

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Busca de Genes Envolvidos na Resistência de
Amendoim Silvestre ao Nematóide das Galhas
(*Meloidogyne arenaria*)**

Karina Proite

Orientador: Dr. David John Bertioli
Co-orientadora: Dra. Patrícia Messenberg Guimarães

Brasília – DF
2007

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Busca de Genes Envolvidos na Resistência de
Amendoim Silvestre ao Nematóide das Galhas
(*Meloidogyne arenaria*)**

Karina Proite

Orientador: Dr. David John Bertoli
Co-orientadora: Dra. Patrícia Messenberg Guimarães

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Biologia,
da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Biologia Molecular, Área de
concentração: Biologia Molecular.

Brasília-DF, 2007

AGRADECIMENTOS

Essa tese foi realizada através do apoio de diferentes pessoas e instituições, em especial gostaria de agradecer:

À CAPES pelo bolsa de estudo tanto no país quanto à “bolsa-sanduíche” .

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infra-estrutura de trabalho e pelo apoio recebido;

Ao BIRD/PRODETAB, à União Européia e ao Generation Challenge Program pelo suporte financeiro e aos Drs. David, Patrícia e Soraya pelo empenho na gestão desses projetos, cuidando do fornecimento dos meios necessários para a realização dessa tese;

Ao Departamento de Biologia Celular da UnB, pela concessão desse treinamento e aos professores da UnB, pelos ensinamentos;

Ao meu querido orientador, Dr. David Bertoli, pela amizade, orientação, sugestões e apoio durante a realização desse trabalho;

À minha querida orientadora, Dra. Patrícia Messenberg Guimarães, pela amizade, orientação, acompanhamento, respeito e coleguismo ao longo de todo este trabalho;

À querida, Dra. Soraya Leal-Bertoli, pela amizade, organização e manutenção de toda estrutura laboratorial. Pelo acompanhamento e sugestões para realização deste trabalho;

À Dra. Regina Carneiro, pela amizade, orientação e ensinamentos do valioso estudo com os nematóides;

Ao Dr. Márcio Moretzsohn, pela amizade e análise dos EST-SSRs;

Às queridas colegas e amigas do Laboratório de Microscopia, Ana Cristina Gomes e Rosana Falcão pelo suporte técnico neste trabalho;

Ao Olivier Garsmeur, pelo apoio e dedicação na geração das bibliotecas BAC.

Ao Leandro, pelo capricho e cuidado com as plantas nas casas de vegetação;

Ao Dr. Valls pela concessão dos acessos de *Arachis* utilizados;

Aos colegas de trabalho do Laboratório Planta-Praga III da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Carol, Fernando, Stephan, Maíra e Maria Laine, pela boa convivência durante todo trabalho;

Aos queridos colegas do Laboratório de Nematologia, Fabiane, Marcilene, Pedro e Luís pelos bons momentos neste trabalho;

Às minhas queridas Alessandra e Lisangêla pela amizade, companherismo e divertidos momentos;

Aos amigos, Rob, Ana Cristina, Lúcio, Stéphan, Guta, Glyn Mara, Giovana, Alexandre, Maju, PC, Inácio, Leandro, Vieira, Karen, Carol e Renato que me proporcionaram bons momentos durante a execução deste trabalho;

Aos colegas e examinadores, Francisco Aragão, Robert Miller, Simone Ribeiro e Fátima Grossi pelas excelentes sugestões na finalização deste manuscrito;

À toda a equipe envolvida nos projetos de amendoim, pela colaboração;

À minha família, pelo amor e apoio em toda minha vida;

