

**Boletim de Pesquisa 77**

---

**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2004

**Desenvolvimento de marcadores moleculares RGA  
para o mapeamento genético em espécies silvestres de  
*Arachis*: Southern Blot e PCR**



**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimárzio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Chefe-Geral

*Maurício Antonio Lopes*

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*

Chefe-Adjunto de Administração

ISSN 1676 - 1340  
Novembro, 2004

## **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 77**

**Desenvolvimento de marcadores moleculares  
RGA para o mapeamento genético em espécies  
silvestres de *Arachis*: Southern Blot e PCR**

Soraya.C.M. Leal-Bertioli,  
Ana Carolina V. F. José  
David J., Bertioli  
K. Proite  
Patrícia M. Guimarães

Brasília, DF  
2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

Desenvolvimento de marcadores moleculares RGA para o mapeamento genético em espécies silvestres de *Arachis*: Southern Blot e PCR / S.C.M. Leal-Bertioli... [et al.]

– Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

18 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676 – 1340 ; n. 77)

1. Marcadores moleculares – *Arachis*. 2. *Arachis* - Genética vegetal – Mapeamento –. I. Leal-Bertioli, S.C.M.

572.8 - CDD 21

---

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	9
<b>3. RESULTADOS</b> .....	11
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	17

## Desenvolvimento de marcadores moleculares RGA para o mapeamento genético em espécies silvestres de *Arachis*: Southern Blot e PCR

---

Soraya.C.M. Leal-Bertioli<sup>1</sup>  
Ana Carolina V. F. José<sup>2</sup>  
David J. Bertioli<sup>3</sup>  
K. Proite  
Patrícia M. Guimarães<sup>4</sup>

### Resumo

O maior grupo de genes de resistência de plantas conferem resistência a diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides. Para diferentes espécies de *Arachis*, primers de PCR degenerados foram construídos para a região NBS, e o produto de tradução putativo indicou similaridade com genes de resistência conhecidos sendo denominados análogos a genes de resistência (RGAs). Doze destes RGAs foram utilizados para o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em seus padrões de hibridização com DNA digerido de *Arachis*. Inicialmente, avaliou-se o polimorfismo de cada RGA como sonda nos parentais de uma população de mapeamento, contrastantes quanto à resistência as manchas foliares e nematóides das galhas, e na planta híbrida F1. Os RGAs, mesmo isolados de espécies diferentes de *Arachis* apresentaram homologia com o DNA das espécies testadas, além de apresentarem múltiplas cópias e alto polimorfismo na progênie F2. Todas estas características tornam estes RGAs marcadores moleculares altamente informativos, sendo que alguns apresentaram segregação em "clusters" na F2, indicando que seus locos estão ligados. Além disso, primers específicos foram construídos para alguns destes RGAs, sendo feita a análise dos mesmos na população F2. Estes marcadores serão incluídos em um mapa genético de *Arachis*, o que será de grande utilidade para os programas de melhoramento do amendoim cultivado.

---

<sup>1</sup> Bióloga, PhD em Genética Molecular de Microorganismos, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Engenheira Florestal, estudante de mestrado, Universidade Católica de Brasília

<sup>3</sup> PhD em Biologia Molecular, Professor, Universidade Católica de Brasília.

<sup>4</sup> Engenheira agrônoma, PhD em Biologia Molecular, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Development of Resistance Gene Analogs molecular markers in wild Arachis

---

### Abstract

The majority of cloned plant pathogen resistance genes confer resistance to diverse pathogens such as viruses, bacteria, fungi, nematodes and aphids. The conserved NBS domain was used to generate resistance gene analogues (RGAs) by polymerase chain reaction (PCR) using degenerated primers in different *Arachis* species. Twelve of these RGAs were used to develop molecular markers based on their patterns of hybridisation to restricted *Arachis* DNA. An initial step was the evaluation of the polymorphism generated by each RGA in the contrasting parents of a mapping population that segregates for resistance to leaf spot and nematodes, and the hybrid plant F1. RGAs isolated from different *Arachis* species showed high homology to the DNA of the parents and hybrid, multiple copies in the genome and high polymorphism in the F2. Therefore, they were considered highly informative markers, with some segregating in clusters in the F2. Furthermore, specific primers were designed to some of these sequences, which were totally scored in the F2 population. These RGAs will be included in the *Arachis* genetic map, which will be of paramount importance for the *Arachis* breeding programs.

