

Boletim de Pesquisa 60

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340

Junho, 2004

**RGA-Display: Uma nova estratégia de utilização
de RGAs como marcadores moleculares**



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 Dimázio

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
Junho, 2004

***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 60**

RGA-Display: Uma nova estratégia de utilização de RGAs como marcadores moleculares

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

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

D 451 Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo RGA para o mapeamento genético de *Arachis silvestre* / S. C. M. Leal-Bertioli ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.
22 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 60)

1. Amendoim. 2. Marcadores moleculares. 3. RGA. 4. Mapa genético. I. Leal-Bertioli, S. C. M. II. Série.

633.368 – CDD 21

RGA-Display: Uma nova estratégia de utilização de RGAs como marcadores moleculares

Soraya.C.M. Leal-Bertioli¹

Patrícia M. Guimarães²

Ana Carolina V. F. José³

Martin Parniske⁴

David J. Bertioli⁵

Resumo

O melhoramento de plantas tem sido auxiliado pelo uso de marcadores moleculares em seleção assistida. A eficiência de seleção assistida por marcadores depende do uso de marcadores que estejam fortemente ligados à característica de interesse. O uso de marcadores ligados a genes que codificam para proteínas envolvidas na reação de resistência já foi estabelecido e previamente, foram isoladas 79 regiões análogas a genes de resistência por PCR com primers que se ligam a regiões conservadas. Para utilizar RGAs como marcadores moleculares, foi desenvolvida uma técnica envolvendo AFLP e primers desenhados para motivos de genes de resistência. Foi observado que das enzimas utilizadas para digerir o DNA genômico total, *HaeIII* gerou o maior número de marcadores. Primers degenerados em toda a sua extensão geraram perfis de RGA-display complexos demais, impossibilitando sua análise, enquanto que primers totalmente específicos geraram poucas bandas. Os primers escolhidos para este estudo foram os degenerados na região 3'. Dos marcadores produzidos, 45% apresentaram homologia com RGAs de *Arabidopsis thaliana*, o que demonstra ter este método, alto potencial para a geração e mapeamento de RGAs. Para avaliar a ligação entre RGAs e resistências, estes marcadores serão utilizados para analisar a população F2 de um cruzamento interespecífico de *Arachis duranensis* x *A. stenosperma*, que segrega para cinco diferentes resistências.

¹ Bióloga, PhD em Genética Molecular de Microorganismos, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Engenheira agrônoma, PhD em Biologia Molecular, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Engenheira Florestal, estudante de mestrado, Universidade Católica de Brasília

⁴ PhD em Biologia Molecular, Pesquisador, Sainsbury Laboratories, Norwich

⁵ PhD em Biologia Molecular, Professor, Universidade Católica de Brasília.

Summary

Plant breeding has been greatly aided by the use of molecular markers in marker-assisted selection (MAS). The efficiency of MAS depends on the use of markers that are tightly linked to the character of interest. The use of markers linked to genes coding for proteins involved in the reaction of resistance has been established and previously we isolated 79 resistance genes analogues (RGAs) by PCR using primers that bind to conserved regions. In order to efficiently use RGAs as molecular markers, a technique combining AFLP with degenerate primers with Resistance Gene motifs was developed. It was observed that from the enzymes used to digest total DNA, *Hae*III generated the greater number of markers. Totally degenerate primers generated profiles that were too complex to analyse (smears), whereas totally defined primers generated too few bands. Therefore primers with degeneracy only at the 3' end were the type of choice. Of the markers produced, 45% showed homology with *Arabidopsis thaliana* RGAs showing a method of high potential for the mapping of RGAs. In order to evaluate the linkage between RGAs and resistances, these markers will be used to analyse the F₂ population from the cross between *Arachis duranensis* x *A. stenosperma*, which segregates for five different resistances.

1. Introdução

A eficiência de seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento depende da ligação entre os marcadores e os fenótipos de interesse. Tradicionalmente, marcadores moleculares anônimos (SSR, RAPD etc) são utilizados para estabelecer ligações com o fenótipo. Entretanto, a ligação de um marcador anônimo é aleatória, o que pode dificultar a obtenção de marcadores com ligação forte. Além disso, a ligação pode ser interrompida após vários ciclos de meiose, que ocorrem nos cruzamentos. Para otimizar a chance de se obterem marcadores moleculares ligados a características de interesse, existe o uso de genes candidatos sabidamente envolvidos nas vias metabólicas da característica em questão.

