e da população F ₂ para marcadores DR-analogs potencialmente ligados a resistência a raça 1 de FOLAC.....	108
4.2. Análises Blast dos amplicons clonados e seqüenciados	108
4.3. Marcadores do tipo CAPS	109
5. DISCUSSÃO.....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

CAPÍTULO 4 - Emprego da estratégia de *genotyping-by-sequencing* (GBS) visando identificar regiões genômicas ligadas à resistência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface

RESUMO	134
ABSTRACT	135
1. INTRODUÇÃO	136
2. OBJETIVOS.....	139
2.1. Objetivo Geral	139
2.2. Objetivos Específicos	140
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	140
3.1. Parentais utilizados para a produção de populações segregantes	140
3.2. Caracterização fenotípica das linhagens parentais e populações segregantes	140
3.3. Extração de DNA de genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes	141
3.4. Preparação das bibliotecas e sequenciamento.....	141
3.5. Processamento das sequências e identificação dos SNPs	144
3.6. Mapeamento de QTLs	144
4. RESULTADOS.....	145
4.1. Genotipagem de marcadores moleculares e mapeamento de QTLs	145
4.2. Mapeamento do QTL.....	145
5. DISCUSSÃO.....	154
5.1. <i>Genotyping-by-sequencing</i> e análise de SNPs.....	154
5.2. Mapeamento genético.....	156
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2-1. Análise das respostas de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) a um isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 nas gerações F₁ e F₂ obtidas do cruzamento entre os parentais ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente) e ajuste dos dados dos padrões de segregação para um modelo de 3:1 de acordo o teste de do qui-quadrado (χ^2). 78
- Tabela 3-2. Lista do subgrupo de 98 pares *primers* empregados, visando identificar marcadores associados com a resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 em alface. Esses marcadores foram derivados de sequências do tipo *Resistance gene analogs* (RGA) dispersas em dos cinco principais MRCs (*major resistance clusters*) do genoma da alface localizados nos cromossomos (Cr.)/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. Os pares de *primers* foram obtidos no site <http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMapView/display/> ou foram sintetizados a partir de sequências disponíveis no mesmo site. Marcadores do tipo SRR e SCAR previamente descritos por Simko *et al.* (2009) e Aruga *et al.* (2012) foram também incorporados nas análises. 115
- Tabela 3-3. Resultados das buscas (via o algoritmo BLAST) de identidade das sequências dos amplicons derivados de um subgrupo de *primers* empregados, visando identificar marcadores ligados e/ou genes candidatos associados com a resistência a FOLAC raça 1 em alface. Esses marcadores foram derivados de sequências do tipo *Resistance gene analogs* (RGAs) estão dispersos em cinco dos principais MRCs (*major resistance clusters*) do genoma da alface localizados nos cromossomos (Cr.)/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. 120
- Tabela 3-4. Recombinantes encontrados na análise dos marcadores moleculares testados em indivíduos da população F₂ de alface. 122
- Tabela 4-1. Mapa genético da população F₂ do cruzamento entre os genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1. 147
- Tabela 4-2. QTLs para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 (com suas designações de acordo com as notas de severidade identificados em populações F₂ e F₃ derivadas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente). 148

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2-1. Perfil de amplicons gerados com um subconjunto de *primers* RAPD dos grupos OP-A e OP-B (Operon) usando como molde o DNA genômico dos genitores de alface contrastantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 [‘Vanda’, resistente e ‘Gizele’, suscetível]. Duas cultivares de alface do segmento varietal Americana (‘Laurel’ e ‘Raider’), também foram incluídas (como padrões) nessas análises. O código ‘M’ indica a linha do marcador de peso molecular 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen). 84
- Figura 2-2. Perfil de amplicons obtido com o par de *primers* SCAR OPW-15-3 para os genitores contrastantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1

['Vanda' (V), resistente e 'Gizele' (G), suscetível]. A eletrofore em gel de agarose (1,2%) ilustra o padrão de bandas para 'V' e 'G' e para 11 plantas potencialmente de natureza híbrida F₁ (códigos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 11 & 17) obtidas de cruzamentos controlados entre 'G' x 'V'. O código 'M' indica a linha do marcador de peso molecular 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen). A seta aponta uma banda polimórfica informativa (originária de 'Vanda') que foi utilizada para distinguir plantas verdadeiramente de origem híbrida F₁ (ex. as assinaladas com barras) de plantas de 'Gizele' autofecundadas (ex. 5, 6, 11 & 17), quando empregando a cultivar 'Vanda' como doadora de pólen e 'Gizele' como receptora de pólen.85

- Figura 3-1. Padrão de amplicons gerado pelos primers testados. Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). F: fenótipo de alface (*Lactuca sativa* L.) observado (resistente ou suscetível). G: Genotipagem pelo marcador em questão considerando R o padrão da cultivar 'Vanda' (V) e S o padrão da cultivar 'Gizele' (G) e padrão heterozigoto (H). 123
- Figura 3-2. Desenho de um marcador CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) baseado na sequência obtida pela amplificação com o primer LE0351. Abaixo a sequência obtida após amplificação da cultivar de alface (*Lactuca sativa* L.) 'Gizele' com o sítio de restrição da enzima *MspA1*. Acima o segmento mostrando o mapa de restrição para o amplicon de 'Vanda' (sem *MspA1*) e 'Gizele' (com *MspA1*). 124
- Figura 3-3. Desenho de um marcador CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) baseado na sequência obtida pela amplificação com o primer LE0337. Abaixo a sequência obtida após amplificação da cultivar de alface (*Lactuca sativa* L.) 'Vanda' com o sítio de restrição da enzima *BstN1*. Acima o segmento mostrando o mapa de restrição para o amplicon de 'Vanda' (com *BstN1*) e 'Gizele' (sem *BstN1*). 125
- Figura 3-4. Desenho de um marcador CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) baseado na sequência obtida pela amplificação com o primer M4241. Abaixo a sequência obtida após amplificação da cultivar de alface (*Lactuca sativa* L.) 'Gizele' com o sítio de restrição da enzima *MseI*. Acima o segmento mostrando o mapa de restrição para o amplicom de 'Vanda' (sem *MseI*) e 'Gizele' (com *MseI*). 126

- Figura 4-1. Sequência de adaptadores contendo o barcode específico para cada amostra e o sítio de restrição para *AvaII*. 142
- Figura 4-2. Molde do mapa genético de alface no cromossomo 9. As 82 plantas F₂ foram obtidas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes 'Gizele' (suscetível) x 'Vanda' (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. As linhas correspondem as distintas localizações cromossômicas e as colunas da correspondem os genótipos da população F₂ em cada local. O genótipo "A" corresponde ao parental feminino ('Gizele'), "B" para o parental masculino ('Vanda'), "H" para heterozigoto, e '-' para os *missing data*. Um total de 38 *scaffolds* foram posicionados nesse cromossomo. 149
- Figura 4-3. Molde do mapa genético de alface no cromossomo 4. As 82 plantas F₂ foram obtidas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes 'Gizele' (suscetível) x 'Vanda' (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. As linhas correspondem as distintas localizações cromossômicas e as colunas da correspondem os genótipos da população F₂ em cada local. O genótipo "A" corresponde ao parental feminino

- (‘Gizele’), “B” para o parental masculino (‘Vanda’), “H” para heterozigoto e ‘-’ para os *missing data*. Um total de 92 *scaffolds* foram posicionados nesse cromossomo. 150
- Figura 4-4. QTLs ligados a resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionados nos grupos de 8 (4a) e 16 (9a). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F_2 e F_3) e as notas de severidade. 151
- Figura 4-5. QTL ligado a resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionado entre os marcadores [Lsat_1_v5_g4_2792 a Lsat_1_v5_g4_1990] no grupo de ligação 8 (Cromossomo 4a). (LOD = 6.02). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F_2 e F_3) e as notas de severidade. 152
- Figura 4-6. QTLs ligados à resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionado entre os marcadores [Lsat_1_v5_g9_108}, [Lsat_1_v5_g9_111 e Lsat_1_v5_g9_448] no grupo de ligação 16 (Cromossomo 9a). (LOD = 4.77 e LOD = 6,61, respectivamente). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F_2 e F_3) e as notas de severidade. 153
- Figura 4-7. Localização no mapa genético da alface dos três QTLs associados com à resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 derivados da cultivar de alface ‘Vanda’. As barras indicam as regiões significativas associados com a resistência ao patógeno. 154

RESUMO GERAL

Cabral, Cléia Santos. **ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* RAÇA 1 EM ALFACE: APLICAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO RGA E DE SNPs DERIVADOS DE *GENOTYPING-BY-SEQUENCING***. 2016. 182p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, DF.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil e no mundo. A murcha de fusário (causada por distintas raças do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* – FOLAC) é uma das principais doenças de da alface em regiões tropicais e subtropicais. Devido à dificuldade de implementação de estratégias eficazes de controle químico e cultural, o uso de cultivares com resistência genética é o método mais prático de manejo da doença. Fontes estáveis de resistência à raça FOLAC 1 foram encontradas, mas a base genética dessa característica ainda se encontra mal caracterizada. A integração da seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento convencional irá acelerar o desenvolvimento e lançamento de cultivares de alface com resistência genética a esse patógeno. O presente estudo teve como objetivos: elucidar os fatores genéticos associados à resistência a murcha de fusário (**Capítulo 2**) e identificar marcadores moleculares potencialmente ligados aos fatores de resistência a isolados de FOLAC raça 1 identificados na cultivar ‘Vanda’ (**Capítulo 3**). O estudo da herança genética da resistência a FOLAC raça 1 foi conduzido com populações segregantes (F₂ e F₃) obtidas do cruzamento entre um parental suscetível ‘Gizele’ e ‘Vanda’. Populações foram inoculadas com uma suspensão de esporos do patógeno (3×10^6 microconídios/mL) por meio de corte e imersão de raízes e avaliadas quanto à resistência por meio de escala de notas. O DNA genômico das plantas resistentes e suscetíveis foi extraído e usado como molde em diferentes sistemas de marcadores (RAPD, SCAR, DR analogs, SRR e CAPS), visando identificar polimorfismos ligados a essa característica. Com relação à resistência a FOLAC raça 1, os estudos indicaram um

controle genético relativamente simples na cultivar ‘Vanda’, com os resultados de segregação indicando um *locus* monogênico com uma provável combinação de efeitos de dosagem e penetrância incompleta. No entanto, os diferentes sistemas de marcadores moleculares utilizados nessa primeira etapa do trabalho não permitiram encontrar polimorfismos com estreita ligação com o(s) fator(es) de resistência. Desta forma, uma nova etapa do trabalho foi conduzida visando identificar por meio do método *genotyping-by-sequencing* (GBS) marcadores moleculares ligados a resistência (**Capítulo 4**). O GBS foi explorado na identificação de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) empregando DNA extraído dos dois parentais e de um conjunto de 82 indivíduos da população F₂ derivados do cruzamento entre ‘Vanda’ x ‘Gizele’. Cada indivíduo foi genotipado utilizando o Illumina HiSeq 3000, que produziu 4,5 milhões de *reads* por amostra. Um total de 10.017 SNPs foi identificado entre os parentais. Estes SNPs foram avaliados para ligação com o fenótipo de resistência nos 82 indivíduos F₂. Os dados genotípicos foram condensados em 1.484 *scaffolds* ou supercontigs. Um subconjunto de 417 *scaffolds* contendo polimorfismos foi selecionado para a construção de um mapa de ligação após filtragem baseada em *missing data* (< 20%), teste de qui-quadrado (3:1 p>0,05) e número de SNPs por *scaffold*. O mapa foi composto por 17 grupos de ligação, com um comprimento total de 1.132,984 cM. A análise de QTL (*quantitative trait loci*) para resistência a FOLAC raça 1 foi realizada no mapa de ligação com os conjuntos de dados de severidade da doença obtido nas populações F₂ e F₃. Dois QTLs de efeito maior foram identificados no cromossomo 9, explicando 30 a 40% da variação fenotípica observada na população F₃ e F₂, respectivamente. Um QTL de efeito menor foi detectado no cromossomo 4, explicando 0,06% da variação fenotípica na população F₃. Desta forma, o presente estudo estabelece a porção mediana do cromossomo 9 como sendo a localização física do principal *locus* de resistência para FOLAC raça 1 presente na cultivar ‘Vanda’. Portanto, os marcadores moleculares localizados na proximidade desta região genômica

são candidatos para o desenvolvimento de ferramentas de SAM em programas de melhoramento genético visando incorporar essa característica em linhagens elite de alface.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., murcha de fusário, marcadores moleculares, seleção assistida, QTLs.

GENERAL ABSTRACT

Cabral, Cléia Santos. **Genetic analysis and mapping of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 in lettuce: Employment of the RGA marker system and SNPs derived from genotyping-by-sequencing strategy.** 2016. 182p. Doctor Degree in Plant Pathology – Universidade de Brasília, DF.

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most important leafy vegetable crops in Brazil and worldwide. Fusarium wilt (caused by distinct races of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* – FOLAC) is one of the main soil-borne diseases of lettuce in tropical and subtropical regions. Due to the complexity of implementing effective cultural and chemical control, the most practical disease management strategy has been the use of cultivars with genetic resistance. Stable sources of resistance to FOLAC race 1 have been found, but the genetic basis of this trait is yet poorly characterized. The integration of marker assisted selection (MAS) in conventional breeding programs would be an important contribution to accelerate the development and release of lettuce cultivars with genetic resistance to this pathogen. In this context, the present study aimed to elucidate the inheritance of resistance to FOLAC race 1 detected in the cultivar Vanda (**Chapter II**) and to search for molecular markers linked to FOLAC race 1 resistance factor(s) (**Chapter III**). Inheritance studies were carried out using segregating populations (F₂ and F₃ families) derived from the cross between a susceptible cultivar (Gizele) and a FOLAC race 1 resistant cultivar (Vanda). The parental lines and the segregating populations were inoculated via root dipping technique with a conidial suspension adjusted to 3 x 10⁶ microconidia/mL. Reaction to one FOLAC race 1 isolate was evaluated using a disease rating scale ranging from 1 (= no symptoms) to 5 (= dead plant). The studies indicated a simple genetic control of FOLAC race resistance in cultivar Vanda, with segregation results indicating a single gene *locus* with a likely

combination of dosage effects and incomplete penetrance. Genomic DNA of resistant and susceptible plants was extracted and used as a template in PCR assays with different marker systems (RAPD, SCAR, DR Analogs, SSRs and CAPS) aiming to identify polymorphisms linked to the resistant reaction. However, none of the evaluated molecular techniques were able to identify markers in close linkage with the resistance factor(s). Therefore, a new phase of the present study was conducted with the objective of searching for markers linked to resistance through the employment of the genotyping-by-sequencing (GBS) strategy (**Chapter IV**). The GBS strategy was employed using DNA extracted from the parental lines and 82 phenotyped F₂ individuals derived from the same cross between Gizele \times Vanda. Each individual was genotyped using the Illumina Hiseq 3000. A total of 4.5 million reads was obtained per sample with 10,017 SNPs being identified among the parental lines as well as among the 82 F₂ individuals. Genotypic data were condensed into 1484 scaffolds. Four hundred seventeen (417) scaffolds containing polymorphisms were selected for the construction of the linkage map after filtering based on missing data (< 20%), chi-square test (3: 1 p> 0.05) and number of SNPs per scaffold. The final map consisted of 17 linking groups with a total length of 1,132.984 cM. The QTL analysis for resistance to FOLAC race 1 was performed on the linkage map based upon the disease severity datasets of F₂ population and F₃ families. Two major effect QTLs were identified on chromosome 9, explaining 30 to 40% of the phenotypic variation observed in the population F₃ and F₂, respectively. One QTL of minor effect was also identified on chromosome 4, explaining 0.06% of the phenotypic variation in the F₃ population. This study establishes the central region of chromosome 9 as the physical location of a major resistance locus to FOLAC race 1 found in Vanda. Molecular markers in close proximity to this genomic region are candidates for the development of MAS tools for breeding programs aiming to incorporate this trait into elite lettuce lines.

Keywords: *Lactuca sativa* L., Fusarium wilt, molecular markers, assisted selection, QTLs mapping.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. A CULTURA DA ALFACE

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteraceae, subfamília Cichorioideae e tribo Lactuceae (Ryder, 1999). A Asteraceae (previamente denominada de Compositae) é a maior família dentro das dicotiledôneas, contendo cerca de 23.000 espécies distribuídas por mais de 1.500 gêneros (Almeida, 2006).

A alface é uma das mais importantes hortaliças folhosas cultivadas no mundo. A produção mundial em 2010 foi de mais de 23 milhões de toneladas. A Ásia produziu aproximadamente 65%, seguida de 19% na América Central e do Norte e 13% na Europa. A área restante foi cultivada na América do Sul, na África e na Oceania, cada uma contribuindo com 1% da produção total (Simko, 2013). Os Estados Unidos são o maior produtor de alface com as regiões produtoras se localizando na região central da Califórnia (70-75%) e no Arizona (18-20%) (Simko, 2013, 2014). Por ser o principal componente de saladas ou *mix* de saladas, o agronegócio de alface nos Estados Unidos é considerado como um dos dez economicamente mais valiosos do país, somando US\$ 2 bilhões por ano (Kandel, 2015). Na China e no Egito, além das folhas, os caules são também consumidos cozidos ou crus, em conserva, como sopas, desidratados ou na composição de molhos (Mou, 2008).

A possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano, um consolidado hábito de consumo alimentar pela população e uma demanda sempre crescente do produto são fatores que fazem da alface a hortaliça folhosa mais produzida no Brasil, conferindo a essa cultura uma grande importância econômica e social (Sala & Costa, 2016). Além disso, a alface apresenta grande aceitação no mercado não só por suas qualidades organolépticas, mas também por possuir baixo valor calórico e ser rica em sais de cálcio e de ferro e em vitaminas A, B1, B2, B6 e C (Oliveira *et al.*, 2006).

O centro de origem e domesticação da alface é o sul da Europa e a Ásia Ocidental, sendo cultivada desde 2500 a.C. (Ryder, 1999). A alface foi introduzida no Brasil no século XVI, por meio dos imigrantes portugueses (Filgueira, 2008). Do ponto de vista do melhoramento genético, a viabilização do cultivo da alface em regiões tropicais e subtropicais (com temperaturas mais elevadas e precipitações pluviométricas mais frequentes) envolveu a superação de uma série de obstáculos via incorporação de um conjunto de características para melhor adaptação desta hortaliça. Nas condições ambientais dos trópicos e subtropicais, cultivares de alface com baixa adaptação não conseguem expressar o potencial genético plenamente, ocorrendo emissão prematura do pendão floral (= antecipação da fase reprodutiva) e redução drástica do ciclo da cultura, que comprometem a qualidade e a produção (Sala & Costa, 2016). Segundo Silva *et al.* (1999), as temperaturas ideais para a produção de folhas e a formação da cabeça de alface estão entre 12 e 22°C. Temperaturas acima desse limite favorecem o florescimento (pendoamento) precoce das plantas. O florescimento precoce provoca o alongamento do caule, estimula a produção de látex (que confere sabor amargo às folhas), reduz o número de folhas e afeta a formação de cabeça (Silva *et al.*, 2000; Sala & Costa, 2016).

2. TIPOS VARIETAIS E O MERCADO BRASILEIRO DE ALFACE

A planta da alface é herbácea de caule carnoso e esverdeado, ao qual se aderem às folhas. Conforme a cultivar, as folhas podem se apresentar lisas ou crespas, formando ou não “cabeça”, com coloração em vários tons de verdes, ou roxa. Segundo Filgueira (2008), as cultivares podem ser agrupadas em seis diferentes tipos ou segmentos varietais: (1) Tipo Repolhuda – Crespa (= Americana): As folhas são caracteristicamente crespas, bem firmes e com nervuras destacadas, formando uma cabeça compacta. As folhas internas são mais crocantes que as externas, sendo preferidas para sanduíches. Exemplos: ‘Lucy Brown’, ‘Laurel’, ‘Raider Plus’, ‘Tainá’ e

‘Rafaela’; (2) Tipo Repolhuda – Manteiga: As folhas são bem mais lisas, muito delicadas, de coloração verde amarelada e aspecto amanteigado, formando uma cabeça tipicamente compacta. Exemplos: ‘White Boston’, ‘Carolina’, ‘Elisa’ e ‘Lídia’; (3) Tipo Solta – Lisa: As folhas mais macias, lisas e soltas, não havendo formação de cabeça. Exemplos: ‘Babá de Verão’, ‘Regina’, ‘Luisa’ e ‘Vitória de Santo Antão’; (4) Tipo Solta – Crespa: As folhas são firmes, crespas e soltas, não formando cabeça. Folhas com superfície inteiramente irregular com destaque para as bordas (que se apresentam inteiramente onduladas). Exemplos: ‘Vanda’, ‘Verônica’, ‘Vera’, ‘Mônica’ e ‘Gizele’. A Embrapa Hortaliças em parceria com a empresa Agrocinco liberou recentemente três cultivares nesse segmento (‘BRS Leila’, ‘BRS Lélia’ e ‘BRS Mediterrânea’); (5) Tipo Mimosa: As folhas são delicadas e com aspecto muito recortado. É um tipo varietal recente e que vem adquirindo certa relevância. Exemplos: ‘Red Salad Bowl’ e ‘Mimosa’. (6) Tipo Romana: As folhas são alongadas, com nervuras bem protuberantes, formando cabeças pouco densas. É um tipo muito demandado em processamento e na produção de *mix* de folhas, bastante utilizados por restaurantes. De todas as alfaces citadas, é a menos consumida no Brasil, mas apresenta ampla aceitação na Europa e nos EUA. Exemplos: ‘Romana Paris’, ‘Donna’ e ‘Sofia’.

Até meados da década de 1980, o mercado consumidor no Brasil tinha preferência pela alface lisa do tipo ‘White Boston’ ou ‘manteiga’. Posteriormente, houve uma mudança de mercado para o segmento de alface do tipo crespa ‘Grand Rapids’. Nos últimos anos, a alface do grupo varietal americana tem mostrado o maior crescimento no mercado. Esse segmento foi estabelecido com maior intensidade no Brasil, inicialmente, para atender às redes de *fast food*. Entretanto, a preferência por esse grupo varietal também tem aumentando pelos consumidores domiciliares (Sala & Costa, 2012). O aumento observado no consumo de alface do tipo americana se deve principalmente às suas características organolépticas superiores em termos de

crocância e sabor diferenciado (Sala & Costa, 2012). Os tipos varietais ‘Mimosa’ e ‘Romana’ também apresentam um consumo crescente no Brasil, sendo demandados por restaurantes e processadores de hortaliças. Outro grupo varietal crescente é formado pelas cultivares coloridas, como os segmentos do tipo ‘Crespa roxa’ e ‘Crespa vermelha’, e o segmento de alface do tipo ‘Mimosa Roxa’ (Henz & Suinaga, 2009; Sala & Costa, 2012). A grande diversificação de tipos varietais de alface contribui para o aumento de seu consumo, além de ser uma importante forma de agregar valor em vários elos da cadeia produtiva. A disponibilidade de um amplo portfólio de cultivares capazes de atender aos diferentes tipos de mercados consumidores, com variados níveis de exigência e diferentes níveis financeiros, tem resultado na expansão do consumo desta hortaliça (Silva, 2009; Sala & Costa, 2012).

3. HISTÓRICO DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE ALFACE NO BRASIL

Os programas de melhoramento da alface para condições tropicais e subtropicais têm como foco o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas e com resistência múltipla a doenças. Esse trabalho tem permitido plantar e colher alface de boa qualidade nas condições brasileiras durante todo o ano (Filgueira, 2008).

O melhoramento genético de alface no Brasil foi formalmente estabelecido pelo Professor Marcílio de Souza Dias na ESALQ em 1953, que propiciou o lançamento da cultivar ‘Gorga’ (‘Great Lakes’ x ‘Batávia Blonde’). A ‘Gorga’ foi considerada, na época, como um conceito revolucionário uma vez que foi a primeira cultivar que combinava espessura foliar, arquitetura de planta aberta, tolerância ao pendoamento precoce e adaptação ao verão chuvoso, sem formação de cabeça. O fator limitante para seu cultivo foi sua suscetibilidade ao *tip burn* (deficiência na translocação de cálcio causando pela queima de bordas das folhas externas) e má formação de cabeça no cultivo de verão (Sala & Costa, 2016).

Posteriormente, outras importantes contribuições no melhoramento dessa cultura foram feitas pelo Dr. Hiroshi Nagai, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), com o cruzamento da cultivar lisa ‘White Boston’ com a cultivar romana ‘Galega’, resistente ao potyvírus *Lettuce mosaic virus* (LMV). Cultivares de alface lisa resistentes ao LMV e com tolerância ao pendoamento precoce foram obtidas nesse programa. Das várias progênies selecionadas, a que se destacou foi a cultivar ‘Brasil 48’. A maior limitação dessa cultivar foi a sua baixa adaptação ao cultivo de verão, que ocasionava muitas perdas devido o apodrecimento das plantas e formação de cabeça (Sala & Costa, 2016).

Na década de 1980, o Professor Dr. Cyro Paulino da Costa assumiu o programa de melhoramento genético de hortaliças da ESALQ. Em continuidade ao melhoramento genético de alface lisa foi liberada em 1985 a cultivar ‘Regina’, caracterizada por ser resistente ao LMV, apresentar plantas de grande porte (ausência de formação de cabeça) e tolerância ao cultivo no verão chuvoso. Essa alface foi lançada para o domínio público e todas as empresas do setor de sementes multiplicaram suas sementes e comercializaram-nas no mercado nacional.

O conceito de alface aberta no cultivo de verão permitiu o desenvolvimento do segmento de alface do tipo crespa ‘Grand Rapids’, mais adaptada ao cultivo verão. A partir da década de 1990 esse tipo de alface ganhou importância no país (Sala & Costa, 2016). O lançamento das cultivares ‘Verônica’ e ‘Vera’ (tipo crespa ‘Grand Rapids’) pela equipe liderada pelo Dr. Paulo T. Della Vecchia da Agroflora S.A. (Della Vecchia *et al.*, 1999) permitiu o cultivo de alface no verão em todo o Brasil. Essas cultivares foram a sustentabilidade da alfacultura por décadas, devido ao pendoamento lento, não formação de cabeça, resistente as chuvas de verão, fácil manuseio e transporte e ciclo curto. Com isso o melhoramento genético de alface realizado no país, até então concentrado nas instituições públicas, passou a ser realizado pela iniciativa privada.

Posteriormente, a empresa Sakata Seed Sudamerica lançou a cultivar ‘Vanda’ e passou a ser a empresa líder na produção na produção de sementes de alface com 70% do mercado.

Entre os anos de 1992 a 1993 o Engenheiro Agrônomo Carlos Alberto M. Tavares passou a trabalhar com o desenvolvimento de alface americana, restrita a região de Mogi-São Paulo em plantios de inverno. Ele avaliou mais de 300 acessos de alface americana e somente duas (‘Lucy Brown’ e ‘Raider’) foram selecionadas para as condições brasileiras.

Nos últimos anos diferentes empresas tais como: Sakata, TopSeed, Hortices, Feltrin, Takii, Sakama, Hortec, Eagle e Enza Zaden vêm desenvolvendo e validando inúmeras cultivares de alface de diferentes tipos varietais e com resistência a fitopatógenos, evidenciando que esse processo precisa ser contínuo em razão das demandas futuras do setor. Duas cultivares do segmento crespa uma da Hortices, como a cultivar Marisa e outra da Sakata, a cultivar Valentina apresentam resistência a murcha de fusário da alface. A Embrapa Hortaliças também iniciou um programa de melhoramento genético de alface de maneira informal em 2005 e que foi posteriormente formalizado com um projeto em parceria com a empresa Agrocinco em 2012/2013. Recentemente, três cultivares do segmento varietal crespa (‘BRS Leila’, ‘BRS Lélia’ e ‘BRS Mediterrânea’) foram liberadas dentro desse programa.

4. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E BIOLOGIA FLORAL

Das quase 100 espécies pertencentes ao gênero *Lactuca*, apenas quatro podem cruzar entre si, formando um grupo: a espécie domesticada *L. sativa* L. e as selvagens *L. serriola* L., *L. saligna* L. e *L. virosa* L., utilizadas em programas de melhoramento genético dessa hortaliça (Lebeda *et al.*, 2014). A alface é uma espécie diploide com $2n=2x=18$ cromossomos e com um genoma de 2.7 Gb, um dos maiores do reino vegetal (Arumuganathan & Earle, 1991; The Lettuce Genome Sequencing Consortium, <http://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>)

A alface apresenta inflorescência do tipo capítulo composta por aproximadamente 10 a 25 floretes ou flores. Cada flor apresenta um óvulo que, subsequentemente, formará um só aquênio. Devido aos dispositivos botânicos presentes na estrutura floral, a alface é uma espécie estritamente autógama. Dependendo da temperatura e da luminosidade do ambiente, o conjunto de flores do capítulo abre na parte da manhã, a partir das oito horas, e se fecham após as dez. No período de duas horas da antese, o pistilo se diferencia e, ao passar pelo tubo de anteras, é autopolinizado (dispositivo botânico de cleistogamia). Por esse motivo, não existe a produção comercial de sementes híbridas de alface, devido à sua biologia floral. Para realizar as hibridações (cruzamentos) artificiais controlados, os floretes do capítulo devem ser despolinizados (= emasculação parcial) via limpeza com jatos de água. Esse método não garante 100% de eficiência, resultando, ainda, em frequências variáveis de sementes autofecundadas. Após, os floretes são secados e polinizados com o pólen de outra cultivar de interesse. Após o cruzamento, a flor que recebeu o pólen é identificada com os dados dos cruzamentos (Sala *et al.*, 2014). Portanto, a superação dos dispositivos botânicos de autogamia representa um fator determinante na formação de populações segregantes dos programas de melhoramento genético da alface.

5. DOENÇAS DA ALFACE

Mais de 75 doenças da alface causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus já foram relatadas no mundo. Segundo Blacard *et al.* (2006) e Lopes *et al.* (2010) as doenças da parte aérea que mais causam danos a alface durante o seu ciclo produtivo são: Mancha bacteriana [*Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp], Míldio [Downy Mildew-*Bremia lactucae* Regel], Antracnose [*Microdochium panattonianum* (Berl.)], Septoriose [*Septoria lactucae* Passerini], Mancha de cercóspora [*Cercospora longissima* (Cugini.) Sacc.], Podridão de botrytis [*Botrytis*

cinerea Pers], Oídio [Powdery mildew – *Golovinomyces cichoraceatum sensu stricto* = *Erysiphe cichoracearum* DC)], Mancha bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Brown) Dye], Mosaico [*Lettuce mosaic virus*-LMV], Vira-cabeça [várias espécies: (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV), (*Tomato chlorotic spot virus* – TCSV) e (*Groundnut ringspot virus* – GRSV)], Mosqueado [*Lettuce mottle virus* – LeMoV] e Engrossamento-das-nervuras [(*Big-vein-Lettuce big vein virus* – LBVV) e (*Mirafiori lettuce big-vein virus* – MLBVV)], Lettuce Dieback [*Tomato bushy stunt virus* – TBSV e *Lettuce necrotic stunt virus* – LNSV] e outras viroses [(*Cucumber mosaic virus* – CMV) e (*Turnip mosaic virus* – TuMv)].

As doenças que afetam a raiz e o caule limitantes para o cultivo da alface são: *Pythium* spp., *Sclerotinia minor* Jagger, *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Khun, *Thielaviopsis basicola* (Berk.& Broome) Ferraris, Podridão-mole [*Pectobacterium* spp. ou *Dickeya* = *Erwinia* spp (Jones) Waldee], Nematóide das galhas [*Meloidogyne* spp.], Root downy Midew [*Plasmopara lactucae-radialis* (Stang. & Gilbn)], murcha de verticílio [*Verticillium dahliae* Kleb] e Murcha de fusário [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi – FOLAC] (Blacard *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2010).

6. A MURCHA DE FUSÁRIO DA ALFACE

A murcha de fusário ou fusariose (causada por raças do fungo *Fusarium oxysporum*, Schlechtend. f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi) é uma das doenças economicamente mais importantes da alface ao redor do mundo. Os danos na produção podem variar de 20 a 70%, dependendo da cultivar, das práticas de manejo adotadas e das condições ambientais (Pasquali *et al.*, 2005; 2007). Os sintomas iniciais dessa doença são um amarelecimento foliar e/ou redução do crescimento. Com o progresso da doença, as folhas mais velhas podem murchar totalmente, levando ao colapso e morte da planta. Cortes no sentido vertical do caule de plantas doentes

permitem a visualização de uma coloração marrom intensa nos vasos condutores que aparece como resultado da reação da planta hospedeira à colonização e produção de toxinas pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) (**Fujinaga et al., 2001; Garibaldi et al., 2004b; Scott et al., 2010**).

A fusariose da alface tem uma ampla distribuição geográfica já foi relatada no Japão (**Matuo & Motohashi, 1967**), nos Estados Unidos (**Hubbard & Gerik, 1993**), em Taiwan (**Huang & Lo, 1998**), no Irã (**Millani et al., 1999**), na Itália (**Garibaldi et al., 2002**), em Portugal (**Pasquali et al., 2007**), no Brasil (**Ventura & Costa, 2008; Cabral et al., 2012**) e, mais recentemente, na Argentina (**Malbrán et al., 2014**) e na Holanda (**Gilardi et al., 2016**). Quatro raças de FOLAC foram identificadas, sendo que a raça 1 é a mais disseminada em todo o mundo, com relatos na Itália, em Portugal, nos EUA (**Pasquali et al., 2005**) e no Brasil (**Cabral et al., 2014**). O Japão é o único país onde três raças (1, 2 & 3) já foram registradas (**Fujinaga et al., 2001, 2003; Yamauchi et al., 2004**). Fora do Japão, a raça 3 foi relatada apenas em Taiwan (**Lin et al., 2014**). A raça 4 foi recentemente reportada na Holanda (**Gilardi et al., 2016**).

A determinação de raças de FOLAC se baseia na capacidade dos isolados induzirem (ou não) sintomas em um conjunto de cultivares de alface diferenciais ou diferenciadoras (**Ogiso et al., 2002; Fujinaga et al., 2003**), e que consiste em uma abordagem trabalhosa e demorada, envolvendo a produção de mudas, produção de inóculo, inoculação controlada e avaliação da resposta das plantas.

No gênero *Fusarium*, a identificação de espécies baseada exclusivamente em características biológicas ou morfológicas representa um enorme desafio que, em geral, resulta em classificações imprecisas. O gênero *Fusarium* é especialmente difícil para taxonomistas devido à ausência de características morfológicas informativas e a instabilidade fenotípica de várias das características de valor no diagnóstico que são fortemente afetadas pelas condições de cultivo *in*

vitro ou *in vivo* (Fravel *et al.*, 2003). Neste sentido, o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em PCR para determinação de raças de FOLAC tem se mostrado muito útil para aumentar a precisão do diagnóstico e para permitir a análise em larga escala de coleções de isolados, uma vez que são menos trabalhosos e abreviam, consideravelmente, o tempo de obtenção dos resultados (Pasquali *et al.*, 2007; Mbofung & Pryor, 2010), incluindo a amplificação do DNA com marcadores do tipo *Sequence characterized amplified region* – SCAR (Lievens *et al.*, 2008). Um destes marcadores (Pasquali *et al.*, 2007) foi desenvolvido em regiões entre retrotransposons, os chamados *Long Terminal Repeats* (LTRs). Essa região denominada Han foi encontrada distribuída em todo o genoma de *Fusarium* (Huan-Van *et al.*, 2000). Estudo realizado por Cabral *et al.* (2014) demonstrou que o par de *primers* Hani e Hanilatt3rev pode ser utilizado para identificar isolados brasileiros de FOLAC raça 1. Outros métodos utilizados para diferenciar e identificar populações de FOLAC, como a amplificação de uma região codificadora do fator de alongação-1 α (TEF-1 α), de uma região da pequena subunidade mitocondrial (mtSSU rDNA) e a região espaçadora intergênica do DNA ribossômico (IGS) (Mbofung *et al.*, 2007). A região IGS é particularmente adequada para estudos de relações intra-específicas de *F. oxysporum*, por ser muito informativa (Mbofung *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2010).

Está bem estabelecido na literatura que as distintas *formae speciales* de *F. oxysporum* são eficientemente transmitidas por sementes (Mbofung *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2015). De fato, a detecção de isolados de FOLAC raça 1 em vários países geograficamente distantes em um período de tempo relativamente curto sugere a sua recente dispersão mundial tenha ocorrido principalmente via sementes infectadas (Garibaldi *et al.*, 2004a). Da mesma forma, a presença da raça 1 de FOLAC em distintas regiões produtoras de alface do Brasil sugere que este patógeno pode ter sido introduzido e disseminado dentro do país por meio de sementes

infectadas/infestadas. Este fato é preocupante e alerta para a necessidade de um melhor controle fitossanitário das sementes importadas pelo Brasil.

O controle da murcha de fusário da alface através do uso de fungicidas ou da desinfestação dos solos com produtos químicos é, geralmente, pouco eficiente e inviável em termos econômicos e/ou ambientais. Estratégias de controle biológico estão sendo implementadas com isolados não patogênicos de *F. oxysporum* e com outros microrganismos antagônicos tais como *Tricoderma harzianum* (Innocenti *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a presença de fungos no solo pode ser controlada pela manipulação do ambiente por meio da utilização da solarização, da fumigação do solo e da rotação de cultura para reduzir os níveis de inóculo do solo (Matheron, 2015). A persistência de FOLAC no solo pode não ser afetada se as culturas empregadas em sistemas de rotação com alface permitirem o desenvolvimento ou a sobrevivência do patógeno (Gordon & Koike *et al.*, 2015). Pesquisas realizadas por Scott *et al.* (2013) mostraram que FOLAC pode colonizar raízes de tomate, melancia, algodão, brócolis e espinafre sem causar sintomas da doença. De qualquer forma, a medida de rotação de cultura é de pouca eficiência, uma vez que é um fungo de solo, podendo sobreviver no campo por 10 anos ou mais, mesmo na ausência do hospedeiro, uma vez que pode crescer em matéria orgânica.

Por essas razões, as táticas de manejo mais eficazes da doença se baseiam em estratégias de prevenção e incluem: uso de sementes isentas do patógeno, uso de material propagativo sadio, remoção de solo contaminado, limpeza prévia de tratores, equipamentos agrícolas, tubos de irrigação, equipamentos de colheita e calçados. No entanto, a estratégia preferencial de prevenção e controle da doença é o uso de cultivares resistentes (Gordon & Koike *et al.*, 2015).

O conhecimento sobre a variabilidade genética de FOLAC no Brasil é uma importante informação para o melhoramento genético visando incorporar fatores (alelos) de resistência que

sejam efetivos contra todas as variantes (raças) desse patógeno. Isso subsidiará o desenvolvimento de cultivares com um espectro de resistência mais amplo, podendo prevenir problemas relacionados com potenciais surtos epidêmicos causados por variantes desse patógeno, ainda não reportadas no Brasil (**Cabral & Reis, 2013**). Essa informação também é importante para os produtores e extensionistas, orientando-os na seleção e escolha de cultivares resistentes e com melhor adaptação a uma dada região produtora (**Cabral & Reis, 2013**). A transmissão do fungo através de sementes e as perdas econômicas causadas pela fusariose também indicam a necessidade dos programas de melhoramento genético implementarem estratégias de ‘piramidação’ de fatores genéticos distintos (do tipo raça-específicos) em uma única cultivar, incluindo, de maneira antecipatória (*preemptive breeding*), fatores que controlam resistência mesmo contra raças ainda não reportadas no Brasil.

7. IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO

Um marcador genético para ser útil em programas de seleção assistida deve apresentar os seguintes atributos: polimorfismo com elevado nível de especificidade (para um genótipo, fenótipo e região genômica ou gene); estabilidade e herança simples (**Collard *et al.*, 2005; Collard & Mackill, 2008**). Os marcadores moleculares ideais são aqueles denominados funcionais, ou seja, derivados ou localizados dentro dos próprios genes que controlam a característica de interesse.

O mapeamento genético de uma espécie consiste na geração de um conjunto ordenado de informações sobre as sequências do DNA que cobrem a totalidade ou um segmento de uma região do genoma. O mapeamento genético estima a frequência de cotransmissão de dois marcadores ou genes. As probabilidades de permutas genéticas ocorrerem entre dois marcadores

ou genes são menores quanto mais próximos estes estiverem localizados. Tal fato, torna possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos. Ou seja, o mapa genético consiste na representação da ordem e da distância entre genes em grupos de ligação genética (**Collard et al., 2005; Collard & Mackill, 2008**).