## 1. INTRODUÇÃO

O amendoim, *Arachis hypogaea* L. é uma leguminosa de importância como alimento humano, com um grande genoma tetraplóide ( $n=1.74 \times 10^9$  bp, Bennet and Smith, 1976), Embora tenha alta variabilidade morfológica, tem baixa diversidade genética, além de não possuir fontes de resistência a diversas pragas (Kochert et al., 1996). Isso possivelmente se deve ao fato de que *A. hypogaea* se origina a partir de um único evento de alotetraploidização de um híbrido estéril de duas espécies silvestres diplóides. A planta resultante, contendo dois genomas distintos, chamados A e B, é reprodutivamente isolada dos seus parentais silvestres, tendo uma base genética extremamente estreita (Kochert et al., 1991). As espécies silvestres e diplóides de *Arachis* são, por outro lado, geneticamente bem diversas e ricas em fontes de resistências (Halward et al., 1992, Galgaro et al., 1998). Resistência a pragas é uma das características mais importantes a ser transferida para as plantas cultivadas devido ao elevado preço e danos causados pelos agroquímicos.

A transferência destas resistências para o amendoim cultivado é muito dificultada por esta diferença de ploidia e conseqüente barreira de fertilidade. Uma maneira de conduzir esta transferência é através de cruzamentos complexos, introgressão de resistências e vários retrocruzamentos com *A. hypogaea* (Simpson, 2001). Para exemplificar a dificuldade em se obter variedades de amendoim com resistências derivadas das plantas silvestres, a variedade resistente ao nematóide das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 1, lançada pela Universidade do Texas A & M em 2001, após o primeiro cruzamento, levou 32 anos para ser desenvolvida (Simpson, comunicação pessoal). Recentemente, uma compreensão maior sobre o modo de ação e estrutura de genes de resistência tem acelerado a transferência dos mesmos para cultivares através da seleção assistida por marcadores moleculares (Hash et al., 2003).

Genes de resistência possuem regiões conservadas denominadas "motivos". Esta conservação propiciou o desenvolvimento de primers degenerados que amplificam regiões análogas a estes genes de resistência (RGAs) de várias espécies (Leister et al., 1996, Kanazin et al., 1996, Yu et al., 1996). Em vários trabalhos, foi observado que estes RGAs são fortemente ligados a genes de resistência, ou parte dos mesmos (Collins et al., 2001).

Como parte deste trabalho, foram isolados um total de 79 RGAs de parentes silvestres de amendoim, *Arachis hypogaea*. (Bertioli et al., 2003, Leal-Bertioli et al., 2000, 2004). Um mapa de ligação baseado em SSRs está também sendo construído utilizando dois acessos contrastantes para resistência aos fungos foliares *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum* e *Puccinia arachidis* e aos nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 1 e raça 2, *M. javanica* raça 4 (Carneiro et al., 2003) e *M. hapla* (dados não publicados). Estes acessos são: *A. stenosperma* V10309 e *A. duranensis* K7988, ambos depositados no banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A população F2 segregante está também sendo avaliada para as pragas descritas acima.

O objetivo deste trabalho foi utilizar os RGAs como marcadores moleculares para a identificação de locos associados a resistências no mapa em andamento.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em RGAs, foram utilizadas duas estratégias: utilização de RGAs como sondas em Southern Blots e o desenvolvimento de primers específicos. Inicialmente, foram feitos testes-piloto para se avaliar o polimorfismo de cada RGA nos parentais K7988 e V10309 e na planta híbrida F1.

### a. Southern blots

#### a.1) Preparação das membranas

DNA total de *A. stenosperma* V10309, *A. duranensis* K7988 e da planta híbrida F1 foi extraído utilizando um método baseado em CTAB. 10µg de cada amostra foram digeridos com 100 unidades das enzimas de restrição *EcoRI* ou *HindIII*. A incubação foi a 37°C por três horas. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose 0,8% e transferidos para membrana de nylon Hybond N (Amersham, Pharmacia) por capilaridade em SSC com o auxílio de um transferidor a vácuo (BioRad). As amostras foram fixadas à membrana em forno de 'cross-link' por um minuto.

#### Seleção de sondas

#### a.2) Seleção e marcação das sondas

Os RGAs isolados de *Arachis* spp. foram classificados em diferentes clades, de acordo com sua similaridade (Bertioli *et al.*, 2003). Para a utilização de RGAs como sondas para Southern Blot, RGAs foram escolhidos a partir de cada clade, de forma a se ter uma amostra representativa de todas as seqüências isoladas. Os clones utilizados estão listadas na tabela 2. As sondas consistiam de produtos de PCR a partir de plasmídios contendo seqüências de RGAs. 100ng de cada sonda foram marcados com  $\alpha$ -P<sup>32</sup> utilizando o kit Ready-to-Go (d-CTP) (Amersham Pharmacia). Nucleotídeos não incorporados foram eliminados da solução utilizando o kit Microspin<sup>TM</sup> S-400 HR Columns (Amersham Pharmacia).