A estratégia de genes candidatos tem sido particularmente avançada para genes envolvidos na resposta inicial de reconhecimento de patógenos, os chamados genes de resistência R. Estes 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). Em vários trabalhos, foi observado que estes RGAs são fortemente ligados a genes de resistência, ou parte dos mesmos (Collin *et al.*, 1999, 2001, Madsen *et al.*, 2003).

Um extenso banco de RGAs de diversas espécies de *Arachis* é hoje de domínio público (Leal-Bertioli *et al.*, 2000, Bertioli *et al.*, 2003). De 1333 clones seqüenciados, foram obtidos 79 RGAs não redundantes, o que representa o maior banco de RGAs de um genoma não seqüenciado.

Duas estratégias foram anteriormente testadas para utilização de RGAs como marcadores moleculares (Leal-Bertioli *et al.*, 2004): utilização dos clones como sondas em Southern blots e utilização de seqüências específicas para o desenvolvimento de primers. Com ambos métodos foram obtidos marcadores baseados em RGAs, mas em número insuficiente para representar todos os grupos de ligação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi adaptar uma técnica semelhante a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995, Hayes & Saghai Maroof, 2000) e S-SAP (Sequence-specific amplification polymorphism) (Waugh *et al.*, 1997), para obter marcadores moleculares baseados em seqüências do tipo RGA.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparação das amostras de DNA genômico:

Dois microgramas de DNA genômico extraído pelo método CTAB dos acessos K7988 (*Arachis duranensis*) e V10309 (*A. stenosperma*) foram digeridos com uma das três enzimas: *AluI*, *HaeIII* ou *RsaI* como a seguir: 20µl (2µg) de DNA genômico, 4µl de tampão da enzima, 14 µl de água e 2 µl de enzima (10U/µl, New England Biolabs). As reações foram incubadas a 37°C por 3h. Às mesmas, foram acrescentados 60µl de água. Em seguida, as reações foram purificadas por extração com 100µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitadas

com isopropanol e dissolvidas em 26µl de água. Uma alíquota de 4µl de DNA digerido (aproximadamente 300µg) foi utilizada para ligação com o adaptador GWA (Genome Walking Adapter, Clontech).

(5'-

GTA.ATA.CGA.CTC.ACT.ATA.GGG.CAC.GCG.TGG.TCG.ACG.GCC.CGG.GCT.

GGT – 3'

(H₂N- 3'- CC CGA.CCA -P5')

As ligações foram feitas overnight a 16°C com os seguintes reagentes: 1,9µl de GWA (Genome Walker Adapter) (25µM), 1,6µl tampão de T4 DNA ligase, 0,5µl de T4 DNA ligase (5U/µl), 4µl de DNA digerido (aprox. 300ng). Após incubação, a enzima foi inativada a 72 °C por 5 minutos.

Após ligação, alíquotas das amostras foram submetidas a três tratamentos diferentes, para testar a eficácia do PCR posterior e a repetibilidade das reações, ou seja:

- as ligações foram purificadas com QIAquick^(R) PCR Purification kit (Quiagen)
- as ligações foram redigeridas com a mesma enzima de restrição (para eliminar ligações DNA genômico – DNA genômico, evitando assim, artefatos)
- As ligações não foram submetidas a nenhum procedimento

2.2. Ligação com adaptador

Um adaptador com um braço longo e um braço curto foi ligado aos terminais destes fragmentos. Um primer desenhado para um motivo de interesse (neste caso, o motivo Kinase-2, presente em genes de resistência) (Tabela 1) foi utilizado juntamente com um primer específico para o adaptador (AP1) em uma reação de PCR.

2.3. RGA-Display

Após a preparação, as amostras foram submetidas a uma reação de PCR, que amplifica preferencialmente as regiões que contém os motivos para os quais os primers foram desenhados. Os motivos dos primers aqui utilizados são presentes comumente em genes de resistência e estão representados na Figura 1.