Aos queridos João e Caio, pelo amor.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. O gênero <i>Arachis</i>	3
1.2. Cultura do Amendoim	4
1.2.1. Cenário Internacional	4
1.2.2. Cenário Nacional	5
1.3. Espécies Silvestres de <i>Arachis</i>	5
1.4. Principais Doenças e Parasitas do Amendoim	6
1.4.1. Nematóides	7
1.4.1.1. O gênero <i>Meloidogyne</i>	7
1.4.1.1.1. Biologia dos nematóides das galhas	8
1.4.1.2. Nematóides no Brasil	10
1.4.1.3. Nematóides no Amendoim	10
1.4.1.4. Estratégias de Controle dos Nematóides no Amendoim	11
1.5. Genes de Resistência	12
1.5.1. Resistência	12
1.5.2. Genes <i>R</i> e suas proteínas	13
1.5.2.1. Genes <i>R</i> e a identificação destas resistências aos nematóides <i>Meloidogyne</i> spp.	14
1.5.2.2. Prospecção de Genes de Resistência	16
1.6. ESTs de Leguminosas	18
1.7. Análise da Expressão Gênica	19
1.8. BAC - <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	20
2. PROBLEMA	22
3. HIPÓTESE	24
4. JUSTIFICATIVAS	24
5. OBJETIVO GERAL	26
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26

Capítulo 1 - Desenvolvimento Pós-infecção e Histopatologia de *Meloidogyne arenaria* raça 1 em *Arachis* spp.

1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Nematóide e Preparação do Inóculo	31
2.2. Avaliação do Fator de Reprodução do Nematóide em <i>Arachis</i> spp.	31
2.3. Estudos Histopatológicos	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Avaliação do Fator de Reprodução do Nematóide em <i>Arachis</i> spp.	33
3.2. Observações Histológicas das Raízes Infectadas das Espécies Suscetíveis, <i>A. hypogaea</i> cv. IAC-Tatu-ST e <i>A. duranensis</i> K7988	33

3.3. Observações Histológicas das Raízes Infectadas da Espécie Resistente <i>A. stenosperma</i> V10309	34
4. DISCUSSÃO	36

Capítulo 2 - Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria* e o desenvolvimento de marcadores microssatélites

1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Construção das Bibliotecas de cDNA	47
2.2. Seqüenciamento dos ESTs	50
2.3. Análise Computacional dos ESTs	50
2.4. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1. ESTs Diferencialmente Expressos	51
3.2. Marcadores Microssatélites Desenvolvidos	56
4. CONCLUSÕES	57

Capítulo 3 - Análise da expressão diferencial de genes de raízes de *Arachis stenosperma* e de *A. hypogaea* infectadas com o fitonematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1.

1. INTRODUÇÃO	60
1.1. Gene da Protéina Reprimida por Auxina - <i>arp</i>	61
1.2. Gene da enzima citocinina-oxidase/desidrogenase - <i>ckx</i>	63
1.3. Interação Auxina-Citocinina	64
1.4. Metalotioneínas– MT	66
1.5. Resveratrol sintase - RS	67
1.6. Proteínas Hipotéticas – HP1 e HP2	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1. Plantas de <i>Arachis</i> e bioensaio com <i>Meloidogyne arenaria</i> raça 1	70
2.2. Validação da análise <i>in silico</i> por Northern Blot	70
2.3. Análise das Proteínas Preditas	71
3. RESULTADOS	73
3.1. Análise temporal da expressão do gene <i>arp</i> (proteína reprimida por auxina, contig 821)	73
3.1.1. AsARP e outras proteínas ARP	73
3.2. Análise temporal da expressão do gene <i>ckx</i> (gene da enzima citocinina-oxidase/desidrogenase, contig 433)	75
3.2.1. AsCKX e outras proteínas CKXs	76
3.3. Análise temporal da expressão do gene <i>mt2</i> (gene da enzima metalotioneína 2, contig 154)	78
3.3.1. AsMT2 e outras proteínas MT2s	79
3.4. Análise temporal da expressão do gene <i>rs</i> (gene da enzima resveratrol sintase, contig 440)	80
3.4.1. AsRS e outras proteínas RS	80

3.5. Análise da expressão temporal dos genes <i>Ashp1</i> e <i>Ashp2</i> (genes homólogos às proteínas hipotéticas de <i>Nicotiana tabacum</i> e <i>Oryza sativa</i> , contigs 214 e 185)	81
4. DISCUSSÃO	85
4.1. Expressão do gene <i>Asarp</i>	85
4.2. Proteínas ARP	87
4.3. Expressão do gene <i>Asckx</i>	88
4.4. AsCKX e outras proteínas CKXs	89
4.5. Interação dos genes <i>Asarp</i> e <i>Asckx</i>	91
4.6. Expressão do gene <i>Asmt2</i> e a reação de hipersensibilidade	92
4.7. AsMT2 e outras proteínas MT2s	96
4.8. Expressão do gene <i>Asrs</i>	97
4.9. AsRS e outras enzimas resveratrol sintase	98
4.10. Expressão dos genes das proteínas hipotéticas AsHP1 e AsHP2	99
5. CONCLUSÕES	100