O emprego de marcadores moleculares propicia a seleção mais rápida de plantas superiores permitindo, inclusive, que novos cruzamentos possam ser realizados ainda dentro de uma mesma geração, aumentando significativamente a eficiência de um programa de melhoramento (**Collard et al., 2005; Collard & Mackill, 2008**). Marcadores moleculares podem ser utilizados mesmo que não tenham sido ainda mapeados, contanto que possam estar fortemente associados com um dado genótipo ou fenótipo, comprovando o seu valor de diagnóstico (**Milach, 1998**).

Vários genes de resistência a doenças foram isolados/clonados, utilizando as estratégias de mapeamento genético/físico de alta resolução. Esse tipo de trabalho tem o objetivo de encontrar marcadores moleculares próximos (= ligados) ao gene de interesse, saturando com o maior número possível de marcadores a região do genoma onde o gene candidato se localiza. Esse processo foi acelerado/facilitado em algumas espécies de plantas cujos genomas completos já estão disponíveis (**Collard et al., 2005**). Desta forma, a informação sobre a estrutura de genes de resistência a fungos possibilita o estabelecimento de métodos mais simplificados e eficientes, baseados na identidade de sequência com genes homólogos/análogos, visando a busca dos “genes candidatos” (**Collard et al., 2005; Michelmore et al., 2013**).

8. SISTEMAS DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Diversos tipos de sistemas de marcadores moleculares são empregados na alface, incluindo, RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified*

Regions), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SSR (*Simple Sequence Repeats* – Microsatélites) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (Kesseli *et al.*, 1991; Jeuken *et al.*; 2001; Truco *et al.*, 2007; Simko, 2009). Alguns marcadores foram encontrados em estreita ligação com segmentos genômicos contendo fatores que controlam importantes características de interesse para o melhoramento da alface, incluindo genes de resistência a doenças (Simko, 2013).

O sistema de marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), baseado na PCR, foi utilizado em vários estudos genéticos (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; D'Andrea *et al.*, 2008). Os marcadores RAPD são predominantemente dominantes de natureza binária (presença ou ausência de bandas ou amplicons) (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A análise via RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (6-30 ng de DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma ou do fenótipo a ser estudado (Williams *et al.*, 1990). As principais limitações dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética gerado em cada análise e a baixa reprodutibilidade dos resultados.

Os marcadores baseados nas regiões amplificadas de sequências caracterizadas (*Sequence Characterized Amplified Regions* – SCAR) foram desenvolvidos como o objetivo de eliminar algumas das desvantagens dos marcadores RAPD. O marcador SCAR é um fragmento de DNA genômico em um *locus* específico que é identificado por amplificação em PCR, usando-se um par de *primers* específicos (Sakiyama, 1993). Se um fragmento amplificado por meio do RAPD for de interesse, ele é clonado e as suas duas extremidades, sequenciadas. Essas informações são utilizadas para a construção de dois *primers* específicos com aproximadamente 24 nucleotídeos, que resultam em amplificação reproduzível desses *loci* quando altas temperaturas de anelamento são utilizadas. As vantagens dos marcadores SCAR sobre os marcadores RAPD é que eles detectam de maneira específica somente um *locus*; sua amplificação é menos sensível às

condições experimentais/laboratoriais e podem ser potencialmente transformados em marcador codominante.

CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se *primers* específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão (clivagem) com endonucleases de restrição que relevam polimorfismos internos de um amplicon inicialmente identificado como sendo não-polimórfico em análises convencionais via PCR. As principais vantagens dos marcadores CAPS são a codominância e a alta reprodutibilidade e as principais desvantagens são a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção dos *primers* e para a escolha das endonucleases de restrição (Faleiro, 2007).

Os microssatélites são conjuntos de sequências (geralmente de dois a seis nucleotídeos de comprimento) originadas por arranjos de repetições em *tandem*. O polimorfismo desses marcadores caracteriza-se pela variação do número dos elementos repetidos presentes na região. Essa variação no número de elementos repetidos ocorre, geralmente, devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001). O emprego de *primers* específicos flanqueando o segmento variável do microssatélite permite a sua amplificação e detecção dos polimorfismos, gerando amplicons de tamanhos diferentes. As principais vantagens dos marcadores microssatélites são a codominância, alta reprodutibilidade dos resultados e o elevado nível de polimorfismos devido à sua alta frequência de mutação e abundância na maioria dos genomas vegetais (Morgante *et al.*, 1993; Milach, 1998; Matioli, 2001).

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são marcadores moleculares de DNA utilizados para identificar mutações/polimorfismos de base individual (Ansari *et al.*, 2015). Com a crescente disponibilidade de bancos de dados de sequências, principalmente de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), tem cada vez mais aumentado o ritmo de desenvolvimento e utilização de

marcadores SNPs. O desenvolvimento de marcadores do tipo SNPs necessita do aporte de informações de sequenciamento do DNA para o desenho de *primers*. As variações do tipo SNP são caracterizadas por substituições ou deleções/inserções (coletivamente chamadas de Indels) de um único nucleotídeo. Estas classes de mutações são as formas de variação mais frequentemente encontradas nos diferentes genomas vegetais. As vantagens atribuídas aos SNPs para estudos genéticos são evidenciadas pela sua enorme aplicação em algumas espécies vegetais tais como *Arabidopsis* (Schmid *et al.*, 2003), *Zea mays* (Bhatramakki *et al.*, 2002) e *Eucalyptus* (Grattapaglia *et al.*, 2011).

A aplicação das tecnologias coletivamente denominadas como *next-generation sequencing* (NGS) tem propiciado enormes avanços na caracterização de genomas vegetais alavancando os sistemas de genotipagem em larga escala disponíveis para os programas de melhoramento. Uma das estratégias derivadas dos sistemas NGS é a chamada genotipagem via sequenciamento – *genotyping-by-sequencing* (GBS) que permite ampliar de maneira significativa a descoberta de marcadores moleculares (especialmente SNPs e Indels) ligados com características de interesse agrônomo. A estratégia de GBS envolve a digestão do DNA genômico da espécie vegetal de interesse com enzimas de restrição (otimizadas para cada espécie) seguida de uma reação de ligação com adaptadores do tipo *barcode* que são empregados como moldes para ensaios de PCR e posterior sequenciamento do conjunto do DNA genômico amplificado. Esses *barcodes* permitem rastrear as sequências geradas de cada amostra (Craig *et al.*, 2008). Os dados gerados pela estratégia GBS são posteriormente processados e analisados em plataformas de bioinformática. Várias plataformas NGS, como a Roche 454 FLX Titanium (Thudi *et al.*, 2012), a Illumina MiSeq e HiSeq 2500 (Bentley *et al.*, 2008), HiSeq 3000 (Boland *et al.*, 2013) e a Ion Torrent PGM (Rothberg *et al.*, 2011) foram utilizadas (Deschamps *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação das tecnologias e plataformas de *next-generation sequencing*.

Plataforma de sequenciamento	Read Length (bp)	Reads per Run
Roche 454 FLX Titanium	~ 800	~ 1 milhão
Illumina Miseq	2 x 250 ^a	~ 1 milhão
Illumina Hiseq 2500	2 x 100 ^a	~3.0 milhões
Ion Torrent PGM	100	~ 1 milhão
Illumina Hiseq 3000	2 x 150 ^a	~ 2.5 bilhões

^a*Paired-end read sequencing*

Os avanços nas metodologias de NGS têm propiciado uma redução considerável nos custos de sequenciamento de DNA (Elshire *et al.*, 2011). Esse sistema de última geração pode produzir centenas de milhões a centenas de bilhões de sequências simultaneamente, permitindo o desenvolvimento de marcadores em escala industrial. Os principais aspectos positivos deste sistema incluem: baixo custo, demanda por uma menor quantidade de DNA purificado, seleção do tamanho dos fragmentos, um número menor de etapas de PCR e purificação, não apresentam limites de sequência de referência, contam com código de barras eficiente e fácil para ampliação (Davey *et al.*, 2011). Esse método está se tornando cada vez mais importante como uma ferramenta eficaz na seleção assistida em uma variedade de espécies de plantas (Elshire *et al.*, 2011). A construção de bibliotecas de GBS é baseada na redução da complexidade do genoma com enzimas de restrição (Elshire *et al.*, 2011). Essa abordagem é simples, rápida, extremamente específica, altamente reproduzível, podendo chegar a importantes regiões do genoma que são inacessíveis a outras abordagens de captura de sequência. A escolha de enzimas de restrição apropriadas pode evitar regiões repetidas do genoma e regiões com um número menor de cópias

podem ser alvo com uma eficiência duas a três vezes maior (**Gore et al., 2009**), o que minimiza problemas de alinhamentos computacionais em espécies com níveis elevados de diversidade genética.

Devido a esse conjunto de características, a estratégia GBS é empregada em um variado grupo de estudos genéticos, incluindo os chamados *genome-wide association studies* (GWAS), diversidade genômica, desenvolvimento de marcadores moleculares, identificação de regiões genômicas contendo genes candidatos e características quantitativas (QTLs) de interesse (**Deschamps et al., 2012; He et al., 2014**). Esse conjunto de informações pode ser convertido em marcadores de interesse para sistemas aplicados de seleção de indivíduos superiores, combinando múltiplas características de interesse.

Em alface, avanços significativos estão sendo feitos utilizando a estratégia GBS. O desenvolvimento de mapas genéticos extremamente densos (i.e. com um número elevado de marcadores) tem permitido a localização genômica/isolamento de genes e o uso de diversos marcadores moleculares em programas de melhoramento com seleção assistida (**Truco et al., 2013**). A Universidade da Califórnia, em Davis, é a instituição com as maiores e mais relevantes contribuições no desenvolvimento de marcadores derivados de NGS em alface e espécies selvagens (silvestres) geneticamente relacionadas (**Stoffel et al., 2012; Atkinson et al., 2013; Truco et al., 2013**).

9. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

A interação planta-patógeno envolve longos processos co-evolucionários que podem resultar no estabelecimento, por parte da planta hospedeira, de mecanismos de percepção dos agentes patogênicos e de ativação de sinais que podem ser convertidos em respostas de defesa específicas (ou não). Enfrentando a pressão seletiva imposta pelos patógenos, as plantas

desenvolveram mecanismos genéticos para defesa pós-invasão, cujos produtos gênicos detectam direta ou indiretamente os efetores específicos do patógeno e desencadeiam respostas eficazes de defesa (**Michelmore et al., 2013**). Essa indução de sinalização de defesa da planta via reconhecimento de efetores específicos do patógeno é feita por conjuntos variados de produtos gênicos codificados por genes referidos como genes R (= resistência). Numerosos genes de resistência (R) já foram caracterizados e estão sendo, muitos deles, eficientemente utilizados em programas de melhoramento genético vegetal (**Gururani et al., 2012**).

O emprego de cultivares resistentes é a alternativa mais conveniente quando comparada com outras medidas de controle. Os benefícios de usar fatores de resistência incluem a redução eficiente do crescimento e propagação do patógeno, a redução de danos para a planta hospedeira, redução de agrotóxicos e, sobretudo, a produção de alimentos mais saudáveis. Além disso, é uma tecnologia fácil de ser adotada, uma vez que já vem imbutida na semente. O controle eficiente e sustentável de uma gama de patógenos como bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematóides e insetos é uma exigência para todos os sistemas agrícolas (**Gurunani et al., 2012**).

O melhoramento genético com base em genes de resistência está sendo otimizado através da incorporação de técnicas moleculares e biotecnológicas. A genética de resistência a patógenos é intensamente estudada em muitas espécies vegetais (**Michelmore et al., 2013**). Com base na herança, a resistência é frequentemente classificada como monogênica (dominante ou recessiva) ou poligênica. Altos níveis de resistência contra raças específicas de um patógeno são controlados por um ou poucos genes, muitas vezes de grandes efeitos fenotípicos e de alta penetrância que tendem a ser estáveis em diversas condições ambientais. Esse tipo de resistência refere-se à monogênica ou resistência de gene maior (que engloba grande parte dos genes R) (**Michelmore et al., 2013**). Entretanto, nem toda resistência monogênica confere imunidade completa. Níveis parciais ou intermediários na resistência são também observados em distintos

patossistemas. Algumas vezes os genes R se mostram sensíveis às condições ambientais (**Zhu et al., 2010**). A resistência de caráter poligênico é determinada por genes menores (= de reduzido efeito fenotípico) múltiplos genes ou *loci* de características quantitativas, resultando em diferentes níveis de completa e incompleta resistência (**Michelmore et al., 2013**).

O desenvolvimento de novas abordagens para a proteção genética das culturas contra fitopatógenos demanda contínuos avanços no entendimento dos mecanismos moleculares que regulam os níveis de resistência da planta. Segundo **Jones & Dangl (2006)**, as ferramentas moleculares e genômicas têm possibilitado dissecar as principais estratégias e mecanismos empregados pelo chamado “sistema imunológico vegetal”, a saber: PAMP (padrões moleculares associados a agentes patogênicos)-*triggered immunity* (**PTI**) e o *effector-triggered immunity* (**ETI**).

10. RESISTÊNCIA BASAL E RESISTÊNCIA MEDIADA POR GENES R

As plantas possuem dois tipos gerais de resistência a doenças: a defesa basal e a defesa mediada por genes R. A defesa basal, constituída por resistência do tipo ‘não hospedeira’ e ‘hospedeira’, representa a primeira linha de defesa contra a infecção por uma ampla gama de patógenos. A defesa basal envolve interações entre receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* – PRRs), como por exemplo, *receptor-like kinases* (RLKs) e o *receptor-like proteins* (RLPs). Esses se localizam na matriz extracelular ou na membrana plasmática (**Jones & Dangl, 2006; Dangl et al., 2013**), e possuem a capacidade de reconhecimento dos PAMPs.

Geralmente, a resistência ‘hospedeira’ é específica de uma cultivar ou de um acesso, enquanto a resistência ‘não hospedeira’ se manifesta contra uma ampla gama de potenciais agentes patogênicos em todos os membros de uma dada espécie de planta (**Heath, 2000**).

Elicitores de defesa basal podem ser derivados da degradação da parede celular da planta hospedeira (que são liberados pela atividade hidrolítica das enzimas secretadas por patógenos invasores), mas também identificam características comuns dos diferentes grupos de patógenos, referidos como os PAMPs (Nürnberg *et al.*, 2004).

Os PAMPs representam uma gama variável de moléculas contendo epítomos microbianos primordiais na sobrevivência ou aptidão de um dado grupo de patógenos, como, por exemplo, lipopolissacarídeos, quitinas, β -glucanos, peptidoglicanos, fator Tu de alongamento bacteriano, flagelina e ergosterol (Schwessinger *et al.*, 2008). O termo padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs) também pode ser empregado, visto que essas moléculas podem também ocorrer em microorganismos não patogênicos (Jones & Dangl, 2006; Boller & Felix, 2009). Essas interações promovem a PAMP-triggered immunity (PTI), que compreende a ativação de uma MAP (que é uma proteína associada com a mitogênese ou com capacidade de iniciar o processo de divisão celular), cascatas de proteínas quinases (enzimas que catalizam a transferência de grupos fosfatos) e ativação de fatores de transcrição WRKY (TF). Essas alterações fisiológicas e bioquímicas impedem a colonização do patógeno e conferem um espectro de resistência efetivo contra a maioria dos patógenos em potencial. O PTI também inclui mudanças no fluxo de íons em todo o plasmalema, rápida produção de espécies ativas de oxigênio e indução de genes de defesa (Michelmore *et al.*, 2013).

Quando os patógenos conseguem ter sucesso na superação do PTI, uma segunda linha de defesa do sistema ‘imunológico’ vegetal pode evoluir e se manifestar: a chamada ETI (*effector-triggered immunity*). Genes de avirulência do patógeno evoluem de acordo com a espécie, a raça, *formae speciales*, os patotipos ou mesmo de acordo com efetores de avirulência de estipes que, após a secreção e translocação dentro da célula hospedeira, interferem ou desativam a sinalização da PTI, tornando as plantas suscetíveis ao patógeno, resultando da suscetibilidade do tipo

effector-triggered susceptibility (ETS) (**Gohre & Robatzek, 2008**). Desta forma, diferem-se dos PAMPs, pois atingem especificamente os mecanismos de defesa do hospedeiro. Dentro da ETI, encontra-se o modelo gene-a-gene e o modelo de Guarda.

Fitopatógenos produzem certas moléculas chamadas "efetores", que são codificadas pelos genes da avirulência (Avr) do patógeno. Os produtos dos genes de avirulência são liberados diretamente nas células da planta durante a fase inicial da infecção. Esses efetores podem alterar o estado fisiológico da planta hospedeira, a fim de beneficiar a colonização do patógeno ou serem utilizados para interferir negativamente ou mesmo desativar as respostas de defesas das plantas (**Hammond-Kosack et al., 2007**). No entanto, as plantas têm desenvolvido uma forma adicional de imunidade que é baseada na percepção desses efetores por proteínas de resistência do hospedeiro codificadas pelos genes R (**Nimchuk et al., 2003**).

Os genes R são altamente polimórficos e possuem distintas especificidades de reconhecimento dos diferentes patógenos e variantes de patógenos. Normalmente, os genes R ocorrem como parte de uma família gênica em agrupamentos físicos (= *clusters*) que evoluíram via eventos de duplicação e recombinação. Em geral, cada gene R confere resistência a um patógeno específico. A forma de atuação deste mecanismo de defesa se adequa dentro do modelo clássico de gene-a-gene proposto por **Flor (1971)**. Neste modelo, o gene R funciona como um receptor que é ativado ao receber um sinal externo, induzindo e/ou ativando uma cascata de sinais que são traduzidos para que se obtenha uma resposta de defesa. Essa resposta pode ser local, havendo uma reação local de hipersensibilidade (HR) na qual ocorre a morte programada de células no sítio inicial da infecção ou pode se apresentar como uma resposta sistêmica (**Flor, 1971**).

Um mecanismo associado de maneira consistente com o 'disparo' de reações de hipersensibilidade é a geração de intermediários reativos de oxigênio (*Reactive Oxygen*

Intermediates) (ROIs) e de espécies ativas de oxigênio (EAOs), que envolvem a produção/liberação de superóxido (O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esses eventos em associação com a produção coordenada de óxido nítrico (NO) são coletivamente denominados de ‘explosão oxidativa’ celular (**Grant & Loake, 2000**). Essas alterações bioquímicas desempenham um papel crucial na ativação dos mecanismos de resistência a doenças em plantas. A explosão oxidativa associada com a HR é parte de um complexo sistema integrado de sinalização que envolve também a participação do ácido salicílico (AS) e alterações nos níveis de Ca^{2+} citosólico para desencadear mecanismos de defesa (**Resende et al., 2003**). Ocorre também no processo um acúmulo de fito-hormônios, especialmente o ácido jasmônico e o etileno. Modificações estruturais envolvem o espessamento da parede celular, produção de fenóis, ação de lipoxigenases, formação de fitoalexinas e indução da expressão de proteínas PR (*Pathogenesis-related proteins*) (**Hammond-Kosak & Parker, 2003**). Esses eventos podem desencadear, posteriormente, uma resposta generalizada e de longa duração, prolongando-a de forma sistêmica e atuando mesmo longe do sítio de infecção (= Resistência Sistêmica Adquirida).

Um exemplo de HR em total conformidade com a hipótese gene-a-gene é fornecida por uma das mais caracterizadas interações planta-patógeno, entre a alface e o agente patogênico *Bremia lactucae* Regel, causando a doença denominada míldio da alface. Mais de 25 *Dm* (*Downy mildew resistance*) genes controlando resistência a *B. lactucae* foram identificados, sendo que a maioria deles apresenta caráter dominante (**Crute & Johnson, 1976; Farrara et al., 1987; Illott et al., 1987; Michelmore et al., 2009**).

O outro modelo para ação dos genes de defesa vegetal denomina-se como “modelo guarda” (**Holt III et al., 2003**). De acordo com essa teoria, a proteína R interage, ou “guarda”, uma segunda proteína denominada “guardee”, que é alvo da proteína Avr do patógeno invasor. Neste modelo, a ocorrência de interações envolvendo a proteína “guardee” serve como sinal para ativar

a resistência mediada por genes R (**Marathe & Dinesh-Kumar, 2003**). Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, a proteína *RPM1*, codificada por um gene de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, não se relaciona diretamente com a sua proteína Avr correspondente (*avrRPM1*). Nessa situação, ocorre a indução da proteína *RIM4*, a qual interage com a *avrRPM1*. Essa interação sinaliza para *RPM1* que, por sua vez, desencadeia uma resposta de hipersensibilidade (HR) (**Mackey et al., 2002**). Da mesma maneira, o gene *Cf-2* de tomate que condiciona resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* (que expressa *Avr2*) também necessita da expressão de um segundo gene (proteína *RCR3*) (**Krüger et al., 2002**), o que reforça o valor biológico desta hipótese (**Pinto et al., 2010**).

11. MECANISMOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE GENES DE RESISTÊNCIA CARACTERIZADOS EM PLANTAS.

Os genes de resistência caracterizados até o momento são classificados em grupos ou famílias gênicas que possuem regiões filogeneticamente conservadas, denominadas motivos (*motifs*) ou domínios (*domains*), os quais podem incluir proteínas ricas em leucina (*Leucine-rich repeats* – LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide binding sites* – NBS), estruturas complexas envolvendo a combinação de estruturas do tipo NBS-LRR ou ainda genes combinando domínios para localização em membranas (= *transmembrane domains*) e repetições ricas em leucina (TM-LRR) (**Hammond-Kosack & Jones, 1997**).

Outros estudos têm identificado diferentes motivos/domínios relacionados aos mecanismos de resistência em plantas, incluindo repetições de pentatricopeptídeo e peroxidases (**Staskawicz et al., 1995; Liu et al., 2007**). Em alguns genes os domínios NBS-LRR podem apresentar organizações estruturais mais complexas aparecendo em associação com outros domínios como, por exemplo, TIR (*Toll interleucine receptor*)-NBS-LRR (sigla **TNL**) ou não TNL/*coiled-coil*-

NBS-LRR (sigla **CNL**). Os alvos dos genes das classes TNL e CNL são especificamente proteínas efetoras patogênicas no interior da célula hospedeira, que caracteriza as respostas do tipo ETI – *effector-triggered immunity*.

Da mesma forma, os TM-LRRs podem ser divididos em duas classes: receptores do tipo quinase (*Receptor-like kinases* – RLKs) ou proteínas do tipo receptoras (*Receptor-like protein-RLPs*). RLPs e RLKs são receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que interferem na associação dos padrões moleculares associados de microorganismos (PAMPs/MAMPs), desencadeando o sistema imunológico vegetal para permitir o reconhecimento de uma ampla gama de agentes patogênicos (Sekhwal *et al.*, 2015).

Família NBS-LRR: *Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*: Os genes da classe NBS-LRR consistem, estruturalmente, em uma extremidade N-terminal variável, uma ligação conservada de nucleotídeos de domínio interno (NB)-ARC, e um carboxi-terminal altamente polimórfico com múltiplas repetições ricas em leucina (LRRs) (Sekhwal *et al.*, 2015). Os NBS-LRR podem ser classificados em dois grandes grupos: o TNL e o CNL, baseados na presença ou ausência de receptor TOLL/interleucina-1 (TIR), que mostram homologia com domínios de sinalização de *Drosophila* (Toll) e um interleucina (IL) basal de mamíferos ou *coiled coil* (CC) (cauda espiralada) no N-Terminal. NBS-LRR é a família mais conhecida, pois todos os genes integrantes desta família estão relacionados de alguma forma a resistência de plantas a fatores bióticos. Os genes que codificam NBS-LRR estão, normalmente, localizados em agrupamentos físicos (*clusters*) nos genomas vegetais como resultado de eventos de duplicação de segmentos de linhagens específicas, seguidos por eventos de rearranjos locais (Zhang *et al.*, 2014). A expansão de *clusters* individuais ocorre através da duplicação em *tandem*, originados de *crossing-overs* desiguais (Richly *et al.*, 2002; Meyers *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004). A complexidade desses *clusters* também é afetada pela perda de genes ou de função de genes e também de ganhos de

função de genes através da seleção natural, em um processo referido como “nascimento-e-morte” (Michelmore & Meyers 1998; Mondragon-Palomino & Gaut 2005; Guo *et al.*, 2011). Esses processos genéticos e evolutivos têm resultado em complexos e variáveis *clusters* no genoma, conferindo diversidade alélica e geração de novos fatores resistência contra múltiplas doenças.

Família RLK e RLP (*Receptor Like Kinase* – RLK e *Receptor Like Protein* – RLP): Essas duas classes de proteínas são estruturalmente semelhantes, apresentando um peptídeo de sinal (SP) no início do N-terminal e domínios extracelulares de percepção do padrão microbiano através das repetições ricas em leucina. Apresentam também um domínio de hélice transmembranar (TrD) que permitem a ancoragem das proteínas na membrana plasmática. As RLPs diferem de RLKs pela falta de um domínio quinase intracelular. As RLPs e RLKs são consideradas PRRs que reconhecem elicitores, tais como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (Sekhwal *et al.*, 2015).

Família *Receptor Like Kinase* – RLK: Os genes da família RLK estão envolvidos na defesa e também no desenvolvimento da planta. As proteínas dessa família podem ser divididas em duas classes principais. A primeira consiste em proteínas quinases envolvidas na interação planta-patógeno e respostas de defesa. Por exemplo, o gene *Xa21*, no arroz, está envolvido na resistência a uma doença bacteriana causada por *Xanthomonas oryzae* (*Xoo*) e o gene *Fls2* na percepção da flagelina em *Arabidopsis thaliana*. Na segunda, as proteínas estão envolvidas no desenvolvimento celular e no crescimento, assim como em *Arabidopsis*, nos genes de abscisão de órgãos florais (Jin *et al.*, 2000), no desenvolvimento do meristema (*clavata1*) (Clark *et al.*, 1997) e na regulação do crescimento celular (*Bri1*) (Li & Chory, 1997). As proteínas quinases alteram estruturas e funções de proteínas-alvo, fosforilando grupos específicos de serina e treonina. Por sua vez a quinase receptora de histidina (RHKs) pode fosforilar resíduos de

histidina, por exemplo, em produtos gênicos associados com a produção de etileno (ETR1) (Bleecker *et al.*, 2000) e citoquininas (CRE1) (Inoue *et al.*, 2001).

Família de genes do tipo *Receptor Like Protein* – RLP: Os genes desta família codificam proteínas que possuem um domínio LRR extracelular no N-Terminal ancorado à célula com pequenos domínios transmembranares. O gene *Cf-9* foi o primeiro gene identificado nessa família, conferindo resistência à mancha foliar de *C. fulvum* no tomateiro. De fato, vários genes da família *Cf* pertencem à família RLP (Dixon *et al.*, 1996, 1998). Nem todos os RLPs estão envolvidos na resistência a doenças, alguns desempenham um papel de desenvolvimento da planta, como por exemplo, o gene *clavata2* (*Clv2*) e o gene (*TMM*) que estão envolvidos no desenvolvimento de meristema e na regulação estomática em *Arabidopsis*, respectivamente.

12. OUTRAS CLASSES DE GENES DE RESISTÊNCIA

O sistema de defesa vegetal é iniciado quando receptores extracelulares transmitem sinais para elementos intracelulares. Para detectar os sinais de organismos invasores, as células vegetais possuem sistemas de receptores TM (transmembranares) que facilitam a comunicação entre ambientes intra e extracelulares. Entretanto, vários receptores TM relatados não contêm domínios completos como observado em NBS-LRR e RLPs ou RLKs. Assim, o termo “outros genes” é utilizado para classificar esses genes peculiares.

Família serina treonina quinase citoplasmática desprovida de domínio LRR (STK): Esta família codifica proteínas que não contêm domínios NBS-LRR. Caracteriza-se pela presença de uma quinase que fosforila resíduos de serina e treonina (Tang *et al.*, 1996). Um exemplo clássico é o gene *Pto*, que, em conjunto com o gene *Prf*, confere resistência a algumas estipes de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate via reação de hipersensibilidade e morte celular programada (Frederick *et al.*, 1998). Essa família gênica também já foi caracterizada em *A.*

thaliana, *Phaseolus vulgaris* (Nomura *et al.*, 2005) e *Musa acuminata* (Peraza-Echeverria *et al.*, 2007).

Família *coiled coil* ancorado à membrana: Os genes de resistência dessa família contêm um domínio transmembranar, ancorado a um domínio *coiled-coil*. O principal representante dessa família é o gene *RPW8* em *Arabidopsis*, que codifica uma redutase localizada na membrana, com uma estrutura helicoidal (Xiao *et al.*, 2001). Esse gene ativa a produção de ácido salicílico como estratégia de defesa e promove o acúmulo local de H₂O₂, provavelmente para restringir o crescimento do haustório e, ao mesmo tempo, reduzir o dano oxidativo às células hospedeiras, conferindo um amplo espectro de resistência (Xiao *et al.*, 2003).

13. GENES ANALÓGOS DE RESISTÊNCIA (RGAs): ESTRUTURA, FUNÇÃO & DIVERSIDADE

Os genes análogos de resistência (*resistance gene analogs*-RGAs) são genes, pseudogenes, ou regiões genômicas que apresentam características estruturais similares e/ou sequências com identidade com os diferentes domínios conservados presentes nos genes de resistência caracterizados em plantas. Esta conservação estrutural apresenta um enorme interesse do ponto de vista genético, uma vez que sugerem que elas representem sítios de relevância biológica na expressão fenotípica dos genes de resistência (Bent, 1996). Com base nessa conservação filogenética um novo sistema de marcadores foi concebido para análises genéticas. Nesse sistema, um conjunto de *primers* degenerados foi desenhado com o objetivo de amplificar (usando técnicas simplificadas de PCR heterólogo) regiões análogas a genes de resistência (RGAs) que se encontram conservadas em várias espécies vegetais (Leister *et al.*, 1996; Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996).

Em diversos trabalhos, observou-se que os marcadores do tipo RGAs co-localizam com genes de resistência ou os amplicons produzidos podem até mesmo representar segmentos dentro de genes de resistência funcionais (**Hammond-Kosack & Jones, 1997**). Neste sentido, o sistema de marcadores RGAs constitui uma ferramenta útil para a construção de mapas genéticos e em seleção assistida dentro de programas de melhoramento genético vegetal. A possibilidade de gerar um grande número de polimorfismos entre diferentes acessos de uma mesma espécie ou gênero também pode permitir o uso dos marcadores RGAs em sistemas de caracterização genética de acessos (*fingerprinting*) e cultivares (**Hammond-Kosack & Jones, 1997**).

14. ANÁLISES DE GENES R CANDIDATOS E DE RGAs EM ALFACE

Como mencionado, nos genomas vegetais, os genes de resistência são frequentemente encontrados formando agrupamentos físicos (*clusters*) em distintas regiões cromossômicas (**Michelmore & Meyers 1998**). Um clássico exemplo do agrupamento físico de genes de resistência em alface é ilustrado pelo grupo de ligação LG 2 que abriga pelo menos nove *Dm* (*Downy mildew resistance*) genes conhecidos, incluindo o já clonado *Dm3* (**Meyers et al., 1998**), que pertence à família NBS-LRR (**Shenet et al., 2002**).

Análises de ESTs de alface identificaram mais de 700 genes R candidatos que apresentaram sequências e/ou estruturas similares as identificadas em genes de resistência já caracterizados em plantas (**McHale et al., 2008**). Estes genes podem ser classificados em quatro grandes grupos: (1) genes candidatos para resistência (RGCs); (2) Genes de sinalização (*signaling pathway genes*); (3) Genes associados com respostas gerais de defesa (*defense response associated genes*) e (4) fatores de susceptibilidade (*susceptibility factors*) (**McHale et al., 2009**). RGCs em alface foram categorizados em 20 famílias baseados nas similaridades das sequências. RGC2 é uma grande família gênica que inclui mais de 40 membros conferindo resistência a patógenos

economicamente importantes e se localizam no cromossomo 2 (Kuang *et al.*, 2004, 2008; Christopoulou *et al.*, 2015a,b).

15. ABORDAGENS DE BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E RGAs EM GENOMAS VEGETAIS

O número de genes R varia muito entre espécies, por exemplo, 54 foram anotados em *Carica papaya* (Porter *et al.*, 2009), 150 em *Arabidopsis thaliana* (Meyers *et al.*, 2003), 571 em *Medicago truncatula* (Shao *et al.*, 2014), 465 em *Glycine max* (Shao *et al.*, 2014), 402 em *Populus trichocarpa* (Kohler *et al.*, 2008), 535 em *Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 2004), 1015 em *Malus domestica* (Arya *et al.*, 2014) e 1134 em *Lactuca sativa* cv. 'Salinas' (Christopoulou *et al.*, 2015b). A prevalência dos diferentes grupos também pode variar consideravelmente, por exemplo, o grupo TNL apresenta ampla ocorrência em Eudicots (*Primula hortensis*), mas estão ausentes no genoma de monocotiledôneas.

Mais recentemente, os genes de resistência e RGAs foram identificados a partir de genomas sequenciados utilizando ferramentas de bioinformática. Nos últimos 15 anos, mais de 50 genomas de plantas foram sequenciados e montados e suas sequências estão sendo depositadas e liberadas em bancos de dados públicos como o *Phytozome* (Goodstein *et al.*, 2012; Nordberg *et al.*, 2014) e o *EnsemblPlants FTP servers* (Bolser *et al.*, 2015). Avanços no sequenciamento de próxima geração são umas das abordagens mais importantes da pesquisa biológica moderna.

Vários métodos de bioinformática foram utilizados para identificar genes de resistência e RGAs e prever suas funções, incluindo alinhamento de sequências, pesquisa pelo BLAST, análise filogenética, análise de domínio e motivos, utilizando diversas aplicações, como o *Hidden Markov Model* (HMM) (Yoon *et al.*, 2009), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz

et al., 2000), o *Prosite* (<http://prosite.expasy.org/>), o *pfam* (<http://pfam.xfam.org/>) e o *InterProScan5* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>).

A identificação e a caracterização de genes de resistência e RGAs segue, geralmente, uma sequência de procedimentos padrões. O primeiro passo envolve a obtenção das sequências obtidas dos marcadores (amplicons) obtidos em ensaios de PCR com *primers* degenerados, usando como molde o DNA genômico extraído de acessos contrastantes de uma dada espécie vegetal. Na segunda etapa, as sequências obtidas são comparadas com as sequências disponíveis em plataformas tais como *GenBank* e PRGdb usando o algoritmo BLAST. Essa etapa visa confirmar e identificar a presença de potenciais genes de resistência candidatos. Na terceira etapa, ferramentas de *software* são empregadas para identificar os diferentes domínios, motivos conservados e produzir alinhamentos. No último passo, é realizada uma classificação dos genes R candidatos de acordo com seu domínio e motivos ou a suas combinações.

Até o momento, não há ferramentas de bioinformática padronizadas e critérios consistentes que foram empregados em estudos individuais. Além disso, ferramentas de *software* individuais têm suas próprias vantagens e limitações para identificar os diferentes domínios dos genes R. Um pacote de *software* mais abrangente, capaz de integrar ferramentas individuais de análise facilitaria o processamento, a padronização de organização de dados, permitindo uma consistente identificação dos genes R em análises comparativas entre as espécies e acessos dentro de espécies (Sekhwal *et al.*, 2015).

16. MAPAS DE LIGAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE QTLs

Marcadores apresentando frequência de recombinação abaixo de 50% são descritos como sendo ligados (*linked*) e acima desse valor são considerados como sendo não-ligados (*unlinked*). A indicação de ausência de ligação significa que os marcadores podem estar localizados em

braços distintos de um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes. Funções de mapeamento são usadas para converter frações de recombinação em unidades do mapa chamada de *centiMorgans* (cM). Mapas de ligação são construídos a partir da análise de diversos marcadores (por exemplo, fenotípicos, bioquímicos e moleculares) em populações segregantes. As três etapas principais na construção de mapas de ligação são: **(a)** produção de uma população segregante para mapeamento, **(b)** identificação de polimorfismos entre os parentais e **(c)** análise do padrão de segregação e de ligação entre marcadores polimórficos e fenótipos (**Collard *et al.*, 2005**).

Populações de mapeamento: A construção de um mapa de ligação requer uma população segregante obtida do cruzamento controlado entre parentais divergentes para uma ou mais características de interesse. O tamanho da população recomendado para trabalhos de mapeamento genético varia entre 50 a 250 ou mais indivíduos (**Mohan *et al.*, 1997**). Populações com um número mais elevado de indivíduos são necessárias para o mapeamento de ‘alta resolução’. Diferentes populações podem ser utilizadas para mapeamento dentro de uma determinada espécie de planta, todavia, cada tipo de população possui vantagens e limitações (**McCouch & Doerge, 1995**). Os tipos mais simples de populações de mapeamento para espécies autógamas são as populações F_2 , geradas a partir da autofecundação de uma planta híbrida F_1 , e populações de retrocruzamentos, derivadas do cruzamento de um indivíduo da geração F_1 com um dos parentais contrastantes. As principais vantagens destas populações são a facilidade de geração e exigência de apenas um curto período de tempo para produzi-las. Além disso, na população F_2 , os gametas de cada indivíduo são informativos, fazendo com que a quantidade de informação disponível seja o dobro daquela disponível nas populações derivadas de retrocruzamentos. Por esses motivos e somado ao fato da população F_2 possuir todas as possíveis combinações dos alelos parentais (AA,

Aa & aa), essa população é amplamente utilizada para mapeamento de ligação em plantas (Guimarães *et al.*, 2006).

O avanço nos níveis de endogamia a partir de plantas individuais da geração F₂ via ciclos sistemáticos de autofecundação permite a construção de outro tipo de população de mapeamento, denominadas de RILs (*recombinant inbred lines*). As RILs consistem em uma série de linhagens F₆ ou F₇ (portanto, com níveis elevados de homozigose) cada uma contendo uma combinação única de segmentos cromossômicos dos parentais originais. O tempo necessário para a obtenção das RILs (entre seis a sete gerações) é maior desvantagem dessa estratégia quando comparada com o uso da geração F₂. As linhagens duplo-haplóides (DH), por sua vez, podem ser reproduzidas pela duplicação natural ou pela indução da duplicação do conjunto cromossômico em células haplóides ou pela produção artificial via cultivo de células de pólen ou de células-ovo. A produção de populações DH só é possível em espécies que são passíveis de cultura de tecidos (por exemplo: pimentão, cenoura, arroz, cevada e trigo). A maior vantagem das populações DH e RILs é que elas produzem linhas homozigotas que podem ser multiplicadas e reproduzidas sem ocorrência de alteração genética. Essas populações representam recursos genéticos permanentes para o mapeamento de genes individuais e QTLs (Paterson, 1996). A pureza genética das populações DH e RILs permite a realização de ensaios comparativos em diferentes locais e anos.

Padrões de segregação e razões mendelianas de acordo com o teste do qui-quadrado (χ^2): O qui-quadrado é um teste estatístico empregado para avaliar quantitativamente se o conjunto de dados obtidos em um experimento difere daqueles obtidos ao acaso. Este teste estima se a distribuição de uma determinada classe fenotípica e/ou genotípica se adequa a uma hipótese formulada para explicar um dado fenômeno genético. Esse teste estima um grau de ‘certeza’ de que os valores observados estão de acordo com a hipótese formulada para uma dada distribuição fenotípica e/ou genotípica. A fórmula de $\chi^2 = \sum [(o-e)^2/e]$ onde: o = frequência observada de uma

classe fenotípica e/ou genotípica; e = frequência esperada de uma classe fenotípica/genotípica; Σ = somatório dos valores da expressão. É proposta uma hipótese nula H_0 , onde as frequências observadas não são diferentes das frequências esperadas. Comparando o valor esperado com o observado para cada fenótipo obtém-se o desvio. Verifica-se se os desvios são significativos ou não, baseados na probabilidade de ocorrência do evento. Se os desvios não são significativos, conclui-se que eles são devidos ao acaso, aceitando-se a hipótese formulada. Por outro lado, se os desvios são significativos, a hipótese é rejeitada, havendo necessidade de se formular nova hipótese para explicar os resultados obtidos. É necessário nesse teste fazer a comparação de dois valores estatísticos denominados de χ^2 calculado e χ^2 tabelado. As frequências observadas são obtidas diretamente dos dados amostrais, enquanto as frequências esperadas são calculadas a partir da hipótese a ser testada (H_0). Assim, o χ^2 calculado é obtido a partir dos dados experimentais, levando-se em consideração os valores observados e os esperados, tendo em vista a hipótese. Já o χ^2 tabelado depende do número de graus de liberdade e do nível de significância adotado. A tomada de decisão é feita comparando-se os dois valores de χ^2 . Se χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado: Rejeita-se H_0 . Por sua vez, se χ^2 calculado $< \chi^2$ tabelado aceita-se H_0 , o que significa que o desvio observado nos dados experimentais pode ser atribuído exclusivamente ao acaso (Schuster & Cruz, 2004; Ramalho *et al.*, 2008).