#### a.3) Hibridização

As hibridizações, lavagens e revelações dos filmes de raio X foram feitas de acordo com Sambrook & Russell (2001).

### b. Primers específicos: desenvolvimento e utilização

As seqüências dos RGAs isoladas de *Arachis* foram alinhadas utilizando Staden Package e seis primers específicos foram desenhados. Um exemplo de alinhamento e escolha da região do primer é mostrado na Figura 1. Os primers desenvolvidos estão descritos na Tabela 1.

### c. Análise de 'Bulks' segregantes

Análise de 'Bulks' segregantes (BSA, Michelmore *et al.*, 1991) é um método que envolve a busca de seqüências específicas em uma população segregante para uma característica de interesse, neste caso, resistência e susceptibilidade a nematóides e fungos (dados não publicados). Foram feitos dois grupos com a mesma quantidade de DNAs de indivíduos: o 'bulk' resistente (J02, J04, J05, J08, J10, J13, J38, J47, J48, J51, J66, J70 e J71) e o 'bulk' suscetível (J09, J23, J24, J28, J33, J36, J42, J45, J68, J69, J82 e J83).

**Tabela 1.** Seqüências dos primers específicos baseados em contigs únicos de RGAs de *Arachis* spp. A temperatura de ligação do primer (TM) foi calculada de acordo com a fórmula  $TM = 4(G+C) + 2(A+T)$

Primer	Contig	Espécie	Acesso	Seqüência 5'-3'	Tamanho Prod.PCR	T M
S48-2F	S4_A_164	<i>A. stenosperma</i>	V10309	CAG . GAG . AAT . GTG . ATT . GGT . TTA	215 bp	58
				TT . GAG . CAT . AAT . GTA . TTG . CTT		52
C8V11R.abi	incompleto	<i>A. cardenasii</i>	GKP10017	TCG . CTT . GTT . ACG . TAC . AAA . GCA	260 bp	60
				TTT . AGG . TGA . CAC . TAT . AGA . ATA		56
S534-R	S5_A_384	<i>A. stenosperma</i>	S5	CCC . AAT . TTG . AAG . AAC . ACT . GCA	314 bp	60
				AAA . CAG . TGT . TAC . TCC . ATG . TGA		58
S5-26-F	S5_A_378	<i>A. stenosperma</i>	S5	GGC . AGT . GTA . TAA . TTG . GCT . TGT	418 bp	60
				TGA . AAC . TGA . GCA . ATT . CTA . GAG		62
SMP7_3-F	SmpD6_A_56P	<i>A. simpsonii</i>	V13710	TCC . ATA . TAT . TGT . GTA . ATG . GAT . TT	222 bp	66
				CAT . CAT . CAA . GAA . CAA . CAA . GAA . CAA		64
D6-6-3-F	incompleto	<i>A. duranensis</i>	V14167	ATG . AGG . ATC . CTG . ATA . GAT . GGG	240 bp	61
				GGA . CAA . TTT . CCT . TGC . CGA . TCA		61

Os primers foram utilizados em reação de PCR, na concentração final de 1pmol/µl, com os seguintes componentes: 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq DNA polimerase (Gibco, BRL), 1X tampão da enzima, 200nM dNTPs, 25ng de DNA e água destilada autoclavada para completar o volume para 15µl. O programa de termociclagem foi como a seguir: 5min a 96°C, 35 ciclos de: 96°C - 1 min, TM médio para cada par de primers - 1 min, 72°C - 1 min, extensão final de 72°C. As reações foram efetuadas em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorff), resolvidas em gel de agarose 1% e observadas sob luz UV.

### Seqüenciamento de bandas

As bandas obtidas em gel de agarose foram sacadas com o auxílio de uma lâmina, purificadas com o auxílio do QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen), quantificadas em gel de agarose em comparação com alíquotas de DNA de quantidades conhecidas. Seis ng foram levados a reação de seqüenciamento.

No caso de bandas em gel de poliácridamida, o gel foi reidratado na região da banda, que foi cortada com o auxílio de uma lâmina, imersa em 50µl de água overnight. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para reamplificação em uma reação de PCR. O produto obtido foi purificado em sepharose, quantificado em gel de agarose e seis ng foram utilizados para seqüenciamento.