Capítulo 4 - Bibliotecas BAC dos genomas ancestrais diplóides do amendoim cultivado alotetraplóide

1. RESUMO	103
2. INTRODUÇÃO	104
3. MATERIAL E MÉTODOS	107
3.1. Plantas Utilizadas	107
3.2. Isolamento do DNA de Alto Peso Molecular	107
3.3. Construção das Bibliotecas BAC	108
3.4. <i>Screening</i> das Bibliotecas BACs e Isolamento do DNA	109
3.5. Sondas Genômicas	110
4. RESULTADOS	110
4.1. Isolamento do DNA de Alto Peso Molecular	110
4.2. Bibliotecas BAC	111
5. DISCUSSÃO	113

PERPECTIVAS	119
-------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
----------------------------	-----

ANEXOS

ANEXO I - Proite <i>et al.</i> , 2007 (manuscrito em preparação)	158
ANEXO II - Martins <i>et al.</i> , 2006	176
ANEXO III - Proite <i>et al.</i> , 2007	177
ANEXO IV - Alinhamentos	178
ANEXO V - Guimarães <i>et al.</i> , 2007 (manuscrito em preparação)	194

RESUMO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) é uma espécie importante, amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É bastante suscetível a diversos estresses bióticos e abióticos, para os quais muitas das espécies silvestres são resistentes. Neste trabalho foram avaliadas as duas espécies silvestres *A. duranensis* e *A. stenosperma* e selecionadas quanto à resistência ao nematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1. O estudo histopatológico mostrou que *A. stenosperma* é uma espécie resistente sendo esta caracterizada por uma reação de hipersensibilidade (HR). *A. duranensis* é uma espécie suscetível, mas possui ciclo de infecção diferenciado da espécie hospedeira típica, *A. hypogaea*. Bibliotecas de cDNA de raízes de *A. stenosperma* foram construídas para a formação de um banco de ESTs. Os ESTs de bibliotecas de raízes de *A. stenosperma* inoculadas e não inoculadas com o nematóide foram analisados *in silico* para a expressão diferencial de genes durante a infecção. A estratégia do estudo dos ESTs evidenciou oito genes diferencialmente expressos e foi uma primeira tentativa de procura dos fatores responsáveis pela resistência ao nematóide em *A. stenosperma*. A análise da expressão de seis ESTs foi testada por *Northern blot* para a confirmação da análise *in silico* e identificação do possível envolvimento destes genes com a resistência.

Neste trabalho ainda, foram construídas e validadas duas bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) das espécies silvestres diplóides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* que são as possíveis espécies parentais do alotetraplóide *A. hypogaea*. Estas bibliotecas servirão como importantes ferramentas genéticas que possibilitarão o isolamento de genes de interesse do amendoim silvestre e sua comparação com o genoma de outras leguminosas.

ABSTRACT

Arachis hypogaea, the cultivated peanut, is an important crop, widely grown in tropical and subtropical regions of the world. It is highly susceptible to several biotic and abiotic stresses to which wild species are resistant. In this work, two wild species, *A. duranensis* and *A. stenosperma* were evaluated and selected based upon resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* race 1. Histopathological studies showed that *A. stenosperma* is a resistant species. Its resistance is characterized by a hypersensitive response (HR). *A. duranensis* is susceptible but the evolution of the nematode cycle is different to the host species, *A. hypogaea*. cDNA libraries of roots were constructed for the development of an EST databank for wild *Arachis* species. ESTs generated from non inoculated and *M. arenaria* race 1 inoculated roots of *A. stenosperma* were analyzed *in silico* for differential gene expression during infection. This strategy revealed eight clones differentially expressed and represented a first attempt to search for factors that are responsible for resistance in *A. stenosperma*. Expression analysis of six of these ESTs was conducted by Northern blot to confirm and validate the *in silico* analysis for the possible involvement of these genes in resistance.