Identificação de polimorfismos: A segunda etapa na construção de um mapa de ligação é identificar marcadores fenotípicos, bioquímicos ou de DNA que revelam diferenças entre os parentais (ou seja, revelam polimorfismos). Em geral, espécies de polinização cruzada (alógamas) possuem níveis mais elevados de polimorfismo de DNA em comparação com as espécies endogâmicas (autógamas) tais como a alface. O mapeamento de espécies endogâmicas geralmente requer a seleção de parentais que são geneticamente divergentes (= pouco

relacionados). Na maioria dos casos, os parentais são selecionados com base no nível de diversidade genética (Collard *et al.*, 2005).

Sistemas de marcadores moleculares de DNA: A escolha dos sistemas de marcadores de DNA a serem utilizados para o mapeamento depende da disponibilidade de marcadores caracterizados para uma determinada espécie ou grupo taxonômico relacionado. Uma vez que os marcadores polimórficos entre as linhagens parentais são identificados, a segregação destes marcadores pode ser monitorada na população de mapeamento (“genotipagem”). Dessa forma, o DNA deve ser extraído de cada indivíduo da população de mapeamento. Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste qui-quadrado. A segregação mendeliana não é observada quando os *loci* apresentam distorção de segregação, o que é, por exemplo, observado comumente em cruzamentos interespecíficos (Collard *et al.*, 2005).

Análise de ligação (*linkage*) entre marcadores: A etapa final na construção de um mapa de ligação envolve a codificação de dados para cada marcador e para cada indivíduo da população. A análise de ligação pode ser realizada de forma manual para um conjunto pequeno marcadores, no entanto, não é viável analisar e determinar as ligações entre um grande número de marcadores. Desta forma, programas de bioinformática são comumente empregados para essa finalidade. A condução de análises de ligação em larga escala é feita utilizando aplicativos computacionais. Ausências de dados para algumas combinações indivíduos-marcadores (= *missing data*) também podem ser aceitas e incorporadas nas análises conduzidas nesses programas. A ligação entre os marcadores é normalmente calculada usando o *odds ratio*, ou seja, a proporção (*ratio*) de ligação *versus* a proporção de não ligação.

Grupos de ligação: Marcadores ligados são agrupados em grupos de ligação, que são definidos como grupos de genes (ou marcadores) cujos *loci* estão localizados em um mesmo

segmento cromossomal ou em um mesmo cromossomo. Estatisticamente, um grupo de ligação pode ser definido como um conjunto de *loci* que são herdados conjuntamente (**Liu, 1998**). Um mapa genético é considerado como sendo saturado quando o número obtido de grupos de ligação é igual ao número haplóide de cromossomos de uma espécie (**Paterson, 1996**). Muito frequentemente, os marcadores polimórficos identificados não estão uniformemente distribuídos ao longo dos cromossomos, deixando áreas descobertas ou, de maneira oposta, formando densos agrupamentos (*clusters*) em algumas regiões (**Paterson, 1996**). Além da distribuição aleatória dos marcadores, a frequência de recombinação não é igual ao longo dos cromossomos. A acurácia na medição da distância genética e a determinação da ordem dos marcadores estão diretamente relacionadas com o número de indivíduos estudados nas populações de mapeamento. Preferencialmente, as populações de mapeamento devem consistir, no mínimo, em 50 indivíduos na construção de mapas de ligação (**Young, 1996**).

QTLs (*Quantitative Trait Loci*): As principais características de relevância agrônômica apresentam herança do tipo multifatorial ou poligênica. Para estes caracteres, a variação entre indivíduos é resultante de múltiplos *loci*, da interação entre eles e dos efeitos ambientais envolvidos na determinação dos fenótipos (**Ferreira & Gattapaglia, 1998**). Devido ao grande número de genes controlando tais características, os fenótipos resultantes seguem um padrão contínuo de variação. Essas características quantitativas ou *loci* gênicos (ou regiões genômicas) relacionados com seu controle recebem a designação de QTL (*Quantitative Trait Loci*). A análise desses *loci* associada ao uso de mapas genéticos, obtidos por marcadores moleculares possibilita identificar, quantificar e mapear o efeito dos QTLs (**Tanksley et al., 1988**). Muitos fatores contribuem na eficiência de identificação de QTLs: a herdabilidade da característica, o número de QTLs, a magnitude do seu efeito sobre a característica, interação genótipo \times ambiente, a análise de um grande número de indivíduos de diferentes gerações de populações segregantes, ensaios

experimentais para mensuração do fenótipo de interesse, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, tamanho do genoma e saturação do mapa (**Tanksley, 1993; Young, 1996**).

Mapeamento de QTLs (*Quantitative trait loci*): O mapeamento de QTLs baseia-se no princípio em que cada um dos genes responsáveis pela expressão fenotípica de um caráter poligênico e marcadores genéticos ou moleculares ligados a esses genes co-segregam (via recombinação cromossômica ou *crossing-over*) durante a meiose (reprodução sexual), permitindo assim sua análise nas progênes (**Young, 1996**). Genes e marcadores que estão fortemente ligados serão transmitidos dos parentais para a progênie com maior frequência do que aqueles genes e/ou marcadores que não estão ligados com um determinado fator quantitativo (**Collard et al., 2005**). A frequência de genótipos recombinantes é utilizada para calcular frações de recombinação, que são usadas para inferir a distância genética entre os marcadores e o caráter em estudo. Ao analisar a segregação dos marcadores, a ordem relativa e a distância entre os marcadores, pode-se determinar que, quanto menor frequência de recombinação entre dois marcadores, mais perto eles estão situados em um cromossomo. Inversamente, quanto maior a frequência de recombinação entre dois marcadores, mais distantes estão situados no cromossomo (**Collard et al., 2005**).

Ferramentas computacionais para análise de QTLs: O programa *QTL Cartographer* consiste em um conjunto de programas de mapeamento de QTLs a partir de um mapa de ligação genético estipulando valores de *LOD Score* (LOD) para cada região analisada do mapa (**Basten et al., 2001**). A caracterização do LOD está em função do número de marcadores avaliados e do comprimento do mapa de ligação. As estratégias de mapeamento via *Single-Marker-Analysis*, Mapeamento por Intervalo Simples (*Simple Interval Mapping*), Mapeamento por Intervalo Composto (*Composite Interval Mapping*) e o Mapeamento por Múltiplos Intervalos (*Multiple Interval Mapping*) (**Tanksley, 1993; Kao et al., 1999**) são as mais utilizadas em estudos de mapeamento de caracteres quantitativos. O *Single-Marker-Analysis* é o método mais simples para

detecção de QTLs associado a marcadores individuais. Este método não requer um mapa de ligação completo e pode ser realizado através de testes estatísticos como teste *t*, análise de variância (ANOVA) e regressão linear simples. No entanto, quando a distância entre o marcador e o QTL for grande, menos provável será detectá-lo tendo em vista a possibilidade de recombinação entre o gene marcador e o QTL, dificultando a estimativa da magnitude do efeito do QTL (Lynch & Walsh, 1998). Por sua vez, o *Simple Interval Mapping* utiliza mapas de ligação e intervalos de análise entre pares adjacentes de marcadores ligados ao longo dos cromossomos simultaneamente, por regressão linear ou estimativa de verossimilhança, para estimar a frequência de recombinantes e a magnitude do efeito do QTL entre dois marcadores ligados (Lander & Botstein, 1989; Carneiro *et al.*, 2002). O *Composite Interval Mapping* é o método mais preciso e eficaz, especialmente quando existem QTLs ligados, pois avalia os QTLs fora do intervalo em questão, por um modelo de regressão múltipla, evitando que toda variação devida a outros QTLs fora do intervalo sejam residuais, elevando a precisão das estimativas. A desvantagem deste método é que não se permite estimar os efeitos epistáticos (Jansen, 1993; Zeng, 1993, 1994; Carneiro *et al.*, 2002). O *Multiple Interval Mapping* é um modelo desenvolvido posteriormente e que leva em consideração os efeitos de epistasia e de múltiplos QTLs, utilizando diversos intervalos de marcadores simultaneamente, para buscar, testar posições e verificar interações de vários QTLs (Kao *et al.*, 1999).

17. MAPAS GENÉTICOS E FERRAMENTAS GENÔMICAS DISPONÍVEIS PARA

Lactuca sativa

Para o gênero *Lactuca*, diversos mapas foram relatados utilizando populações a partir de cruzamentos intraespecíficos e/ou interespecíficos (Kesseli *et al.*, 1994; Witsenboer *et al.*, 1997; Waycott *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Jeuken *et al.*, 2001; Syed *et al.*, 2006). Um mapa

molecular de referência em alface foi construído utilizando RILs (*Recombinant inbred lines*) derivadas da população de mapeamento *L. sativa* cv. ‘Salinas’ x *L. serriola* ‘UC96US23’ (Truco *et al.*, 2007). Este mapa foi construído utilizando mais de 700 marcadores AFLP e SSR e, posteriormente, um mapa genético ultradenso foi gerado com aproximadamente 14.000 loci baseados em sequências transcritas por um chip de *microarray* (Michelmore *et al.*, 2010; Stoffel *et al.*, 2012; Truco *et al.*, 2013). O chip contém sequências para detectar polimorfismos em aproximadamente 35.000 unigenes e, com isso, facilita a análise de alto rendimento, a massiva genotipagem e a análise de expressão de genes de alface (Stoffel *et al.*, 2012). Aproximadamente 45.000 genes modelos foram preditos em *Scaffolds* (Michelmore *et al.*, 2010; Reynes-Chin Wo *et al.*, 2012) que está atribuído ao mapa de referência utilizando a tecnologia *genotyping-by-sequencing* (GBS) (Elshire *et al.*, 2011). Sequências do genoma da alface foram liberadas publicamente em 2012. As mais completas e recentes informações sobre o projeto do genoma da alface, utilizando uma variedade de recursos genéticos e genômicos, estão disponíveis como uma parte do *Compositae Genome Project* (CGP), no website <http://cgpdb.ucdavis.edu>. Uma população de mapeamento entre o cruzamento de *L. sativa* ‘Salinas 88’ x *L. sativa* ‘La Brillhante’ utilizando a metodologia GBS também desenvolveu mais de 1000 marcadores SNPs em alface e foram utilizados para a construção de um novo e articulado mapa de ligação (Truong *et al.*, 2012). Da mesma forma foi construído um mapa de referência por McHale *et al.* (2009) e Christopoulou *et al.* (2015a,b) contendo 36 *loci* associados a fenótipos de resistência e 20 QTLs para dez patógenos e um para insetos. Os fatores de resistência mapeados em alface foram para os seguintes patógenos/doenças: míldio (Downy mildew, causada por *Bremia lactucae* Regel), corky root (*Sphingomonas suberifaciens*, formerly *Rhizomonas suberifaciens*), Lettuce Dieback, causada pelo complexo viral *Tomato bushy stunt virus* – TBSV e *Lettuce necrotic stunt virus* – LNSV, outras viroses [mosaico (*Lettuce mosaic virus*-LMV) e *Turnip mosaic virus* – TuMv)],

root downy mildew causado por *Plasmopara lactucae-radidis* (Stang. & Gilbn), oídio (*Golovinomyces cichoraceatum sensu stricto* – formerly *Erysiphe cichoracearum* DC), big-vein (*Mirafiori lettuce big-vein virus* – MLBVV), antracnose (*Microdochium panattonianum* (Berl.)), podridão de esclerotínia (*Sclerotinia minor* Jagger e *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary) mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Brown) Dye), murcha de verticílio (*Verticillium dahliae* Kleb) e murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Lista de genes de resistência e QTLs (*Quantitative trait loci*) localizados nos diferentes grupos de ligação (Linkage Groups – LG) disponíveis nos mapas de ligação da alface (*Lactuca sativa* L.).

Doença	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7	LG8	LG9
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm5/8</i>	<i>Dm1</i>	<i>Dm13</i>	<i>Dm4</i>			<i>qDM7.1</i>		<i>qDMR9.1</i>
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm10</i>	<i>Dm2</i>		<i>Dm7</i>			<i>qDMR7.1</i>		<i>qDMR9.2</i>
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm17</i>	<i>Dm3</i>		<i>Dm11</i>					<i>qDMR9.3</i>
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm25</i>	<i>Dm6</i>		<i>Dm24</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm36</i>	<i>Dm14</i>		<i>Dm38</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm37</i>	<i>Dm15</i>		<i>Dm44</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm43</i>	<i>Dm16</i>		<i>Dm48</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>Dm45</i>	<i>Dm18</i>		<i>Dm49</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>RBQ2</i>	<i>Dm50</i>		<i>qDM4.1</i>					
Míldio (Downy mildew)	<i>qDMR1.1</i>	<i>qDMR2.2</i>							
Míldio (Downy mildew)		<i>qDM2.1</i>							
Root aphid resistance		<i>Ra</i>							
Corky root			<i>Cor</i>						
Lettuce mosaic virus	<i>Mo-2</i>			<i>mo-1</i>					
Lettuce dieback		<i>Tvr1</i>							
Murcha de verticílio					<i>qVRT</i>			<i>qVRT</i>	<i>Vr1</i>
Turnip mosaic virus	<i>Tu</i>								
Root downy mildew	<i>Ptr</i>								
Oídio (Powdery mildew)	<i>pm-1.1</i>	<i>pm-2.1</i>					<i>pm-7.1</i>		
Oídio (Powdery mildew)		<i>pm-2.2</i>							
Big-vein (MLBVV)			<i>BV1</i>	<i>BV2</i>	<i>BV4</i>	<i>BV5</i>			
Big-vein (MLBVV)				<i>BV3</i>					
Murcha de Fusário	<i>qFUS1.1</i>	<i>FUS2</i>		<i>qFUS4.1</i>			<i>FUS3</i>	<i>qFUS8.1</i>	
Murcha de Fusário	<i>qFUS1.2</i>	<i>RRD2</i>							
Antracnose		<i>qANT1</i>						<i>ANT3</i>	
Mancha Bacteriana		<i>Xar1 e Xcvr</i>							
Hypersensitive bacterial	<i>AvrB</i>							<i>AvrPpic</i>	
Hypersensitive bacterial	<i>AvRpt2</i>							<i>AvrRps4</i>	
Hypersensitive bacterial	<i>AvrRpm1</i>							<i>AvrPo</i>	

A localização dos genes de resistência foi compilada a partir de artigos científicos, livros e capítulos de livros, Dissertações, Teses e relatórios de pesquisa.

18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAMA, H.A.; EIZENGA, G.C. & YAN, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Molecular Breeding* 19:341–356.
- ALMEIDA, D. 2006. Asteráceas. Manual de Culturas Hortícolas-Volume II. Editorial Presença. Lisboa. p.156–158.
- ANSARI, A. M. 2015. Molecular markers in vegetable improvement. *Horticultural Biotechnology Research* 1: 5–10.
- ARUGA, D.; TSUCHIYA, N.; MATSUMURA, H.; MATSUMOTO, E. & HAYASHIDA, N. 2012. Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* 187:1–9.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229–241.
- ARYA, P.; KUMAR, G.; ACHARYA, V. & SINGH, A. K. 2014. Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae. *Plos One* 9:e107987.
- ATKINSON, L.D.; MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; HILTON, H.W.; LYNN, J.; SCHUT, J.W.; MICHELMORE, R.W.; HAND, P. & PINK, D.A. 2013. An intra-specific linkage map of lettuce (*Lactuca sativa*) and genetic analysis of postharvest discolouration traits. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2737–2752.
- BAE, J.; HALTERMAN, D. & JANSKY, H. 2008. Development of a molecular marker associated with *Verticillium* wilt resistance in diploid interspecific hybrids. *Molecular Breeding* 22:61–69.
- BASTEN, C. J.; WEIR, B.S. & ZENG, Z.B. 2001. QTL Cartographer: A Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. Program in Statistical Genetics. Bioinformatics Research Center, Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- BECRAFT, P.W. 2002. Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 18:163–192.
- BENDAHMANE, A.; KANYUKA, K. & BAULCOMBE, D.C. 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11:781–792.

- BENT, A.F. 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* 8:1757–1771.
- BENTLEY, D.R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H.P.; SMITH, G.P.; MILTON, J.; BROWN, C.G.; HALL, K.P.; EVERS, D.J.; BARNES, C.L.; BIGNELL, H.R. *et al.* 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53–59.
- BHATTRAMAKKI, D.; DOLAN, M. HANAFEY, M.; WINELAND, R.; VASKE, D.; REGISTER III, J.C.; TINGEY, S.V. & RAFALSKI, A. 2002. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Molecular Biology* 48: 539–547.
- BLANCARD, D.; LOT, H. & MAISONNEUVE, B. 2006. *A Colour Atlas of Diseases of Lettuce and Related Salad Crops. Observation, Biology and Control.* Manson Publishing Ltd. Academic Press. London, UK.
- BLEECKER, A.B. & KENDE, H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16:1–18.
- BOLAND, J. F.; CHUNG, C.C.; ROBERSON, D.; MITCHELL, J.; ZHANG, X.; IM, K. M.; HE, J.; CHANOCK, S.J.; YEAGER, M. & DEAN, M. 2013. The new sequencer on the block: comparison of Life Technology's Proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing. *Human genetics* 132:1153–1163.
- BOLLER, T. & FELIX, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379–406.
- BOLSER, D.M.; KERHORNOU, A.; WALTS, B. & KERSEY, P. 2015. Triticeae resources in Ensembl Plants. *Plant and Cell Physiology* 56:e3.
- BOYD, L.A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E. & LEUNG, H. 2013. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genetics* 29:233–240.
- CABRAL, C.S. 2012. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos de alface resistentes. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.
- CABRAL, C.S. & REIS, A. 2013. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1. *Tropical Plant Pathology* 38:272–281.

- CABRAL, C.S.; BRUNELLI, K.R.; COSTA, H.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. & REIS, A. 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39:197–202.
- CARNEIRO, M. S. & VIEIRA, M. L. C. 2002. Mapas genéticos em plantas. *Bragantia* 61: 89–100.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904–909.
- CHANDRA-NAYAKA, S.; UDAYA SHANNKAR, A.C.; NIRANJANA, S.R.; REDDY, M.S. & PRAKASH, H.S. 2010. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India. *World Journal Microbiology Biotechnology* 26:71–78.
- CHRISTOPOULOU, M.; McHALE, L.K.; KOZIK, A.; REYES-CHIN WO, S.; WROBLEWSKI, T. & MICHELMORE, R.W. 2015a. Dissection of two complex clusters of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:751–765.
- CHRISTOPOULOU, M.; WO, S.R.C.; KOZIK, A.; McHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; WROBLEWSKI, T. & MICHELMORE, R.W. 2015b. Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 5: 2655–2669.
- CLARK, S.E.; WILLIAMS, R.W. & MEYEROWITZ, E.M. 1997. The CLAVATA 1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89:575–585.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B. & PANG, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- COLLARD, B.C.Y. & MACKILL, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:557–572.
- CRAIG, D.W.; PEARSON, J.V.; SZELINGER, S.; SEKAR, A.; REDMAN, M.; CORNEVEAUX, J.J.; PAWLOWSKI, T.L.; LAUB, T.; NUNN, G. STEPHAN, D.A.; HOMER, N. & HUENTELMAN, M.J. 2008. Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing. *Nature Methods* 5:887–893.
- CRUTE, I.R. & JOHNSON, A.G. 1976. The genetic relationship between races of *Bremia lactucae* and cultivars of *Lactuca sativa*. *Annals of Applied Biology* 83:125–137.

- CRUZ, C. D. 2005. Princípios de genética quantitativa. UFV. Viçosa, MG.
- D'ANDREA, L.; FELBER, F. & GUADAGNUOLO, R. 2008. Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. *Environmental Biosafety Research* 7:61–71.
- DANGL, J.L.; HORVATH, D.M. & STASKAWICZ, B.J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:746–751.
- DAVEY, J.W.; HOHENLOHE, P.A.; ETTER, P.D.; BOONE, J.Q.; CATCHEN, J.M. & BLAXTER, M.L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12:499–510.
- DELLA VECCHIA, P.T.; KOCH, P.S.; KIKUCHI, M. 1999. Vera: nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. *Horticultura Brasileira* 17:171.
- DESCHAMPS, S.; LLACA, V. & MAY, G.D. 2012. Genotyping-by-sequencing in plants. *Biology* 1:460–483.
- DIXON, M.S.; JONES, D.A.; KEDDIE, J.S.; THOMAS, C.M.; HARRISON, K. & JONES, J.D. 1996. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451–459.
- DIXON, M.S.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, D.A.; HARRISON, K. & JONES, J. 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.
- ELLIS, P.; MCCLEMENT, S.; SAW, P.; PHELPS, K.; VICE, W.; KIFT, N.; ASTLEY, D. & PINK, D. 2002. Identification of sources of resistance in lettuce to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. *Euphytica* 125:305–315.
- ELSHIRE, R.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S. & MITCHELL, S.E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos One* 6:e19379.
- FALEIRO, F.B. 2007. Marcadores Genético-Moleculares Aplicados a Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF.
- FARRARA, B.F.; ILOTT, T.W. & MICHELMORE, R.W. 1987. Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology* 36: 499–514.

- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3ª edição. Embrapa. Brasília-DF.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2008. Asteráceas. Alface e outras folhosas. *In*: Filgueira, F.A.R. (ed.). Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças. 3ª ed. revista e ampliada. UFV. Viçosa. p. 300–306.
- FLOR, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275–296.
- FRADIN, E.F.; ZHANG, Z.; JUAREZ AYALA, J.C.; CASTROVERDE, C.D.; NAZAR, R.N.; ROBB, J.; LIU, CM. & THOMMA, B.P. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. *Plant Physiology* 150:320–332.
- FRAVEL, D.; OLIVAIN, C. & ALABOUVETTE, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157:493–502.
- FREDERICK, R. D.; THILMONY, R. L.; SESSA, G. & MARTIN, G. B. 1998. Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Molecular cell* 2:241–245.
- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2001. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root rot of crisp head lettuce. *Journal of General Plant Pathology* 67:205–206.
- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2003. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *Journal of General Plant Pathology* 69:23–28.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G. & GIULLINO, M.L. 2002. First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe. *Plant Disease* 86:1052.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G. & GULLINO, M.L. 2004a. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Phytoparasitica* 32:61–65.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G. & GULLINO, M.L. 2004b. Varietal resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Crop Protection* 23:845.
- GILARDI, G.; FRANCO ORTEGA, S.; RIJSWICK, P. C. J.; ORTU, G.; GULLINO, M. L. & GARIBALDI, A. 2016. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology*.

- GOHRE, V. & ROBATZEK, S. 2008. Breaking the barriers. microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Reviews of Phytopathology* 46:189–215.
- GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R.D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N. & ROKHSAR, D.S. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40:D1178–D1186.
- GORDON, T.R., & KOIKE, S.T. 2015. Management of Fusarium wilt of lettuce. *Crop Protection* 73:45–49.
- GORE, M.A.; WRIGHT, M.H.; ERSOZ, E.S.; BOUFFARD, P.; SZEKERES, E.S.; JARVIE, T.P.; HURWITZ, B.L.; NARECHANIA, A.; HARKINS, T.T.; GRILLS, G.S.; WARE, D.H. & BUCKLER, E.S. 2009. Large-scale discovery of gene-enriched SNPs. *The Plant Genome* 2:121–133.
- GRANT, J. J. & LOAKE, G. J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*. 124:21–30.
- GRATTAPAGLIA, D.; SILVA-JUNIOR, O.B. KIRST, M.; de LIMA, B.M.; FARIA, D.A. & PAPPAS, G.J. 2011. High-throughput SNP genotyping in the highly heterozygous genome of *Eucalyptus*: assay success, polymorphism and transferability across species. *BMC Plant Biology* 11:65.
- GUMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V. & SOUZA JR, C.L. 2006. Marcadores moleculares no Melhoramento de Plantas. *In*: Borém, A; Caixeta, E.T. Marcadores Moleculares. UFV. Viçosa, MG.
- GUO, Y. L.; FITZ, J.; SCHNEEBERGER, K.; OSSOWSKI, S.; CAO, J. & WEIGEL, D. 2011. Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157:757–769.
- GURURANI, M.A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C.P. & NOOKARAJU, A. 2012. Plant disease resistance genes: current and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78:51–65.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575–607.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & PARKER, J.E. 2003. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177–193.

- HAMMOND-KOSACK, K.E. & KANYUKA, K. 2007. Resistance genes (R genes) in plants. eLS.
- HAYES, R.J.; MCHALE, L.K.; VALLAD, G.E.; TRUCO, M.J.; MICHELMORE, R.W.; KLOSTERMAN, S.J.; MARUTHACHALAM, K. & SUBBARAO, K.V. 2011. The inheritance of resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *Theoretical and Applied Genetics* 123:509–517.
- HE, J.; ZHAO, X.; LAROCHE, A.; LU, Z.X.; LIU, H. & LI, Z. 2014. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science* 5:484.
- HEATH, M.C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion Plant Biology* 3:315–319.
- HENZ, G.P. & SUINAGA, F. 2009. Tipos de alfaces cultivadas no Brasil. (Comunicado Técnico Número 75). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. 7pp.
- HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; VOS, P.; KESSELI, R. & MICHELMORE, R.W. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1202–1210.
- HOLT III, F.B., HUBERT, D. A. & DANGL, J.L. 2003. Resistance gene signaling in plants complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 15:20–25.
- HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J. & VICK, B.A. 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica* 144:225–235.
- HUA-VAN, A.; DAVIÈRE, J. M.; KAPER, F.; LANGIN, T. & DABOUSSI, M.J. 2000. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Current Genetics* 37:339–576.
- HUANG, J.H. & LO, C.T. 1998. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 7:150–153.
- HUBBARD, J.C. & GERIK, J.S. 1993. A new disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum forma specialis* nov. *Plant Disease* 77:750–754.
- HULBERT, S.H. & MICHELMORE, R.W. 1985. Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 70:520–528.

- ILOTT, T. W.; DURGAN, M. E. & MICHELMORE, R. W. 1987. Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Phytopathology* 77:1381–1386.
- INNOCENTI, G.; ROBERTI, R. & PIATTONI, F. 2015. Biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* strain T22 against Fusarium wilt disease on water-stressed lettuce plants. *BioControl*. 60:573–581.
- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K. & KAKIMOTO, T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060–1063.
- JANSEN, R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205–211.
- JANSKY, S.; ROUSE, D.I. & KAUTH, P.J. 2004. Inheritance of resistance to *Verticillium dahliae* in diploid interspecific potato hybrids. *Plant Disease* 88:1075–1078
- JEUKEN, M.; VAN WIJK, R.; PELEMAN, J. & LINDHOUT, P. 2001. An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* × *L. saligna* F₂ populations. *Theoretical and Applied Genetics* 103:638–647.
- JIANG, G.L. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields* 45–83.
- JIN, H.; COMINELLI, E.; BAILEY, P.; PARR, A.; MEHRTENS, F.; JONES, J.; TONELLI, C.; WEISSHAAR, B. & MARTIN, C. 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 19:6150–6161.
- JOHNSON, W.C.; JACKSON, L.E.; OCHOA, O.; VAN WIJK, R.; PELEMAN, J., CLAIR, D. S. & MICHELMORE, R.W. 2000. Lettuce, a shallow-rooted crop, and *Lactuca serriola*, its wild progenitor, differ at QTL determining root architecture and deep soil water exploitation. *Theoretical and Applied Genetics* 101:1066–1073.
- JONES, J.D. & DANGL, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- KANAZIN, V.; MAREK, L.F. & SHOEMAKER, R.C. 1996. Resistance genes analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:11746–11750.
- KANDEL, R. 2015. Identification of QTLs for *Liriomyza trifolii* resistance and two agronomic traits in lettuce. Doctoral dissertation. UNIVERSITY OF FLORIDA.

- KAO, CH.; ZENG, ZB. & TEASDALE, R.D. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152:1203–1216.
- KESSELI, R.V. & MICHELMORE, R.W. 1986. Genetic variation and phylogenies detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. *Journal of Heredity* 77:324–331.
- KESSELI, R.V.; OCHOA, O. & MICHELMORE, R.W. 1991. Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome* 34:430–436.
- KESSELI, R.V.; PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1994. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics* 136:1435–1446.
- KOHLER, A.; RINALDI, C.; DUPLESSIS, S.; BAUCHER, M.; GEELEN, D.; DUCHAUSSOY, F.; MEYERS, B.C.; BOERJAN, W. & MARTIN, F. 2008. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant molecular biology* 66:619–636.
- KRÜGER, J.; THOMAS, C.M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M.S.; SMOKER, M.; TANG, S.K.; MULDER, L. & JONES, J.D.G. 2002. A tomato cysteine protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* 296:744–747.
- KUANG, H.; WOO, S.S.; MEYERS, B.C.; NEVO, E. & MICHELMORE, R.W. 2004. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell* 16:2870–2894.
- KUANG, H.; VAN ECK, H.J.; SICARD, D.; MICHELMORE, R.W. & NEVO, E. 2008. Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its RGC2 resistance gene cluster. *Genetics* 178:1547–1558.
- KWON, S.; SIMKO, I.; HELLIER, B.; MOU, B. & HU, J. 2013. Genome-wide association of 10 horticultural traits with expressed sequence tag-derived SNP markers in a collection of lettuce lines. *The Crop Journal* 1:25–33.
- LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185–199.
- LEBEDA, A.; KŘÍSTKOVÁ, E.; KITNER, M.; MIESLEROVÁ, B.; JEMELKOVÁ, M. & PINK, D. A. 2014. Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology* 138:597–640.
- LI, J.M. & CHORY, J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929–938.

- LIEVENS, B.; REP, M; THOMMA, B.P.H.J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64:781–788.
- LIN, Y.H.; LAI, P.J.; CHANG, T.H.; WAN, Y.L.; HUANG, J.W.; HUANG, J.H. & CHANG, P.F.L. 2014. Genetic diversity and identification of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Taiwan. *European Journal of Plant Pathology* 140:721–733.
- LIU, B.H. 1998. *Statistical Genomics*. CRC. New York.
- 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.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A. & REIS, A. 2010. *Doenças da Alface*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Brasília-DF.
- LYNCH, M. & WALSH, B. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates. Sunderland.
- MACKEY, D.; HOLT III, B. F.; WIIG, A. E. & DANGL, J. 2002. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743–754.
- MAISONNEUVE, B.; BELLEC, Y.; ANDERSON, P. & MICHELMORE, R.W. 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* 89:96–104.
- MALBRÁN, I.; MOURELOS, C.A.; MITIDIERI, M.S.; RONCO, B.L. & LORI, GA. 2014. Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Argentina. *Plant disease* 98:1281.
- MARATHE, R & DINESH-KUMAR, S.P. 2003. Plant defense: one post, multiple guards? *Molecular Cell* 11:284–286.
- MATHERON, M.E. & KOIKE, S.T. 2003. First report of Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Arizona. *Plant Disease* 87:1265.
- MATHERON, ME.; MCCREIGHT, J.D.; TICKES, B.R. & PORCHAS, M. 2005. Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of Fusarium wilt of lettuce in desert production fields. *Plant Disease* 89:565–570.

- MATHERON, M.E. & PORCHAS, M. 2010. Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for *Fusarium* wilt of lettuce. *Plant Disease* 94:1323–1328.
- MATHERON, M.E. 2015. Biology and management of *Fusarium* wilt of lettuce.
- MATIOLI, S.R. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. *In*: Matioli S.R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. Ribeirão Preto-SP, Brasil.
- MATUO, T. & MOTOHASHI, S. 1967. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n.f. causing root of lettuce. *Transactions of Mycological Society of Japan* 8:13–15.
- MBOFUNG, G.Y.; HONG, S.G. & PRYOR, B.M. 2007. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Mycology* 97:87–98.
- MBOFUNG, G.Y. & PRYOR, B.M. 2010. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. *Plant Disease* 94:860–866.
- MCCOUCH, S.R. & DOERGE, R.W. 1995. QTL mapping in rice. *Trends in Genetics* 11:482–487.
- MCCREIGHT, J.D.; MATHERON, M.E.; TICKES, B.R. & PLANTTS, B. 2005. *Fusarium* wilt race 1 on lettuce. *HortScience* 40:529–531.
- MCHALE, L.K. 2008. Global analysis of disease resistance genes in lettuce. Ph.D. diss., University of California, Davis, CA, USA.
- MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; KOZIK, A.; LAVELLE, DO.; OCHOA, O.E.; WROBLEWSKI, T.; KNAPP, S.J. & MICHELMORE, R.W. 2009. The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 118:565–580.
- MEYERS, B.C.; CHIN, D.B.; SHEN, K.A.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; LAVELLE, D.O.; ZHANG, Z. & MICHELMORE, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817–1832.
- MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H. & MICHELMORE, R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809–834.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in

specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 9828–9832.

MICHELMORE, R.W. & MEYERS, B.C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 8:1113–1130.

MICHELMORE, R.W.; OCHOA, O. & WONG, J. 2009. *Bremia lactucae* and lettuce downy mildew. In: Lamour, K. & Kamoun, S. Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Plant and Animal Interactions, and Toolbox. (eds.). John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, U.S.A. p.241–262.

MICHELMORE, R.W. 2010. Genetic variation in lettuce. California leafy greens research program, [calgreens.org/control/uploads/Micheltmore_Variation_report_2009-2010_final_\(2\)1.pdf](http://calgreens.org/control/uploads/Micheltmore_Variation_report_2009-2010_final_(2)1.pdf)

MICHELMORE, R.W.; CHRISTOPOULOU, M. & CALDWELL, K.S. 2013. Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual Review Phytopathology* 51:291–319.

MILACH, S.C.K. 1998. Marcadores de DNA. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 5:14–17.

MILLANI, M.J.; EREBARIAN, H.R. & ALIZADEH, A. 1999. Occurrence of Fusarium wilt of lettuce in Shahr- Ray, Varamim and Karaj areas. *Journal of Plant Pathology* 35:121.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R. & SASAKI, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87–103.

MONDRAGON-PALOMINO, M. & GAUT, B.S. 2005. Gene conversion and the evolution of three leucine-rich repeat gene families in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* 22: 2444–2456.

MORGANTE, M; OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatélites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3:175–182.

MORENO-V´AZQUEZ, S.; OCHOA, O.E.; FABER, N.; CHAO, S.; JACOBS, J.M.E.; MAISONNEUVE, B.; KESSELI, R.V. & MICHELMORE, R.W. 2003. SNP-based codominant markers for a recessive gene conferring resistance to corky root rot (*Rhizomonas suberifaciens*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genome* 46:1059–1069.

- MOU, B. 2008. Lettuce. *In*: Prohens, J.; Nuez, F. & Carena, M.J. (eds.). Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Springer. New York. p.75–116.
- NIEWOHNER, J.; SALAMINI, F. & GEBHARDT, C. 1995. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst-nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Molecular Breeding* 1: 65–78.
- NIKAIDO, A.M.; UJINO, T.; IWATA, H.; YOSHIMURA, K.; YOSHIMURA, H.; SUYAMA, Y.; MURAI, M.; NAGASAKA, K. & TSUMURA, Y. 2000. AFLP and CAPS: linkage maps of *Crytomeria japonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 825–831.
- NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B.F. & DANGL, J.L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37:579–609.
- NOMURA, K.; MELOTTO, M.; & HE, S. Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8:361–368.
- NORDBERG, H.; CANTOR, M.; DUSHEYKO, S.; HUA, S.; POLIAKOV, A.; SHABALOV, I.; SMIRNOVA, T.; GRIGORIEV, IV. & DUBCHAK, I. 2014. The genome portal of the department of energy joint genome institute: updates. *Nucleic Acids Research* 42:D26–D31.
- NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLINGM, B. & PIATER, L. 2004. *Immunological Reviews* 198:249–266.
- OERKE, E.C. & DEHNE, H.W. 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 23:275–285.
- OGISO, H.; FUJINAGA, M.; SAITO, H.; TAKEHARA, T. & YAMANAKA, S. 2002. Physiological races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp *lactucae* isolated from crisphead lettuce in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 68:292–299.
- OLIVEIRA, M.D.L.S.; FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO, L.D.F.H. & LOURENÇO, V.V. 2006. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.) e tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará. *Higiene alimentar* 20: 96–100.
- PARRA, L.; MAISONNEUVE, B.; LEBEDA, A.; SCHUT, J.; CHRISTOPOULOU, M.; JEUKEN, M.; MCHALE, L.; TRUCO, M.J.; CRUTE, I. & MICHELMORE, R. 2016. Rationalization of genes for resistance to *Bremia lactucae* in lettuce. *Euphytica* 1–18.

- PASQUALI, M.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce: vegetative compatibility and RAPD analysis. *Phytopathology* 53:73–75.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2005. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Disease* 89:237–240.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* 97:987–996.
- PATERSON, A.H. 1996. Making genetic maps. In: Paterson, A.H. (ed.). *Genome Mapping in Plants*. R.G. Landes Company. Austin, Texas. p. 23–39.
- PELEMAN, J.D.; ROUPPE, VAN DER. VOORT, J.R. 2003. The challenges in marker assisted breeding. In: van Hintum THJL.; Lebeda, A.; Pink, D. & Schut, J.W. (eds.). *Eucarpia Leafy Vegetables*. CGN. Noorwijkerhout. The Netherlands. p. 125–130.
- PERAZA-ECHEVERRIA, S.; JAMES-KAY, A.; CANTO-CANCHÉ, B. & CASTILLO-CASTRO, E. 2007. Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 443–453.
- PINTO, M.D.S.T.; RIBEIRO, J.M., & DE OLIVEIRA, E.A.G. 2011. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Revista Brasileira de Biociências* 9.
- PORTER, B.; PAIDI, M.; MING, R.; ALAM, M.; NISHIJIMA, W.T. & ZHU, Y.J. 2009. Genome wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. *Molecular Genetics and Genomics* 281:609–626.
- QUAIL, M.A.; SMITH, M.; COUPLAND, P.; OTTO, T.D.; HARRIS, S.R.; CONNOR, T.R. BERTONI, A.; SWERDLOW, H. & GU, Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13: 341.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. & PINTO, C.A.B. 2008. *Genética na Agropecuária*. 4 ed. UFLA. Lavras, MG.
- RAUSCHER, G. & SIMKO, I. 2013. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biology* 13:11.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. 2003. [Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens.] *Fitopatologia Brasileira* 28:123–130.

- REYNES-CHIN-WO, S.; WANG, Z.; BEITEL, C.; KOZIK, A.; CHI, S.; CHEN, W.; TRUCO, M.J.; XU, X.; FROENICKE, L.; LAVELLE, D.; YANG, B.; KORF, I.; WANG, J. & MICHELMORE, R.W. 2012. Lettuce genome update. Plant & Animal Genome XX, San Diego, CA, USA, W188.
- RICHLY, E.; KURTH, J. & LEISTER, D. 2002. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* Evolution. Molecular Biology and Evolution 19:76–84.
- ROTHBERG, J.M.; HINZ, W.; REARICK, T.M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J.H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M.J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J.F.; MARRAN, D.; MYERS, J.W.; DAVIDSON, J.F.; BRANTING, A.; NOBILE, J.R.; PUC, B.P.; LIGHT, D.; CLARK, T.A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J.T.; STONER, I.B.; CAWLEY, S.E. & LYONS, M. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475: 348–352.
- RYDER, E.J. 1999. Lettuce, Endive and Chicory. CABI Publishing. New York.
- SAKIYAMA, N.S. 1993. Marcadores moleculares e as hortaliças. Horticultura Brasileira 11: 204–206.
- SALA, F.C. & COSTA, C.P. 2012. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. Horticultura Brasileira 30: 187–194.
- SALA, F.C. & NASCIMENTO, W.M. 2014. Produção de sementes de alface. In: Nascimento, W.M. (ed.). Produção de Sementes de Hortaliças. Embrapa. Brasília, DF.
- SALA, F.C. & COSTA, C.P. 2016. Melhoramento de alface. In: Nick, C. & Bórem, A. Melhoramento de Hortaliças. (eds.). UFV. Viçosa, MG.
- SCHEEL, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. Current Opinion in Plant Biology 1:305–310.
- SCHMID, K. J.; SORENSEN, T. R.; STRACKE, R.; TORJEK, O.; ALTMANN, T.; MICHELL-OLDS, T. & WEISSHAAR. 2003. Large-scale identification and analysis of genome wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. Genome Research 13:1250–1257.
- SCHULTZ, J.; COPLEY, R.R.; DOERK, T.; PONTING, C.P. & BORK, P. 2000. SMART: A web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Research 28:231–234.