## 3. RESULTADOS

### 1. Southern blot:

Dos 12 clones representativos testados, 11 se apresentaram polimórficos para os parentais, apresentando no total 28 bandas diferenciadoras, representando 28 marcadores moleculares (Tabela 2). Dois exemplos da utilização de RGAs como sondas podem ser observados na Figura 2, com o RGA S1\_A\_36 (A) e S1\_A\_37 (B), que produziram três e onze bandas polimórficas, respectivamente. A partir destes testes, os RGAs polimórficos serão testados na população inteira ou em parte da população de mapeamento.

**Tabela 2:** clones utilizados como sondas em Southern blot para avaliação de polimorfismo entre V10309 e K7988, clade em que foram classificadas (Bertioli *et al.* 2003), o número de bandas polimórficas, o parental em que cada banda aparece e a enzima de restrição utilizada.

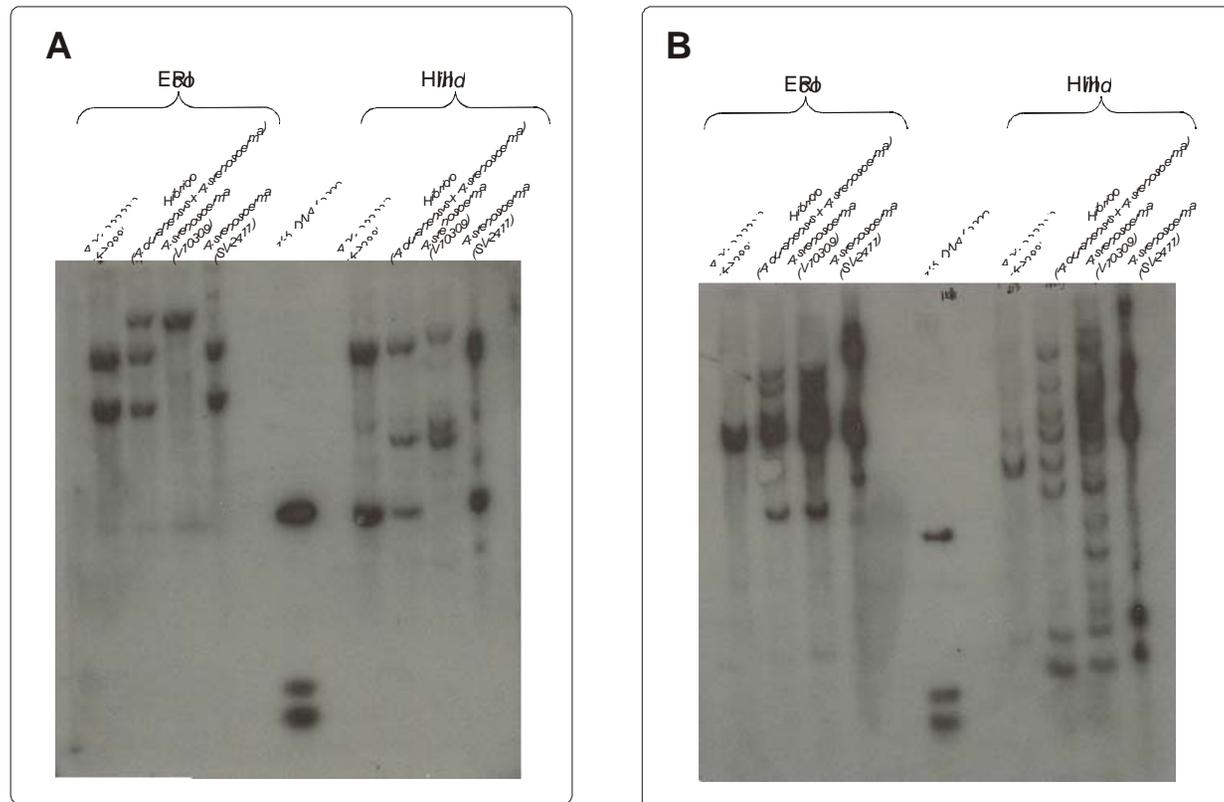
Clone	Clade	Espécie(s) de origem	Número de bandas polimórficas/enzima	
S4C8_AX_402	N	<i>A. stenosperma</i> <i>A. cardenasii</i>	1 dominante V10309	<i>EcoRI</i>
			1 dominante K7988	<i>HindIII</i>
C8_XY_340	A	<i>A. cardenasii</i>	1 dominante K7988	<i>EcoRI</i>
S4_A_164	R	<i>A. stenosperma</i>	1 dominante V10309	<i>HindIII</i>
S1_A_36	M	<i>A. stenosperma</i>	1 dominante V10309	<i>EcoRI</i>
			1 dominante K 7988	<i>HindIII</i>
			1 dominante V10309	<i>HindIII</i>
S1_A_37	O	<i>A. stenosperma</i>	4 dominante V10309	<i>EcoRI</i>
			7 dominante V10309	<i>HindIII</i>
C8_V_434	E	<i>A. cardenasii</i>	1 dominante K7988	<i>EcoRI</i>
T_A_44	M	<i>A. hypogaea</i>	1 dominante V10309	<i>HindIII</i>
S1_S2_A_152	A	<i>A. stenosperma</i>	não polimórfico	
C8_Y_260	C	<i>A. hypogaea</i>	2 dominante V10309	<i>EcoRI</i>
			1 dominante K 7988	<i>EcoRI</i>
S5_A_375	O	<i>A. stenosperma</i>	1 dominante V10309	<i>HindIII</i>
S5_A_384	N	<i>A. stenosperma</i>	2 dominante K7988	<i>HindIII</i>
S5C8_AXY_370	Q	<i>A. stenosperma</i> <i>A. cardenasii</i>	1 dominante K7988	<i>HindIII</i>
			1 dominante V10309	<i>EcoRI</i>
<b>Número total de marcadores produzidos</b>			<b>28</b>	