Inicialmente, três tipos de primers para o motivo Kinase-2 foram testados: primer degenerado em toda sua extensão (P2-391), primer degenerado em uma das terminações (NBS5) e primer sem degeneração (P2-12). As seqüências dos primers estão na Tabela 1. Os cinco primeiros primers foram extraídos da literatura e os subseqüentes desenvolvidos neste trabalho. Com exceção do primer NBS7, todos os outros primers são baseados no motivo Kinase-2.

Reação 2: um microlitro do produto da reação 1 foi utilizado para a próxima reação com os primers NBS5 e AP2, programa Display3.

As combinações de primers e adaptadores foram como a seguir:

1. AP1 + NBS5
2. AP2 + NBS5
3. AP1 + P2-212
4. AP1 + P2-391
5. AP1 + P2-414

Os produtos amplificados foram observados em um gel de poliacrilamida corado com prata, como descrito por Creste *et al.* (2001). Um diagrama esquemático do RGA Display é mostrado na Figura 2.

2.4. Amplificação e seqüenciamento de bandas de gel de poliacrilamida:

Uma vez que este método depende da especificidade de apenas um primer, espera-se que só uma parte das bandas produzidas sejam originadas de RGAs. Para testar esta hipótese, bandas do gel de poliacrilamida foram reamplificadas e seqüenciadas. Um fragmento do gel com cerca de 1mm de diâmetro foi cortado com o auxílio de uma lâmina e colocado em 100 microlitros de mix de PCR contendo: 10 µl de tampão 10X, 1 µl de dNTPs (20mM), 6 µl MgCl₂ (25mM), 10 µl primer F+R (10µM), 1 µl Hot Star *Taq* (5U/µl, Quiagen) e 72 µl de água. Após termociclagem, o produto de PCR foi visualizado em gel de agarose e a banda foi extraída e purificada com QIAquick^(R) Gel Extraction kit (Quiagen). O seqüenciamento foi efetuado com o kit BigDye version 3 (Applied Biosystems) usando 1.6 pmoles do primer direto (AP2) ou reverso (NBS5).

2.5. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Duas bandas alélicas geradas no RGA-Display (H12 e H13) tinham peso molecular muito baixo, não sendo possível visualizar de maneira consistente em toda a população F2. Para aumentar os níveis de detecção, primers específicos no sentido direto foram desenhados com base nas seqüências das bandas isoladas de ambos os parentais. Os primers específicos foram desenhados em uma região de divergência de seqüência, como mostrado na Figura 3.

3. Resultados:

3.1. Preparação das amostras de DNA genômico:

Os fragmentos de digestão do DNA genômico de *Arachis* variaram entre 300 e 400bp. Os perfis gerados pelo Display utilizando amostras obtidas pelos três tipos de preparação foram idênticos: reação purificada com kit Quiagen, reação religada ou reação sem tratamento (item 2.1). Portanto, subseqüentemente, nenhum tratamento foi feito com as amostras após ligação.

3.2. RGA-Display

Displays utilizando primers degenerados em toda sua extensão (P2-212, P2-391, P2-414) produziram padrões muito complexos (rastros). Isto provavelmente reflete a falta de especificidade, que leva aos primers a ligarem-se a muitas regiões do DNA. Displays com primers degenerados em uma das terminações (NBS5, NBS7) ou sem degeneração (P2-12, P2-19, P2-378) produziram bandas distintas. Os *primers* P2-12, P2-19 e P2-378 também foram testados com o adaptador AP1. A combinação P2-12 e AP1 produziu 3 bandas polimórficas entre os parentais, a combinação P2-19 e AP1 produziu 1 banda polimórfica e a combinação P2-378 e AP1 não apresentou polimorfismo entre os parentais.

Destes primers, o que produziu bandas mais definidas foi NBS5 em combinação com o adaptador AP1, sem os passos de amplificação linear e sem o PCR nested. Por isso, a maior parte deste trabalho concentrou-se em combinações utilizando o primer NBS5.

Displays com DNA preparado com a enzima *AluI* produziram três bandas polimórficas, sendo duas, RGAs. Displays com *HaeIII*, produziram 18 bandas polimórficas, sendo 8 RGAs e um retroelemento. Displays com *RsaI* produziram apenas uma banda polimórfica sem similaridades com nenhuma seqüência no Blastx (Tabela 2). Desta maneira, por apresentar perfil mais definido, com maior número de polimorfismos, a enzima *HaeIII* foi escolhida para análises com a população segregante (Figura 4).