- SCHUSTER, I. & CRUZ, C.D. 2004. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. UFV. Viçosa, MG.
- SCHWESSINGER, B. & ZIPFEL, C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11:389–395.
- SCOTT, J.C.; KIRKPATRICK, S.C. & GORDON, T.R. 2010. Variation in susceptibility of lettuce cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Pathology* 59:139–146.
- SCOTT, J.C.; GORDON, T.R.; KIRKPATRICK, S.C.; KOIKE, S.T.; MATHERON, M.E.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J. & MICHELMORE, R.W. 2012. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from Fusarium wilt in lettuce. *California Agriculture* 66:20–24.
- SEKHWAL, M.K.; LI, P.; LAM, I.; WANG, X.; CLOUTIER, S. & YOU, F.M. 2015. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 16:19248–19290.
- SHAO, Z.Q.; ZHANG, Y.M.; HANG, Y.Y.; XUE, J.Y.; ZHOU, G.C.; WU, P.; WU, X.Y.; WU, X.Z.; WANG, Q. & CHEN, J.Q. 2014. Long-term evolution of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes: understanding gained from and beyond the legume family. *Plant Physiology* 166:217–234.
- SHEN, K.A.; CHIN, D.B.; ARROYO-GARCIA, R.; OCHOA, O.E.; LAVELLE, D.O.; WROBLEWSKI, T.; MEYERES, B.C & MICHELMORE, R.W. 2002. Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:251–261.
- SHIU, S.H.; BLECKER, A.B. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:10763–10768.
- SILVA, E.C.; MALUF, W.R.; LEAL, N.R. & GOMES, L.A.A. 1999. Inheritance of bolting tendency in lettuce *Lactuca sativa* L. *Euphytica* 109:1–7.
- SILVA, V. D.; BEZERRA NETO, F.; NEGREIROS, M.D. & PEDROSA, J.F. 2000. Comportamento de cultivares de alface em diferentes espaçamentos sob temperatura e luminosidade elevadas. *Horticultura Brasileira* 18:183–187.
- SILVA, E.C. 2009. Anita: cultivar de alface de verão para cultivo protegido no solo e em hidroponia. *Horticultura Brasileira* 27: 260–262.

- SIMKO, I.; JANSKY, S.; STEPHENSON, S. & SPOONER, D. 2007. Genetics of resistance to pests and disease. *In*: Vreugdenhil, D.; Bradshaw, J.; Gebhardt, C.; Govers, F.; Taylor, M.; MacKerron, D. & Ross, H. (eds.). *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Elsevier.Oxford, UK. p. 117–155.
- SIMKO, I. 2009. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100: 256–262.
- SIMKO, I.; PECHENICK, D.A.; MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; OCHOA, O.E.; MICHELMORE, R.W. & SCHEFFLER, B.E. 2010. Development of molecular markers for marker-assisted selection of dieback disease resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). *Acta Horticulture* 859: 401.
- SIMKO, I. 2013. Marker-assisted selection for disease resistance in lettuce. *Translational Genomics for Crop Breeding* 1:267–289.
- SIMKO, I.; HAYES, R. J.; MOU, B. & MCCREIGHT, J.D. 2014. Lettuce and spinach. *Yield Gains in Major US Field Crops*: 53-86.
- SOUSA, M.V.; MACHADO, J.D.C.; SIMMONS, H.E. & MUNKVOLD, G.P. 2015. Real- time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. *Plant Pathology* 64: 478-488.
- SRINIVASAN K.; GILARDI G.; SPADARO D.; POLI A.; GULLINO ML. & GARIBALDI, A. 2010. Molecular characterization through IGS sequencing of formae speciales of *Fusarium oxysporum* pathogenic on lamb's lettuce. *Phytopathologia Mediterranea* 49:309–320.
- STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G. & JONES, J.D. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661–667.
- STOFFEL, K.; VAN LEEUWEN, H.; KOZIK, A.; CALDWELL, D.; ASHRAFI, H.; CUI, X.; TAN, X.; HILL, T.; REYES-CHIN-WO, S.; TRUCO, M.J.; MICHELMORE, R.W. & VAN DEYNZE, A. 2012. Development and application of a 6.5 million feature Affymetrix Genechip[®] for massively parallel discovery of single position polymorphisms in lettuce (*Lactuca* spp.). *BMC Genomics* 13: 185.
- STUDART. M.T. 2001. Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, Brasil.
- SYED, N.; SØRENSEN, A.P.; ANTONISE, R.; VAN DE WIEL, C.C.M.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN'T WESTENDE, W.P.C.; HOOFTMAN, D.A.P.; NIJS DEN, H.C.M. & FLAVELL, A. 2006. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112:517–527.

- TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y. & MARTIN, G.B. 1996. Initiation of Plant disease resistance by physical interaction of AvrPo and Pto kinase. *Science* 274:2160–2063.
- TANKSLEY, S.D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. 1988. Molecular mapping of plant chromosomes. *In: Gustafson, J.P. & Appels, R. (Eds.). Chromosome Structure and Function.* Springer. New York. p. 157–173.
- TANKSLEY, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review Genetics* 27: 205–233.
- THUDI, M.; LI, Y.; JACKSON, S.A.; MAY, G.D. & VARSHNEY, R.K. 2012. Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. *Briefings in Functional Genomics* 11:3–11.
- TRUCO, M.J.; ANTONISE, R.; LAVELLE, D.; OCHOA, O.; KOZIK, A.; WITSENBOER, H.; FORT, S.B.; JEUKEN, M.J.W.; KESSELI, R.V.; LINDHOUT, P.; MICHELMORE, R.W. & PELEMAN, J. 2007. A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 115:735–746.
- TRUCO, M.J.; ASHRAFI, H.; KOZIK, A.; LEEUWEN, H.V.; BOWERS, J.; CHIN WO, S.R.; STOFFEL, K.; XU, H.; HILL, T.; DEYNZE, A.V. & MICHELMORE, R.W. 2013. An ultra-high-density, transcript-based, genetic map of lettuce. *G3. Genes/genome/genetics* 3: 617–631.
- TRUONG, H.T.; RAMOS, A.M.; YALCIN, F.; DE RUITER, M.; VAN DER POEL, H.J.A.; HUVENAARS, K.H.J.; HOGERS, R.C.J.; VAN ENCKEVORT, L.J.G.; JANSSEN, A.; VAN ORSOUW, N.J. & VAN EIJK, M.J.T. 2012. Sequence-based genotyping for marker discovery and codominant scoring in germplasm and populations. *Plos One* 7:e37565.
- TSUCHIYA, N.; YOSHIDA, K.; USUI, T. & TSUKADA, M. 2004. Resistance tests and genetic resources for breeding Fusarium root rot resistant lettuce. *Journal Japan Society Horticultural Science* 73:105–113.
- VAN DE WIEL, C.; ARENS, P. & VOSMAN, B. 1999. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome* 42:139–149.
- VAN DER VOSSEN, E.A.; VAN DER VOORT, J.N.; KANYUKA, K.; BENDAHMANE, A.; SANDBRINK, H.; BAULCOMBE, D.C.; BAKKER, J.; STIEKEMA, W.J. & KLEIN-LANKHORST, R.M. 2000. Homologues of a single resistance gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal* 23:567–576.
- VENTURA, J.A. & COSTA, H. 2008. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espirito Santo, Brazil. *Plant Disease* 92: 976.

- WAYCOTT, W.; FORT, S.B.; RYDER, E.J. & MICHELMORE, R.W. 1999. Mapping morphological genes relative to molecular markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Heredity* 82:245–251.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reseach* 18: 6531–6535.
- WITSENBOER, H.; MICHELMORE, R.W.; & VOGEL, J. 1997. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome* 40: 923–936.
- WUFF, E.G.; SORENSEN, J.S.; LUBECK, M.; NIELSEN, K.F.; THARANE, U. & TORP, J. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: Ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology* 12: 649–657.
- XIAO, S.; ELLWOOD, S.; CALIS, O.; PATRICK, E.; LI, T.; COLEMAN, M. & TURNER, J. G. 2001. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* 291:118–120.
- XIAO, S.Y.; BROWN, S.; PATRICK, E.; BREARLEY, C. & TURNER, J.G. 2003. Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes RPW8.1 and RPW8.2 via a salicylic acid-dependent amplification circuit is required for hypersensitive cell death. *Plant Cell* 15:33–45.
- YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M. & SHIRAKAWA, T. 2001. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 67:288–290.
- YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M. & SHIRAKAWA, T. 2004. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70:308–313.
- YANG, Y.; SHAH, J. & KLESSIG, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development* 11:1621–1639.
- YOON, B.J. 2009. Hidden markov models and their applications in biological sequence analysis. *Current Genomics* 10:402–415.
- YOUNG, N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34:479–501.

- YU, Y.G.; BUSS, G.R. & SAGHAI-MAROOF, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:11751–11756.
- ZENG, Z.B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping of quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 90:10972–10976.
- ZENG, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:492-496.
- ZHANG, R.Z.; MURAT, F.; PONT, C.; LANGIN, T. & SALSE, J. 2014. Paleo evolutionary plasticity of plant disease resistance genes. *BMC Genomics* 15:187.
- ZHAO, K.; TUNG, C.; EIZENGA, G.; WRIGHT, M.; ALI, M.; PRICE, A.; NORTON, G.; ISLAM, M.; REYNOLDS, A.; MEZEY, J.; MCCLUNG, A.; BUSTAMANTE, C. & MCCOUCH, S. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communications* 2:467.
- ZHOU, T.; WANG, Y.; CHEN, J.Q.; ARAKI, H.; JING, Z. JIANG, K.; SHEN, J. & TIAN, D. 2004. *Molecular Genetics and Genomics* 271:402–415.
- ZHU, Y.; QIAN, W. & HUA, J. 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *Plos Pathogens* 6:e1000844.

CAPÍTULO 2

Herança da resistência à murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1) na cultivar de alface ‘Vanda’

Herança da resistência à murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1) na cultivar de alface ‘Vanda’

RESUMO

A murcha de fusário (causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* – FOLAC) é uma das principais doenças da alface em regiões tropicais e subtropicais. Devido às dificuldades de controle químico e cultural da murcha de fusário, a estratégia de controle mais eficiente e economicamente viável é o emprego de cultivares com resistência genética. Até o presente momento, apenas a raça 1 de FOLAC foi implicada com a murcha de fusário da alface no Brasil. Fontes de resistência genética contra a raça 1 de FOLAC foram identificadas, sendo a cultivar ‘Vanda’ (do grupo varietal ‘crespa’) um dos materiais mais promissores. No entanto, ainda não existem estudos determinando o controle genético dessa resistência. A identificação de plantas híbridas resultantes de cruzamentos controlados é um dos grandes problemas enfrentados no melhoramento genético da alface. O sistema de marcadores RAPD-SCAR é uma ferramenta simples e bastante utilizada em sistemas de identificação de cultivares (*fingerpriting*) em diversas culturas, incluindo a alface. Três marcadores RAPD-SCAR foram desenvolvidos (SCARB11-10, SCARW15-3 e SCAR17-1) capazes de distinguir plantas híbridas, demonstrando ser uma metodologia confiável e eficaz. Estudos de herança foram realizados utilizando as linhagens parentais, plantas híbridas F₁ genotipadas e as populações segregantes (F₂ e famílias F₃)

derivadas do cruzamento ‘Gizele’ x ‘Vanda’. Plantas foram inoculadas via *root-dipping* com uma suspensão ajustada 3×10^6 microconídios/mL. A reação ao isolado de FOLAC raça 1 foi avaliada usando uma escala de notas variando de 1 (= sem sintomas) até 5 (= planta morta). Os resultados sugerem que a resistência a FOLAC raça 1 é determinada por um *locus* (monogênico) dominante, com efeitos de dosagem e penetrância incompleta. Esses dados experimentais estão em contraste com prévios estudos com isolados de FOLAC raça 1 onde herança recessiva e/ou controle poligênico foram reportados. O fato da herança da resistência na cultivar ‘Vanda’ ser relativamente simples, faz dessa cultivar um promissor germoplasma para uso em programas de melhoramento da alface visando incorporar resistência a FOLAC raça 1 nos diferentes segmentos varietais.

Palavras chave: Resistência, controle genético, penetrância, melhoramento.

ABSTRACT

Fusarium wilt (caused by fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* –FOLAC) is one of the main diseases of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in tropical and subtropical regions. Due to the problems of implementing effective cultural and chemical control of fusarium wilt, the most effective and economically viable strategy to control this disease has been the use of cultivars with genetic resistance. So far, only FOLAC race 1 isolates have been reported causing fusarium wilt of lettuce under Brazilian conditions. Sources resistance have been identified to FOLAC race 1 isolates with the variety Vanda (varietal group loose leaf) being one of the most promising materials. However, there is so far still no study determining the genetic control of this resistance. The identification of bona fide hybrid plants resulting from controlled crosses is one of the major challenges in lettuce breeding programs. RAPD-SCAR marker system is a simple and widely used tool in fingerprinting systems in several crops, including lettuce. Three developed RAPD-SCAR markers (SCARB11-10, SCARW15-3, and SCAR17-1) were capable of distinguishing hybrid plants between the contrasting genotypes Gizele (susceptible) and Vanda. Inheritance studies were carried out using the parental lines, genotyped F₁ hybrid plants, and segregating populations (F₂ and F₃ families) derived from the cross Gizele \times Vanda. Plants were inoculated via root dipping technique with a conidial suspension adjusted to 3×10^6 microconidia/mL. Reaction to one FOLAC race 1 isolate was evaluated using a disease rating scale ranging from 1 (= no symptoms) to 5 (= dead plant). The studies indicated a simple genetic control of FOLAC

race resistance in cultivar Vanda, with segregation results indicating a single gene locus with a likely combination of dosage effects and incomplete penetrance. These experimental data are in contrast to previous studies with FOLAC race 1 isolates that reported recessive inheritance and/or polygenic control. The relatively simple genetic control of FOLAC race 1 resistance in Vanda makes this variety a promising germplasm for use in lettuce breeding programs aiming to incorporate this trait in a wide array of elite lines and variety groups.

Keywords: Resistance, genetic control, penetrance, breeding, crop improvement.

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais importante no Brasil, possuindo expressiva importância social e econômica, sendo cultivada tanto em campo aberto quanto em sistemas protegidos e hidropônicos. No Brasil, o segmento varietal ‘Crespa’ é o mais importante em termos de área cultivada e volume de produção, correspondendo a aproximadamente 60% do mercado (Sala & Costa, 2012, 2016). O segmento varietal ‘Americana’ ocupa aproximadamente 25% do mercado e o grupo varietal ‘Lisa’ e os demais segmentos (‘Mimosa’, ‘Romana’ e ‘Roxa’/‘Vermelha’) representam em torno de 15% do total cultivado (Sala & Costa, 2012, 2016).

No Brasil, as doenças causadas por fungos habitantes do solo são fatores limitantes para o cultivo da alface especialmente devido às práticas empregadas na cultura tais como o uso intensivo das áreas com cultivos sucessivos (Lopes *et al.*, 2010). A murcha de fusário ou fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) é uma das principais doenças da alface em regiões tropicais e subtropicais. A variabilidade patogênica de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* foi agrupada em quatro raças (1, 2, 3 & 4) de acordo com a reação de cultivares diferenciadoras de alface (Fujinaga *et al.*, 2003; Gilardi *et al.*, 2016). A raça 1 do patógeno apresenta a mais ampla distribuição geográfica, sendo registrada nos seguintes países: Japão (Matuo & Motohashi, 1967), Estados Unidos (Hubbard & Gerik, 1993; McCreight *et al.*, 2005), Taiwan (Huang & Lo, 1998), Irã (Millani *et al.*, 1999), Portugal (Pasquali *et al.*, 2007) e Itália (Pasquali *et al.*, 2005, 2007). O Japão é o único país onde foi relatada a presença de três raças (1, 2 & 3) em plantios comerciais de alface (Fujinaga *et al.*, 2001, 2003; Yamauchi

et al., 2004). Mais recentemente, uma nova raça (= raça 4) foi reportada ocorrendo na Holanda (**Gilardi *et al.*, 2016**).

No Brasil, a murcha de fusário foi relatada inicialmente no Estado do Espírito Santo por **Ventura & Costa (2008)** e, posteriormente, em outros Estados da região Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e na região Sul do Brasil (Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul) (**Cabral *et al.*, 2012**). Até o presente momento, apenas isolados de FOLAC raça 1 foram relatados em associação com a doença no Brasil (**Cabral *et al.*, 2014**).

Devido às dificuldades de controle químico e cultural de FOLAC (**Davis *et al.*, 2006**; **Lopes *et al.*, 2010**; **Matheron *et al.*, 2010**; **Matheron, 2015**), a medida de controle mais eficiente e economicamente viável para o produtor é o uso de cultivares com resistência genética. Fontes de resistência genética de amplo espectro (i.e. efetiva contra diferentes variantes do patógeno) e com estabilidade fenotípica foram identificadas e podem ser empregadas em programas de melhoramento com objetivo de produzir cultivares de alface com resistência a isolados de FOLAC (**Tsuchiya *et al.*, 2004**; **Scott *et al.*, 2010**; **Cabral & Reis, 2013**).

A genética de resistência contra distintos isolados de FOLAC é descrita como qualitativa ou quantitativa. Estudos de herança e o desenvolvimento de mapas genéticos para esse patógeno foram relatados utilizando populações de alface oriundas dos Estados Unidos e Japão. Os resultados indicam que a resistência para isolados da raça 2 é controlada por um gene dominante, enquanto a resposta para isolados da raça 1 é controlada quantitativamente por múltiplos fatores genéticos (**McCreight *et al.*, 2005**; **Aruga *et al.*, 2012**; **Truco *et al.*, comunicação pessoal**).

Fontes de resistência genética contra isolados brasileiros da raça 1 também foram identificadas, sendo a cultivar ‘Vanda’ (do grupo varietal ‘crespa’) um dos materiais mais promissores (**Cabral & Reis, 2013**). No entanto, ainda não existem estudos determinando o

controle genético dessa resistência quanto ao número de genes envolvidos e suas relações alélicas (dominância /recessividade).

Um problema prático enfrentado pelos programas de melhoramento genético de alface é a enorme dificuldade de identificação de plantas híbridas resultantes de cruzamentos controlados. Essa dificuldade é intensificada pela natureza autógama (cleistogâmica) da alface, que dificulta a obtenção segura de híbridos, mesmo envolvendo cruzamentos controlados, quando níveis consideráveis de autofecundação ainda podem ocorrer (**Sala & Nascimento, 2014**). Nos cruzamentos intervarietais, quando os pais são fenotipicamente distintos, os descritores morfológicos são suficientes na identificação de plantas híbridas, (embora possam ser majoritariamente aplicados apenas em plantas adultas). Entretanto, quando os pais são fenotipicamente muito semelhantes, como nos cruzamentos entre acessos de um mesmo grupo varietal e/ou morfo-agronômico, há problemas para correta identificação de plantas híbridas usando apenas descritores morfológicos. Nesse aspecto, os marcadores moleculares são ferramentas poderosas para a identificação segura e precoce de plantas híbridas obtidas a partir de cruzamentos controlados (**Silva et al., 2005**). Os marcadores moleculares (além de acessarem diretamente o genótipo da planta e não sofrerem influência do ambiente) podem ser analisados a partir de amostras de qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento. Essas características tornam os marcadores moleculares muito mais vantajosos quando comparados com análises conduzidas via descritores morfológicos.

Os marcadores derivados dos sistemas RAPD-SCAR são uma ferramenta simples e bastante utilizada em sistemas de identificação de cultivares (*fingerpriting*) em diversas culturas, incluindo a alface (**Dziechciarkova et al., 2004**). Neste contexto, visando dar suporte aos programas de melhoramento de alface, o presente trabalho teve como objetivos: desenvolver marcadores para identificação de plantas híbridas entre os dois parentais contrastantes para

resistência ao fungo e estudar a herança da resistência a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* na cultivar ‘Vanda’.

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO

2.1. Objetivos Gerais

- Caracterização da genética da resistência a um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 em populações segregantes obtidas a partir de cruzamentos entre um parental suscetível ‘Gizele’ (comercializada no Brasil pela empresa TopSeed) e um parental resistente ‘Vanda’ (Empresa Sakata Seed Sudamerica).
- Desenvolver marcadores moleculares derivados dos sistemas RAPD-SCAR capazes de identificar plantas híbridas resultantes do cruzamento intravarietal do segmento alface ‘Crespa’ entre as cultivares ‘Gizele’ e ‘Vanda’.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a herança genética associada com a resistência a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* na cultivar ‘Vanda’
- Determinar as relações alélicas dos fatores de resistência (i.e. dominância ou recessividade)
- Investigar a ocorrência de outros fatores genéticos e outros tipos de ação gênica associados com a expressão fenotípica da resistência (ex. presença de penetrância e de efeitos de dosagem gênica).

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Cruzamentos entre parentais contrastantes para resposta a isolados FOLAC raça 1 e desenvolvimento de populações segregantes para estudos de herança da resistência –

Foram realizados cruzamentos entre o parental suscetível (PS) ‘Gizele’ e o parental resistente (PR) ‘Vanda’, que foi usado exclusivamente como progenitor masculino (= doador de pólen). As duas cultivares utilizadas como parentais são do segmento varietal do tipo ‘Crespa’. As sementes resultantes dos cruzamentos (geração F₁) foram semeadas em bandejas e as plantas individuais produzidas foram autofecundadas, para constituir a geração F₂. Progênes F₃ foram obtidas a partir da autofecundação de plantas individuais da geração F₂. Os parentais contrastantes, os indivíduos F₁ genotipados (ver descrição abaixo) e as populações, F₂ e F₃ foram utilizadas para o estudo de herança.

3.2. Extração de DNA genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes – O DNA foi extraído individualmente de cada planta das linhagens parentais e de indivíduos das populações segregantes de acordo com a metodologia de CTAB 2X, com a incorporação de algumas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). As amostras das folhas foram trituradas em cadinho de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos contendo 750 µL de CTAB 2X, colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos. Após esta etapa, 750 µL de clorofil foram acrescentados em cada tubo e o conteúdo final foi agitado em vortex por aproximadamente 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas por 9.000 rpm durante 5 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga e 600 µL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 µL de isopropanol gelado e para homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual. Os tubos foram posteriormente centrifugados a 12.000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* foi lavado, com álcool 70%. Os tubos foram colocados na estufa a 37°C por 20 minutos, depois foram acrescentados 50 µL de TE+RNAse e os tubos foram então acondicionados em uma geladeira. No dia seguinte, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs purificados foram guardados (-20°C) em freezer. As quantificações

de DNA foram feitas usando o espectrofotômetro (NanoDrop[®]). Posteriormente, o DNA foi purificado usando o kit Power Clean[®] Pro DNA Clean-up, seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante (MO BIO Laboratories-Carlsbad, CA, USA). Essa etapa foi empregada porque foi verificada a presença de inibidores da PCR na maioria das amostras.

3.3. Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de plantas híbridas no cruzamento ‘Gizele’ x ‘Vanda’ com uma coleção de primers RAPD – Um total de 520 primers RAPD (série Operon OPA-01 até OPZ-20, Operon Technologies, Alameda, Califórnia, EUA) foi avaliado na busca por polimorfismos entre indivíduos contrastantes, no parental suscetível (‘Gizele’) e no parental resistente (‘Vanda’). Duas cultivares de alface do segmento varietal americana (‘Laurel’ e ‘Raider’), também foram incluídas (como padrões) nessas análises. As amostras de DNA quantificadas foram diluídas com TE+RNAse para uma concentração de 50 ng/μL e utilizadas nas reações de RAPD. A reação foi composta de 2 μL de DNA genômico (50 ng/μL), 1,25 μL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 μL de MgCl₂ (50mM), 0,5 μL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5u/μL), 2 μL de primer, 5,95 μL de H₂O Milli-Q com volume total de 12,5 μL. As amplificações foram efetuadas em um termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos foi de um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 30 seg para a desnaturação, 36°C por 1 min para anelamento, e 72°C por 2 min para extensão, o ciclo final constituiu-se 68° por 10 min e 4°C por tempo indeterminado (∞). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se o marcador 1 Kb Plus DNALadder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

3.4. Validação com amostras dos parentais e da população F₁ de marcadores RAPD-SCAR – A seleção de marcadores moleculares capazes de identificar plantas híbridas entre

‘Gizele’ e ‘Vanda’ foi conduzida em três etapas. Na primeira etapa, *primers* capazes de gerar amplicons polimórficos entre os dois parentais contrastantes foram selecionados para confirmação de sua estabilidade. Na segunda etapa, amplicons selecionados foram removidos do gel de agarose, purificados, clonados e sequenciados, com a finalidade de desenhar novos primers do tipo *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR), mais específicos. Para a purificação das bandas foi utilizado o Kit Invitrogen PureLink™[®] (*Quick Gel Extraction Kit*[®]), seguindo as recomendações preconizadas pelo fabricante. Os novos *primers* desenhados foram validados nos parentais e em 30 indivíduos potencialmente representando plantas híbridas (F₁). No estudo de validação dos marcadores que foram polimórficos entre os parentais, as amplificações foram realizadas em duplicatas para confirmar a estabilidade dos resultados.

3.5. Desenvolvimento de marcadores do tipo *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) – Para a clonagem de amplicons polimórficos foi utilizado o protocolo pGEM-T Easy Vector Systems[®] (Promega). A ligação foi feita adicionando a microtubos: 0,5 µL do vetor pGEM-T Easy[®]; 5 µL do tampão; 1 µL ligase (T4 DNA); 0,5 µL de água Milli-Q e 3 µL do produto de PCR (bandas purificadas), com volume total de 10 µL de ligação. As reações foram incubadas a 4°C overnight. Após esse período foram adicionados 50 µL de células competentes (JM 109 High Efficiency Competent Cells, Promega) a 2 µL da reação de ligação, incubando-os em gelo por 20 minutos. O choque térmico foi dado retirando os tubos do gelo e colocando em banho-maria a exatamente 42°C por 45 segundos. Imediatamente os tubos foram retirados e acondicionados em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 950 µL de meio LB líquido. As transformações foram incubadas (durante 1 hora e 30 minutos a 37°C) em condições de constante agitação. 100 µL de cada suspensão de bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB + ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. A confirmação e seleção das bactérias transformadas foram feitas via PCR utilizando os

iniciadores de síntese do vetor M13 (M13 *reverse* e *forward*). O DNA foi extraído das colônias selecionadas para sequenciamento dos produtos de PCR clonados (miniprep), utilizando os mesmos *primers* universais do vetor M13.

3.6. Sequenciamento dos amplicons clonados – O sequenciamento dos amplicons clonados foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 pertencente ao Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças (CNPQ), utilizando o Kit ABI Prism BigDye[®] version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil) e os iniciadores de síntese do vetor M13 (M13 *reverse* e *forward*). A análise da qualidade das sequências, remoção dos segmentos de baixa qualidade (Alex, 1999) e a obtenção das sequências consenso foram realizadas usando o programa SeqMan[®] (Lasergene, Madison, Wisconsin-WI). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank, empregando algoritmo BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

3.7. Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação dos potenciais marcadores do tipo *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) – Pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa PrimerSelect[®] (Lasergene, Madison, Wisconsin-WI), utilizando as sequências originais dos primers RAPD com o acréscimo de 5-10 bases de acordo com as informações obtidas via sequenciamento. Os três pares *primers* (*forward* – F / *reverse* – R) do tipo SCAR desenhados foram os seguintes:

- 1 **B11-10-F** (5'-AGA-CCC-GTT-ACT-ACT-GGA-AGG-AA-3')
- B11-10-R** (5'-ACC-CGT-CCC-CGG-TAT-GAT-GAT-TCC-3')

- 2 **W15-3-F** (5'-CGG-AAC-GAC-GGA-AAT-G-3')
- W15-3-R** (5'-CAC-CGG-AAC-CAC-ACC-3')

- 3 **A17-1-F** (5'-GACCGCTTGTCAGCA-3')
- A17-1-R** (5'-GACCGCTTGTTGGGGTT-3')

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2 µL de DNA genômico (50 ng/µL), em volume final de 12,5 µL, contendo 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL), 0,3 µL de cada *primer* SCAR, 7,35 µL de H₂O Milli-Q. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos foi de um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 1 min para a desnaturação, 61°C por 1 min para anelamento e 72°C por 2 min para extensão, o ciclo final constituiu-se 72°C por 7 min e uma etapa final de 4°C ∞. As condições de PCR foram otimizadas em termos de temperatura de anelamento para cada primer utilizado. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se o marcador 1 Kb Plus DNALadder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

3.8. Caracterização fenotípica das linhagens parentais, híbridos F₁ e populações segregantes para resposta a resistência um isolado de FOLAC raça 1 – Plantas dos parentais PR (30 plantas) e PS (30 plantas) e das populações F₁ (30 plantas); F₂ (82 plantas) e F₃ (719 plantas) foram inoculadas com isolado CMM-3577 (Fus-209) da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (pertencente a coleção de fungos fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF e também depositado na coleção da “Professora Maria Menezes-Recife, Pernambuco”) (Cabral & Reis, 2013). Para estimar os genótipos dos indivíduos F₂, entre 9 e 16 plantas das diferentes progênies F₃ foram avaliadas. O isolado do fungo foi cultivado em meio de cultura BDA-t (BDA adicionado de 50 ppm de tetraciclina) por cinco dias. A suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração de 3 x 10⁶ microconídios/mL. Para produção das mudas, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor, preenchidas com substrato esterilizado (Plantmax[®]). Mudas com 30 dias após o semeio foram removidas das células e as raízes lavadas em água corrente, visando eliminar o substrato aderido às raízes. As porções apicais das raízes (aproximadamente 2

cm) foram cortadas com o auxílio de uma tesoura esterilizada e mergulhadas (por três minutos) em 50 mL da suspensão de esporos. Em seguida as mudas foram transplantadas para vasos de 2 L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada e esterilizada. Posteriormente foram adicionados no colo de cada plântula 3 mL da suspensão de conídios. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura do ar variando entre 25 e 35°C e fotoperíodo de 12 horas e turnos de rega regulares (um pela manhã e outro no final da tarde). A irrigação foi suprimida no dia da inoculação visando evitar perda do inóculo por lixiviação.

3.9. Avaliação da resposta dos materiais genéticos de alface ao isolado de FOLAC raça 1 e análises dos padrões de segregação para resistência – A avaliação foi efetuada aos 20 dias após a inoculação usando uma escala de notas, adaptada de Santos (1996), variando de 1 a 5, sendo a nota **1** = plantas sem sintomas; nota **2** = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; nota **3** = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; nota **4** = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; nota **5** = plantas mortas. As plantas foram classificadas (com base nas notas recebidas) como resistentes ($R \leq 2$) ou suscetíveis ($S > 2$). O padrão de segregação de indivíduos resistentes e suscetíveis foi observado para cada uma das gerações/populações e a adequação a razões mendelianas foi conduzida utilizando o teste do qui-quadrado (Schuster & Cruz, 2004; Ramalho *et al.*, 2008).

3.10. Validação dos marcadores moleculares entre os parentais contrastantes – Os marcadores moleculares gerados pelos diferentes primers RAPD e SCAR foram analisados quanto à presença de bandas (amplicons) polimórficas entre os dois parentais contrastantes. Foi observada a presença ou ausência de bandas informativas (marcadores dominantes) ou a presença de bandas com variação no tamanho (sugerindo a presença de INDELS – inserções e/ou

deleções). Foram consideradas bandas informativas somente aquelas com alta intensidade e estabilidade.

3.11. Emprego da estratégia de *Bulked segregant analysis* (BSA) para verificar potencial ligação com o(s) fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 dos marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes – Foram estabelecidos dois grupos (*bulks*) de DNA extraído de sete genótipos resistentes e sete indivíduos suscetíveis da geração F₂ como descrito por **Michelmores *et al.* (1991)**. A confirmação da presença de polimorfismos entre os dois *bulks* foi feita com marcadores RAPD e SCAR polimórficos descritos anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de plantas híbridas entre ‘Gizele’ e ‘Vanda’ – Foi utilizado em uma triagem inicial um total de 512 iniciadores RAPD (**Figura 2-1**). Destes, apenas 13 (OPA-01, OPA-17, OPB-03, OPB-11, OPC-04, OPL-12, OPK-03, OPO-17, OPS-01, OPS-08, OPT-14, OPS-06 e OPW-15) foram selecionados por se apresentarem polimórficos. Análises adicionais indicaram que somente três desses marcadores apresentavam polimorfismos estáveis com o DNA genômico extraído dos dois parentais contrastantes para FOLAC raça 1 (‘Gizele’ e ‘Vanda’). Esses três iniciadores RAPD que mantiveram a estabilidade dos amplicons polimórficos foram convertidos para três marcadores do tipo SCAR (códigos: SCARB11-10, SCARW15-3 e SCAR17-1). Análises adicionais confirmaram que estes marcadores SCAR permitem uma inequívoca distinção de plantas híbridas versus plantas autofecundadas (**Figura 2-2**).

4.2. Padrão de segregação de resistência para FOLAC raça 1 – A severidade de doença das progênes F₂ e F₃ derivadas do cruzamento entre uma cultivar resistente e uma suscetível foi utilizada para entender os fatores de resistência para FOLAC raça 1. O padrão de resistência entre

os parentais foi relatado anteriormente por **Cabral et al. (2013)**. O parental ‘Vanda’ apresentou 100% de plantas resistentes e a geração F₁ apresentou 83,33% das plantas com resposta do tipo resistente. O parental ‘Gizele’ apresentou 100% de plantas mortas. A severidade da doença na progênie de 82 indivíduos da população F₂ foi distribuída da seguinte forma: 13 plantas, nota 5.0; e 69 plantas, nota 1 e/ou 2. De acordo com distribuição da taxa da severidade da doença, observou-se um padrão de segregação na geração F₂ com um bom ajuste à proporção 3:1 (resistente vs. suscetível) de acordo com o teste do qui-quadrado (χ^2) ($p > 0,05$), já que o valor calculado foi maior que o tabelado com grau de liberdade (GL) de 1 e probabilidade (P) de 0,05 (**Tabela 2-1**).

Tabela 2-1. Análise das respostas de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) a um isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 nas gerações F₁ e F₂ obtidas do cruzamento entre os parentais ‘Gizele’ (susceptível) x ‘Vanda’ (resistente) e ajuste dos dados dos padrões de segregação para um modelo de 3:1 de acordo o teste de do qui-quadrado (χ^2).

Parentais e gerações		Número de plantas avaliadas			Padrão esperado (R:S)	χ^2 tabelado	χ^2 calculado
		Total	Plantas R	Plantas S			
‘Gizele’	P ₁	30	0	30	1:00	-	-
‘Vanda’	P ₂	30	30	0	0:01	-	-
P ₁ x P ₂	F ₁	30	25	5	1:00	-	-
F ₁ x F ₁	F ₂	82	69	13	3:01	3,84	3,65*

* Valor encontrado para GL=1 e P=0,05.

Devido ao fato do isolado de FOLAC raça 1 induzir a morte das plantas F₂ suscetíveis, apenas indivíduos resistentes (ou potenciais escapes) puderam gerar progênies F₃. Para progênies F₃ oriundas apenas de indivíduos resistentes, observou-se 1/3 das progênies obtidas de indivíduos homocigotos RR (\approx 23 famílias) e 2/3 de indivíduos heterocigotos Rr (\approx 46 famílias).

4.3. Bulked segregant analysis (BSA) para verificar potencial ligação com o(s) fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 dos marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes – Todos os três iniciadores que mantiveram a estabilidade dos amplicons polimórficos (SCARB11-10, SCARW15-3 e SCARA17-1) foram avaliados com DNA de dois grupos (*bulks*) (Michelmore *et al.*, 1991). No entanto, nenhum desses marcadores mostrou-se estar em ligação com o fenótipo de resistência.

5. DISCUSSÃO

Para a identificação de híbridos entre as cultivares ‘Gizele’ e ‘Vanda’, foi utilizado, em uma triagem inicial, um total de 512 iniciadores RAPD. Destes, apenas 13 foram selecionados por se apresentarem polimórficos e, após exaustivas análises, somente três destes confirmaram os polimorfismos entre os parentais contrastantes para FOLAC raça 1. A diversidade genética de alface cultivada em nível molecular foi investigada por vários grupos de pesquisa com diferentes sistemas de marcadores com resultados variáveis em termos dos níveis de polimorfismos observados (Kesseli & Michelmore 1986; Kesseli *et al.* 1991; Hu *et al.*, 2005; Simko, 2009; van Treuren & van Hintum, 2009). A quantidade relativamente baixa de polimorfismos obtidos no presente estudo se deve, provavelmente, ao fato de que a espécie *L. sativa* tem uma base genética estreita (Kesseli & Michelmore, 1986; Kesseli *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 2005; Simko, 2009; van Treuren & van Hintum, 2009) que foi agravado ainda mais pelo fato de que os dois parentais contrastantes serem pertencentes a um mesmo grupo varietal ou morfo-agronômico. Apesar de todas as limitações, amplicons polimórficos estáveis foram identificados entre os parentais contrastantes e apenas plantas genotipadas como híbridas foram utilizadas no estudo subsequente de herança da resistência. Como esperado, os indivíduos F₁ empregados para a

obtenção das populações F₂ segregantes apresentaram um alelo (= banda ou amplicon) oriundo do parental resistente e outro alelo oriundo do parental suscetível (**Figura 2-2**).

Na cultura da alface, há uma dificuldade inerente na identificação segura e precoce dos híbridos, pois algumas plantas da progênie podem ser originadas de autofecundação da planta mãe, reforçando a importância do uso de marcadores como ferramenta auxiliar para o trabalho dos melhoristas e geneticistas. O emprego de marcadores moleculares com uma alternativa viável para confirmação dos cruzamentos em alface foi relatado por vários autores. Segundo **D'Andrea et al. (2008)** a obtenção de híbridos de alface resultantes de cruzamentos interespecíficos foi confirmada pela análise de bandas informativas utilizando o primer específico RAPD (OPT-06). Da mesma forma, **Uwimana et al. (2012a,b)** identificaram híbridos de alface resultantes do cruzamento interespecífico entre *L. sativa* e *L. serriola*, por meio de marcadores SSR.

Os genitores contrastantes para a resposta a isolados de FOLAC raça 1 foram escolhidos em virtude do seu potencial agrônomico e também características de interesse, visando obter populações segregantes com maior frequência de indivíduos com alta produtividade, ciclo precoce, adaptação às condições tropicais de cultivo, rusticidade e resistência a doenças. Os três marcadores SCAR desenvolvidos para distinguir plantas híbridas mostraram-se excelentes ferramentas para verificar a ocorrência da hibridização, demonstrando ser uma metodologia confiável e eficaz, que permite sua utilização em estágios iniciais do desenvolvimento das supostas plantas híbridas. A estratégia de *bulked segregant analysis* (BSA) é frequentemente utilizada no melhoramento genético da alface para identificar marcadores associados com fenótipos contrastantes (**Michelmore et al., 1991**). No entanto, no presente trabalho, apesar dos marcadores obtidos distinguiram de maneira estável os parentais contrastantes, nenhum deles mostrou uma forte ligação com o fenótipo de resistência a FOLAC raça 1.

Nas condições experimentais descritas no presente trabalho, as plantas foram submetidas a um método de inoculação drástico que consistiu de uma imersão do sistema radicular uma suspensão com alta concentração de esporos (3×10^6 microconídios/mL) após injúria mecânica (cortes com tesoura aproximadamente 2 cm acima da extremidade da raiz). Além disso, para acompanhamento do desenvolvimento dos sintomas, as plantas foram expostas a temperaturas do ar variando entre 25 °C a 35 °C. Essas condições experimentais podem ter contribuído para aumentar a frequência de plantas suscetíveis, inibindo a plena expressão do(s) fator(es) de resistência. De fato, em sistemas de seleção de plantas resistentes quando a inoculação com o patógeno é requerida, a expressão dos genes alvos é altamente variável as condições ambientais (**Jiang, 2013**). A temperatura, por exemplo, é conhecida por modular a expressão da resistência em diferentes interações entre patógenos – hospedeiros. Temperaturas do solo e do ar elevadas podem, muitas vezes, inibir a expressão da resistência ou intensificar reações de suscetibilidade (**Schoeneweiss, 1975**). No entanto, a base genética e molecular da sensibilidade à temperatura dos genes R é ainda pouco caracterizada (**Zhu et al., 2010**). Por exemplo, plantas de *Arabidopsis* se mostraram mais suscetíveis à *Pseudomas syringae* pv. *tomato* a 28 °C do que a 22 °C (**Wang et al., 2009**). A resistência ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) conferida pelo gene *N* em acessos de fumo é eficaz a 22°C, mas não se expressa a 30 °C (**Whitham et al., 1996**). Resistência aos nematóides das galhas conferida pelo gene *Mi* em tomate é inativada em temperaturas de solo acima de 28°C (**Hwang et al., 2000**).