DNAs dos 'bulks' também foram amplificados por PCR com os primers S48-2F e S534-R. O 'bulk' resistente apresentou bandas mais fortes do que o 'bulk' suscetível (Figura 3), indicando uma possível ligação mais forte, mas este resultado não foi conclusivo.

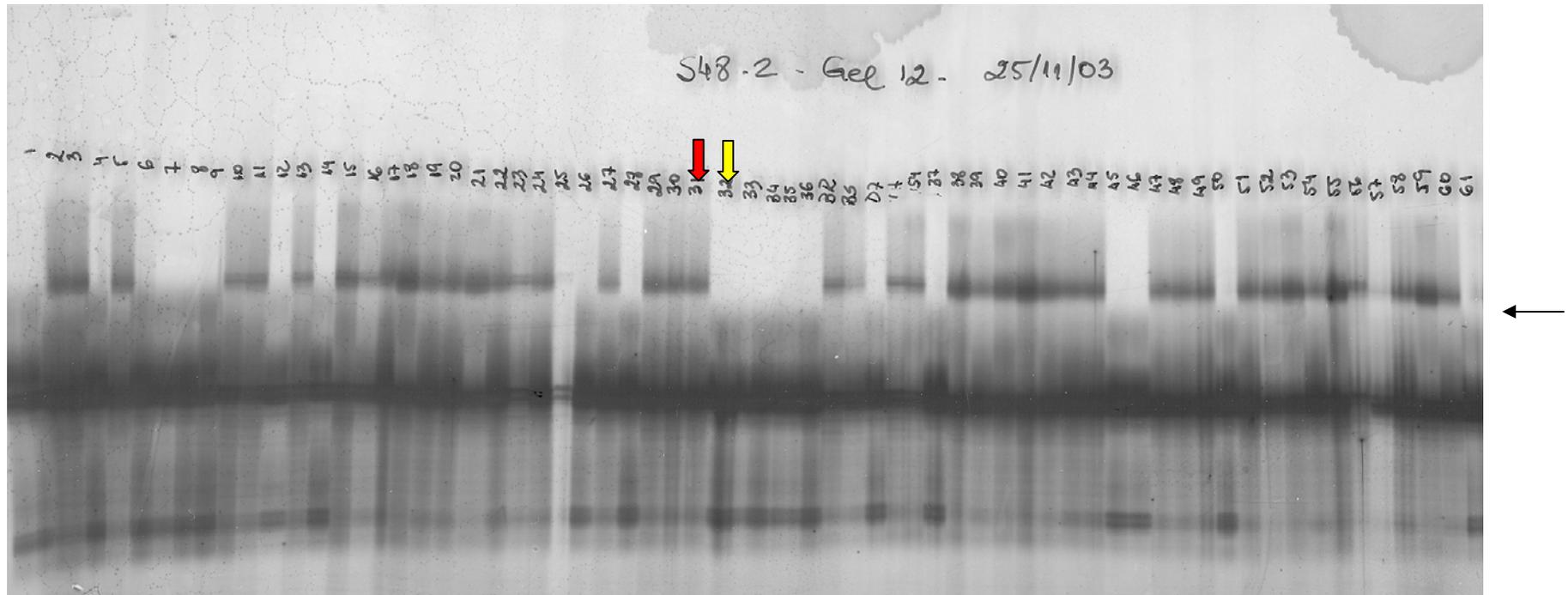
**Figura 1:** Exemplo de alinhamento de seqüências de aminoácidos derivadas de seqüências de ácidos nucleicos de RGAs de *Arachis* spp. Em negrito está uma região candidata à seleção do primer no contig S5\_A\_378.