3.3. Análise das bandas e mapeamento dos RGAs

Análise das seqüências das 22 bandas produzidas pelos Displays com o primer NBS5 com DNAs preparados com as enzimas *AluI*, *HaeIII* e *RsaI* mostraram que 10 eram RGAs, sendo duas, alélicas (H12 e H13, Tabela 2). Além disso, algumas bandas eram quase idênticas a RGAs isolados previamente (Bertioli *et al.*, 2003), ou seja, H2 corresponde ao clone C8_V_492, H8A corresponde ao clone C8_V_492 e A5 corresponde ao clone S1S2_A_152.

Displays com DNAs preparados com *HaeIII* produziram maior número de bandas polimórficas e maior número de RGAs. Com estas reações, foi possível mapear quatro RGAs e três marcadores anônimos na população F2. A análise das bandas de menor peso molecular, H9 a H14, não pôde ser feita porque elas são pouco visíveis por serem coradas de maneira mais fraca do que as outras. Entre estas, estavam H12 e H13, que são RGAs. Para que estas bandas também pudessem ser mapeadas, foram desenvolvidos primers específicos baseados em divergências únicas entre as seqüências das duas (SNPs, single nucleotide polymorphisms, seção 2.5).

Tabela 2: Resultado da análise de alinhamento das bandas polimórficas originadas dos Displays. Nomes iniciados com ‘A’ são de display com os parentais com *Alul*, ‘H’, com *Haelll* e ‘R’ com *Rsal*.

Banda	Blastx	Origem	Segregação na F2
A1	no hits	ambos	-
A5	RGA	V10309	-
A8	RGA	ambos	-
H0	no hits	K7988	35:21
H1	Retroelemento	V10309	não segrega
H2	RGA	ambos	39:18
H3	no hits	V10309	18:11
H4	RGA	ambos	não segrega
H5	no hits	V10309	31:11
H6	RGA	K7988	49:10
H6A	RGA	ambos	não segrega
H7	no hits	K7988	não segrega
H8	RGA	V10309	41:27
H8A	RGA	K7988	20:13
H9	no hits / alelo de H10	V10309	não analisada
H10	no hits / alelo de H9	K7988	não analisada
H11	no hits	ambos	não segrega
H12	RGA alelo de H13	V10309	não analisada
H13	RGA alelo de H12	K7988	não analisada
H13B	no hits		não segrega
H14	no hits		não analisada
R6	no hits	K7988	-

RGA-display também foi efetuada utilizando os primers P2-212, P2-391 e P2-414, com as condições descritas na seção 4. Entretanto, os perfis gerados eram complexos demais (‘smear’) para serem analisados na F2 (dados não apresentados). Portanto, outros primers foram desenhados, com seqüência mais específica para o motivo Kinase-2: P2-12, P2-19 e P2-378 e apresentaram polimorfismo com os parentais *A. duranensis* e *A. stenosperma*.

3.4. SNPs

Baseados em um polimorfismo das seqüências das bandas RGA H12 e H13, foram desenhados primers específicos no sentido direto. Os primers específicos foram desenhados em uma região de divergência de seqüência, como mostrado na Figura 3. Os dois primers são utilizados em uma reação de PCR com um primer em comum para ambos os parentais que se liga no sentido reverso, chamado H-12-13-KV (Tabela 3). O produto gerado em V10309 é 3pb maior do que o gerado em K7988. Estes primers serão utilizados para o mapeamento dos RGAs H12 e H13.

Tabela 3: Primers alelo-específicos gerados por alinhamento de seqüências.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Orientação</i>	<i>Especificidade</i>
H12-V-1	GTGGAACAAGCTGAAGGATTATG	For	V10309
H13-K-1	GTGGAACAAGTTGGAGCATC	For	K7988
H-12-13-KV	TGATGGTGAGGTTTCCTTTGAC	Rev	Ambos

4. Discussão

O melhoramento de plantas tem sido auxiliado por seleção assistida por marcadores. Os mapas genéticos com marcadores ligados às resistências é um passo fundamental para este processo. Neste contexto, o desenvolvimento de marcadores do tipo RGA é uma ferramenta promissora para a identificação de locos associados a genes de resistência, uma vez que já foi estabelecido que uma grande proporção de RGAs de várias espécies está ligado ou faz parte de genes de resistência (Collins et al., 2001, Donald et al., 2002, Peñuela et al., 2002).