O fenômeno genético de resistência ‘parcial’ devido aos fenômenos de semi-dominância e penetrância incompleta (i.e. percentagem de indivíduos de uma população com um dado genótipo que expressa o fenótipo correspondente) também parece estar envolvido no patossistema alface – FOLAC raça 1. Proporções variáveis de plantas doentes foram encontradas em progênes F₃ de plantas F₂ caracterizadas como resistentes. A penetrância é afetada, entre outros fatores, pela

interação entre genótipo do hospedeiro, isolado do patógeno, concentração do inóculo, idade das mudas e temperatura do solo e do ar. Com uma tendência geral, um aumento na concentração (pressão) do inóculo também induz uma redução nos níveis de penetrância, ou seja, um aumento na incidência de plantas expressando sintomas da doença.

Outro ponto a ser investigado é o efeito de dosagem do(s) fator(es) de resistência presentes na cultivar ‘Vanda’. Neste cenário, plantas heterozigotas (i.e. com apenas uma dose do fator de resistência) se mostraram mais sensíveis aos isolados de FOLAC raça 1 quando comparadas com plantas homozigotas. O efeito de dosagem gênica já foi evidenciado em estudos realizados no patossistema *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate (Alon *et al.*, 1974).

Estudos de herança genética da resistência à raça 2 de FOLAC em alface também foram realizados e um gene semi-dominante (denominado *RRD2*) foi caracterizado controlando essa característica (Aruga *et al.*, 2012). Neste trabalho, um mapa de ligação foi construído utilizando plantas F₂ do cruzamento entre ‘VP1013’ e ‘Patriot’ e o *locus RRD2* foi caracterizado. O *locus RRD2* está posicionado entre os marcadores WF11-12 e WF09-23 no grupo de ligação 2, enquanto o marcador WF25-42 foi intimamente associado com alelos de suscetibilidade. Aruga *et al.* (2012) assumiram que a resistência a raça 2 de FOLAC apresentava um controle mediado pela ação de um único *locus* semi-dominante, pois as taxas de segregação esperadas para marcadores dominantes para uma população F₂ foram na proporção esperada 1:2:1 (resistente: intermediário: suscetível). No entanto, os autores sugerem a presença de efeitos associados com loci menores que também podem contribuir para algumas modificações no padrão de segregação.

McCreight *et al.* (2005) identificaram fontes de resistência a isolados norte-americanos de FOLAC raça 1 nas cultivares ‘Salinas’, ‘Salinas 88’ e ‘Costa Rica No.4’. Por sua vez, a cultivar ‘Vanguard’ se mostrou altamente suscetível. Análises dos padrões de segregação em populações F₁ e F₂ indicaram que a herança da resistência em ‘Salinas’ e ‘Costa Rica No.4’ é

predominantemente controlada por múltiplos fatores recessivos. A resistência contra FOLAC raça 1 foi mapeada em duas populações. Na população derivada do cruzamento [(‘Valmaine’ x ‘Salinas 88’) x ‘Salinas’] foram detectados quatro QTLs de resistência nos grupos de ligação LG1, LG2 e LG7. Os alelos de resistência localizados nos grupos de ligação LG1 e LG2 foram originados da cultivar ‘Valmaine’, enquanto o alelo presente no LG7 foi originado da cultivar ‘Salinas’ (**Michelmore *et al.*, 2010**). Por sua vez, quatro QTLs associados com a resistência nos grupos de ligação LgG1, LG4 e LG8 foram detectados na análise de 112 indivíduos F₂ derivados do cruzamento entre ‘Red Tide’ x ‘Lolla Rosa’ (**Truco *et al.*, comunicação pessoal**). Esses dados de experimentos prévios com isolados de FOLAC raça 1 indicando a presença de distintos fatores em todas as fontes de resistência estudadas até o presente momento estão em contraste com os obtidos no cruzamento entre ‘Gizele’ x ‘Vanda’. Além disso, é importante realçar o fato da herança da resistência na cultivar ‘Vanda’ ser primariamente determinada por um *locus* dominante monogênico, característica que faz dessa cultivar um promissor germoplasma para uso em programas de melhoramento da alface visando resistência a isolados de FOLAC raça 1.

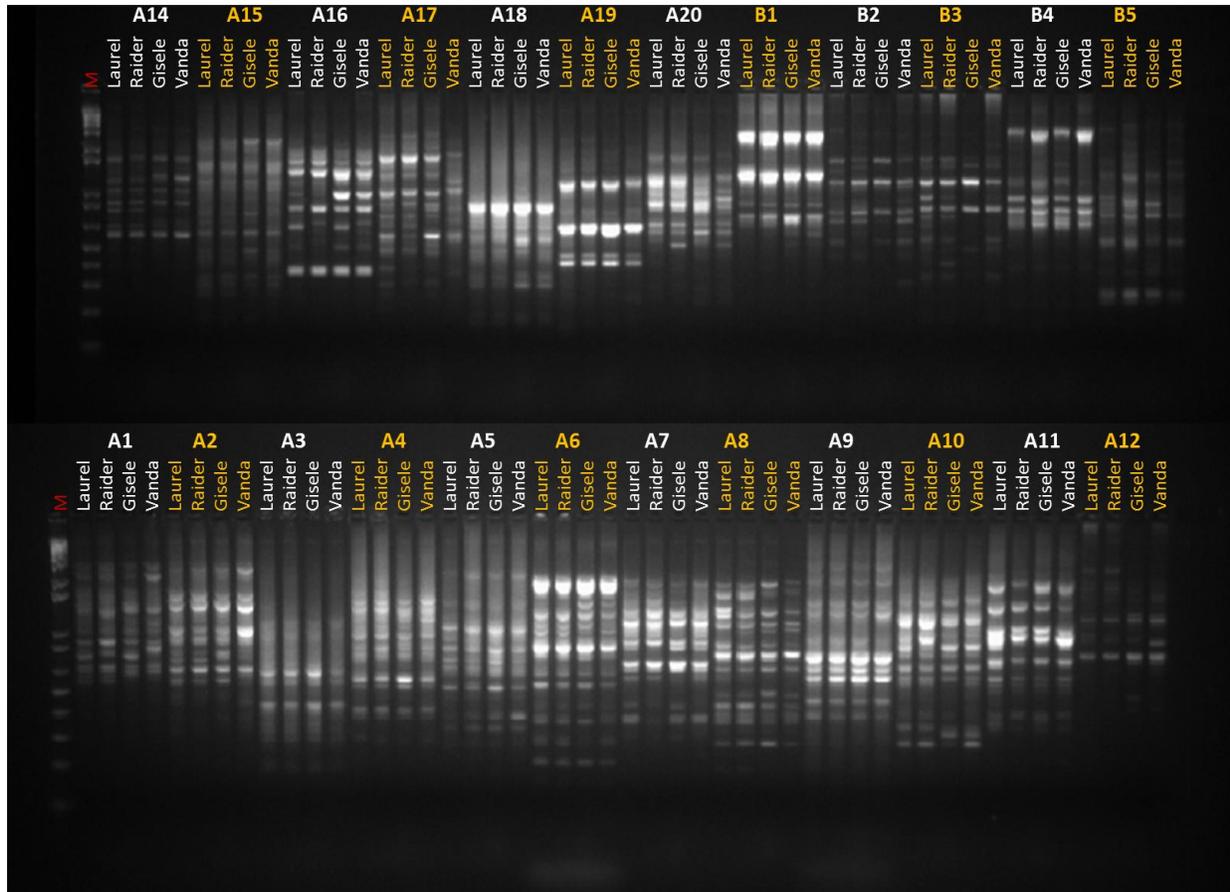
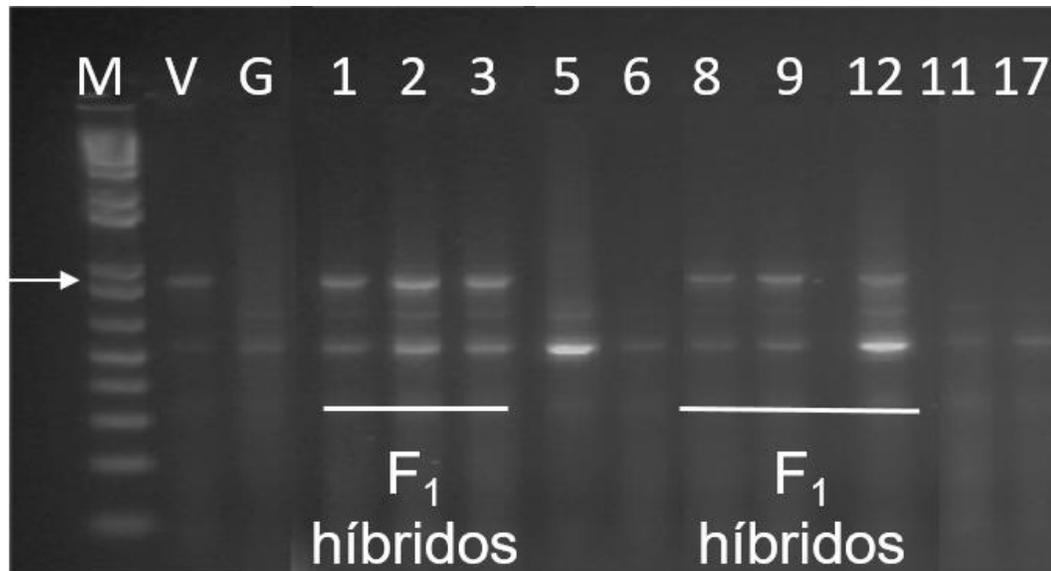


Figura 2-1. Perfil de amplicons gerados com um subconjunto de *primers* RAPD dos grupos OP-A e OP-B (Operon) usando como molde o DNA genômico dos genitores de alface contrastantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 [‘Vanda’, resistente e ‘Gizele’, suscetível]. Duas cultivares de alface do segmento varietal Americana (‘Laurel’ e ‘Raider’), também foram incluídas (como padrões) nessas análises. O código ‘M’ indica a linha do marcador de peso molecular 1 kb *plus* DNA *ladder* (Invitrogen).



♀ V: Doadora de pólen (Parental masculino)
 ♂ G: Parental feminino

Figura 2-2. Perfil de amplicons obtido com o par de *primers* SCAR OPW-15-3 para os genitores contrastantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 [‘Vanda’ (V), resistente e ‘Gizele’ (G), suscetível]. A eletrofore em gel de agarose (1,2%) ilustra o padrão de bandas para ‘V’ e ‘G’ e para 11 plantas potencialmente de natureza híbrida F₁ (códigos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 11 & 17) obtidas de cruzamentos controlados entre ‘G’ x ‘V’. O código ‘M’ indica a linha do marcador de peso molecular 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen). A seta aponta uma banda polimórfica informativa (originária de ‘Vanda’) que foi utilizada para distinguir plantas verdadeiramente de origem híbrida F₁ (ex. as assinaladas com barras) de plantas de ‘Gizele’ autofecundadas (ex. 5, 6, 11 & 17), quando empregando a cultivar ‘Vanda’ como doadora de pólen e ‘Gizele’ como receptora de pólen.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEX, C.F. 1999. Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. Ph.D. Thesis. University of Wisconsin. Wisconsin, Madison.
- ALON, H.; KATAN, J. & KEDAR, N. 1974. Factors affecting penetrance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Phytopathology* 64:455–461.
- ARUGA, D.; TSUCHIYA, N.; MATSUMURA, H.; MATSUMOTO, E. & HAYASHIDA, N. 2012. Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* 187:1–9.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N. & SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting analyses in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:32–38.
- CABRAL, C.S. 2012. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos de alface resistentes. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.
- CABRAL, C.S. & REIS, A. 2013. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1. *Tropical Plant Pathology* 38:272–281.
- CABRAL, C.S.; BRUNELLI, K.R.; COSTA, H.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. & REIS, A. 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39:197–202.
- D'ANDREA, L.; FELBER, F. & GUADAGNUOLO, R. 2008. Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. *Environmental Biosafety Research* 7:61–71.
- DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S & KOCHMAN, J.R. 2006. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. *Plant Disease* 90:692–703.
- DZIECHCIARKOVA, M; LEBEDA, A; DOLEZALOVA, I & ASTLEY, D. 2004. Characterization of *Lactuca* spp. germplasm by protein and molecular markers – a review. *Plant Soil and Environment* 50:47–58.
- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2001. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root rot of crisp head lettuce. *Journal of General Plant Pathology* 67:205–206.

- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2003. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *Journal of General Plant Pathology* 69:23–28.
- GILARDI, G.; FRANCO ORTEGA, S.; RIJSWICK, P.C.J.; ORTU, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2016. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology*.
- HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J. & VICK, B.A. 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica* 144:225–235.
- HUANG, J.H. & LO, C.T. 1998. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 7:150–153.
- HUBBARD, J.C. & GERIK, J.S. 1993. A new disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum forma specialis* nov. *Plant Disease* 77:750–754.
- HWANG, C.F.; BHAKTA, A.V.; TRUESDELL, G.M.; PUDLO, W.M. & WILLIAMSON, V.M. 2000. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. *Plant Cell* 12:1319–1329.
- JIANG, G-L. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields* 45–83.
- KESSELI, R.V. & MICHELMORE, R.W. 1986. *Journal of Heredity* 77:324–331.
- KESSELI, R.; OCHOA, O. & MICHELMORE, R.W. 1991. Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome* 34: 430–436.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A. & REIS, A. 2010. *Doenças da Alface*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Brasília-DF.
- MATHERON, M.E. & PORCHAS, M. 2010. Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for *Fusarium* wilt of lettuce. *Plant Disease* 94:1323–1328.
- MATHERON, M.E. 2015. *Biology and management of Fusarium wilt of lettuce*.
- MATUO, T. & MOTOHASHI, S. 1967. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n.f. causing root of lettuce. *Transactions of Mycological Society of Japan* 8:13–15.
- MCCREIGHT, J.D.; MATHERON, M.E.; TICKES, B.R. & PLANTTS, B. 2005. *Fusarium* wilt race 1 on lettuce. *HortScience* 40:529–531.

- MICHELMORE, R.W. 2010. Genetic variation in lettuce. California leafy greens research program, calgreens.org/control/uploads/Michelmores_Variation_report_2009-2010_final_(2)1.pdf
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:9828–9832.
- MICHELMORE, R.W.; CHRISTOPOULOU, M. & CALDWELL, K.S. 2013. Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual Review of Phytopathology* 51:291–319.
- MILLANI, M.J.; EREBARIAN, H.R. & ALIZADEH, A. 1999. Occurrence of fusarium wilt of lettuce in Shahr- Ray, Varamim and Karaj areas. *Journal of Plant Pathology* 35:121.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2005. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Disease* 89:237–240.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* 97:987–996.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. & PINTO, C.A.B. 2008. *Genética na Agropecuária*. 4 ed. UFLA. Lavras.
- SALA, F.C. & COSTA, C.D. 2012. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. *Horticultura brasileira* 30: 187–194.
- SALA, F.C. & NASCIMENTO, W.M. 2014. Produção de sementes de alface. *In: Nascimento, W.M. (ed.). Produção de Sementes de Hortaliças*. Embrapa. Brasília, DF.
- SALA, F.C. & COSTA, C.P. 2016. Melhoramento de alface. *In: Nick, C. & Bórem, A. Melhoramento de Hortaliças*. (eds.).UFV.Viçosa, MG.
- SANTOS, J.R.M. 1996. Methodology for screening tomato to Fusarium wilt, Verticillium wilt, gray leaf spot, early blight, and Septoria leaf spot. *In: Proceedings of the International Symposium on Tropical Tomato Diseases*. Recife PE, Brazil. p. 164–166.
- SCHOENEWEISS, D.F. 1975. Predisposition, stress, and plant disease. *Annual review of phytopathology* 13: 193–211.

- SCHUSTER, I. & CRUZ, C.D. 2004. Estatística Genômica Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados. UFV. Viçosa, MG.
- SCOTT, J.C.; KIRKPATRICK, S.C. & GORDON, T.R. 2010. Variation in susceptibility of lettuce cultivars to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Pathology* 59:139–146.
- SILVA, M.P.; AMARAL, JR. A.T.; PEREIRA, M.G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R.F. & POSSE, S.C.P. 2005. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. *Acta Scientiarum Agronomy* 27:531–535.
- SIMKO, I. 2009. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100:256–262.
- TSUCHIYA, N.; YOSHIDA, K.; USUI, T. & TSUKADA, M. 2004. Resistance tests and genetic resources for breeding *Fusarium* root rot resistant lettuce. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science* 73:105–113.
- UWIMANA, B.; D'ANDREA, L.; FELBER, F.; HOOFTMAN, D.A.P.; DEN NIJS, H.C.M.; SMULDERS, M.J.M.; VISSER, R.G.F. & VAN DE WIEL, C.C.M. 2012a. A Bayesian analysis of gene flow from crops to their wild relatives: cultivated (*Lactuca sativa* L.) and prickly lettuce (*L. serriola* L.), and the recent expansion of *L. serriola* in Europe. *Molecular Ecology* 21:2640–2654.
- UWIMANA, B.; SMULDERS, M.J.M.; HOOFTMAN, D.A.P.; HARTMAN, Y.; VAN TIENDEREN, P.H.; JANSEN, J.; MCHALE, L.K.; MICHELMORE, R.W.; VISSER, R.G.F. & VAN DE WIEL, C.C.M. 2012b. Crop to wild introgression in lettuce: following the fate of crop genome segments in backcross populations. *BMC Plant Biology* 12:43.
- VAN TREUREN, R. & VAN HINTUM, T.J.L. 2009. Comparison of anonymous and targeted molecular markers for the estimation of genetic diversity in ex situ conserved *Lactuca*. *Theoretical and Applied Genetics* 119:1265–1279.
- VENTURA, J.A. & COSTA, H. 2008. *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espírito Santo, Brazil. *Plant Disease* 92: 976.
- WANG, Y.; BAO, Z.; ZHU, Y. & HUA, J. 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:498–506.
- WHITHAM, S.; MCCORMICK, S. & BAKER, B. 1996. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8776–8781.

YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M. & SHIRAKAWA, T. 2004. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70:308–313.

ZHU, Y.; QIAN, W. & HUA, J. 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *Plos Pathogens* 6: e1000844.

CAPÍTULO 3

Plataforma de marcadores DR analogs derivados de *clusters* gênicos do genoma da alface: Aplicação na localização de fatores de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (raça 1).

**Plataforma de marcadores DR analogs derivados de *clusters* gênicos do genoma da
alface: Aplicação na localização de fatores de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp.
lactucae (raça 1)**

RESUMO

A murcha de fusário, causada por diferentes raças do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC), é um dos mais importantes problemas fitossanitários da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.), acarretando perdas na produção em diferentes regiões do mundo. A seleção assistida por marcadores (MAS) poderia ser explorada como uma ferramenta acoplada ao melhoramento convencional, visando facilitar a obtenção de cultivares resistentes a diferentes raças de FOLAC. Em relação à resistência a FOLAC raça 1, estudos de herança indicaram um controle monogênico dominante e com penetrância incompleta na cultivar ‘Vanda’. No entanto, marcadores moleculares ligados a fatores de resistência ao FOLAC raça 1 derivados dessa cultivar ainda não estão disponíveis impedindo a determinação de sua localização cromossômica. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma coleção de *primers* visando identificar marcadores ligados com a resistência a FOLAC raça 1. A plataforma consiste de uma coleção de oligonucleotídeos (*primers*) que foram selecionados para anelar em regiões distribuídas nos nove cromossomos da alface, de acordo com as informações disponíveis no *Compositae Genome Project Database*. A maioria dos genes de resistência a doenças em alface está localizada em cinco grandes agrupamentos físicos ou *clusters* (*major resistance clusters* – MRCs). Desta forma, foi explorado inicialmente um subconjunto de 98 pares de *primers* que anelam em regiões dispersas em cinco principais MRCs do genoma da alface localizados nos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. Marcadores moleculares do tipo *Disease resistance analogs* (DR-analogs), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*)

e microssatélites foram avaliados para polimorfismos entre as cultivares ‘Gizele’ (suscetível) e ‘Vanda’ (resistente) e em uma população F_2 ($n = 82$), resultante do cruzamento entre ‘Vanda’ (resistente a FOLAC raça 1) e ‘Gizele’ (suscetível). Marcadores DR analog polimórficos entre as cultivares contrastantes foram avaliados para verificar ligação com o fenótipo de resistência empregando populações de mapeamento F_2 ($n = 82$) e F_3 derivadas do cruzamento entre ‘Gizele’ x ‘Vanda’ após bioensaios com inoculação controlada do fungo. No entanto, dentro do subgrupo analisado, não foram obtidas evidências inequívocas de ligação genética com os fatores de resistência a FOLAC raça 1, sugerindo que este(s) fator(es) não se localizam nos MRCs dos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. De qualquer forma, essa coleção de marcadores moleculares servirá como um banco de dados para programas de melhoramento especialmente em estudos de variabilidade genética de genótipos e na busca por marcadores ligados a distintas características de interesse no melhoramento da alface. A identificação de vários marcadores moleculares dentro de diversas famílias de genes de resistência no genoma de alface é importante e podem ser utilizados em sistemas de caracterização (*fingerprinting*) de cultivares dos diferentes segmentos/grupos varietais dessa hortaliça.

Palavras chave: Resistência, marcadores, seleção assistida, melhoramento.

ABSTRACT

Fusarium wilt, caused by different races of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC), is one of the most economically important diseases of lettuce (*Lactuca sativa* L.), in many tropical and subtropical regions of the world. Marker-assisted selection (MAS) could be exploited as a tool in combination with classical breeding programs, in order to facilitate the development of lettuce varieties with resistance to FOLAC. Inheritance studies indicated a monogenic genetic control with high penetrance of FOLAC race 1 resistance in cultivar ‘Vanda’. However, molecular markers linked to FOLAC race 1 resistance factor(s) derived from this cultivar are yet not available, precluding a precise determination of its chromosomal localization. In this context, the objective of this study was to establish a collection of PCR primers in order to enable the identification of markers linked to the genetic factor(s) associated with FOLAC race 1 resistance. The present molecular marker platform consists of a collection of primers that were selected to anneal to nine genomic regions uniformly distributed along the nine lettuce chromosomes, according to the information available in the Compositae Genome Project Database. Most of the known disease resistance genes in lettuce are located in five major clusters (major resistance clusters – MRCs). In this work, a subset of 98 primers pairs scattered in five MRCs of the lettuce genome located on the chromosomes/linkage groups 1, 2, 4, 7 & 8 was initially exploited. Disease resistance analogs (DR-analogs), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), and microsatellite markers were screened for polymorphisms between the cultivars ‘Gizele’ (susceptible) and ‘Vanda’ (resistant). Polymorphic DR analog markers were obtained between the contrasting cultivars and they were checked for linkage to FOLAC race 1 using F₂ (n = 82) and F₃ mapping populations derived from a cross between ‘Gizele’ x ‘Vanda’ after bioassays

employing controlled fungal inoculation. However, no clear evidence of genetic linkage with the factors of resistance to FOLAC race 1 was obtained with the subgroups of primers examined, suggesting that these factors are not located in the MRCs of the chromosomes/linkage groups 1, 2, 4, 7 & 8. Nonetheless, this collection of molecular markers may serve as a database for breeding programs especially in studies dealing with the genetic variability of germplasm collections as well as in the search for markers linked to other traits of interest for lettuce breeding programs. The identification of several molecular markers in several resistance gene families in the lettuce genome is important and this information can be used in fingerprinting systems of cultivars from different varietal groups.

Keywords: resistance, molecular markers, marker assisted, breeding, crop improvement.

1. INTRODUÇÃO

A seleção assistida por marcadores moleculares (*Marker Assisted Selection* – MAS) é uma poderosa ferramenta para uso em programas de melhoramento, especialmente para incorporação de fatores de resistência a doenças (Agrama *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2013). Nos sistemas de MAS, a incorporação de genes de resistência pode ser monitorada de maneira precisa e específica sem mesmo requerer a inoculação e/ou presença do patógeno, reduzindo o tempo e os custos associados com bioensaios de campo e telado. Outra vantagem dos sistemas de MAS é a possibilidade conduzir simultaneamente processos de seleção para múltiplos fatores de resistência contra uma ampla gama de agentes patogênicos, o que torna possível a rápida ‘piramidação’ de genes de interesse em uma única cultivar ou linhagem elite (Peleman & van der Voort, 2003; Simko *et al.*, 2007; Collard & Mackill, 2008).

O desenvolvimento de mapas genéticos densos (i.e. com um número elevado de marcadores) tem permitido a localização física dos genes nos cromossomos, a estimativa do número de *loci* envolvidos no controle de uma dada característica (qualitativa ou quantitativa) e a estimativa da magnitude do efeito destes *loci* no fenótipo de interesse (Collard & Mackill, 2008). Para o gênero *Lactuca*, diversos mapas foram obtidos utilizando populações derivadas de cruzamentos intraespecíficos e/ou interespecíficos (Kesseli *et al.*, 1994; Witsenboer *et al.*, 1995; Waycott *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Jeuken *et al.*, 2002; Syed *et al.*, 2006). Para tal, diversos sistemas de marcadores bioquímicos e moleculares foram empregados na genética da alface incluindo, isoenzimas (Kesseli & Michelmore 1986); *Restriction fragment length polymorphism* – RFLP (Kesseli *et al.*, 1991); *Randomly amplified polymorphic DNA* – RAPD (Kesseli *et al.*, 1994); *Sequence characterized amplified regions* – SCAR (Maisonneuve *et al.*, 1994); *Retrotransposon-based sequence specific amplification polymorphism* (Syed *et al.*, 2006);

Amplified fragment length polymorphism – AFLP (Hill *et al.*, 1996); *Simple sequence repeats* – SSR (Van de Wiel *et al.*, 1999; Rauscher & Simko, 2013); *Target region amplification polymorphism* – TRAP (Hu *et al.* 2005); *Expressed sequence tag-based SSR* – EST-SSR (Simko, 2009); *Single-stranded conformational polymorphism* – SSCP (McHale *et al.*, 2009); *Single nucleotide polymorphism* – SNP (Kwon *et al.*, 2013) e *Single position polymorphism* – SPP (Stoffel *et al.*, 2012).

Os modernos sistemas de marcadores moleculares utilizados em genética vegetal permitem a genotipagem com alto rendimento (Truong *et al.*, 2012). Estes marcadores estão sendo utilizados na construção de vários mapas de ligação de alface (Truco *et al.* 2007, 2013), incluindo estudos envolvendo a localização cromossômica de genes de resistência a doenças (Paran & Michelmore, 1993; Meyers *et al.*, 1998; McHale *et al.*, 2009) e no desenvolvimento de sistemas de MAS para essa hortaliça (Moreno-Vázquez *et al.*, 2003; Simko *et al.*, 2009).

Um mapa molecular de referência em alface foi construído utilizando linhagens RILs (*Recombinant Inbred Lines*) derivadas da população *L. sativa* ‘Salinas’ x *L. serriola* ‘UC96US23’ (Truco *et al.*, 2007). Este mapa engloba com mais de 700 marcadores AFLP e SSR. Posteriormente, um mapa genético ultradenso foi gerado com 13.943 loci baseados em sequências transcritas de alface e outras espécies da família Compositae organizadas em um *chip* de *microarray* (Truco *et al.*, 2013). Os *loci* foram catalogados e ordenados de acordo com a distância genética e organizados em cromossomos para facilitar a visualização com a ajuda do software “GBrowse” (<http://www.Gbrowse.org>). O *Lettuce Genome Browser* pode ser acessado após inscrição e login no site <https://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>.

De acordo com as estimativas, a alface possui cerca de 45.000 genes. Desta forma, esse mapa representa um enorme avanço analítico, disponibilizando cerca de 1/3 dos genes que

codificam proteínas em alface (**Truco *et al.*, 2013**). Mais recentemente, a metodologia de *Genotyping-by-sequencing* (GBS) foi aplicada na análise genômica de alface permitindo o desenvolvimento de mais de 1.000 marcadores SNPs em uma população de mapeamento derivada do cruzamento entre *L. sativa* ‘Salinas 88’ x *L. sativa* ‘La Brillhante’ (**Truong *et al.*, 2012**). Estes marcadores foram adicionados aos mapas de ligação de referência da alface (**Truco *et al.*, 2013**).

Da mesma forma foi construído um mapa de referência por **McHale *et al.* (2009)** e **Christopoulou *et al.* (2015a,b)**, contendo um coleção de marcadores associados com 36 *loci* e 20 QTLs associados a fenótipos de resistência/tolerância a dez patógenos e um inseto (**Tabela 3-1**). Os seguintes patógenos e doenças já tiveram os fatores de resistência e QTLs mapeados em alface: raças fisiológicas de *Bremia lactucae* (míldio); corky root (*Sphingomonas suberifanciens*); lettuce dieback, causado pelo complexo viral (*Tomato bushy stunt virus* – TBSV, *Lettuce necrotic stunt virus* – LNSV); outras viroses (*Lettuce mosaic virus* – LMV e *Turnip mosaic virus* – TuMV); root downy mildew, causado por *Plasmopara lactucae-radici*; oídio (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto = *Erysiphe cichoracearum*); big-vein (*Mirafiori lettuce big-vein virus* – MLBVV); antracnose (*Microdochium panattoniana*); podridão de esclerotínia (*Sclerotinia minor* e *S. sclerotiorum*); mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*); murcha de verticílio (*Verticillium dahliae*) e a murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*).

A maioria dos genes de resistência a doenças identificados no genoma da alface estão localizados em cinco grandes agrupamentos físicos ou *clusters* (*Major Resistance Clusters* – MRCs). Dos cinco principais MRCs em alface, o MRC2 (cromossomo 2) é o mais extensamente estudado. O MRC2 é composto por nove genes *Dm* (*downy mildew resistance genes* – *Dm1*,

Dm2, *Dm3*, *Dm6*, *Dm14*, *Dm15*, *Dm16*, *Dm18* e *Dm50*). Este *cluster* inclui *Dm3* (que foi o primeiro gene de resistência clonado em alface) (Shen *et al.*, 2002; Christopoulou *et al.*, 2015a,b), QTLs para resistência parcial contra raças de míldio (*qDMR2.2* e *qDM2.1*) (Simko *et al.*, 2015), o gene de resistência ao pulgão de raiz (*Ra*) (Ellis *et al.*, 2002), resistência a *Tomato bushy stunt virus* (*Tvr1*) (Grube *et al.*, 2005), um QTL associado com resistência a antracnose (*qANT*) (McHale *et al.*, 2009), genes de resistência a mancha bacteriana (*Xar1* e *Xcvr*) (Hayes *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016), QTLs de resistência ao oídio (*pm-2.1* e *pm-2.2*) (Simko *et al.*, 2014) e um número variável de 15 a 42 membros da família de genes candidatos de resistência 2 (RGC2) do tipo CNL (Shen *et al.*, 2002; Kuang *et al.*, 2004), bem como de alguns NBS-LRR fora da família RGC2 (McHale *et al.*, 2009). A análise de sequências de genes RGC2 de 47 acessos de *L. sativa* indica uma complexidade genética desse *locus* que inclui mutações, conversão gênica e recombinação resultando em numerosas variantes dos membros desta família (Kuang *et al.*, 2004). A partir do *draft* do genoma da alface (*L. sativa* cv. ‘Salinas’) foi possível identificar 754 genes nesse *cluster*, dos quais 61 são NBS-LRR, dois são RLKs e cinco são RLPs (Christopoulou *et al.*, 2015a, b).

O *cluster* MRC1 (cromossomo 1) é constituído por oito genes *Dm* (*Dm5/8*, *Dm10*, *Dm17*, *Dm25*, *Dm36*, *Dm37*, *Dm43* e *Dm45*) (Hulbert & Michelmore, 1985; Landry *et al.*, 1987; Parra *et al.*, 2016), por um QTL (*qDMRI.1*) associado com a resistência parcial ao míldio (*downy mildew*) (Jeuken & Lindhout, 2002), pelo gene de resistência a isolados de *Lettuce mosaic virus* (*Mo2*) (McHale *et al.*, 2009), resistência a *Turnip mosaic virus* (*Tu*) (Robbins *et al.*, 1994), resistência recessiva a *Plasmopara lactucae-radices* (*plr*) (Witsenboer *et al.*, 1995), por QTL de resistência ao oídio (*pm-1.1*) (Simko *et al.*, 2014), por fatores genéticos controlando uma reação de hipersensibilidade em resposta as proteínas efectoras *AvrB*, *AvRpt2* e *AvrRpm1* de

Pseudomonas syringae (*AvrB-HR*, *AvrRpt2-HR* e *AvrRpm1-HR*) (Wroblewski *et al.*, 2009) e pelos QTLs *qFUS1.1* e *qFUS1.2* associados com resistência parcial a murcha de fusário (Truco *et al.*, comunicação pessoal). A partir de estudos de mapeamento com marcadores EST de sequências expressas (*Expressed sequence tag*), McHale *et al.* (2009) identificaram membros da família RGC16 (TNL) e membros da família RCC1 (CNL) dentro da região do *cluster* MRC1.

A disponibilidade de uma primeira versão (*draft*) do genoma da alface (*L. sativa* cv. ‘Salinas’) também permitiu a caracterização detalhada da arquitetura genômica do *locus* MRC1. Conjuntos de dados de 39.000 modelos de genes para a presença de características de domínios Pfam (*Lettuce Genome Resource*) identificaram 365 modelos de genes com o NB-ARC (com e sem a presença de CC, TIR e domínios LRR) e 687 genes que codificam LRR (com ou sem presença do domínio kinase) (Christopoulou *et al.*, 2015a,b).

O *cluster* MRC4 (cromossomo 4) se estende por cerca de 25 cM e é composto por sete *loci* controlando resistência à míldio (*Dm4*, *Dm7*, *Dm11*, *Dm24*, *Dm38*, *Dm44* e *Dm48*) (Hulbert & Michelmore 1985; Landry *et al.*, 1987; Parra *et al.*, 2016), por QTLs associados com resistência a murcha de fusário (*qFUS4.1*) (Truco *et al.*, comunicação pessoal), resistência a big-vein (*BV2* e *BV3*) (Hayes *et al.*, 2010) e o gene recessivo *mo-1* que controla resistência a patótipos do *potyvirus Lettuce mosaic virus* (Nicaise *et al.*, 2003). Membros da família RGC12 (TNL) são predominantes nesse *cluster*. Existem 21 genes do tipo NBS-LRR, sendo 18 TNL atribuídos a família de genes RGC12, com base em suas sequências e três CNL (Christopoulou *et al.*, 2015b).

No cromossomo 7 se localizam dois QTLs de resistência para míldio (*qDM7.1* e *qDMR7.1*) (Christopoulou *et al.*, 2015a,b), um QTL para resistência a oídio (*pm7-1*) (Simko *et al.*, 2014) e um fator de resistência a murcha de fusário (*FUS3*) (Michelmore *et al.*, 2010).

Por sua vez, três MRcs (MRC8A, MRC8B e MRC8C) estão localizados no cromossomo 8 que co-segregam com diferentes fatores genéticos relacionados com resistência a doenças. O MRC8A é composto por 1132 genes, dos quais 23 genes são potencialmente envolvidos no reconhecimento do patógeno: quatro TNL (RGC4), dois CNLs (RCC27), oito RLKs, quatro RLPs, um TIR e quatro genes que codificam LRR. O **MRC8B** co-segrega com HR para *AvrRps4*, contém 127 genes, dos quais 36 são membros do RGC4. Já o **MRC8C** é o mais complexo, contém 348 genes, 26 são do tipo NBS-LRR, 9 membros de RGC15, 11 de RGC9, 4 de RGC29, 1 de RGC7 e 1 de RGC43. Neste cluster há presença de um QTL de resistência a murcha de fusário (*qFUS8.1*) e um QTL para *V. dahliae* (*qVRT*) (**Christopoulou et al., 2015a,b; Truco et al., comunicação pessoal**).

Em relação à resistência a FOLAC raça 1, estudos indicaram um controle genético relativamente simples na cultivar ‘Vanda’ (**ver capítulo 2**), com os resultados de segregação indicando um controle monogênico dominante com penetrância elevada, porém incompleta (**Cabral et al., 2015; ver capítulo 2**). No entanto, marcadores moleculares ligados a fatores de resistência ao FOLAC raça 1 derivados dessa cultivar ainda não estão disponíveis impedindo a determinação de sua localização cromossômica. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma coleção de *primers* visando identificar marcadores ligados e/ou genes candidatos associados com a resistência a FOLAC raça 1. Inicialmente foram selecionados e sintetizados 90 oligonucleotídeos, usando informações disponíveis no *Compositae Genome Project Database*. Esses marcadores estão distribuídos nos nove cromossomos da alface (dez regiões/*primers* por cromossomo), incluindo marcadores dispersos em cinco dos principais MRcs do genoma da alface localizados nos cromossomos/grupos de ligação (1, 2, 3, 4 & 8), descritos acima. Marcadores moleculares do tipo *Disease resistance analogs* (DR-analogs),

CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e microssatélites foram sintetizados e validados em uma população F₂ segregando para reação a FOLAC raça 1. No presente trabalho, essa plataforma foi aplicada visando identificar marcadores moleculares ligados a fatores de resistência a raça 1 de FOLAC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar marcadores derivados de genes análogos de resistência (RGAs) presentes em cinco grandes agrupamentos físicos ou *clusters* (*major resistance clusters* – MRCs) no genoma da alface em populações segregantes obtidas a partir de cruzamentos entre um parental suscetível e um resistente a raça 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, visando identificar marcadores moleculares potencialmente associados o(s) fator(es) de resistência a esse patógeno.

2.2. Objetivos Específicos

- Amplificar de forma específica, RGAs em materiais contrastantes para resistência a raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, utilizando *primers* descritos no site <https://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>).

- Desenhar e validar marcadores moleculares baseados na análise de sequências dos RGAs, potencialmente ligados aos fatores de resistência a FOLAC raça 1.

- Ampliar as ferramentas moleculares disponíveis para mapear outros genes de resistência associados com os mecanismos genéticos que regulam a diferentes interações planta-patógeno em alface.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Cruzamentos entre parentais contrastantes para resposta a FOLAC raça 1 e desenvolvimento de populações segregantes – Foram realizados cruzamentos entre o parental suscetível (PS) ‘Gizele’ (cultivar comercializada no Brasil pela a Empresa Topseed) e o parental resistente (PR) ‘Vanda’ (Empresa Sakata Seed Sudamerica) que foi usado exclusivamente como progenitor masculino (= doador de pólen). As duas cultivares utilizadas como parentais são do segmento varietal do tipo ‘Crespa’. As sementes resultantes dos cruzamentos (geração F₁) foram semeadas em bandejas e as plantas individuais produzidas foram autofecundadas, para constituir a geração F₂. Progênes F₃ foram obtidas a partir da autofecundação de plantas individuais da geração F₂. Os parentais contrastantes e as populações F₁, F₂ e F₃ foram utilizadas nesse estudo.

3.2. Caracterização fenotípica das linhagens parentais e populações segregantes – Inicialmente 30 plantas de cada um dos parentais contratantes, 30 plantas da geração F₁, 82 plantas F₂ e 719 plantas da geração F₃ foram inoculadas com o isolado CMM-3577 (Fus-209) (Cabral & Reis, 2013) da raça 1 de FOLAC (ver capítulo 2). Para confirmar os genótipos dos indivíduos da F₂, entre 9 e 16 plantas (de cada progênie F₃) foram avaliadas para a resposta ao fungo. O isolado do fungo foi cultivado por cinco dias em meio de cultura BDA-t (BDA suplementado com 50 ppm de tetraciclina). A suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração de 3×10^6 microconídios/mL. Para produção das mudas, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor, preenchidas com substrato esterilizado (Plantmax[®]). Mudanças com 25-30 dias após o semeio foram removidas das células e as raízes lavadas em água corrente para eliminar o resíduo de substrato ainda aderido às raízes. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm), com auxílio de tesoura esterelizada, e mergulhadas em 50 mL da suspensão de esporos, por três minutos. Em seguida as mudas foram transplantadas para vasos de

2 L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada. Estes vasos foram irrigados anteriormente (uma hora antes do plantio). Depois disto, 3 mL da suspensão foi adicionado no colo de cada plântula. As plantas não foram irrigadas novamente no dia da inoculação para evitar a perda do inóculo através do escoamento superficial. Posteriormente foram mantidas em casa de vegetação com temperaturas variando de 25 a 35°C e fotoperíodo de 12 horas. Os fenótipos das plantas inoculadas foram avaliados aos 20 dias após a inoculação de acordo com a escala de notas adaptada de **Santos (1996)**, sendo **1** = plantas sem sintomas; **2** = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; **3** = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; **4** = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; **5** = plantas mortas. Com base nas notas recebidas as plantas foram classificadas como resistentes ($R \leq 2$) ou suscetíveis ($S > 2$).