Contig	Seqüência
S5_A_346	--GKTTLARAVYNS----IAES-----FEGVCFLGMVREKS-MTHG-LEH
C8_X_294	--GKTTLARAVYNS----IADS-----FEGVCFLGNVRENS-ITHG-LVY
S5_A_399	--GKTTLARAVYNS----IKDS-----FEDACSLGNVRENS-ATHD-HGH
S5_A_378	--GKTTLAVAVYNW---- <b>LVNHFAVLC</b> FENICFHENTRENS-NKYG-LKH
D6C8S4_AX_400	--GKTTLATAVFN----LCDG-----FEGFCFLNNVREERA-EKYG-IDH
C8_X_305	--GKTTLATAVFN----LCDG-----FEGFCFLKNVREERA-EKYG-IDH
S5C8_AYX_370	--GKTTLARVLFNI----LCDG-----FERFCFLDNVREERV-QKYV-IEH
D7_A_12	--GKTTLARAVFET----IRSR-----FEVTCFLADVRENCEKKD--ITD
S5_A_366	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVICFLADVRED CERKD--ITH
D6_A_424	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLADVRENCEKKD--ITD
C8_X_304	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLADVREQCEKKD--ITD
C8_A_212	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLDNVRENCEKKD--ITH
C8_T_481	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLADVRENCEKKD--ITH
S3S5D7_A_409	--GKTTLARAVFET----IRCG-----FEVTCFLANVRENCEKKD--ITH
S5_A_195	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLANVRENCEKKD--ITH
T_A_51	--GKTTLARAVFEI----IRSR-----FEVTCFLADVREHCEKKD--ITH
T_A_104	--GKTTLARAVFEI----IRSR-----FEVTCFLADVREHCEKKD--ITH
S1C8_A_30	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLADVREKCEKKD--ITH
S1_A_168	--GKTTLARAVFET----IRCR-----FEVTCFLADVRENCEKKD--ITH