Este método combina a eficiência do AFLP com o enriquecimento para RGAs devido à utilização de primers degenerados desenhados para motivos da região NBS presente nos RGAs. O número de marcadores gerados inicialmente foi grande, entretanto, ao se tentar avaliar toda a população F2 com estes marcadores, tornou-se evidente que a sensibilidade da coloração com prata é baixa, as bandas aparecem muito fracas quando um grande número de indivíduos está sendo analisado. Um gel de teste feito com primers marcados com fluorescência, analisados em sequenciador automático ABI 377 apresentou resultados promissores. A detecção por fluorescência parece ser mais sensível do que com coloração com prata, mas as imagens são mais difíceis de interpretar, demandando programas específicos para análise. Apesar do poder de detecção mais baixo de géis corados com prata, a grande vantagem dos mesmos é a possibilidade de se sacar e seqüenciar as bandas diretamente do gel, possibilitando se caracterizar todos os marcadores obtidos. Com estes dados, foi observado que 10 em 22 bandas polimórficas são RGAs. Considerando o grande número de bandas polimórficas por gel, esta técnica tem o potencial de gerar marcadores rapidamente. Hayes & Saghai Maroof (2000) já descreveram a utilização de AFLP direcionado para RGAs, encontrando marcadores ligados a um gene de resistência em soja. A modificação aqui apresentada é a utilização de primers para diversos motivos do NBS, com diversos graus de degeneração.

Com esta técnica, marcadores continuam a ser produzidos e em breve poderão ser mapeados. O objetivo principal deste trabalho foi utilizar o conhecimento já adquirido para transformar RGAs em marcadores genéticos para que estes marcadores fossem colocados no mapa genético que está sendo

construído utilizando a população F2 originada de um cruzamento entre os acessos *A. duranenensis* K7988 e *A. stenosperma* V10309, susceptível e resistente, respectivamente, às seguintes pragas: os fungos foliares *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum* e *Phoma arachidis* e os nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 1 e raça 2, *M. javanica* raça 4 e *M. hapla*. (Fávero, 2004). A população F2 segregante está sendo avaliada para os fungos causadores de manchas foliares, que são o maior problema fitossanitário da cultura do amendoim no Brasil. O primeiro mapa para esta população baseado em SSRs está em fase de finalização e espera-se inserir no mesmo os marcadores do tipo RGA produzidos neste trabalho. Uma vez localizadas estas resistências no mapa, será possível, nos próximos meses, avaliar sua ligação com RGAs e com os outros marcadores. O desenvolvimento de marcadores baseados em RGAs aumentará as possibilidades de serem encontrados locos associados às resistências, alavancando o processo de seleção assistida em programas de melhoramento utilizando parentes silvestres como doadores de genes.

Referências

BERTIOLI, D.J.; LEAL-BERTIOLI, S.M.C.; LION, M.B., SANTOS, V.L., PAPPAS, G. JR., CANNON, S.B., GUIMARAES, P.M. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. **Molecular Genetics and Genomics** v. 270, p.34-45, 2003.

COLLINS, N.; DRAKE, J; AYLIFFE, M; SUN, Q; ELLIS, J; HULBERT S, PRYOR T. Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. **Plant Cell** v. 11, p1365-76, 1999.

COLLINS N; PARK R; SPIELMEYER W; ELLIS J; PRYOR AJ. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome** v. 44, p. 375-381, 2001.

CRESTE; S.; YULMANN NETO; A. & FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter** v.19, p299-306, 2001.

FÁVERO, A.P. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Tese de doutorado. ESALQ, Piracicaba. 2004.

HAYES A.J. & SAGHAI-MAROOF M.A. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics** v.100, p1279-1283, 2000.

KANAZIN V.; MAREK L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* v.93: 11746-11750, 1996.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; JOSÉ, A.C.F.V.; BERTIOLI, D.J.; PROITE, K & GUIMARÃES, P.M. 2004. Desenvolvimento de marcadores moleculares RGA para o mapeamento genético em *Arachis silvestre*: Southern Blot e PCR. *Boletim de Pesquisa. EMBRAPA*.

LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics** v.14, p.421-429, 1996.

MADSEN, L.H.; COLLINS, N.C.; RAKWALSKA, M.; BACKES, G.; SANDAL, N.; KRUSELL, L.; JENSEN, J.; WATERMAN, E.H.; JAHOOR, A.; AYLIFFE, M.; PRYOR, A.J.; LANGRIDGE, P.; SCHULZE-LEFERT, P.; STOUGAARD, J. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. **Molecular Genetics and Genomics** v.269, p.150-161, 2003.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** v.23, p.4407-4414, 1995.

WAUGH, R.; MCLEAN, K.; FLAVELL, A.J.; PEARCE, S.R.; KUMAR, A.; THOMAS, B.B.; POWELL, W. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular and General Genetics** v.253, p.687-694, 1997.

Figura 1: Diagrama esquemático dos primers utilizados para desenvolvimento de marcadores baseados em RGAs. Em preto estão os primers utilizados para amplificação dos RGAs dos DNAs de várias espécies de *Arachis* (Bertioli *et al.*, 2003). Em azul, estão os primers utilizados em RGA-display. Em verde, estão os primers específicos para o motivo kinase-2 dos parentais, mas ainda não mapeados. Com exceção dos NBS, todos os primers foram desenhados neste trabalho. P-loop, Kin-2, GLPL e RNBS-D são motivos conservados de genes de resistência.

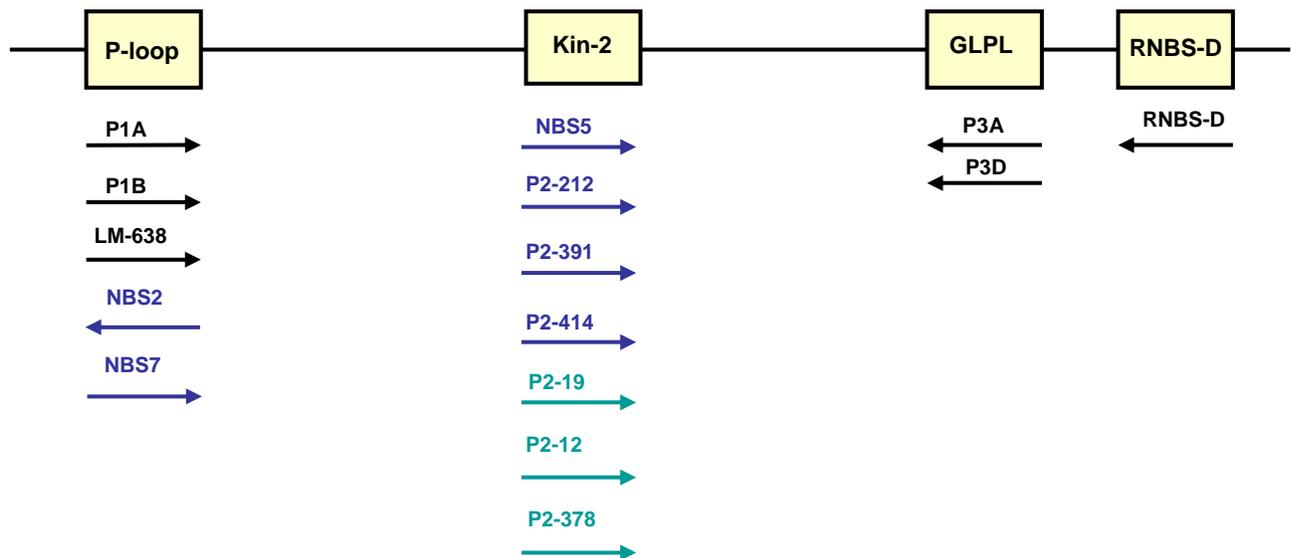


Figura 2: Diagrama esquemático do método RGA-display. Em vermelho estão os adaptadores Genome-walker. Os primers utilizados para “ancorar” a reação são todos baseados no motivo Kinase-2 presente em genes de resistência.