3.3. Extração de DNA de genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes – As amostras foliares foram coletadas dez dias após a inoculação e mantidas em casa de vegetação. O DNA foi extraído individualmente de cada planta das linhagens parentais e de indivíduos das populações segregantes, de acordo com a metodologia de CTAB 2X com a incorporação de algumas modificações (**Boiteux et al., 1999**). As amostras das folhas foram trituradas no cadinho de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, colocadas em tubos com 750 µL de CTAB 2X, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos, acrescenta-se, após esse tempo, 750 µL de clorofil em cada tubo e agita-se no vortex por aproximadamente 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas por 9.000 rpm durante 5 minutos. Os tubos foram retirados da centrifuga 600 µL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 µL de isopropanol gelado e para homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e

posteriormente centrifugados a 12.000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* lavado com álcool 70%. Os tubos foram colocados na estufa a 37°C por 20 minutos, depois se acrescenta 50 µL de TE+RNase e coloca-se os tubos na geladeira. No outro dia, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs então extraídos foram guardados no freezer. As quantificações de DNA foram feitas com o espectrofotômetro (NanoDrop®). Para confirmação da qualidade das amostras de DNA, alíquotas foram utilizadas em uma reação de PCR em condições previamente testadas. O resultado negativo da amplificação indicou a presença de potenciais inibidores da reação de PCR na maioria das amostras. Desta forma a os DNAs foram re-purificados usando o kit Power Clean® Pro DNA Clean-up, seguindo os padrões recomendados pelo fabricante do kit (MO BIO Laboratories – Carlsbad, California, USA). Após este procedimento a reação de PCR foi repetida, desta vez com sucesso, indicando que os inibidores de PCR foram removidos.

3.4. Plataforma de marcadores do tipo *Disease Resistance Analogs* (DR analogs) em alface – A presente plataforma consiste de uma coleção de oligonucleotídeos (*primers*) que foram selecionados para anelar em regiões uniformemente distribuídas nos nove cromossomos da alface, de acordo com as informações disponíveis no *Compositae Genome Project Database*. Um subgrupo de 98 pares de *primers* foi empregado no presente capítulo (**Tabela 3-2**). Estes *primers* foram derivados de sequências do tipo *Resistance Gene Analogs* (RGAs) dispersas em cinco dos principais MRCs (*Major Resistance Clusters*) do genoma da alface localizados nos cromossomos (Cr.)/grupos de ligação 1, 2, 3, 4 & 8. De acordo com dados reportados na literatura, essas cinco regiões MRCs são mais ricas em fatores de resistência a doenças, incluindo fatores reportados controlando resistência para isolados de FOLAC (**Christopoulou et al., 2015a,b**). Estes 98 pares de *primers* foram obtidos no site <http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMapView/display/> ou foram sintetizados a partir de sequências disponíveis no mesmo site. Nesta coleção, foram selecionados

apenas pares de *primers* que anelavam com sequências relacionadas com ‘motivos’ (= regiões conservadas) com assinaturas do tipo NBS (*Nucleotide Binding Sites* = sítios de ligação de nucleotídeos), LRR (*Leucine rich repeats* = regiões ricas em códon correspondentes ao aminoácido leucina) e RLK (*Receptor-like kinase* = Receptores do tipo quinases) (McHale *et al.*, 2009). Essas famílias gênicas estão presentes em diferentes genomas de membros da Asteraceae (Compositae) e em outras famílias botânicas. Marcadores do tipo SRRs e SCAR previamente descritos por Simko *et al.* (2009) e Aruga *et al.* (2012) foram também incorporados na plataforma e nas análises.

3.5. Reação de PCR com *primers* anelando em regiões dos cromossomos 1, 2, 4, 7 & 8 contendo DR analogs – Os *primers* foram inicialmente avaliados nos dois parentais e em 12 indivíduos da população F₂ contrastantes para resposta a FOLAC raça 1 (seis plantas resistentes e seis suscetíveis), baseado na severidade da doença. Amplicons presentes na maior parte dos indivíduos resistentes e ausentes nos suscetíveis foram selecionados. Amplicons em repulsão (i.e. associados com o fenótipo suscetível) também foram selecionados. Em uma segunda etapa, os *primers* capazes de manter o polimorfismo nos 12 indivíduos contrastantes foram validados em 82 indivíduos da população F₂. Amplicons estáveis nos 12 indivíduos contrastantes foram purificados e sequenciados. A análise da sequência destes amplicons permitiu o desenho de novos *primers* a serem utilizados como potenciais marcadores do tipo CAPS (**Tabela 3-2, Figuras 3-2, 3-3 & 3-4**). O objetivo desta etapa foi aumentar probabilidade de identificar polimorfismos ligados a resposta de resistência a FOLAC raça 1. As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2 µL de DNA genômico (50 ng/µL), em volume final de 12,5 µL, contendo 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL), 0,3 µL de cada primer, 7,35 µL de H₂O Milli-Q. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos foi

de um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 1 min para a desnaturação, 1 min para anelamento (temperatura variável), e 72°C por 2 min para extensão, o ciclo final constituiu-se 72°C por 7 min e 4°C ∞. As condições de PCR foram otimizadas em termos de temperatura de anelamento para cada primer utilizado (**Tabela 3-2**).

3.6. Reações de sequenciamento dos amplicons – Os amplicons obtidos foram diretamente sequenciados utilizando o protocolo BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI PRIM 3100 da Embrapa Hortaliças (CNPQ).

3.7. Análise das sequências – Sequências consenso foram obtidas usando o programa SeqMan (DNASTar) e as sequências nucleotídicas foram analisadas usando EditSeq (DNASTar). A qualidade das sequências foi avaliada através do programa *SeqMan (Lasergene, Madison, WI)* e as sequências de baixa qualidade foram removidas (**Allex, 1999**). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank e analisadas para níveis de identidade usando o algoritmo BLASTn, disponível online (**Altschul et al., 1990**). O alinhamento das sequências e o cálculo das identidades nucleotídicas foram realizados por meio do *software Megalign (Lasergene, Madison, WI)*, utilizando-se o método Clustal W.

3.8. Marcadores CAPS – A partir da informação de sequências, sítios de clivagem de enzimas de restrição foram identificados usando o programa SeqMan (DNASTar), visando desenvolver marcadores do tipo CAPS. O corte com enzimas de restrição de cada amostra após PCR com os *primers* originais seguiram o protocolo do fabricante. Foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol e as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, já suplementado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM e 1 mM EDTA), a 120V, por um período de aproximadamente 2 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, tendo-se utilizado o marcador 1 Kb Plus

DNA Ladder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem das linhagens parentais e da população F₂ para marcadores DR-analogs potencialmente ligados a resistência a raça 1 de FOLAC– Dos 98 pares *primers* utilizados, 42 não amplificaram e/ou foram inespecíficos (i.e. apresentaram mais de uma banda) usando o DNA genômico dos dois parentais contrastantes como molde. Cinquenta e três *primers* produziram amplicons monomórficos e que foram caracterizados via sequenciamento. Três amplicons apresentaram polimorfismos entre os parentais do tipo INDEL (inserção/deleção). Os três *primers* que geraram amplicons polimórficos com INDELs foram LE0395 (localizado no cromossomo 8), LM0035 (localizado no cromossomo 8) e LE3164 (localizado no cromossomo 7). A estabilidade desses polimorfismos foi avaliada tomando-se amostras de seis indivíduos F₂ resistentes e seis indivíduos F₂ suscetíveis a FOLAC raça 1. O *primer* LM0035 gerou um amplicon de aproximadamente 1500 pb associada com indivíduos resistentes, enquanto os indivíduos suscetíveis apresentaram um amplicon de aproximadamente 1000 pb. O *primer* LE0351 amplificou uma banda de aproximadamente 550 pb em indivíduos resistentes e uma de 500 pb em indivíduos suscetíveis. O *primer* LE0395 gerou um amplicom de aproximadamente 550 pb para indivíduos resistentes e 650 pb para indivíduos suscetíveis. Em seguida, houve a validação desses primers em 82 indivíduos segregantes da população F₂, observando-se a não co-segregação desses marcadores com o fenótipo de resistência, ou seja, há eventos de recombinação entre o fator de resistência e os marcadores avaliados. (**Tabela 3-4**).

4.2. Análises Blast dos amplicons clonados e seqüenciados – Os resultados das análises de sequências dos 53 amplicons monomórficos obtidos com os *primers* da **Tabela 3-2** estão apresentados na **Tabela 3-3**. Como esperado, diversos dos amplicons seqüenciados

corresponderam a sequências com identidade com genes de resistência a doenças descritos em alface e outras espécies vegetais (**Tabela 3-3**). Alguns amplicons sequenciados apresentaram níveis de identidade elevados com genes da família *Flowering locus T* (FT) que estão relacionados com a indução floral e outros processos de desenvolvimento (**Fukuda et al., 2011; Pin & Nilsson, 2012**).

4.3. Marcadores do tipo CAPS – Apenas três (3) dos (53) amplicons sequenciados apresentaram polimorfismos do tipo SNPs. Estes três amplicons (representativos de DR analogs) foram utilizados para o desenho de marcadores do tipo CAPS (**Figuras 3-2, 3-3 & 3-4**). O padrão de amplicons após PCR com o par de primers LE0351-F/ LE0351-R (localizado no cromossomo 4), LE0337-F/ LE0337-R (localizado no cromossomo 4) e M4241-F/ M4241-R (localizado no cromossomo 7) foram de uma única banda aproximadamente 339 pb, 592 pb e 197 pb, respectivamente. No entanto, após a clivagem com as enzimas de restrição *MspAII*, *BstNI* e *MseI*, as plantas apresentaram três distintos padrões de bandas. No caso do par de primers ‘LE0351-F/ LE0351-R’, uma banda intacta (não clivada) de 339 pb associada com indivíduos homozigotos resistentes, duas bandas (251 pb e 88 pb), resultando da clivagem completa pela *MspAII* de todos os produtos de de PCR para indivíduos homozigotos suscetíveis e três bandas (339 pb, 251pb e 88 pb) para indivíduos heterozigotos, que possuem as duas variantes alélicas do marcador (**Figura 3-1**). Nesse ensaio de genotipagem, do total de 68 plantas da população F₂ foram observadas as seguintes frequências de classes genotípicas: 42 genótipos associados com plantas heterozigotas, 14 plantas apresentaram genótipo associado com plantas homozigotas suscetíveis e 12 genótipos associados com plantas homozigotas resistentes. Para o par de primers ‘LE0337-F/ LE0337-R’, uma banda intacta (não clivada) de 592 pb associada com indivíduos homozigotos suscetíveis, duas bandas (437 pb e 155pb), resultando da clivagem completa pela *BstNI* de todos

os produtos de PCR para indivíduos homocigotos resistentes e três amplicons (437 pb, 437 pb e 155 pb) para indivíduos heterocigotos, possuindo duas variantes do marcador (**Figura 3-1**). Nesse ensaio de genotipagem do total de 59 plantas da população F₂ foram observadas as seguintes frequências de classes genotípicas: 43 plantas apresentaram genótipo associado com plantas heterocigotas, 14 genótipos associados com plantas homocigotas suscetíveis e dois genótipos associados com plantas homocigotas resistentes. Os padrões de bandas dos *primers* ‘M4241-F/ M4241-R’ foram os seguintes: uma banda intacta (não clivada) de 197 pb associada com indivíduos homocigotos resistentes, duas bandas (106 pb e 91 pb), resultando da clivagem completa pela MseI de todos os produtos de PCR para indivíduos homocigotos suscetíveis e três bandas (197 pb, 106 pb e 91 pb) para indivíduos heterocigotos, que possuem as duas variantes alélicas do marcador (**Figura 3-1**). Nesse ensaio de genotipagem do total de 76 plantas da população F₂ foram observadas as seguintes frequências de classes genotípicas: 48 plantas apresentaram genótipo associado com plantas heterocigotas, 19 genótipos associados com plantas homocigotas suscetíveis e 09 genótipos associados com plantas homocigotas resistentes. Os marcadores moleculares que foram testados na população segregante apresentaram valores variando entre 24 a 64% de recombinantes (**Tabela 3-4**). Desta forma, marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes foram obtidos, mas, dentro do subgrupo analisado de marcadores, não foram obtidas evidências inequívocas de ligação genética com os fatores de resistência a FOLAC raça 1, sugerindo que este(s) fator(es) não se localizam nos MRCs dos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8.

5. DISCUSSÃO

A maioria dos amplicons e marcadores moleculares obtidos/caracterizados nesse trabalho apresentaram níveis de identidade com proteínas contendo os ‘motivos’ das famílias gênicas

NBS-LRR e RLK localizadas em cinco dos principais *clusters* MRCs (*Major Resistance Clusters*) dispersos nos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 3, 4 & 8, que co-segregam com vários fenótipos de resistência a doenças em alface (McHale *et al.*, 2009; Michelmore *et al.*, 2010). Os *clusters* de genes são resultado de duplicação em *tandem* de sequências parálogas e são relativamente comuns em genomas de plantas, incluindo a alface (Meyers *et al.*, 2003). Dentro desses *clusters* numerosos genes de resistência estão presentes controlando reações de defesa contra diversos patógenos, diferentes raças e patotipos (Van de Vossen *et al.*, 2000). A formação de *clusters* de genes de resistência também pode facilitar a geração de diversidade genética e a evolução de novos genes de resistência com novas especificidades. Desta forma, a efetividade destes *primers* na amplificação de DR analogs em alface crespa (56 de 98 *primers* empregados) indica níveis elevados de conservação e que os mesmos poderão ser utilizados em projetos similares relacionados a outras doenças de alface ou mesmo na busca por marcadores associados com outras raças de FOLAC.

O desenho de marcadores moleculares do tipo DR analogs, SCAR, CAPS e SSR no grupo varietal crespa representa uma importante ferramenta para a identificação de potenciais *loci* de resistência para diferentes doenças da alface, embora no caso específico dos *primers* avaliados até o momento (que anelam com regiões dos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8) indicam que o(s) fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 não estejam em estreita ligação gênica com essas regiões genômicas da alface.

Os 53 *amplicons* de que foram sequenciados e analisados são, como esperado, majoritariamente do tipo DR analogs, apresentando *motivos* de genes de resistência (Tabela 3-3). Este resultado comprova a utilidade destes *primers* para amplificação deste grupo de sequências no genoma de cultivares de alface do segmento crespa. O número de polimorfismos do tipo

INDELs (3/98) e SNPs (3/53) se encontra dentro do esperado para esta classe de marcadores. A estratégia de uso de marcadores moleculares do tipo CAPS foi bastante eficiente na genotipagem dos SNPs presentes em bandas monomórficas e sem INDELs.

Da mesma forma, a identificação de vários marcadores dentro das diferentes famílias de genes de resistência é importante, já que podem ser utilizados em outros trabalhos de caracterização agrônômica e bioquímica de alface. Alguns dos genes amplificados, como, por exemplo, as enzimas lipoxygenases estão envolvidas na resposta a estresses bióticos e abióticos, germinação e nas vias bioquímicas do ácido jasmônico e em processos de deteriorização de semente (Suzuki *et al.*, 1996; Umate, 2011). Proteínas do tipo ciclase (CAPS), amplificadas neste estudo, são proteínas ligadas a actina e altamente conservadas, estando presentes em uma ampla gama de organismos, incluindo levedura, mosca, plantas e mamíferos. As proteínas CAPS estão envolvidas nas vias de sinalização específicas para cada espécie. Os genes *Flowering locus T* (FT), também foram amplificados neste estudo, estando relacionados com o processo de indução floral. Além da floração, genes FT participam em vários processos de desenvolvimento, incluindo frutificação, crescimento vegetativo, controle estomático e tuberização. Essas funções multifacetadas das proteínas FT se devem a extensos eventos de duplicação de genes, que ocorrem de forma independente em quase todas angiospermas (Fukuda *et al.*, 2011; Pin & Nilsson, 2012) (Tabela 3-3).

Desta forma, marcadores polimórficos entre os parentais contrastantes foram obtidos, mas, dentro do subgrupo inicialmente analisado, não foram obtidas evidências inequívocas de ligação genética com os fatores de resistência a FOLAC raça 1, sugerindo que este(s) fator(es) não se localizam nos MRCs dos cromossomos/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. A próxima etapa do trabalho vai envolver a avaliação de um número maior de *primers*, incluindo aqueles gerados

para a região do cromossomo 9, que se mostrou potencialmente ligada ao gene de resistência a FOLAC raça 1 usando a estratégia de GBS (**ver capítulo 4**).

No presente trabalho, uma plataforma de marcadores moleculares, predominantemente do tipo DR Analogs, foi aplicada visando identificar regiões genômicas ligadas ao(s) fator(es) de resistência a raça 1 de FOLAC. No entanto, a utilidade dessa plataforma não se limita ao tema dessa investigação. De fato, o principal objetivo desta ação de pesquisa foi obter/gerar um conjunto de potenciais marcadores moleculares para permanente uso em projetos de mapeamento de fatores de resistência nessa cultura. Desta forma, espera-se validar marcadores moleculares que poderão ser utilizados na seleção assistida dentro de programas de melhoramento de alface crespa.

Tabela 3-1. Código dos genes e QTLs associados com resistência/tolerância a doenças e pragas mapeados no genoma da alface (*Lactuca sativa* L.). Informações extraídas de **Christopoulou et al. (2015b)**.

Código	Patógeno/doença controlado pelo fator de resistência
<i>Dm</i>	Resistência monogênica dominante ao míldio (<i>Bremia lactuca</i>)
<i>Tvr</i>	Resistência ao <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)
<i>plr</i>	Resistência a <i>Plasmopara lactucae-radicis</i>
<i>Mo</i>	Resistência ao <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)
<i>Tu</i>	Resistência ao <i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)
<i>cor</i>	Resistência ao <i>Sphingomonas suberifaciens</i>
<i>qFUS</i>	QTL para resistência ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>
<i>qDMR</i>	QTL para resistência ao míldio (<i>Bremia lactuca</i>)
<i>qDM</i>	QTL para resistência de campo ao míldio (<i>Bremia lactuca</i>)
<i>qVRT</i>	QTL para resistência ao fungo <i>Verticillium dahliae</i>
<i>Vr1</i>	Resistência monogênica ao <i>Verticillium dahliae</i>
<i>qANT</i>	QTL para resistência a antracnose
<i>Ra</i>	Resistência ao afídeo radicular <i>Pemphigus bursarius</i>
<i>AvrB-HR</i>	HR contra o efector bacteriano AvrB
<i>AvrRpt2-HR</i>	HR contra o efector bacteriano AvRpt2
<i>AvrRpm1-HR</i>	HR contra o efector bacteriano AvrRpm1
<i>AvrPpiC-HR</i>	HR contra o efector bacteriano AvrPpiC
<i>AvrRps4</i>	HR contra o efector bacteriano AvrRps4
<i>AvrPto-HR</i>	HR contra o efector bacteriano AvrPto
<i>Xar1</i>	Resistência a mancha foliar bacteriana

Tabela 3-1. Lista do subgrupo de 98 pares *primers* empregados, visando identificar marcadores associados com a resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 em alface. Esses marcadores foram derivados de sequências do tipo *Resistance gene analogs* (RGA) dispersas em dos cinco principais MRCs (*major resistance clusters*) do genoma da alface localizados nos cromossomos (Cr.)/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8. Os pares de *primers* foram obtidos no site <http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMapView/display/> ou foram sintetizados a partir de sequências disponíveis no mesmo site. Marcadores do tipo SRR e SCAR previamente descritos por **Simko et al. (2009)** e **Aruga et al. (2012)** foram também incorporados nas análises.

Código do par de <i>primers</i>	Sequencia do <i>primer</i> (5' - 3')	Cr.	Fonte da informação da sequencia	Tipo
LE0261-F	CCCAAGCTCAAGTTTCCTGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0261-R	TTACATGCGGTGGTTGGATA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0243-F	TTGTGGGCATATCAACTCCA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0243-R	GCCTTGAGGCTAGGACTGTG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0172-F	AACCAATATAATGGGTTGCTTAAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0172-R	CCTTTTACAGGCTGCTGCT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0229-F	TGACTTGATGAAGCTGGCAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0229-R	GATTGTGCGGCCACAGTTGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0187-F	AAGCCTTCAAGGTGGACA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0187-R	AAAAAGAAGAGACAAAGAGGCATA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0427-F	CCTGATTTGGAGAGCGTGAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0427-R	CTGCAGTGAAACCACCAATG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0193-F	TTCAGGCAACTCCATCACTG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0193-R	GGAAGTGTCCGCTCATGTT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK0005-F	TGAATTCGATACATGCAGCTTT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK0005-R	TGCATTCAGCTGCATTAGATT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK0010-F	AACATGTCTATGGGTTATATTGTCAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK0010-R	AATGCATCCAATTGAGTAACAGT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M1120-F	CGGAGGATGGAGGCAGAGACA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M1120-R	CGTCTTCCCAATCCCACCCA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-F	TTTGCCCTTGGTAAACAGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-R	GGTATCCGCCTCCGCCGACAAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-F	GTTGTGCGCGGAGGCGGATAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-R	GTGGTTGTGTCGGATGGTGGTC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-F	ACCCGACCACCATCCGACGACA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-R	GGAAGTAACCCGCAAATCAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-F	TGAAACTAACGATCGAGGACTACC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9641-R	CGGGACCGAAAATGGCTTGAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M1730-F	TGATCCAGGCTCTCCAGAAT	1	Simko et al. (2009)	SSR
M1730-R	CACGACCATGAATGATAAGTGC	1	Simko et al. (2009)	SSR
LK1117-F	TTGGATTTGGGGTGATGAAT	1	Simko et al. (2009)	SSR
LK1117-R	GCATAGTAATTTGACATTTTGGCATA	1	Simko et al. (2009)	SSR

LE1040-F	CATGAAGTGT TTTGGGGTGA	1	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
LE1040-R	GGCCTTTCATTCTTCCTCA	1	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
CLX_S3_Contig8398-F	ATCACATTCATTCTCACGGGTCAA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-R	CAGCACTGGCCTCGATTACTTAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-F	TGGCGCCATGAGTGTCTT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-R	CCGTTTTGTGGGTCTTGTTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-F	AGTTTACGCCTACCACAAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-R	TCTGACCCCGACCCGAACC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-F	GGGTTATGGCGGGTTGTCTTATTC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-R	GGTTTTCCCTCTGCTCTGTTTCAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-F	AGTCCGTGTTTCTGTCTTC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8398-R	TGTCGCTAGCATAAAAAATA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3390-F	GAAAACCTCCCTGCCGACATC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3390-R	CAAGGGGAATTACCAAAACAGT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
QGF17106-F	ATTGAATGCACCGAGTTTTACCC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
QGF17106-R	ACTTATCTATTCTCAACGCTTTTT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LserNBS03 550-F	TATGATAGGATGAAAGCCACAAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LserNBS03 550-R	GAAGCCGAATAATAATCACAACTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSM741-F	AATTTGGTTGACTTGAA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSM741-R	ATCGCCCATGCTTTTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLRY2600-F	TGTTTCTCACTTTTTCATCTGGTT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLRY2600-R	GTTTATTCTTTTCGGGGCACAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSX3769-F	AATGCATTCCCCCGTAAGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSX3769-R	GGGTGAGGCCTAGAACATT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8409-F	TCCCGATAAAGACCCTGATGATG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig8409-R	TTTTCTCGATGTGGTGTGGTTTTTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSY4446-F	ACAAAGGGCAAGTCAAAGGTAAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSY4446-R	GACTCTCCAGCTAATTCTCCATCA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig1736-F	TGCGGCCATGGAACCTTTTAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig1736-R	TCCGCATCTCCAGTCCATCCA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLRX9010-F	TACGATGGCTTCTCTTCTAAAAA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLRX9010-R	CGCGCAAAATACTTCAAAA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3224-F	TTCAGAGTTTTCAAGTTTTCAGTC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3224-R	CTTTTATGTTGGCCCTTAGAGAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-F	GGTTTTCTTCCATACTCATCTCT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-R	GTGTCGGTGTGTAGGTTTTTCAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-F	AACCCTACAACCCGACACAACCTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-R	TCGATCGTACTCACCAAGAAAGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-F	CAGGAAGATGGAAGTAGG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9834-R	TAAATCATGAGGAGTGGTAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig579-F	TTGTCCGGCTTTCCTTCTCAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig579-R	TGGCATATAATAAAAACAA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig10397-F	GAAGGAGGGGCGGAAGATGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig10397-R	CCGATTAACCCGCTAGGAACAGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig15606-F	CGGGGATAAGAAACCTC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA

CLX_S3_Contig15606-R	TCAACAAAGACTCGACCCCATCAG	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLR1526-F	CTTTCATTGATGCCATCTAACA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLR1526-R	TACTATAACAGCCGACAAAT	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig1828-F	AGCCCAAACCTCTCCACAACAC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig1828-R	AAAATACAATCAAACAAATACAGA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
Contig-6125-F	TGGTTTTGGTGTGTTTGACC	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
Contig-6125-R	TACGTGGCAACAGCCATTA	1	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0238-F	GCTTCTGATTGGTTTGTGGG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0238-R	TGCCGTATCAATGGAGTTCA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0049-F	CGAGGAGTTGATGAGGTATGG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0049-R	TCAGTCCACTCGGGCATATT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0035-F	GTGGGAAGACGACAATGAT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0035-R	CCACAACTGCCATACATCG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0213-F	CGTGATTGTTGAGGATGCAG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0213-R	TGTAGCTCTGGAGTTGCGA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0031-F	AGGGATTGTTGGTGCCATT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0031-R	GTTTGCAACATTGCTCTGA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0029-F	GGAAGTGCAGCAACTGGAAT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0029-R	AGGGAACAAAGTGGTGGTTG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0089-F	GCACTTGAAAGCCTGACACA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LR0089-R	TTCTTCCAATGAAGCAACC	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0224-F	TGCTCCATGGTCAATCTCA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0224-R	CCACAACTGAGATGGGAGGT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0314-F	GAAACGGCTCCGATTGTTA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0314-R	GATTCCAGGATCTGATGCGT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0115-F	ACTGTCCACTACCCACCAC	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0115-R	CGACAAGGCTGACATCGTAA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE3172-F	TTCTTTCGCCCATCTGAAAC	2	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
LE3172-R	AAACAGGGGGCTAACGATCT	2	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
LE3093-F	GGGTTCTCATTGGCTGACAT	2	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
LE3093-R	TGTCTTCCAACAAAACATACA	2	Simko <i>et al.</i> (2009)	SSR
CLX_S3_Contig4455-F	GCGCTTCAATTCATCGGTTTTCTA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig4455-R	TTCTTGCCCCCTCGTTGATTTCTT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig14182-F	CTTCTTTTCTATCCATCAGTTT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig14182-R	ATAATTAATACATCAAGGGCAGAA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig11288-F	CACCATCATTAGACGAAAGACAAG	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig11288-R	GCATGATAAAAAGCTGAAAAGGTA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig12930-F	AGTGGCCCTATGATTGTGACC	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig12930-R	CATTGGCGACTTCCCTCCTC	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3045-F	ACTACGGCCATCAATCCCACCTC	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig3045-R	AATGAACCAATAATCCCAGAAAAT	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9978-F	AACCAATCTTTTCCAACAA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig9978-R	ATGAATATGCAGCCAACAGACCA	2	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
WF25-F	GAGCAATTGATACATACCTGCAACATTGTT	2	Aruga <i>et al.</i> (2012)	SCAR

WF25-R	GGAGGGGCAATAAGAACATTTGCTCTT	2	Aruga <i>et al.</i> (2012)	SCAR
LE0491A-F	CATTACAACAAGAGATGAGCAAGTG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0491A-R	GGCATCTACCCATTCAGGTTT	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0189B-F	GCGAAGATGCAGAAGATGGA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0189B-R	AGGCCATAACAATCTCACCG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M493-F	GGGTTAAGAGGATGTTACAACC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M493-R	TTCACACCAAGCAAAAACCTC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0279-F	ATTGAGGGCAATGAGGTGAC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0279-R	AGAAACACGGGACTTGATGG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0053-F	ATACACCCGCCACCTGTAAA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0053-R	ATAATCTGCCCCAGTGCAAG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0337-F	CCATGGCTAAAAAGCAAACC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0337-R	ACATTAGCCAAGCGACAACA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0126-F	AGGAGGCTGCTAGGGCTTAC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0126-R	ACTAGCAGACTGCCGAAAA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0351-F	GAATATGCGGGGAGATAAG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0351-R	AATCACATGAATGGATGCAAA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0241-F	ACACAACTTTGGGAAGACGG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0241-R	GTAGGGACTTGGCTGTCAGG	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0402-F	ACGACTGGAGCAGGTGAAAC	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0402-R	CAAGTTTGTGCAAGGCTGA	4	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0463-F	TTGGGTTTCAGGAAAGACCAC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0463-R	CTCAAAACGTCGTCGTCAGA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK1425-F	CCGACGAAACCTTGTACTG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK1425-R	GTATTCGGTTTCCACGATGC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M6982-F	GCACCGTTGAGTCGGGTA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M6982-R	AGAACGGATCCGTCCAATCT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0157-F	CGGACAATGCTGATGTATCC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0157-R	AAATTCAAATGCTATCGGGC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0024-F	CTTGCTGACAGAATGCCAGA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0024-R	TCTCTCCACTCCATGATCC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M4241-F	GTACTTTTACTTGCCGAGAAGCC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M4241-R	GTGGCCATACATATATAGCAACCA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M6982-F	GCACCGTTGAGTCGGGTA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M6982-R	AGAACGGATCCGTCCAATCT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE3164-F	CTTCGGTCTGGAGAGTGGTC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE3164-R	CAGAGGCCTCCCAAATATCA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE3180-F	CCAGCTATGTGGGACCCTAA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE3180-R	CCAACAGCCCAACACACTTT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK1425-F	CCGACGAAACCTTGTACTG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LK1425-R	GTATTCGGTTTCCACGATGC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSM11140-F	GAAAACCTCCATTACG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLSM11140-R	ATCAGACTAGGAAACAAGACT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig2031-F	AGTGTATTTCATCTTCGTCAT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig2031-R	ATTCTCTTTATTTATAGTCATCT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig13351-F	ATAACTAAATGATGGAAGAAAG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA

CLX_S3_Contig13351-R	GAAACAGTTATGCATGGGAATCA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig15074-F	CGTGTTCGGGGTCTCTCC	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig15074-R	GACGCATTTTTCTCCATTATTTTT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig2349-F	CCACAATTCCTCTTCTCACTCCAT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
CLX_S3_Contig2349-R	TGTATCAGCTTCCACCATCCT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M1981-F	GCAAGATGTTGACCAAGTCG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
M1981-R	CGTGGTCAAACACACCAAAA	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE-3180-F	TCTAAGGGGTGTGATCTGG	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE-3180-R	CCAACAGCCCAACACTTT	7	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0414-F	CGATTGGGAACACATGTCAG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0414-R	TCCTAAAGAACCACGCAACG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0387-F	TCGATTCCAAGGTCATTGTG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0387-R	TTCAACTCCCCTAGGCAATG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0388-F	AAACTGAGTTACGGTTGATAATGG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0388-R	AAAGTTCGATCCCGAACTAAGA	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0248-F	TGCCGATTCATATGGTGTTT	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0248-R	TTGAAAGTCCACAACCACA	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0395-F	GCGTGATGTCGCTTTGTTAAT	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0395-R	ACAGTGAGTGTGTCGCAAGG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0206-F	GTTCTTGGCTGGAAGTCTG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0206-R	TTGCCCTTGGTAAAAGTCAT	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LM0035-F	TCCTGATCCCAACAACAGTG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LM0035-R	AGGGGGTCGAAAAACAAT	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0225B-F	TTGCAACTTGATACCGCAAA	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0225B-R	TACAGTGGTTGGATGTGGGA	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0457-F	GAGGCATGTGGAAGACGAC	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0457-R	GCAAGCTCTTCGTACCCTTG	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0178-F	TTGCTGACATAAGAGAAGTTTCAA	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA
LE0178-R	ATGTGACAGCAGCCCTTCT	8	http://cgpdb.ucdavis.edu/GeneticMap	RGA

Tabela 3-2. Resultados das buscas (via o algoritmo BLAST) de identidade das sequências dos amplicons derivados de um subgrupo de *primers* empregados, visando identificar marcadores ligados e/ou genes candidatos associados com a resistência a FOLAC raça 1 em alface. Esses marcadores foram derivados de sequências do tipo *Resistance gene analogs* (RGAs) estão dispersos em cinco dos principais MRCs (*major resistance clusters*) do genoma da alface localizados nos cromossomos (Cr.)/grupos de ligação 1, 2, 4, 7 & 8.

Cr	Código dos primers	Identidade Blast	Temp. anel.
1	LE0261	Leucine-rich repeats (LRRs)	60 °C
1	LE0243	Leucine-rich repeats (LRRs)	62 °C
1	LE0229		60 °C
1	LE0193		60 °C
1	M1120		52 °C
1	LE0187		60 °C
1	LE0427		52 °C
1	LK0005	RVK resistance protein candidate gene	60 °C
1	LK0005	RVK resistance protein candidate gene	52 °C
1	CLR9010	flowering locus T (FT) gene	56 °C
1	CLRY-2600	Guasihong cellulase (CEL1) mRNA	58 °C
1	CLSM-741	NBD_sugar-kinase_HSP70-actin	54 °C
1	CLS3769	NBS-LRR resistance-like protein 4W gene	54 °C
1	CLSY4446	Chloroplast ndhF gene for NADH dehydrogenase subunit F	54 °C
1	CLX_S3_Contig1828	Resistance protein RGC2 (RGC2) gene	54 °C
1	CLX_S3_Contig9641-2Ve 2G	LsGID1B mRNA for GA Insensitive Dwarf1 B (Lipoxygenase)	54 °C
1	CLX_S3_Contig9641-3Ve 3G	Arginine methyltransferase 6 mRNA (Lipoxygenase)	54 °C
1	CLX_S3_Contig9641-Ve G	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid (Lipoxygenase)	54 °C
1	QGF17/06	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid (Cap-N super family)	60 °C
1	CLX_S3_Contig3390	Flowering locus T (FT) gene	54 °C
1	CLX_S3_Contig8398 3V e 3 C	Flowering locus T (FT) gene	66 °C
1	CLX_S3_Contig8398-5V e 5G	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid	62 °C
1	CLX_S3_Contig8398-6V e 6 G	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	58 °C
1	CLX_S3_Contig8398	Resistance protein candidate RGC2B (RGC2B) gene,	50 °C
1	CLX_S3_Contig8409	Bushy growth protein mRNA	50 °C
1	CLX_S3_Contig9834	Protein, cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	54 °C
1	CLX_S3_Contig10397	Lactuca sativa clone TM10 resistance protein RGC2 (RGC2)	54 °C
1	LE 172	NBS-LRR resistance-like protein RGC1G gene	62 °C
1	LserNBS03	Clone TDM resistance protein RGC2 (RGC2) gene	66 °C
1	M1730	Microsatellite LSSB56 sequence	66 °C
1	LE1040	tRNA-Lys gene, photosystem II D1 protein (psbA) gene,	52 °C
1	LK1117	Microsatellite LSSB57-1	54 °C
2	LE0238	Resistance protein candidate RGC2C (RGC2C) gene	52 °C
2	LR0049	Resistance protein candidate RGC2S (RGC2S) gene	52 °C

2	LR0035		58 °C
2	LE0314	Hs1pro-1 protein C-terminus	58 °C
2	LE0115		60 °C
2	LR0031		58 °C
2	LR0029	Resistance protein candidate RGC2J (RGC2J) gene	58 °C
2	LR0089		60 °C
2	CLX_S3_Contig14182	Flowering locus T (FT) gene	50 °C
2	CLX_S3_Contig3045	Clone TDH resistance protein RGC2 (RGC2) gene	60 °C
2	CLX_S3_Contig4455	TDM resistance protein RGC2 (RGC2) gene	58 °C
2	CLX_S3_Contig11288	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	60 °C
2	CLX_S3_Contig12930	15-cis-zeta-carotene isomerase mRNA	60 °C
4	LE0491	NB-ARC domain	60 °C
4	LE0189B	Leucine Rich repeats	50 °C
4	LE0279		52 °C
4	LE0053		50 °C
4	LE0337	PP01_KFDV superfamily-	58 °C
4	LE0126	DNA-binding domain (APETALA2)	56 °C
4	LE0351	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	56 °C
4	LE0241		54 °C
4	LE0402		50 °C
7	M4241	TDH resistance protein RGC2 (RGC2) gene	62 °C
7	LE3164		58 °C
7	LE0024		62 °C
7	LE3180	Phosphate-induced protein 1 conserved region	62 °C
7	LE0157	Dolichyl -phosphate-mannose-protein mannosyltransferase.	60 °C
7	M6982		62 °C
7	LE0463	NB-ARC domain	62 °C
7	CLSM11140	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase mRNA	58 °C
7	M1981	Clone 6-1 putative cellulose synthase (CesA) gene	54 °C
7	CLX_S3_Conting2031	Flowering locus T (FT) gene	54 °C
7	CLX_S3_Conting2349	Flowering locus T (FT) gene	62 °C
7	CLX_S3_Conting15074	Cysteine-rich RLK, nine-cis-	60 °C
8	LE414	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	54 °C
8	LE0387		54 °C
8	LE0388		54 °C
8	LE0248		50 °C
8	LE0395		60 °C
8	LE0225B	Cysteine-rich RLK, nine-cis-epoxycarotenoid	54 °C
8	LE0457		60 °C
8	LE0178	RVK resistance protein candidate gene	54 °C
8	LM0035		52 °C

Tabela 3-3. Recombinantes encontrados na análise dos marcadores moleculares testados em indivíduos da população F₂ de alface.

Cromossomos	Marcadores	Recombinantes	%
8	LE0395	17/70	24
7	LE3164	26/52	50
8	LM0035	33/82	40
4	LE0337	10/16	62
4	LE0351	10/26	38
7	M4241	18/28	64

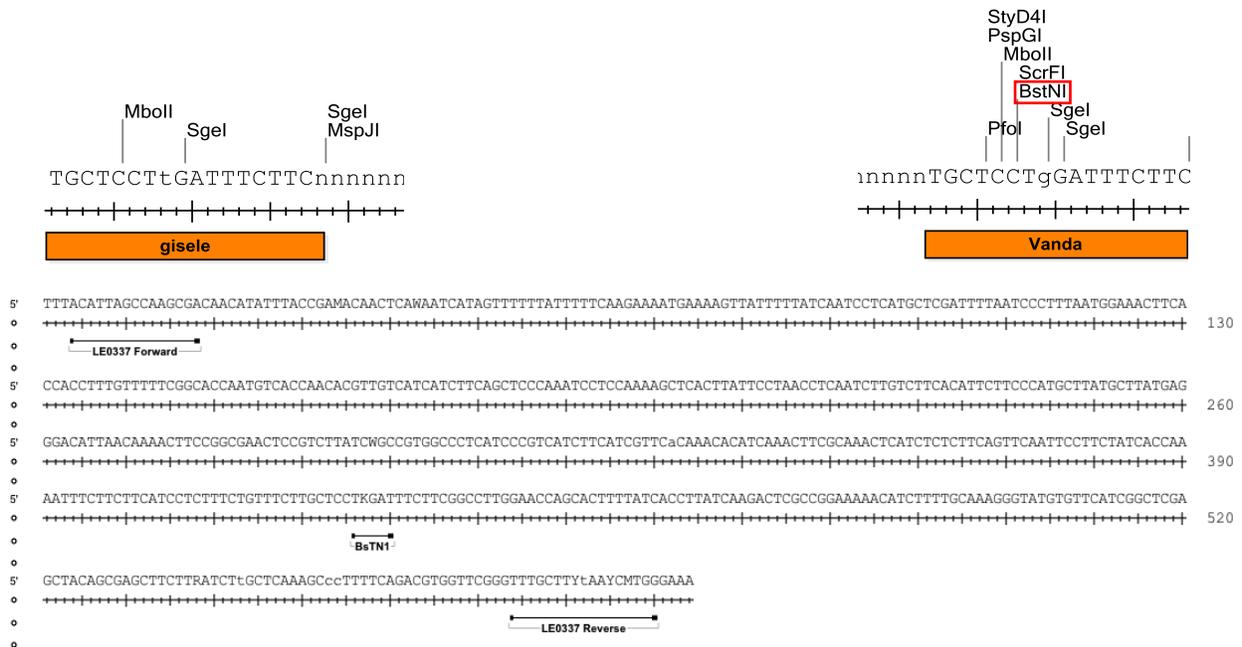


Figura 3-3. Desenho de um marcador CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) baseado na sequência obtida pela amplificação com o primer LE0337. Abaixo a sequência obtida após amplificação da cultivar de alface (*Lactuca sativa* L.) ‘Vanda’ com o sítio de restrição da enzima *Bst*N1. Acima o segmento mostrando o mapa de restrição para o amplicon de ‘Vanda’ (com *Bst*N1) e ‘Gizele’ (sem *Bst*N1).