In this study two BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) libraries of the wild progenitors of *A. hypogaea*, *A. duranensis* and *A. ipaënsis* were also constructed and validated. These libraries will function as genetic tools and may help with the isolation of genes of interest in wild *Arachis* and in comparison with others legume genomes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho visou o estudo da interação do nematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Neal) Chitwood (Koenning e Barker, 1992; McSorley *et al.*, 1992) com duas espécies de *Arachis* silvestres, *A. stenosperma*, Krapov. e W.C. Gregory (acesso V10309) e *A. duranensis* Krapov. e W.C. Gregory (acesso K7899), com a espécie cultivada *A. hypogaea* L. (cultivar IAC-Tatu-ST), a identificação e análise de genes diferencialmente expressos durante o processo de infecção deste nematóide em raízes da espécie silvestre resistente *A. stenosperma*, e a construção de duas bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) de espécies silvestres de *Arachis*, *A. duranensis* (acesso V14167) e *A. ipaënsis* Krapov. e W.C. Gregory (acesso KG30076) visando o isolamento de genes de interesse.

1.1. O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* (Fabaceae) reúne cerca de 80 espécies, está dividido em nove seções botânicas de acordo com a morfologia, distribuição geográfica e viabilidade de cruzamentos (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005). As nove seções são: *Trirectoides*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*. A distribuição natural do gênero é restrita ao Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls e Simpson, 1994).

Arachis é um gênero originário da América do Sul, com provável centro de origem nas regiões de maior altitude do Brasil Central (Gregory *et al.*, 1980). A difusão do amendoim iniciou-se pelos indígenas para as diversas regiões da América Latina, América Central e México. No século XVIII foi introduzido na Europa. No século XIX difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia (Hammons, 1982 *in* Wynne *et al.*, 1991). O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea*, é uma espécie alotetraplóide, composto de dois genomas distintos (genoma A e B), ($2n=4x=40$) que surgiu de um eventual cruzamento entre as duas espécies silvestres diplóides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Kochert *et al.*, 1996; Lavia *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003; Seijo *et al.*,

2004), resultando em um híbrido estéril, cujos cromossomos foram duplicados, o que resultou na restauração da fertilidade (Kochert, *et al.*, 1996). A seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim, apresenta outras 30 espécies descritas, que são classificadas nessa seção por geneticamente compatíveis com *A. hypogaea*.

O amendoim possui sementes, ricas em óleo e proteínas, que são produzidas abaixo da superfície do solo e podem ser consumidas cruas (Brücher, 1989). A importância econômica do amendoim está relacionada ao fato de suas amêndoas possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo (aproximadamente 50%) e proteína (22 a 30%). Além disso, contêm carboidratos, sais minerais e vitaminas, constituindo-se num alimento altamente energético (585 calorias/100 gramas de sementes) (Conab, 2004). Sua folhagem é utilizada como forragem nas pastagens (Machado *et al.*, 2005) e a torta resultante da extração do óleo, juntamente com o farelo, é usada como ração animal (Evangelista *et al.*, 2004). O óleo de amendoim, bem como outros óleos vegetais, está dentre as fontes de biomassa prontamente disponíveis, e tem sido largamente investigado como candidato a programas de energia renovável, como os dos biocombustíveis (Ramos *et al.*, 2003). Além disso, a raiz do amendoim tem a capacidade de fixar nitrogênio, mantendo a fertilidade do solo (Miranda *et al.*, 2003; Pimratch *et al.*, 2004).

1.2. Cultura do Amendoim

1.2.1. Cenário Internacional

O amendoim é a quarta maior cultura oleaginosa mundial, ficando atrás apenas, na safra de 2005/06, da soja, canola e algodão. Nessa safra, o amendoim participou com 10,23% do total da safra mundial de oleaginosas, com uma produção de 33,08 milhões de toneladas (USDA, 2006).

Os maiores produtores mundiais de amendoim nas safras 2005/06 foram: China (43,3% da produção mundial); Índia (19,9%); Estados Unidos (6,6%); Nigéria (4,6%); Indonésia (3,5%); e demais com 21,9% (USDA, 2006).