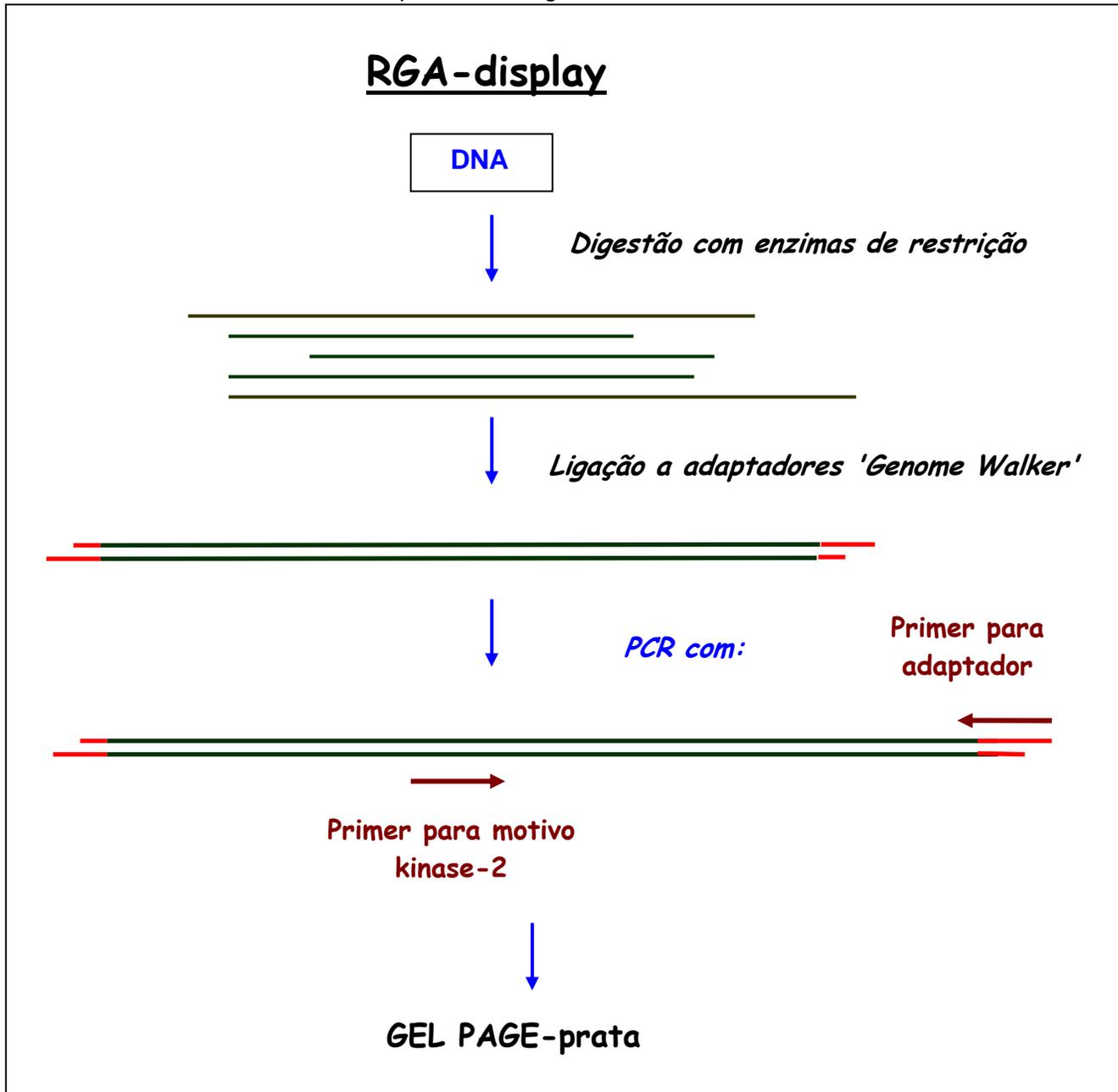


Figura 3: Sequência parcial das bandas alélicas H12 em V10309 e H13 em K7988. A região em amarelo mostra a inserção da sequência 'ATA' na banda H12, que causou o polimorfismo de tamanho. Nesta região foram desenhados os primers alelo-específicos.