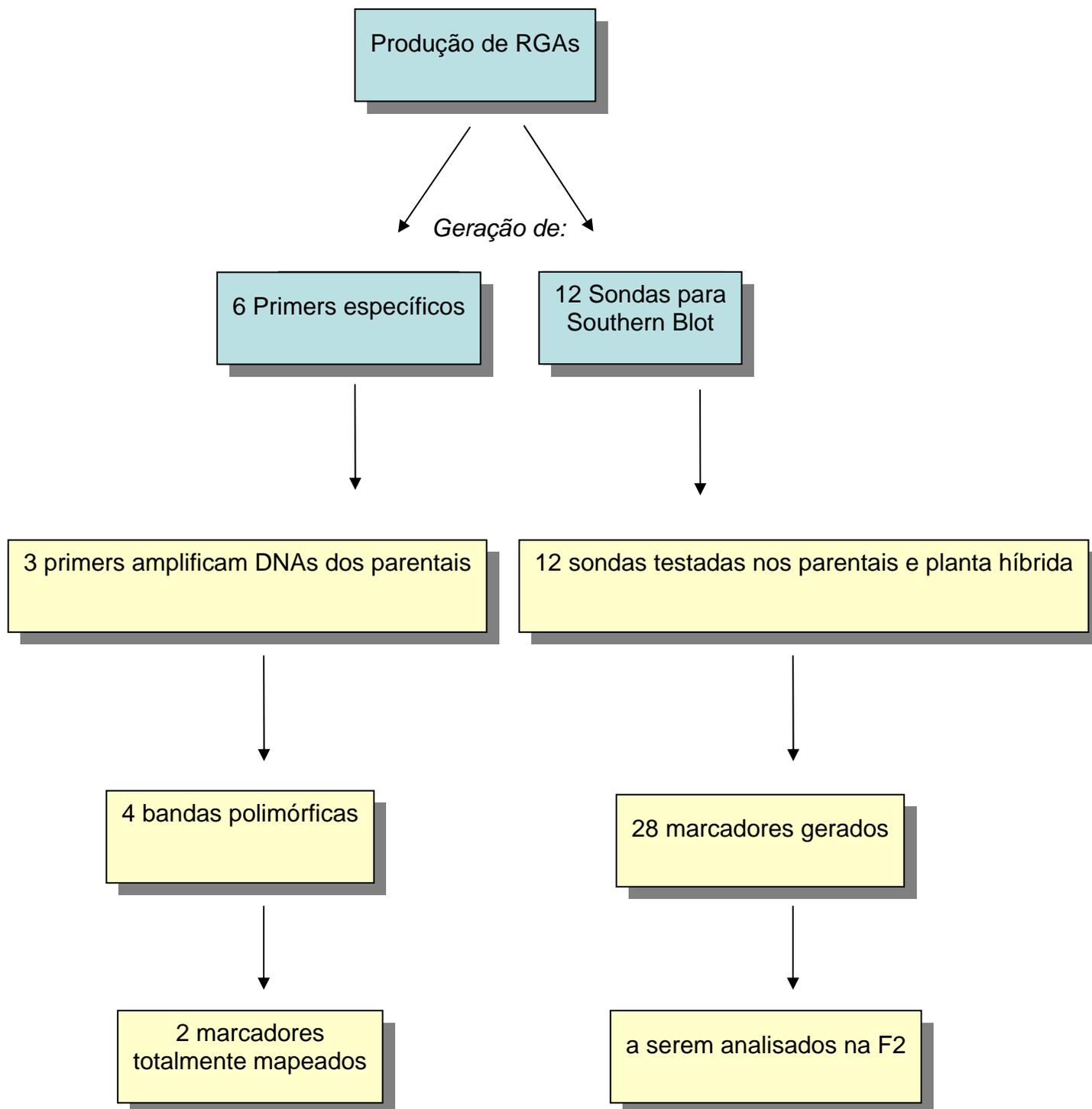
**Figura 2:** Exemplo de Southern Blot com as sondas RGA S1\_A\_36 e S1\_A\_37. Ordem das amostras: K7988, Planta híbrida, V10309 e Sv2411, digeridos com EcoRI, Marcador de peso molecular 1kb Mass Ladder, K7988, Planta híbrida, V10309 e Sv2411, digeridos com HindIII.



**Figura 3:** Exemplo de segregação da banda polimórfica do tipo RGA gerada por PCR com os primers específicos S48-2F For e Rev. Estes primers foram desenhados para o clone RGA S4\_A\_164 derivado do acesso V10309 de *A. stenosperma*. A seta vermelha indica a posição do 'bulk' resistente e a seta amarela indica a banda do 'bulk' suscetível.



**Figura 4:** Diagrama esquemático das duas estratégias de desenvolvimento de marcadores baseados em RGAs e os resultados obtidos até o momento.



## 4. DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de um projeto cujo principal objetivo é a introgressão de resistências para o amendoim a partir de parentes silvestres. Como um todo, o projeto iniciou-se com a caracterização de espécies sexualmente compatíveis (pertencentes à seção *Arachis*) quanto às suas resistências a diversas pragas do amendoim. Em se observando que resistência era regra e não exceção, iniciou-se a prospecção e caracterização de RGAs nestas espécies. Ambas vertentes caminharam em paralelo, com grande sucesso. Finalmente, a ligação entre elas é a possibilidade de aferição de função de RGAs em relação a alguma resistência observada. Isto só seria possível com a obtenção de um mapa genético cujos parentais contrastem para as resistências, assim como a possibilidade de utilização dos RGAs como marcadores moleculares para sua alocação no mapa.

A maneira de escolha da maioria dos autores para utilizar RGAs como marcadores é sua utilização como sondas em Southern Blot (Collins *et al.*, 2001, Madsen *et al.*, 2003). Esta foi a primeira estratégia que resolvemos seguir. A partir de 12 clones, utilizamos como sondas, obtendo 28 marcadores moleculares, representando uma quantidade satisfatória de marcadores. Isto demonstra um nível de polimorfismo surpreendente em uma região com origem tão remota ((Michelmore and Meyers 1998). Todas as sondas utilizadas tiveram homologia com os parentais, independente da espécie de origem. Isto amplia a possibilidade de utilizar estas mesmas sondas em outros cruzamentos.