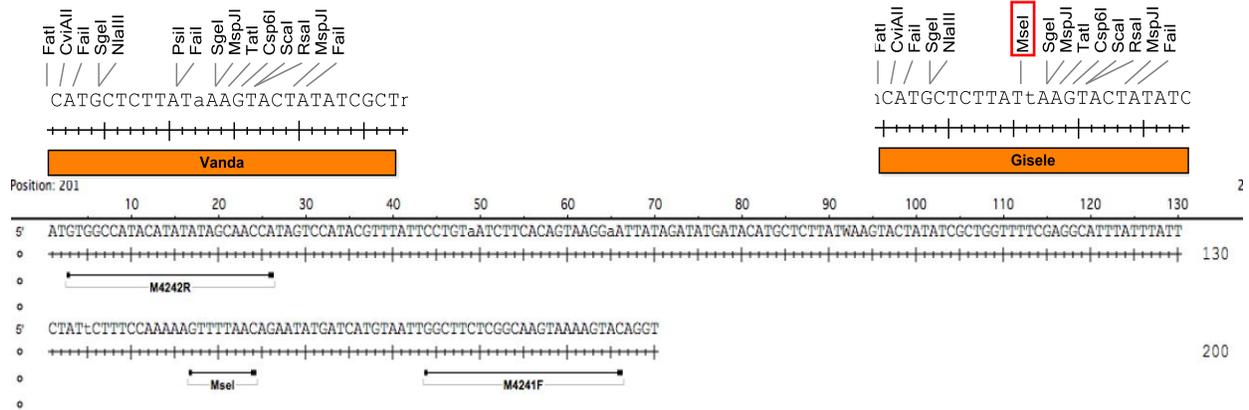


Figura 3-4. Desenho de um marcador CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) baseado na sequência obtida pela amplificação com o primer M4241. Abaixo a sequência obtida após amplificação da cultivar de alface (*Lactuca sativa* L.) ‘Gizele’ com o sítio de restrição da enzima *MseI*. Acima o segmento mostrando o mapa de restrição para o amplicom de ‘Vanda’ (sem *MseI*) e ‘Gizele’ (com *MseI*).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEX, C.F. 1999. Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. Ph.D. Thesis. University of Wisconsin. Wisconsin, Madison.
- AGRAMA, H.A.; EIZENGA, G.C. & YAN, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Molecular Breeding* 19:341–356.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- ARUGA, D.; TSUCHIYA, N.; MATSUMURA, H.; MATSUMOTO, E. & HAYASHIDA, N. 2012. Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* 187:1–9.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N. & SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting analyses in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:32–38.
- CABRAL, C.S.; SUINAGA, F.A.; REIS, A.; FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 2015. Herança da resistência à murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em um acesso de alface crespa. In: 8^o Congresso de Melhoramento de Plantas, Goiânia, CD-ROM.
- CHRISTOPOULOU, M.; MCHALE, L.K.; KOZIK, A.; REYES-CHIN WO, S.; WROBLEWSKI, T. & MICHELMORE, R.W. 2015a. Dissection of two complex clusters of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:751–765
- CHRISTOPOULOU, M.; REYES-CHIN WO, S.; KOZIK, A.; MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; WROBLEWSKI, T.; & MICHELMORE, R.W. 2015b. Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 5:2655–2669.
- COLLARD, B.C.Y. & MACKILL, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:557–572.
- ELLIS, P.; MCCLEMENT, S.; SAW, P.; PHELPS, K.; VICE, W.; KIFT, N.; ASTLEY, D. & PINK, D. 2002. Identification of sources of resistance in lettuce to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. *Euphytica* 125:305–315.

- FUKUDA M.; MATSUO, S.; KIKUCHI, K.; KAWAZU, Y.; FUJIYAMA, R. & HONDA, I. 2011. Isolation and functional characterization of the FLOWERING LOCUS T homolog, the LsFT gene, in lettuce. *Journal of Plant Physiology* 168:1602–1607.
- JEUKEN, M.; VAN WIJK, R.; PELEMAN, J. & LINDHOUT, P. 2001. An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* × *L. saligna* F₂ populations. *Theoretical and Applied Genetics* 103:638–647.
- HAYES, R.; SIMKO, I.; MOU, B. & MCCREIGHT, J.D. 2010. Lettuce breeding, USDA-ARS. California leafy greens research program, calgreens.org/control/uploads/2009-10_CLRBP_-_USDA_final_report.pdf.
- HAYES, R.J.; TRENT, M.A.; MOU, B.; SIMKO, I.; GEBBEN, S.J. & BULL, C.T. 2014. Baby leaf lettuce germplasm enhancement: developing diverse populations with resistance to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *HortScience*, 49:18–24.
- HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; VOS, P.; KESSELI, R. & MICHELMORE, R.W. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1202–1210.
- HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J. & VICK, B.A. 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica* 144:225–235.
- HULBERT, S. H. & MICHELMORE, R.W. 1985. Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 70:520–528.
- JEUKEN, M. & LINDHOUT, P. 2002. *Lactuca saligna*, a non-host for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*), harbors a new race-specific *Dm* gene and three QTLs for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 105:384–391.
- JOHNSON, W.C.; JACKSON, L.E.; OCHOA, O.; VAN WIJK, R.; PELEMAN, J., CLAIR, D. S. & MICHELMORE, R.W. 2000. Lettuce, a shallow-rooted crop, and *Lactuca serriola*, its wild progenitor, differ at QTL determining root architecture and deep soil water exploitation. *Theoretical and Applied Genetics* 101:1066–1073.
- KESSELI, R.V. & MICHELMORE, R.W. 1986. Genetic variation and phylogenies detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. *Journal of Heredity* 77:324–331.
- KESSELI, R.; OCHOA, O. & MICHELMORE, R.W. 1991. Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome* 34:430–436.

- KESSELI, R.V.; PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1994. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics* 136:1435–1446.
- KUANG, H.; WOO, S.S.; MEYERS, B.C.; NEVO, E. & MICHELMORE, R.W. 2004. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell* 16:2870–2894.
- KWON, S.; SIMKO, I.; HELLIER, B.; MOU, B. & HU, J. 2013. Genome-wide association of 10 horticultural traits with expressed sequence tag-derived SNP markers in a collection of lettuce lines. *The Crop Journal* 1:25–33
- LANDRY, B. S.; KESSELI, R. V.; FARRARA, B. & MICHELMORE, R. W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116:331–337.
- MAISONNEUVE, B.; BELLEC, Y.; ANDERSON, P. & MICHELMORE, R.W. 1994 Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* 89:96–104.
- McHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; KOZIK, A.; LAVELLE, D.O.; OCHOA, O.E.; WROBLEWSKI, T.; KNAPP, S.J. & MICHELMORE, R.W. 2009. The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 118:565–580.
- MICHELMORE, R.W. 2010. Genetic variation in lettuce. California leafy greens research program, [calgreens.org/control/uploads/Michelmore_Variation_report_2009-2010_final_\(2\)1.pdf](http://calgreens.org/control/uploads/Michelmore_Variation_report_2009-2010_final_(2)1.pdf)
- MEYERS, B.C.; CHIN, D.B.; SHEN, K.A.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; LAVELLE, D.O.; ZHANG, Z. & MICHELMORE, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817–1832.
- MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H. & MICHELMORE, R.W. 2003. Genome -wide analysis of NBS-LRR encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809–834.
- MORENO-VÁZQUEZ, S.; OCHOA, O.E.; FABER, N.; CHAO, S.; JACOBS, J.M.E.; MAISONNEUVE, B.; KESSELI, R.V. & MICHELMORE, R.W. 2003. SNP-based codominant markers for a recessive gene conferring resistance to corky root rot (*Rhizomonas suberifaciens*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genome* 46:1059–1069.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUÁN, R.; DUBRANA, M.P.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C. & LEGALL, O. 2003. The

eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, 132:1272–1282.

- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985–993.
- PARRA, L.; MAISONNEUVE, B.; LEBEDA, A.; SCHUT, J.; CHRISTOPOULOU, M.; JEUKEN, M.; MCHALE, L.; TRUCO, M.J.; CRUTE, I. & MICHELMORE, R. 2016. Rationalization of genes for resistance to *Bremia lactucae* in lettuce. *Euphytica* 1–18.
- PELEMAN, J.D.; ROUPPE, VAN DER. VOORT, J.R. 2003. The challenges in marker assisted breeding. *In: van Hintum THJL.; Lebeda, A.; Pink, D. & Schut, J.W. (eds.). Eucarpia Leafy Vegetables. CGN. Noorwijkerhout. The Netherlands. p. 125–130.*
- PIN, P.A. & NILSSON, O. 2012. The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant, Cell & Environment* 35:1742–1755.
- RAUSCHER, G. & SIMKO, I. 2013. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biology* 13: 1.
- ROBBINS, M. A.; WITSENBOER, H.; MICHELMORE, R. W.; LALIBERTE, J. F. & FORTIN, M. G. 1994. Genetic mapping of turnip mosaic virus resistance in *Lactuca sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 583–589.
- SANTOS, J.R.M. 1996. Methodology for screening tomato to Fusarium wilt, Verticillium wilt, gray leaf spot, early blight, and Septoria leaf spot. *In: Proceedings of the International Symposium on Tropical Tomato Diseases. Recife PE, Brazil. pp. 164–166.*
- SHEN, K. A.; CHIN, D. B.; ARROYO-GARCIA, R.; OCHOA, O. E.; LAVELLE, D. O.; WROBLEWSKI, T.; MEYERS, B. C. & MICHELMORE, R. W. 2002. Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:251–261.
- SIMKO, I.; JANSKY, S.; STEPHENSON, S. & SPOONER, D. 2007. Genetics of resistance to pests and disease. *In: Vreugdenhil, D.; Bradshaw, J.; Gebhardt, C.; Govers, F.; Taylor, M.; MacKerron, D. & Ross, H. (eds.). Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Elsevier.Oxford. UK. p. 117–155.*
- SIMKO, I. 2009. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100:256–262.

- SIMKO, I.; RAUSCHER, G.; SIDEMAN, R.G.; MCCREIGHT, J.D. & HAYES, R.J. 2014. Evaluation and QTL mapping of resistance to powdery mildew in lettuce. *Plant pathology* 63:344–353.
- SIMKO, I.; OCHOA, O. E.; PEL, M.A.; TSUCHIDA, C.; FONT I FORCADA, C.; HAYES, R.J. TRUCO, M.J.; ANTONISE, R.; GALEANO, C.H. & MICHELMORE, R.W. 2015. Resistance to downy mildew in lettuce ‘La Brillante’ is conferred by dm50 gene and multiple QTL. *Phytopathology* 105:1220-1228.
- STOFFEL, K.; VAN LEEUWEN, H.; KOZIK, A.; CALDWELL, D.; ASHRAFI, H.; CUI, X.; TAN, X.; HILL, T.; REYES-CHIN-WO, S.; TRUCO, M.J.; MICHELMORE, R.W. & VAN DEYNZE, A. 2012. Development and application of a 6.5 million feature Affymetrix Genechip[®] for massively parallel discovery of single position polymorphisms in lettuce (*Lactuca* spp.). *BMC Genomics* 13:185.
- SUZUKI, Y.; YASUI, T.; MATSUKURA, U. & TERAOKA, J. 1996. Oxidative stability of bran lipids from rice variety [*Oryza sativa* (L)] lacking lipoxygenase-3 in seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3479–3483.
- SYED, N.H.; SØRENSEN, A.P.; ANTONISE, R.; VAN DE WIEL, C.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN’TWESTENDE, W.; HOOFTMAN, D.A.P.; NIJS D.E.N, H.C.M. & FLAVELL, A. 2006. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112:517–527.
- TRUCO, M.J.; ANTONISE, R.; LAVALLE, D.; OCHOA, O.; KOZIK, A.; WITSENBOER, H.; FORT, S.B.; JEUKEN, M.J.W.; KESSELI, R.V.; LINDHOUT, P.; MICHELMORE, R.W. & PELEMAN, J. 2007. A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 115:735–746.
- TRUCO, M.J.; ASHRAFI, H.; KOZIK, A.; LEEUWEN, H.V.; BOWERS, J.; CHIN WO, SR.; STOFFEL, K.; XU, H.; HILL, T.; DEYNZE, A.V. & MICHELMORE, R.W. 2013. An ultra-high-density, transcript-based, genetic map of lettuce. *G3. Genes/Genome/Genetics* 3:617–631.
- TRUONG, H.T.; RAMOS, A.M.; YALCIN, F.; DE RUITER, M.; VAN DER POEL, H.J.A.; HUVENAARS, K.H.J.; HOGERS, R.C.J.; VAN ENCKEVORT, L.J.G.; JANSSEN, A.; VAN ORSOUW, N.J. & VAN EIJK, M.J.T. 2012. Sequence-based genotyping for marker discovery and codominant scoring in germplasm and populations. *Plos One* 7:e37565.
- UMATE, P. 2011. Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Signaling & Behavior* 6:335–338.
- VAN DER VOSSEN, E.A.G.; VAN DER VOORT, J.N.; KANYUKA, K.; BENDAHMANE, A.; SANDBRINK, H.; BAULCOMBE, D.C.; BAKKER, J.; STIEKEMA, W.J. & KLEIN-

- LANKHORST, R.M. 2000. Homologues of a single resistance gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal* 23:567–576.
- VAN DE WIEL, C.; ARENS, P. & VOSMAN, B. 1999. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome* 42:139–149.
- WANG, Y.; LU, H. & HU, J. 2016. Molecular mapping of high resistance to bacterial leaf spot in lettuce PI 358001-1. *Phytopathology* 106:1319–1325.
- WAYCOTT, W.; FORT, S. B.; RYDER, E. J. & MICHELMORE, R. W. 1999. Mapping morphological genes relative to molecular markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Heredity* 82: 245–251.
- WITSENBOER, H.; KESSELI, R; FORTIN, M.; STANGHELLINI, M. & MICHELMORE, R.W. 1995. Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to three pathogens in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 91:178-188.
- WROBLEWSKI, T.; CALDWELL, K.S.; PISKUREWICZ, U.; CAVANAUGH, K.A., XU, H.; KOZIK, A.; OCHOA, O.; MCHALE, L.K.; LAHRE, K.; JELENSKA, J.; CASTILLO, J.A.; BLUMENTHAL, D.; VINATZER, B.A.; GREENBERG, J.T. & MICHELMORE, R.W. 2009. Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. *Plant Physiology* 150:1733–1749.
- ZHAO, K.; TUNG, C.; EIZENGA, G.; WRIGHT, M.; ALI, M.; PRICE, A.; NORTON, G.; ISLAM, M.; REYNOLDS, A.; MEZEY, J.; MCCLUNG, A.; BUSTAMANTE, C. & MCCOUCH, S. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communications* 2: 467.

CAPÍTULO 4

Emprego da estratégia de *genotyping-by-sequencing* (GBS) visando identificar regiões genômicas ligadas à resistência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface

Emprego da estratégia de *genotyping-by-sequencing* (GBS) visando identificar regiões genômicas ligadas à resistência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das principais hortaliças folhosas cultivadas no mundo. A produção de alface é severamente afetada pela murcha de fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1. A cultivar ‘Vanda’ foi identificada como uma das mais estáveis fontes de resistência a isolados de FOLAC raça 1. No entanto, marcadores moleculares ligados à resistência em ‘Vanda’ ainda não estão disponíveis impedindo a determinação de sua localização cromossômica. A disponibilidade de marcadores ligados à resistência a murcha de fusário pode facilitar consideravelmente o melhoramento através da seleção assistida por marcadores (SAM). No presente estudo, a técnica de *genotyping-by-sequencing* (GBS) foi utilizada na busca de polimorfismos de base única (SNPs) em uma população F₂ (n = 82) desenvolvida a partir do cruzamento entre a cultivar ‘Gizele’ (suscetível) e ‘Vanda’ (resistente). Plantas F₂ e F₃ foram fenotipadas para resistência a FOLAC raça 1. Dois QTLs de efeito maior, explicando 30 a 40% da variação fenotípica observada na população F₃ e F₂, respectivamente, foram localizados no cromossomo 9 em uma região que co-segrega com fatores de resistência descritos para murcha de verticílio e míldio. Um QTL de efeito menor (explicando 0.06 % da variação fenotípica na população F₃) foi identificado no cromossomo 4 em uma região que co-segrega com um dos genes de resistência ao míldio (*Dm4*). Este estudo estabelece que o principal *locus* de resistência presente na cultivar ‘Vanda’ está localizado na porção mediana do cromossomo 9. Marcadores em proximidade com esses QTLs são candidatos para o desenvolvimento de ferramentas de SAM em programas de melhoramento genético.

Palavras chave: Resistência, marcadores, QTLs, seleção assistida.

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most cultivated leafy vegetables around the world. In tropical and subtropical areas, the lettuce production has been severely affected by the Fusarium wilt disease caused by physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC). The cultivar Vanda has been identified as one of the most stable sources of resistance to isolates of FOLAC race 1. However, molecular markers linked to resistance factors derived from this cultivar are not yet available, preventing the determination of its chromosomal location. The availability of markers linked to resistance to fusarium wilt can facilitate lettuce breeding via marker assisted selection (MAS). In the present study, the genotyping by sequencing (GBS) approach was used in a search for single base polymorphisms (SNPs) linked to FOLAC race 1 resistance using an F₂ population (n = 82) and F₃ mapping populations from the cross between Gizele (susceptible) and Vanda (resistant). Plants were phenotyped for their reaction to FOLAC race 1 employing standard bioassays. Two major effect QTLs located on chromosome 9 could explain 30 and 40% of the phenotypic variation observed in F₃ and F₂ generations, respectively. This region on chromosome 9 encompasses previously reported resistance factors to verticillium wilt and downy mildew. One QTL with minor effect (0.06% of the phenotypic variation in the population F₃) was also identified on chromosome 4, colocalizing with region encompassing the downy mildew resistance gene *Dm4*. This study establishes that a major resistance locus to FOLAC race 1 resistance in the cultivar 'Vanda' is more likely to be located in the central region of the chromosome 9. Markers in close proximity to these QTLs are candidates for the development of MAS tools for use in lettuce breeding programs.

Keywords: Resistance, QTL, marker assisted selection, breeding.

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é comercialmente produzida no Brasil e em muitos países ao redor do mundo, fazendo com que a cultura seja a mais popular do grupo de plantas folhosas. A alface é uma espécie de autopolinização pertencente à família Asteraceae, é diploide ($2n=2x=18$) e apresenta um genoma de grande tamanho (2.7 Gb), um dos maiores genomas caracterizados entre as espécies de plantas cultivadas (Arumuganathan & Earle, 1991; The Lettuce Genome Sequencing Consortium, <http://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>).

A murcha de fusário, causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC), é uma das doenças mais importantes da cultura de alface, acarretando perdas de produção em diferentes regiões do mundo (Scott *et al.*, 2012). Esse patógeno de solo coloniza as raízes e invade o sistema vascular, causando amarelecimento, murcha e posterior morte da planta. A disseminação ocorre pelo vento, chuva e fatores ambientais por meio da movimentação do solo infestado ou sementes.

As quatro raças fisiológicas de FOLAC atualmente caracterizadas (1, 2, 3 & 4) são definidas com base na reação em cultivares diferenciais de alface (Fujinaga *et al.*, 2003). A raça 1 é a que apresenta a mais ampla distribuição geográfica, sendo detectada na Itália, Japão, Portugal, Taiwan, Irã, Estados Unidos e Brasil (Pasquali *et al.*, 2003, 2007; Ventura & Costa, 2008; Cabral, 2012). O Japão é o único país onde a presença de três raças distintas (1, 2 & 3) foi relatada (Fujinaga *et al.*, 2001, 2003; Yamauchi *et al.*, 2004). Mais recentemente, uma nova raça (= raça 4) foi caracterizada, estando restrita apenas a Holanda (Gilardi *et al.*, 2016).

O emprego de cultivares resistentes oferece a melhor solução para o controle da murcha de fusário. Fontes de resistência estáveis e duráveis foram identificadas e podem ser usadas em programas de melhoramento genético (Cabral *et al.*, 2013). Entretanto, os processos clássicos de

avaliação e caracterização de novos genótipos para resistência demanda muito tempo, espaço físico e infraestrutura de laboratório e telados. Assim, a disponibilidade de marcadores moleculares em estreita ligação com *loci* de resistência é de grande importância para aumentar a escala e eficiência do melhoramento da alface.

Nos últimos anos, o uso de marcadores moleculares tem acelerado o melhoramento de plantas em uma série de características, incluindo resistência a doenças e insetos (**Tester *et al.*, 2010**). A disponibilidade de mapas genéticos densos tem facilitado a seleção assistida por marcadores, clonagem posicional de genes de resistência e mapeamento de *loci* de características quantitativas (QTLs) de interesse agrônomico em muitas culturas (**Collard *et al.*, 2005; McPhee *et al.*, 2012**).

Em alface, a resistência genética à murcha de fusário causada por isolados de FOLAC raça 2 foi caracterizada como sendo controlada por um gene dominante (*locus RRD2*) (**Aruga *et al.*, 2012**). No entanto, em relação ao FOLAC raça 1, observou-se que a resposta de resistência é controlada por múltiplos fatores genéticos, dependendo da fonte de resistência empregada. Estudos realizados nos Estados Unidos mostraram uma herança quantitativa com a presença de diversos QTLs em diferentes regiões genômicas (**Michelmore *et al.*, 2010; Truco *et al.*, comunicação pessoal**). Todavia, estudos mais recentes, com a cultivar de alface crespa ‘Vanda’, indicaram um controle da resistência mediado por um locus monogênico, dominante e com penetrância elevada (**Cabral *et al.*, 2015, Ver capítulo 2**).

Várias ferramentas genômicas e recursos genéticos estão hoje disponíveis para o melhoramento da alface, permitindo uma análise mais detalhada de genes de interesse. Muitas características agrônomicas foram posicionadas em um mapa genético integrado (**Truco *et al.*, 2013**), o que facilita uma análise global de genes resistência a doenças em alface. A maioria dos genes candidatos de resistência (*Resistance Gene Candidates* – RGCs) identificados apresenta

motivos ou domínios ricos em códons codificadores do aminoácido leucina (LRR) que podem estar isolados ou em combinação com sítios de ligação a nucleotídeos (NBS-LRR) ou ainda em combinação com motivos de transmembrana (TM-LRR) (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Os domínios NBS-LRR podem apresentar organizações estruturais ainda mais complexas tais como TIR (*Toll interleucine receptor*)-NBS-LRR (sigla TNL) ou não TNL/*coiled-coil*-NBS-LRR (sigla CNL). Da mesma forma, o grupo TM-LRRs pode ser dividido em duas classes: receptores do tipo quinase (*Receptor-like kinases* – RLKs) ou proteínas do tipo receptoras (RLPs) (Sekhwal *et al.*, 2015).

Após uma descrição detalhada da arquitetura genômica da alface feita por **McHale et al., 2009** e **Christopoulou et al. (2015a,b)**, o atual mapa de referência contém 36 loci associados com fenótipos de resistência e 20 QTLs para 10 agentes patogênicos e uma para insetos. Trinta e quatro dos 36 fenótipos de resistência co-segregam com genes relacionados à defesa (**McHale et al., 2009**). Além disso, uma versão preliminar (*draft*) englobando 2.4 Gb do genoma de referência de *L. sativa* cv. ‘Salinas’ está agora disponível, juntamente com um mapa genético ultradenso contendo 1.460 genes candidatos organizados em supercontigs (= *scaffolds*) ordenados ao longo dos nove grupos de ligação (<http://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>; **R. W. Michelmore et al., comunicação pessoal**). Estudos sobre a diversidade genética de cultivares de alface indicam níveis elevados de polimorfismos, especialmente para cinco dos principais *clusters* de resistência (MRCs – *Major Resistance Clusters*) localizados nos cromossomos 1, 2, 3, 4, & 8 (**McHale et al., 2009; Truco et al., 2013; Christopoulou et al., 2015a,b**).

Muitos estudos têm empregado marcadores moleculares para aumentar a precisão na discriminação de acessos dentro coleções de germoplasma (**Wouw et al., 2011**). No entanto, o elevado custo das análises conduzidas em grande escala tem restringido a aplicação prática em programas de melhoramento de plantas. Novos desenvolvimentos nos métodos de genotipagem

baseados em *Next Generation Sequencing* (NGS) têm possibilitado enormes avanços na caracterização de genomas vegetais de forma viável e de baixo custo (**Deschamps et al., 2012; Bhatia et al., 2013**). O método de *genotyping-by-sequencing* (GBS), desenvolvido pela empresa Illumina, visa reduzir a complexidade nos processos de análise genômica (**Elshire et al., 2001; Deschamps et al., 2012; Bhatia et al., 2013**). O GBS é um método relativamente simples e rápido para gerar dados de SNPs quando comparado com os outros métodos de redução da complexidade de genoma, tais como *Reduced Representation Libraries* (RRL) e *Restriction Site Association DNA Sequencing* (RAD) (**Deschamps et al., 2012; Bhatia et al., 2013**).

A estratégia GBS tem uma ampla variedade de aplicações em uma gama de estudos genéticos incluindo, diversidade genômica, análises filogenéticas, desenvolvimento de marcadores moleculares em larga escala e identificação de regiões genômicas contendo genes candidatos e características quantitativas de interesse (QTLs). Em alface, esse conjunto de informações foi convertido em marcadores de interesse para sistemas aplicados de seleção de plantas superiores, combinando múltiplas características de interesse (**Truco et al., 2013**). Visando dar suporte aos programas de melhoramento de alface, o presente trabalho tem como objetivo identificar quais regiões do genoma de alface estão ligadas ao fator(es) de resistência a FOLAC raça 1 utilizando a estratégia GBS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Uso da estratégia de *genotyping-by-sequencing* (GBS) para identificar marcadores moleculares em uma população de mapeamento derivada do cruzamento entre ‘Gizele’ (suscetível) e ‘Vanda’ (resistente) visando definir as regiões genômicas ligadas à resistência à raça 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar regiões genômicas que controlam a resistência a FOLAC raça 1.
- Definir a posição cromossômica dos *loci* de resistência no mapa genético da alface.
- Ampliar as ferramentas moleculares disponíveis para a identificação de genes de resistência associados com os mecanismos genéticos que regulam essa interação planta – patógeno.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Parentais utilizados para a produção de populações segregantes – Foram utilizadas como parentais para geração das populações de mapeamento genético as cultivares do segmento crespa, sendo ‘Vanda (Empresa Sakata Seed Sudamerica)’ o parental resistente a FOLAC raça 1 e ‘Gizele’ (comercializada no Brasil pela Empresa Topseed) como o parental suscetível a essa raça.

3.2. Caracterização fenotípica das linhagens parentais e populações segregantes – Oitenta e dois (82) indivíduos da população F₂ do cruzamento entre ‘Gizele’ x ‘Vanda’ foram utilizados nas análises de ligação. Para confirmar os genótipos dos indivíduos da F₂, 9 a 16 plantas da população F₃ foram avaliadas. Essas duas populações foram utilizadas para fenotipagem da resistência a doença. O teste de resistência a FOLAC raça 1 foi realizado como descrito por **Cabral et al. (2013)**. A severidade da doença foi avaliada 20 dias após a inoculação de acordo com a escala de notas adaptada de **Santos (1996)**, sendo 1= plantas sem sintomas; 2 = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; 3 = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; 4 = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; 5 = plantas

mortas. Com base nas notas recebidas, as plantas foram arbitrariamente classificadas como resistentes ($R \leq 2$) ou suscetíveis ($S > 2$). Para o mapeamento de QTL, utilizaram-se as notas de severidade das populações F_2 e F_3 (designadas como [F2_RS_(1) e F2_RS_(2)], [F3_RS_(1) e F3_RS_(2)], com notas: 1 e/ou 2 para plantas resistente e 5 para suscetíveis. Na população F_3 empregou-se as médias da avaliação de 9 a 16 plantas.

3.3. Extração de DNA de genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes – As amostras foliares foram coletadas dez dias após a inoculação e mantidas em casa de vegetação. O DNA foi extraído individualmente de cada planta das linhagens parentais e de indivíduos das populações segregantes de acordo com a metodologia de CTAB 2X com a incorporação de algumas modificações (**Boiteux et al., 1999**). Para confirmação da qualidade das amostras de DNA, alíquotas foram utilizadas em uma reação de PCR em condições previamente testadas. O resultado negativo da amplificação indicou a presença de inibidores da reação na maioria das amostras. Desta forma os DNAs foram re-purificados usando o kit Power Clean[®] Pro DNA Clean-up, seguindo os padrões recomendados pelo fabricante do kit (MO BIO Laboratories- Carlsbad, CA, USA). Após este procedimento a reação de PCR foi repetida, desta vez com sucesso, indicando que os inibidores de PCR foram retirados.

3.4. Preparação das bibliotecas e sequenciamento – O DNA de 82 indivíduos da população F_2 e dos dois parentais foram quantificados, normalizados, cortados com a enzima de restrição e ligados adaptadores com código de barras, seguindo o protocolo desenvolvido por **Poland et al. (2012)**. As bibliotecas foram feitas da seguinte forma: Em uma placa de 96 poços foram adicionados 5 μ L de adaptadores (**Elshire et al, 2011**) em cada poço. Em seguida utilizou-se o concentrador SpeedVac por 30 minutos para secar todo o conteúdo. Em seguida acrescentou-se 50 ng a 100 ng do DNA da alface e foi feita a concentração da placa da mesma forma anterior. Posteriormente foi realizada a digestão da seguinte maneira: O mix da reação constitui de 0,2 μ L

da enzima *AvaII*, 4 μL de tampão (CutSmart[®] Buffer_NEB), 35,8 μL de H₂O MilliQ, no total da reação de 40 μL . O tempo utilizado pela enzima foi de uma hora a temperatura constante de 37°C. Em seguida foi feita a ligação dos adaptadores as extremidades do inserto. A reação apresentou a seguinte composição: 5 μL de buffer ligase, 1 μL de T4 DNA ligase (New England Biolabs, NEB) e 4 μL de H₂O MiliQ, adicionando 10 μL em cada poço. A sequência de adaptadores contendo o barcode específico para cada amostra e o sítio de restrição comum para *AvaII* foi o recomendado pela Illumina e utilizado como rotina Centro de Genômica de UC Davis (Figura 4-1).

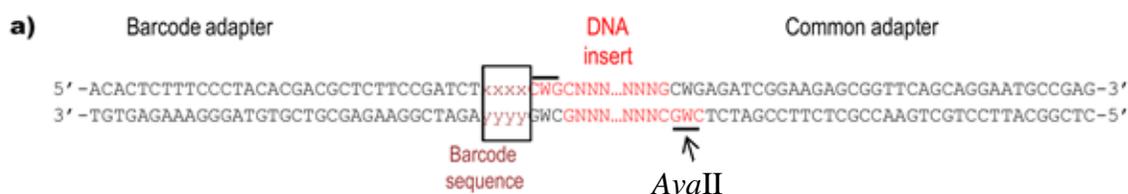


Figura 4-1. Sequência de adaptadores contendo o barcode específico para cada amostra e o sítio de restrição para *AvaII*.

As amostras foram incubadas a 22°C por uma hora e aqueceu-se a 65°C por 20 minutos para inativar a T4 DNA ligase. Após essa etapa retirou-se 5 μL de cada poço e adicionou-se 2.500 μL do CP buffer Omega Bio-Tek Cycle Pure Kit[®]. Uma alíquota de 500 μL de cada amostra foram colocados em uma membrana de sílica que foi posteriormente centrifugada a 1400 rpm por 1 minuto. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes. Depois colocou-se 50 μL do *ellution buffer* na membrana de sílica, incubou-se por 10 minutos e centrifugou-se a 1400 rpm por 1 minuto. Desses 50 μL de reação de ligação dos adaptadores, 12 μL foram utilizados na PCR (passo posterior). Foram adicionados aos 12 μL de DNA mais adaptadores, volumes de 25 μL do Taq Master Mix (NEB), 2 μL do par de *primers* (12,5 μM de cada primer): (A) 5'-AAT-

GAT-ACG-GCG-ACC-ACC-GAG-ATC-TAC-ACT-CTT-TCC-CTA-CAC-GAC-GC-TC-TTC-
CGA-TCT-3' (B) 5'-CAA-GCA-GAA-GAC-GGC-ATA-CGA-GAT-CGG-TCT-CGG-CAT-
TCC-TGC-TGA-ACC-GCT-CTT-CCG-ATCT-3' e 11 µL de H₂O Milli-Q. O ciclo de
amplificação consistiu de 72°C durante 5 minutos, 98°C por 30 segundos, seguido de 18 ciclos de
10 segundos para 98°C, 65°C por 30 segundos, para 72°C por 30 segundos com a etapa final de
extensão de 72°C por 5 minutos. Em seguida, o produto da PCR foi purificado com o *Bio-Tek
Cycle Pure kit* (Omega). Para tal adicionou-se 250 µL de CP Buffer para 50 µL de DNA. Os
tubos foram suavemente agitados e previamente centrifugados. Posteriormente adicionou-se as
amostras na coluna HiBind[®]DNA e foi realizada a purificação como se segue: Foi feita a
centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado e o tubo foi re-utilizado.
Adicionou-se 700 µL de DNA Wash Buffer, centrifugou-se novamente a 14000 rpm por 1
minuto e descartou-se o filtrado. Adicionou-se 700 µL de DNA Wash Buffer, centrifugou-se a
14000 rpm por 1 minuto e descartou-se o filtrado. A mini coluna HiBind[®]DNA vazia foi
centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos para secar. Transferiu-se a mini coluna HiBind[®]DNA
para um tubo de 1.5 mL e adicionou-se 30 µL de *Ellution Buffer* por 10 minutos. A qualidade e a
quantidade das bibliotecas foram mensuradas utilizando os aparelhos Quibit High Sensitivity
dsDNA kit (Invitrogen, USA) e o Bionalyzer DNA 1000 Chip (Agilent, USA). O total de DNA
utilizado foi entre 100 pg/µL a 10 ng/ µL. Em seguida, a biblioteca foi enviada para o Centro de
Genômica da UC Davis (UC Davis Genome Center, Davis, Califórnia, EUA) para o
sequenciamento (NGS) com Illumina Hi-seq 3000, utilizando quatro linhas do sequenciador e
com isso permitindo a corrida de várias amostras em uma mesma linha. Uma segunda biblioteca
de GBS foi constituída para incluir amostras que não tiveram bons resultados na primeira
biblioteca (baixo número de *reads*). Polimorfismos (SNPs) associados com os fenótipos
contrastantes foram identificados via análise genômica comparativa usando a plataforma de

bioinformática da UC Davis. O processamento eficiente desses dados das sequências de GBS foi feito via um *pipeline* de bioinformática, denominada *Tassel-GBS software* (**Bradbury et al., 2007; Glaubitz et al., 2014**).

3.5. Processamento das sequências e identificação dos SNPs – O processamento (*pipeline*) presente no *software* TASSEL (*Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage*) versão 3.0 (<http://www.maizegenetics.net/tassel>) foi desenvolvido para processar os dados de sequência do Illumina HiSeq 300 (**Glaubitz et al., 2014**). As etapas envolvendo esta *pipeline* foram executadas em *scripts* separados, utilizando diferentes ferramentas de *software* disponíveis publicamente (FASTQ, BWA, TBT e TOPM). Os SNPs foram filtrados utilizando TOPMtools baseado nos seguintes critérios: *proportion of taxa covered by TagLocus*, *Minimum minor allele frequency* (mnMAF) e *inbreeding coefficient* (mnF) e *missing data*. Para determinar o número de cópias e coordenadas genômicas, as *tags* sequências de cada indivíduo foram alinhadas com o genoma de referência de *L. sativa* cv. ‘Salinas’ (<http://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>; **R. W. Michelmore, comunicação pessoal**). Os indivíduos foram classificados como “A” quando homozigotos para o alelo parental feminino, “B” quando homozigotos para o alelo parental masculino e “H” quando heterozigotos.

3.6. Mapeamento de QTLs – Os dados de ligação foram obtidos utilizando o programa JoinMap 4.0 (**Van Ooijen, 2006**). O mapeamento foi realizado com seguintes limites: frequência de recombinação $< 0,4 \text{ LOD} > 1$. As frequências de recombinação foram convertidas para mapear distâncias em centimorgans (cM) usando a função Kosambi (**Kosambi, 1944**). A análise de QTL foi realizada usando o programa Win QTL Cartographer v. 2.5 (**Wang et al., 2005**). Os QTLs foram identificados utilizando *Composite Interval Mapping* (CIM) (Jansen & Stam, 1994). Os limites de significância estatística (LOD, *thresholds log likelihood ratio*) foram gerados para cada um dos caracteres utilizando análise de permutação baseada em 1000 permutações e 0,05 de

significância (Doerge & Churchill, 1996). Também foi calculado o percentual de variação fenotípica atribuída a cada QTL (R^2). Em seguida, os grupos de ligação foram desenhados com MapChart 2.2 (Voorrips, 2002), mostrando as posições dos QTLs no mapa genético.

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem de marcadores moleculares e mapeamento de QTLs – A genotipagem dos marcadores moleculares e a construção do mapa genético foi realizada utilizando 82 plantas F_2 do cruzamento entre ‘Gizele’ \times ‘Vanda’. Cada indivíduo genotipado usando o Illumina Hiseq 3000 produziu aproximadamente 4,5 milhões *reads* por amostra. Dez mil e dezessete (10.017) SNPs polimórficos foram identificados entre os parentais e validados na população segregante. Posteriormente, os dados genotípicos foram condensados em 1484 *scaffolds* ou supercontigs. Após filtragem baseado em *missing data* (<20%), teste do qui-quadrado (3:1 $p > 0,05$) e número de SNPs por *scaffold*. Quatrocentos e dezessete (417) *scaffolds* (Figura 4-2, 4-3) contendo polimorfismos foram selecionados para a construção do mapa de ligação.

4.2. Mapeamento do QTL – O mapa consistiu de 17 grupos de ligação, com um comprimento total de 1.133 cM. Os grupos de ligação 3, 4, 5, 7, 8 e 9 consistem de subgrupos LG 3a, LG 3b, LG 4a, LG 4b, LG 5a, LG 5b, LG 7a, LG 7b, LG 8a, LG 8b, LG 9a e LG 9b, respectivamente e o grupo de ligação 1 por 3 subgrupos (LG1a, LG1b e LG1c) (Tabela 4-1). A análise de QTL para resistência a FOLAC raça 1 foi realizado no mapa de ligação construído com os conjuntos de dados de severidade da doença. Somente o LOD scores nos cromossomos 4 e 9 mostraram picos que ultrapassaram o limite dos limiares (*thresholds*) estabelecidos (Figura 4-4), conforme calculado por Win QTL Cartographer v 2.5.

O QTL localizado no cromossomo 4a está entre os *scaffolds*: [Lsat_1_v5_g4_2792], [Lsat_1_v5_g4_673426], [Lsat_1_v5_g4_3422], [Lsat_1_v5_g4_1153], [Lsat_1_v5_g4_5355], [Lsat_1_v5_g4_1736], [Lsat_1_v5_g4_1100] e [Lsat_1_v5_g4_ Lsat_1_v5_g4_1990]. Esses *scaffolds* que cobrem este QTL contêm genes membros da família RGC12, classificados no grupo dos TNLs. Na população [F3_RS_(1), F3_RS_(2)], o LOD score e a percentagem de variação fenotípica (R^2) explicada pelo QTL foi de (LOD>5 e R^2 =0,06%, respectivamente) **(Figuras 4-5, 4-7; Tabela 4-2)**.

Dois QTLs foram detectados no cromossomo 9 com localização no *scaffold* [Lsat_1_v5_g9_108] **(Figuras 4-6, 4-7)**. Esse *scaffold* contêm genes pertencentes à família RGC12. Outro QTL foi posicionado nos *scaffolds* [Lsat_1_v5_g9_111 e Lsat_1_v5_g9_448] **(Figuras 4-6, 4-7)**. O LOD score e a percentagem de variação fenotípica (R^2) na população [F2_RS_(1) e F2_RS_(2)], foram: LOD > 5 e R^2 = 40%. Para a população [F3_RS_(1) e F3_RS_(2)], foram: LOD > 4 e R^2 = 30% **(Tabela 4-2)**.