1.2.2. Cenário Nacional

O Brasil já foi um grande produtor de amendoim. A cultura se expandiu a partir dos anos 50, quando as gorduras animais começaram a ser substituídas pelos óleos vegetais, especialmente de amendoim e algodão. Porém, com o crescimento da cultura da soja, mais barata e abundante, as áreas de cultivo e a produção de amendoim foram diminuindo gradativamente, estabilizando-se na faixa de 90 a 100 mil hectares cultivados, com volume de produção entre 171 e 217 mil toneladas/ano, entre os anos de 1998 a 2003 e produção entre 288 a 301 mil toneladas/ano, entre os anos de 2004 e 2006 (Tabela 1). (Conab, 2004 e 2006). Os principais fatores que explicam a redução da atividade econômica do amendoim, no período de 1998-2000, no Brasil foram: i) a concorrência crescente da soja, cujo processo de produção é totalmente mecanizado, desde a semeadura até a colheita; ii) a baixa produtividade por área em alguns anos, devido a adversidades climáticas e ocorrência de doenças foliares para as quais há carência de genótipos resistentes; iii) baixa qualidade do produto quanto aos níveis permitidos de ocorrência de aflatoxina nos grãos entre outros (Câmara, 2000).

Tabela 1. Produção área e produtividade da cultura do amendoim entre os anos 1998-2006.

	1998	1999	2000	2001	2002	2003/04	2004/05	2005/06
Produção (em 1000 t)	183,5	172,4	171,6	196,7	189,4	217,2	301,7	288,3
Área (em 1000 ha)	100,0	96,7	104,0	102,4	93,9	98,2	120,3	119,6
Produtividade (em kg/ha)	1.835,0	1.782,8	1.650,0	1.920,9	2.017,0	2.213	2.330,0	2.367,0

Fonte: Conab.

No entanto, a partir de 2000, o Brasil tem expandido a produção da cultura do amendoim nas regiões Sul e Sudeste, graças a expressivos aumentos de produtividade devido à introdução de novas cultivares. As variedades mais utilizadas de sementes de amendoim nos cultivos atuais, no Brasil, são originárias do Instituto Agrônomo de Campinas que mantém a atividade de pesquisa e desenvolvimento de sementes. (Conab, 2004).

1.3. Espécies Silvestres de *Arachis*

A coleta, manutenção, caracterização e avaliação de fontes de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis*, ocorreu relativamente tarde

comparado às outras culturas tais como tabaco, milho e trigo (Stalker e Simpson, 1995). A coleta de germoplasma de espécies de *Arachis* tem sido conduzida de forma disciplinada nos últimos 40 anos, na maior parte sob a liderança de Antonio Krapovickas (IBONE- *Instituto de Botánica del Nordeste*, Argentina), Walton C. Gregory (NCSU- *North Carolina State University*, EUA), Charles E. Simpson (TAES- *Texas Agricultural Experiment Station*, EUA) e José F. M. Valls (EMBRAPA- Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil).

A descoberta de que plantas possuem centros de origem, onde reside uma enorme diversidade genética, e de que plantas e patógenos co-evoluíram, estimulou uma série de programas de melhoramento com a finalidade de identificar genes de resistência em parentes silvestres de muitas plantas-alvo e assim poder introgridi-las (Leppik, 1970).

O Brasil contém alguns dos centros de diversidade genética mais ricos do mundo, sendo o centro de origem de um número de plantas de importância sócio-econômica (ex. mandioca, amendoim, caju, abacaxi e cacau), assim como de parentes silvestres de muitas outras plantas (ex. diversos representantes de solanáceas). A EMBRAPA *Recursos Genéticos e Biotecnologia* possui um banco de germoplasma silvestre de *Arachis*, com mais de 1000 acessos de espécies silvestres e outros 1000 de variedades primitivas, algumas das quais já identificadas como fontes de resistência para fungos e nematóides (Leal-Bertioli *et al.* 1999; Bertioli *et al.*, 2000; Fávero 2004). Outras espécies silvestres possuem grande valor como plantas forrageiras, (ex. *A. glabrata*, *A. pintoï*) e alto potencial como cobertura para controle de erosões e como plantas ornamentais (ex. *A. repens*, *A. helodes*, *A. kempff-mercadoï*) (Valls, 2000). Temos ainda, *A. villosulicarpa* e *A. stenosperma* que permanecem sendo cultivadas para produção de grãos alimentícios por indígenas brasileiros (Stalker e Simpson, 1995; Freitas *et al.*, 2003).