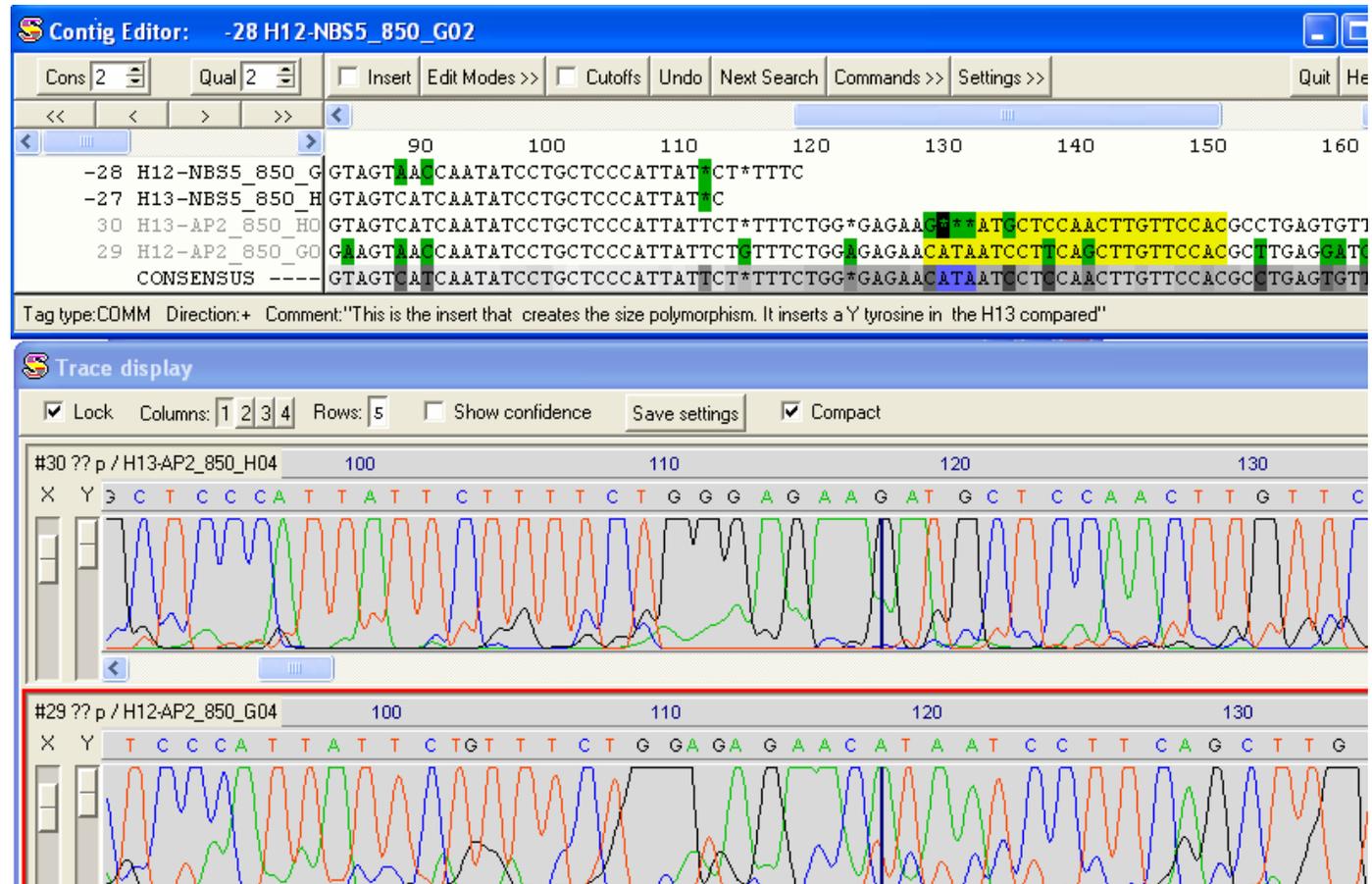


Figura 4: AFLP ancorado com os parentais D7 (K7988) e S4 (V10309). Para a preparação das amostras, foram utilizadas as enzimas de restrição *AluI*, *HaeIII* e *RsaI*. As reações estão em duplicata. Setas verdes indicam bandas polimórficas que representam RGAs. Setas vermelhas indicam bandas polimórficas sem similaridade com RGAs.