Tabela 4-1. Mapa genético da população F₂ do cruzamento entre os genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1.

Mapa genético		
Grupo de ligação	Número de marcadores	Comprimento (cM)
1-(1a)	4	13,093
2-(1b)	8	14,618
3-(1c)	10	36,498
4-(2)	16	52,347
5-(3a)	10	40,975
6-(3b)	10	24,744
7-(4a)	36	96,645
8-(4b)	56	98,258
9-(5a)	33	87,883
10-(5b)	16	54,574
11-(6)	42	150,128
12-(7a)	5	22,128
13-(7b)	51	134,43
14-(8a)	25	49,603
15-(8b)	57	150,484
16-(9a)	27	79,99
17-(9b)	11	26,586
Total	417	1.132,984

Tabela 4-2. QTLs para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLAC) raça 1 (com suas designações de acordo com as notas de severidade identificados em populações F₂ e F₃ derivadas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente).

Populações ^a	Cromossomos ^b	LOD ^c	R ² (%) ^d
[F2_RS_(1)]	9	6,61	40%
[F2_RS_(2)]	9	6,61	40%
[F3_RS_(1)_T]	9	4,77	30%
[F3_RS_(2)_T]	9	4,79	30%
[F3_RS_(1)_T]	4	6,02	0,06%
[F3_RS_(2)_T]	4	6,06	0,06%

^a

Populações utilizadas do qual os dados de mapeamento genético foram derivados

^b

Cromossomos no *draft* do genoma da alface (S. Reyes-ChinWo *et al.*, comunicação pessoal)

^c

Log₁₀ likelihood ratio (LOD)

^d

Variação fenotípica (R²).

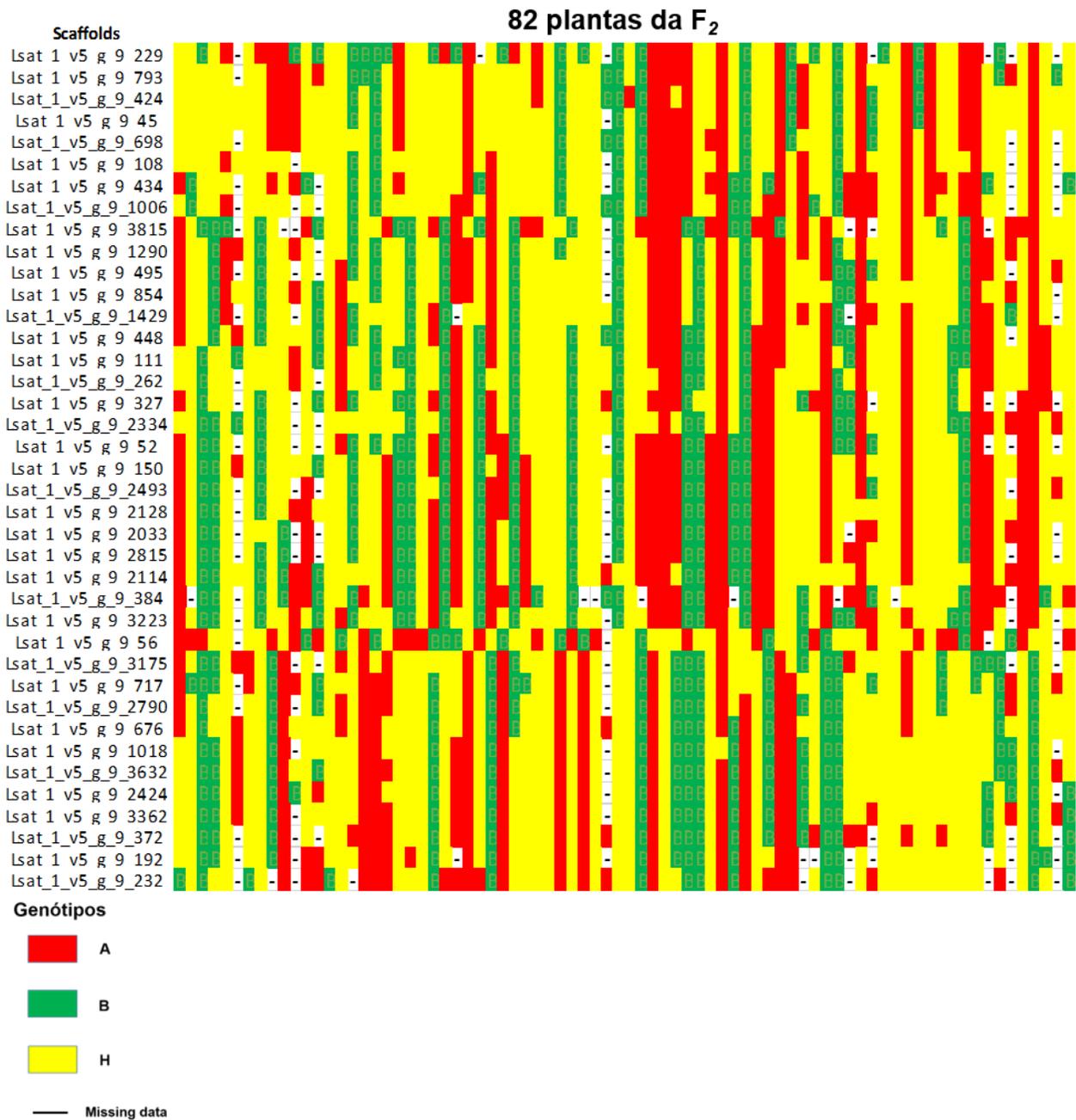


Figura 4-2. Molde do mapa genético de alface no cromossomo 9. As 82 plantas F₂ foram obtidas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. As linhas correspondem as distintas localizações cromossômicas e as colunas da correspondem os genótipos da população F₂ em cada local. O genótipo “A” corresponde ao parental feminino (‘Gizele’), “B” para o parental masculino (‘Vanda’), “H” para heterozigoto, e “-” para os *missing data*. Um total de 38 *scaffolds* foram posicionados nesse cromossomo.

82 plantas da F₂

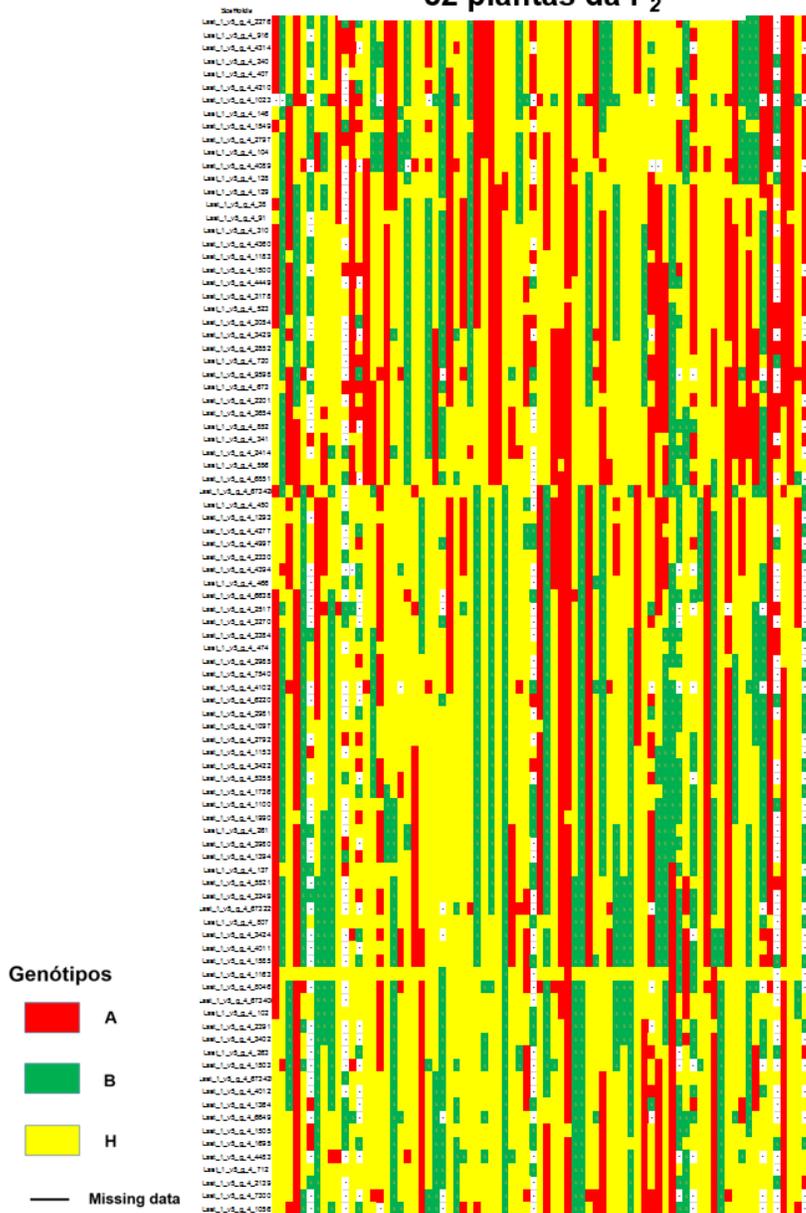


Figura 4-3. Molde do mapa genético de alface no cromossomo 4. As 82 plantas F₂ foram obtidas do cruzamento entre genitores de alface contrastantes ‘Gizele’ (suscetível) x ‘Vanda’ (resistente) para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1. As linhas correspondem as distintas localizações cromossômicas e as colunas da correspondem os genótipos da população F₂ em cada local. O genótipo “A” corresponde ao parental feminino (‘Gizele’), “B” para o parental masculino (‘Vanda’), “H” para heterozigoto e “-” para os *missing data*. Um total de 92 *scaffolds* foram posicionados nesse cromossomo.

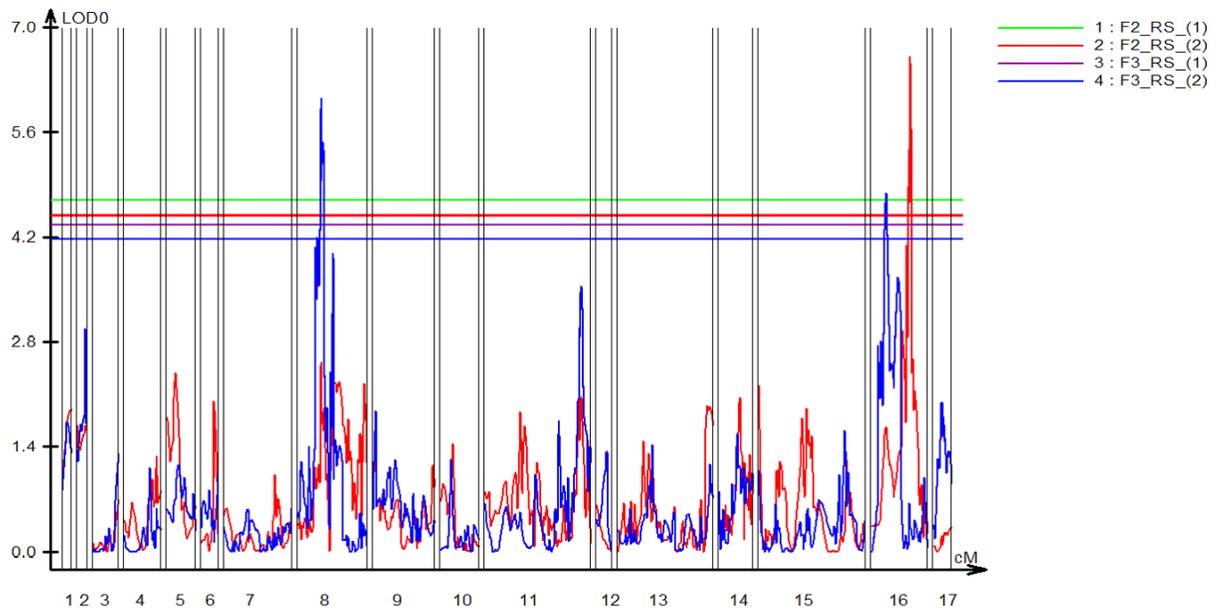


Figura 4-4. QTLs ligados a resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionados nos grupos de ligação 8 (4a) e 16 (9a). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F_2 e F_3) e as notas de severidade.

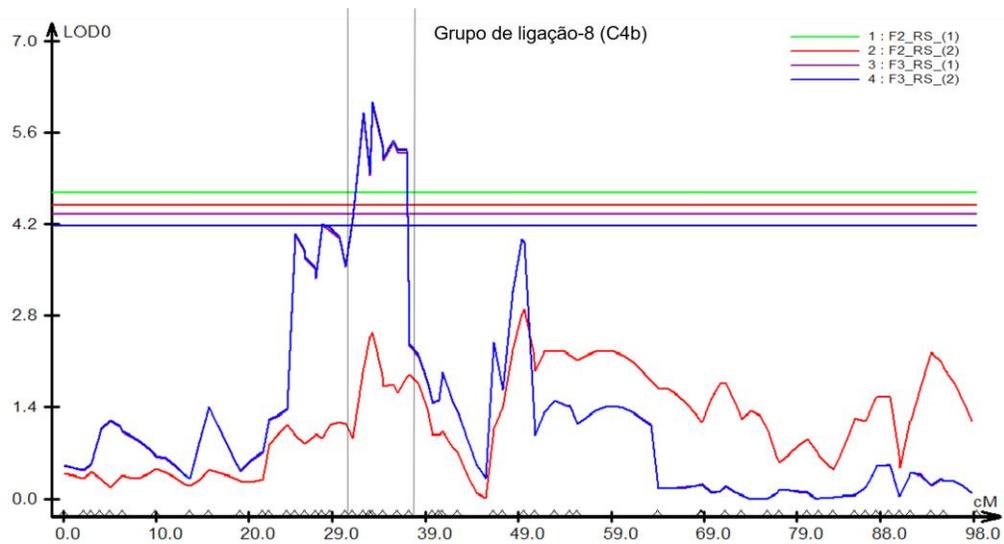


Figura 4-5. QTL ligado a resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionado entre os marcadores [Lsat_1_v5_g4_2792 a Lsat_1_v5_g4_1990] no grupo de ligação 8 (Cromossomo 4a). (LOD = 6,02). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F_2 e F_3) e as notas de severidade.

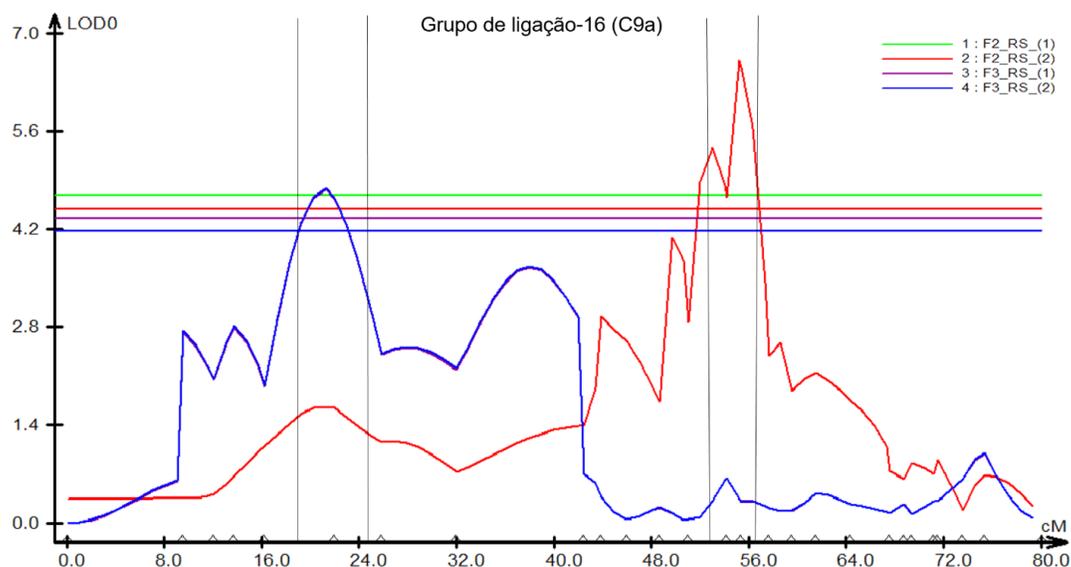


Figura 4-6. QTLs ligados à resistência à murcha de fusário da alface causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 posicionado entre os marcadores [Lsat_1_v5_g9_108], [Lsat_1_v5_g9_111 e Lsat_1_v5_g9_448] no grupo de ligação 16 (Cromossomo 9a). (LOD = 4,77 e LOD = 6,61, respectivamente). As linhas verticais azul, roxa, vermelha e verde indicam o limite de significância estatística (LOD) de acordo com a população empregada (F₂ e F₃) e as notas de severidade.

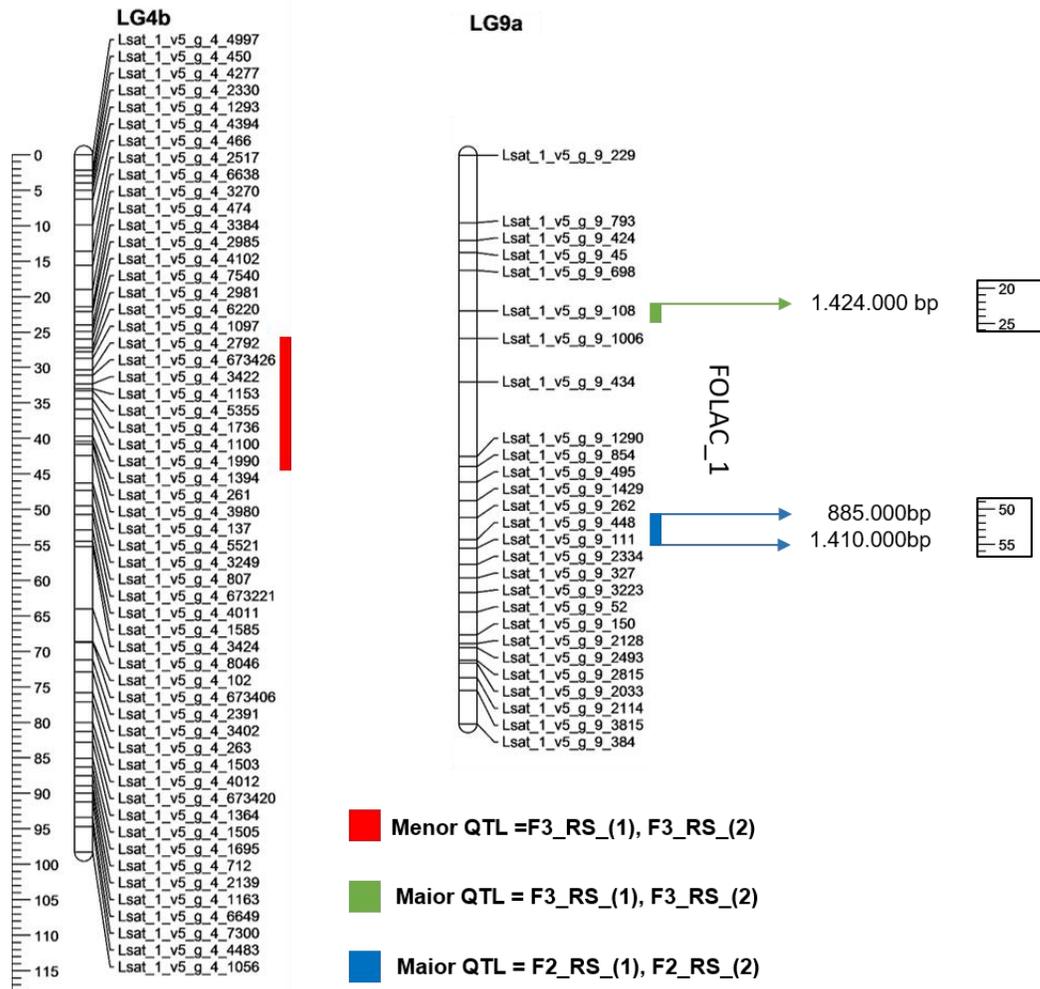


Figura 4-7. Localização no mapa genético da alface dos três QTLs associados com a resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 derivados da cultivar de alface ‘Vanda’. As barras indicam as regiões significativas associadas com a resistência ao patógeno.

5. DISCUSSÃO

5.1. Genotyping-by-sequencing e análise de SNPs – Como evidenciado anteriormente (Ver capítulo 2) existe uma baixa diversidade genética entre os parentais, tendo em vista que pertencem ao mesmo grupo varietal (crespa-verde). Por este motivo o número de SNPs (10.017) gerados no presente estudo é menor em comparação com os valores relatados para outras

culturas, como arroz (>30.000) (**Spindel et al., 2013**), trigo (>130.00) (**Rutkoski et al., 2013**) e Eucalipto (> 80.000) (**Gratapaglia et al., 2011**) utilizando GBS. Mesmo assim, a estratégia de GBS apresentou um bom desempenho em *L. sativa*, uma espécie de base genética estreita e elevada homogeneidade, permitindo a análise de um número muito alto de marcadores distribuídos ao longo de todo o seu genoma. A estratégia de GBS aumentou em ordem de milhares o número de polimorfismos analisados quando constrataada com as técnicas anteriormente utilizadas nessa tese (RAPD, SCAR, DR analogs, SSR e CAPS), que permitiram, em geral, a análise de poucas centenas de marcadores.

No presente estudo observou-se uma grande proporção de *missing data* (1.689 no total, em todos os indivíduos) quando comparado com resultados obtidos em outras populações de alface (**Truco et al., comunicação pessoal**). Isto é esperado na técnica de GBS devido à baixa cobertura de *reads*, resultante de diversos fatores como, por exemplo, a mistura das amostras com códigos de barras em uma única linha do sequenciador (**Barba et al., 2014**), os fragmentos do genoma sequenciados com uma cobertura considerada baixa (*low depth coverage*) fazendo com que alguns loci tenham zero de cobertura em alguns indivíduos (**Elshire et al. 2011**). Outro detalhe importante é que o DNA a ser utilizado na metodologia de GBS deve ser de elevada qualidade e com uma concentração adequada, estando livre da contaminação de compostos fenólicos, já que estes interferem na digestão das enzimas de restrição e na ligação dos adaptadores, por isso o método de extração adequado é primordial nessa técnica (**Wong et al., 2015**). No presente trabalho, o DNA foi inicialmente extraído pelo método CTAB, que não é o mais indicado para a plataforma Illumina. Posteriormente foi feita a purificação com colunas [MO BIO Laboratories – Carlsbad, CA, USA] com o objetivo de remover eventuais inibidores da reação de sequenciamento. Essas condições consideradas sub-ótimas podem ter afetado negativamente a qualidade do DNA analisado. No entanto, populações apresentando um sequenciamento com

valores entre 10% a 20% de *missing data* podem ser utilizadas na construção de mapas genéticos e reduzir erros nas análises tais como a presença de SNPs falsos positivos (**Hackett & Broadfoot, 2003**). Bibliotecas menos complexas possuem um número consideravelmente menor de *missing data*, mas também um menor número de marcadores (**Bhatia et al., 2013**). A maioria das análises exige um conjunto de dados bem completos (**Bhatia et al., 2013**). A retirada de marcadores com grande número de *missing data* é uma etapa necessária antes que os dados de GBS possam ser utilizados para a maioria dos estudos de mapeamento genético. A disponibilidade do genoma de referência e de um mapa de ligação saturado pode evitar a retirada de marcadores da análise de ligação. A partir das análises de ligação 19 indivíduos com menos que 2.5 milhões de *reads* por amostra (*low sequence coverage*) foram removidos da análise evitando, desta forma, muitos sítios heterozigóticos e índices de distorção de segregação que tornariam o processo de mapeamento ainda mais complicado.

5.2. Mapeamento genético – A ação gênica em alface governando a resistência a FOLAC raça 1 foi estudada por uma abordagem abrangente envolvendo a combinação de estudos clássicos de herança (**Ver capítulo 2**) e mapeamento genético e de QTL com marcadores moleculares baseados na tecnologia *genotyping-by-sequencing*. Inicialmente, observou-se um modelo monogênico dominante com níveis elevados de penetrância na população F₂. Estudos anteriores indicam que a genética da resistência a FOLAC está sob controle de um ou mais genes com completa ou incompleta dominância (**Aruga et al., 2012; Truco et al., comunicação pessoal**). A partir da análise genética com base na técnica de GBS, observou-se a presença de duas regiões genômicas, uma no cromossomo 4a e a segunda no cromossomo 9a. Entretanto foi detectado QTLs de maior efeito no LG9 e um adicional no LG4. Provavelmente, o *locus* maior de resistência a FOLAC raça 1 deve estar localizado próximo na porção mediana do cromossomo 9,

contribuindo com 40% e 30% da variação fenotípica com dados de fenotipagem da F₂ e F₃, respectivamente.

Níveis elevados na concentração do inóculo em testes em casa de vegetação, método de inoculação, diferentes condições ambientais durante a condução dos ensaios para avaliação da severidade nas populações F₂ e F₃, podem ter contribuído para uma fenotipagem mais estrigente e conseqüentemente contribuindo para a detecção de genes com efeitos menores. Avaliações em campo e em casa de vegetação têm revelado interações em resposta a FOLAC entre cultivares e linhagens, raças de FOLAC e locais de avaliação (casa de vegetação vs. campo infestado).

Michelmore et al. (2010) avaliando uma população derivada do cruzamento entre ('Valmaine' x 'Salinas 88') x 'Salinas' em condições de campo nos Estados Unidos para resistência a FOLAC raça 1, detectaram quatro QTLs de resistência nos grupos de ligação LG1 (*qFUS1.1* e *qFUS1.2*), LG2 (*FUS2*) e LG7 (*qFUS7.1*). Posteriormente, **Truco et al. (Comunicação pessoal)** no mesmo campo, utilizando 112 indivíduos da população F₂ do cruzamento entre 'Red Tide' x 'Lolla Rossa', identificaram quatro QTLs associados com a resistência nos grupos de ligação LG1 (*qFUS1.1* e *qFUS1.2*), LG4 (*qFUS4.1*) e LG8 (*qFUS8.1*).

No Japão, **Aruga et al. (2012)** em condições de casa de vegetação determinaram que a resistência a FOLAC raça 2 é controlada por um *locus* semi-dominante (denominado *RRD2*). Um mapa de ligação foi construído e o *locus RRD2* foi localizado no LG2 (**Aruga et al., 2012**).

O QTL de resistência a FOLAC raça 1 derivado da cultivar 'Vanda' foi identificado no cromossomo 9. Essa região cromossômica engloba um QTL de resistência ao míldio em condições de casa de vegetação (*qDMR9.1*), um QTL de resistência de campo ao míldio (*qDM9.1*) e um *locus* de resistência à murcha causada por *Verticillium dahliae* (*Ve1*) (**McHale et al., 2009; Christopoulou et al., 2015a,b**) Além disso, três distintos *clusters* de NBS-LRR e ou RLK estão presentes nos cromossomos 9: MRC9A, MRC9B e MRC9C. MRC9A que co-segrega

com os QTLs para resistência ao míldio (*qDMR9.1*, *qDMR9.2* e *qDMR9.3*) e com um gene candidato que codifica um RLK para resistência *V. dahliae*. O *cluster* MRC9B consiste de um aglomerado de RGC12. No entanto, não existe ainda nenhum fenótipo de resistência conhecido mapeado nesse *locus* (**Christopoulou et al., 2015a,b**).

Um QTL de menor efeito (contribuindo com 0,06% da variação fenotípica com os dados de fenotipagem da F₃) foi identificado no cromossomo 4 e está na mesma região cromossômica que engloba o *locus* *Dm4*. Esse QTL está localizado em um *hot-spot* de genes de resistência onde também residem importantes genes/fatores de resistência a diferentes patógenos, tais como os setes loci de resistência ao míldio (*Dm4*, *Dm7*, *Dm11*, *Dm24*, *Dm38*, *Dm44* e *Dm48*). É interessante mencionar que um QTL de resistência a murcha de fusário em alface (*q.FUS4.1*) foi identificado no cromossomo 4 (**Christopoulou et al., 2015a,b**), em uma região diferente daquela encontrada no presente trabalho.

Os cromossomos 4 e 9 contêm mais que 89% de TNLs. Membros de cada família multigênica normalmente são encontrados em *clusters* no mesmo cromossomo (pelo menos 68% das famílias de genes) com exceção da família RGC12 com distribuição ampla no genoma e da família RGC14 presente em quatro cromossomos. A família RGC12 é a segunda maior família com 55 membros presentes em seis cromossomos, dos quais 20 membros estão presentes no cromossomo 9 e 19 no cromossomo 4. Três RGC14 estão presentes no cromossomo 9 (**Christopoulou et al., 2015a,b**). De acordo com esses mesmos autores, as múltiplas localizações cromossômicas de algumas famílias devem-se ao agrupamento de mais de um gene que evoluíram lentamente em famílias individuais baseada no *threshold* de 70% de identidade de sequência. Vários *clusters* são homogêneos, constituindo de uma única família gênica (MRC1, MRC4, MRC3, MRC8A e MRC8B). Já outros são bastante complexos contendo múltiplos TNLs e CNLs. A arquitetura genômica da alface no MRC4 está envolvida com genes que confere

resistência genética no genoma de alface e em plantas em geral (**Meyers et al., 1998; Michelmore & Meyers, 1998**). Sequências do genoma revelam a complexidade deste *loci* com predominância da família de genes RGC12 localizados em clusters cercados por genes relacionados ou não com resistência. Dentro desse cluster, a família NBS-LRR controla a maioria dos fenótipos de resistência que são altamente conservados em quatro genótipos de alface como, *L. sativa* cv. ‘Salinas’, ‘Diana’, ‘Valmaine’ e *L. serriola* ‘US96UC23’.

A relativa importância de QTLs de maior efeito, a presença de QTLs em *clusters* e efeitos fenotípicos refletem uma rápida domesticação impulsionada pela forte seleção direcional (**Riesenberg et al., 2002; Ross-Ibarra, 2005**), ao passo que a maioria dos QTLs de menor efeito tendem a refletir um processo gradual com vários eventos de domesticação (**Burke et al., 2007**). Os genes em *clusters* são mais facilmente domesticados do que genes mais dispersos no genoma (**Burke et al. 2007**). Alternativamente, os *clusters* podem ser resultado de genes individuais com efeitos pleiotrópicos para várias características. De qualquer maneira, análises mais detalhadas são necessárias para obter conclusões mais definitivas (**Hartman et al., 2013**).

Uma característica interessante dos fatores de resistência mapeados nos cromossomo 4 e cromossomo 9 é que eles se localizam em *clusters* geneticamente bem próximos. A identificação de um marcador molecular associado especificamente a um desses fatores de resistência pode representar uma tarefa de difícil execução. Em geral, as linhagens de melhoramento genético são constituídas por diferentes *loci* provenientes de um conjunto diverso de acessos/cultivares. Desta forma, é pouco provável que estes materiais genéticos possam compartilhar um mesmo marcador capaz de identificar todas as diferentes variantes alélicas. Dessa maneira, somente marcadores em extrema ligação com gene de interesse poderão permitir a identificação do fator ou fatores de resistência a FOLAC raça 1. De qualquer forma, a existência de um QTL de efeito maior para resistência a FOLAC raça 1 deve facilitar um mapeamento mais pontual e a potencial clonagem

de genes nessas regiões genômicas do cromossomo 9. A partir dessas informações será possível sintetizar um conjunto de *primers* que anelem em regiões do genoma em forte ligação com os fatores de resistência, propiciando assim o desenvolvimento de marcadores altamente específicos que serão convertidos para uso de rotina (via PCR) para seleção assistida nos programas de melhoramento genético desta hortaliça.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUGA, D.; TSUCHIYA, N.; MATSUMURA, H.; MATSUMOTO, E. & HAYASHIDA, N. 2012. Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* 187:1–9.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229–241.
- BARBA, P.; CADLE-DAVIDSON, L.; HARRIMAN, J.; GLAUBITZ, J.C.; BROOKS, S.; HYMA, K. & REISCH, B. 2014. Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map. *Theoretical and Applied Genetics* 127:73–84.
- BHATIA, D.; WING, R.A. & SINGH, K. 2013. Genotyping by sequencing, its implications and benefits. *Crop Improvement* 40:101–111.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N. & SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting analyses in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:32–38.
- BRADBURY, P.J.; ZHANG, Z.; KROON, D.E.; CASSTEVENS, T.M.; RAMDOSS, Y. & BUCKLER, E.S. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633–2635.
- BURKE, J.M.; BURGER, J.C & CHAPMAN, M.A. 2007. Crop evolution: from genetics to genomics. *Current Opinion in Genetics Development* 17:525–532.
- CABRAL, C.S. 2012. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos de alface resistentes. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.
- CABRAL, C.S. & REIS, A. 2013. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1. *Tropical Plant Pathology* 38:272–281.

- CABRAL, C.S.; SUINAGA, F.A.; REIS, A.; FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 2015. Herança da resistência à murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em um acesso de alface crespa. In: 8^o Congresso de Melhoramento de Plantas, Goiânia, CD-ROM.
- CHRISTOPOULOU, M.; MCHALE, L.K.; KOZIK, A.; REYES-CHIN WO, S.; WROBLEWSKI, T. & MICHELMORE, R.W. 2015a. Dissection of two complex clusters of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:751–765.
- CHRISTOPOULOU, M.; REYES-CHIN WO, S.; KOZIK, A.; MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; WROBLEWSKI, T. & MICHELMORE, R.W. 2015b. Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 5: 2655–2669.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B. & PANG, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- DESCHAMPS, S.; LLACA, V. & MAY, G.D. 2012. Genotyping-by-sequencing in plants. *Biology* 3:460–483.
- DOERGE, R.W. & CHURCHILL, G.A. 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285–294.
- ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S. & MITCHELL, S.E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos One* 6:e19379.
- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2001. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of fusarium root rot of crisp head lettuce. *Journal of General Plant Pathology* 67:205–206.
- FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TSUCHIYA, N. & SAITO, H. 2003. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *Journal of General Plant Pathology* 69:23–28.
- GANAL, M.W.; ALTMANN, T. & RODER, M.S. 2009. SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:211–217.
- GILARDI, G.; FRANCO ORTEGA, S.; RIJSWICK, P.C.J.; ORTU, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2016. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology*.

- GLAUBITZ, J.C.; CASSTEVENS, T.M.; LU, F.; HARRIMAN, J.; ELSHIRE, R.J.; SUN, Q. & BUCKLER, E.S. 2014. TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *Plos One* 9:e90346.
- GRATTAPAGLIA, D.; SILVA-JUNIOR, O. B.; KIRST, M.; DE LIMA, B.M.; FARIA, D.A. & PAPPAS JR, G. J. 2011. High-throughput SNP genotyping in the highly heterozygous genome of *Eucalyptus*: assay success, polymorphism and transferability across species. *BMC Plant Biology*. 11:65.
- HACKETT, C.A. & BROADFOOT, L.B. 2003. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. *Heredity* 90:33–38.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575–607.
- HARTMAN, Y.; HOOFFMAN, D.A.; SCHRANZ, M.E. & VAN TIENDEREN, P.N. 2013. QTL analysis reveals the genetic architecture of domestication traits in crisphead lettuce. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:1487–1500.
- HE, J.; ZHAO, X.; LAROCHE, A.; LU, Z.X.; LIU, H. & LI, Z. 2014. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science* 5:484.
- JANSEN, R.C. & STAM, P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447–1455.
- KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annuaire of Eugenetics* 12:172-175.
- MCHALE, L.K.; TRUCO, M.J.; KOZIK, A.; LAVELLE, D.O.; OCHOA, O.E.; WROBLEWSKI, T.; KNAPP, S.J. & MICHELMORE, R.W. 2009. The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 118:565–580.
- MCPHEE, K.E.; INGLIS, D.A.; GUNDERSEN, B. & COYNE, C.J. 2012. Mapping QTL for Fusarium wilt race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum*). *Plant Breeding* 131:300–306.
- MEYERS, B.C.; CHIN, D.B.; SHEN, K.A.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; LAVELLE, D.O.; ZHANG, Z. & MICHELMORE, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817–1832.

- MICHELMORE, R.W. & MEYERS, B.C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 8:1113–1130.
- MICHELMORE, R.W. 2010. Genetic variation in lettuce. California leafy greens research program, [calgreens.org/control/uploads/Michelmore_Variation_report_2009-2010_final_\(2\)1.pdf](http://calgreens.org/control/uploads/Michelmore_Variation_report_2009-2010_final_(2)1.pdf).
- MOU, B. 2008. Lettuce. *In*: Prohens, J.; Nuez, F. & Carena, M.J. (eds.). *Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. Springer. New York. p.75–116.
- PASQUALI, M.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce: vegetative compatibility and RAPD analysis. *Phytopathology* 53:73–75.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* 97:987–996.
- POLAND, J.A. & RIFE, T.W. 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome* 5: 92–102.
- RIESEBERG, L.H.; WIDMER, A.; ARNTZ, A.M. & BURKE, J.M. 2002. Directional selection is the primary cause of phenotypic diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:12242–12245.
- ROSS-IBARRA, J. 2005. Quantitative trait loci and the study of plant domestication. *Genetics of Adaptation* 123:197–204.
- RUTKOSHI, J.E.; POLAND, J.; JANNINK, J. & SORRELLS, M.E. 2013. Imputation of unordered markers and the impact on genomic selection accuracy. *Genes/Genomes/Genetics* 3:427–439.
- SANTOS, J.R.M. 1996. Methodology for screening tomato to *Fusarium* wilt, *Verticillium* wilt, gray leaf spot, early blight, and *Septoria* leaf spot. *In*: *Proceedings of the International Symposium on Tropical Tomato Diseases*. Recife PE, Brazil. pp. 164–166.
- SCOTT, J.C.; GORDON, T.R.; KIRKPATRICK, S.C.; KOIKE, S.T.; MATHERON, M.E.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J. & MICHELMORE, R.W. 2012. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. *California Agriculture* 66:20–24.

- SEKHWAL, M.K.; LI, P.; LAM, I.; WANG, X.; CLOUTIER, S. & YOU, F.M. 2015. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 16:19248-19290
- SPINDEL, J.; WRIGHT, M.; CHEN, C.; COBB, J.; GAGE, J.; HARRINGTON, S.; LORIEUX, M.; AHMADI, N. & McCOUCH, S. 2013. Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2699–2716.
- STOFFEL, K.; VAN LEEUWEN, H.; KOZIK, A.; CALDWELL, D.; ASHRAFI, H.; CUI, X.; TAN, X.; HILL, T.; REYES-CHIN-WO, S.; TRUCO, M.J. & MICHELMORE, R.W. 2012. Development and application of a 6.5 million feature Affymetrix Genechip[®] for massively parallel discovery of single position polymorphisms in lettuce (*Lactuca* spp.). *BMC Genomics* 13:185.
- TESTER, M. & LANGRIDGE, P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327:818-822.
- TRUCO, M.J.; ASHRAFI, H.; KOZIK, A.; LEEUWEN, H.V.; BOWERS, J.; REYES-CHIN WO, S.; STOFFEL, K.; XU, H.; HILL, T.; DEYNZE, A.V. & MICHELMORE, R.W. 2013. An ultra-high-density, transcript-based, genetic map of lettuce. *G3. Genes/genome/genetics* 3:617–631.
- VAN OOIJEN, J.W. 2006. JoinMap[®]4.0 Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.
- VENTURA, J.A. & COSTA, H. 2008. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espirito Santo, Brazil. *Plant Disease* 92:976.
- VOORRIPS, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93:77–78.
- WANG, S.; BASTEN, C.J. & ZENG, Z.B. 2005. Windows QTL Cartographer version 2.5. *Statistical Genetics*. North Carolina State University, Raleigh.
- WONG, M.M.; GUJARIA-VERMA, N.; RAMSAY, L.; YUAN, H.Y.; CARON, C.; DIAPARI, M.; VANDERBERG, A. & BETT, K.E. 2015. Classification and characterization of species within the genus *lens* using *Genotyping-by-Sequencing* (GBS). *Plos one* 10:e0122025.
- WOUW, M.J.V.D.; TREUREN, R.V. & HINTUM, T.J.L.V. 2011. Authenticity of old cultivars in genebank collections: a case study on lettuce. *Crop Science* 51:736–746.

YAMAUCHI, N.; SHIMAZU, J.; HORIUCHI, S.; SATOU, M. & SHIRAKAWA, T. 2004. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70:308–313.