Como uma estratégia complementar, testamos também o desenvolvimento de primers específicos para seqüências únicas. A partir dos alinhamentos dos RGAs, utilizando o programa Staden Package escolhemos regiões diferenciadas de diversos RGAs. Para algumas destas regiões, não foi possível desenhar primers, por causa de (a) autocomplementaridade das bases (b) temperatura de ligação dos primers direto e reverso não compatíveis (c) região entre os primers não ser de tamanho útil para amplificação. Nas regiões consideradas adequadas, foram construídos ao todo seis pares de primers, para se testar o princípio de amplificação específica. Todos os primers amplificaram o clone de origem, com o produto do tamanho esperado, mas apenas três deles, S48-2F, S534-R e S5-26, amplificaram o DNA dos acessos parentais. Estes produtos foram sacados do gel, purificados, mas não foi possível obter nenhum resultado de seqüenciamento dos mesmos. Quando os produtos foram resolvidos em gel de poliacrilamida, revelaram não apenas uma banda, mas várias bandas (algumas das quais, polimórficas, para os primers S48-2F e S534-R). Isto demonstra a dificuldade em se obter seqüências específicas, uma vez que uma seqüência única em um alinhamento não exclui a possibilidade de a mesma ser encontrada em outras regiões do genoma. Apesar destas dificuldades técnicas, dois marcadores foram obtidos por este método, e já foram totalmente analisados na população segregante F2. Um resumo das estratégias aqui utilizadas está na figura 3. Outras estratégias de produção de marcadores do tipo RGA também estão sendo desenvolvidas no momento.

O próximo passo para este trabalho será avaliar os marcadores Southern Blot na população F2, colocar estes resultados no mapa, assim como ampliar as avaliações de resistências a fungos e nematóides. Isto oferecerá a resposta de uma possível correlação dos RGAs isolados neste trabalho com as resistências desejadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennet MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274:227-274.
- Bertioli DJ, Leal-Bertioli SC, Lion MB, Santos VL, Pappas G Jr, Cannon SB, Guimaraes PM (2003) A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics and Genomics* 270:34-45.
- Carneiro, MDG, Carneiro, RG, Neves, DI, Almeida, MRA (2003) Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 27:219-221.
- Collins N, Park R, Spielmeier W, Ellis J, Pryor AJ (2001) Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. *Genome* 44: 375-381.
- Galgaro L, Lopes CR, Gimenes M, Valls JFM, Kochert G (1998) Genetic variation between species of sections *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, and *Triseminatae* (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. *Genome* 41:445-454.
- Halward T, Stalker T, LaRue E, Kochert G (1992) Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol Biol* 18: 315-25.
- Hash CT, Bhasker Raj AG, Lindup S, Sharma A, Beniwal C R, Folkertsma R T, Mahalakshmi V, Zerbini E, Blümmel M (2003) Opportunities for marker-assisted selection (MAS) to improve the feed quality of crop residues in pearl millet and sorghum. *Field Crops Research* 84: 79-88.
- Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11746-11750.
- Kochert G, Halward T, Branch WD, Simpson CE (1991) RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theor Appl Genet* 81:563-570.
- Kochert G, Halward T, Stalker HT (1996) Genetic variation in peanut and its implications in plant breeding. *In Advances in Legume Systematics. Part 8: Legumes of Economic Importance.* B Pickersgill and JM Lock (Eds) The Royal Botanic Gardens Kew, Great Britain.
- Leal-Bertioli, SCM, Guimarães, PM, Bruzzi Lion, M, Carneiro, RMDG, Valls, JFM, Bertioli, DJ (2000) Busca de resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. e seqüências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis*. *Boletim de Pesquisa* 20, Dez 2000 p5-17. EMBRAPA.
- Leal-Bertioli, SCM, Guimarães, PM, Fávero, AP, Moretzsohn, MC, Proite, K, Bertioli, DJ (2004) Amendoim selvagem: uma fonte de resistência a pragas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* Dezembro 2004. Site: [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br).

Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics* 14:421-429

Madsen LH, Collins NC, Rakwalska M, Backes G, Sandal N, Krusell L, Jensen J, Waterman EH, Jahoor A, Ayliffe M, Pryor AJ, Langridge P, Schulze-Lefert P, Stougaard J (2003) Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Molecular Genetics and Genomics* 269:150-161.

Michelmore RW, Meyers BC. (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 11:1113-30.

Michelmore, RW, Paran, I, Kesseli, RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.

Sambrook, J, Russell, DW (Eds) (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Simpson CE (2001) Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* L. *Peanut Science* 28:114-116.

Yu YG, Buss GR, Maroof MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 11751-11756.