1.4. Principais Doenças e Parasitas no Amendoim

Arachis hypogaea é suscetível a várias doenças e patógenos tanto no Brasil quanto em todo mundo. Entre as principais doenças fúngicas e foliares temos: (i) *Cercospora arachidicola* ou mancha parda; (ii) *Cercosporidium personatum* ou mancha preta; (iii) *Puccinia arachidis* ou ferrugem e *Phoma*

arachidicola ou mancha barrenta. E entre os fitoparasitas de solo temos os nematóides como os mais importantes (Barreto, 2005)

1.4.1. Nematóides

Nematóides são tipicamente vermes cilíndricos não segmentados que formam o filo Nematoda. São considerados organismos primitivos evolutivamente e diversificados e estão entre os mais abundantes de todos os metazoários. Em números, eles representam de 80-90% de todos os animais (Boucher e Lamshead, 1994; Blaxter *et al.*, 1998). Nematóides ocupam todos os nichos ecológicos, a maioria das espécies, incluindo o modelo animal *Caenorhabditis elegans*, é de vida livre e se alimenta de bactérias e de outros organismos microscópicos (Williamson e Kumar, 2006). No entanto, os nematóides parasitas de plantas e animais são os que recebem maior atenção por terem grande impacto nos seres humanos, porque são responsáveis por doenças em animais domésticos e em muitas culturas de plantas (Bird e Koltai, 1999). Nas mais diferentes culturas do mundo, os nematóides fitoparasitas têm sido responsáveis por uma parcela significativa de perdas provocadas pela destruição do sistema radicular. Os prejuízos para a agricultura podem chegar a valores acima de 100 bilhões de dólares em todo o mundo (Opperman e Bird, 1998).

Muitos grupos diferentes de nematóides são fitoparasitas, com aproximadamente 0,3 mm a 10 mm de comprimento e de 20 a 60 µm de diâmetro. Todas as espécies possuem estágios do seu ciclo de vida no solo, mas são essencialmente aquáticos (Perry, 1996). Nematóides são normalmente bissexuais, mas em algumas espécies, onde os machos são raros ou desconhecidos ou não funcionais, a reprodução é partenogênica. Os nematóides fitoparasitas mais prejudiciais e mais importantes economicamente são os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., e os nematóides de cisto, *Heterodera* e *Globodera* spp. (Mitreva *et al.*, 2005).

1.4.1.1. O gênero *Meloidogyne*

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp. são endoparasitas sedentários e obrigatórios, alimentam-se exclusivamente no citoplasma de

células vegetais (Williamson e Gleason, 2003). Todos *Meloidogyne* spp., seja hospedeiro-específico ou polifágico, têm parasitismo caracterizado pelo estabelecimento de sítios de alimentação permanentes que compreendem as células gigantes no córtex, endoderme, periciclo e o parênquima vascular da raiz da planta hospedeira (Trudgill e Blok, 2001). Estes sítios de alimentação são como escoadores dos nutrientes produzidos através da fotossíntese pela planta, causam deformações e bloqueiam os tecidos vasculares limitando a translocação de água e nutrientes, impedindo assim, o crescimento e o desenvolvimento da planta.

1.4.1.1.1. Biologia dos nematóides das galhas

O ciclo de vida dos *Meloidogyne* spp. inicia-se com a liberação de centenas de ovos numa matriz gelatinosa na superfície da raiz por uma fêmea madura (Fig. 1). Em seguida a primeira muda que ocorre dentro do ovo, larvas móveis, denominadas juvenis de segundo estágio (J2), são liberadas no solo e geralmente re-infectam a mesma planta. Os J2s, no solo, não se alimentam e têm seu desenvolvimento bloqueado. Podem permanecer neste estágio por semanas ou até meses sobrevivendo de suas reservas lipídicas. As larvas são atraídas pelas raízes das plantas e penetram através da região de alongação. Os juvenis de segundo estágio migram então intercelularmente, separando as células na lamela média no córtex (Fig. 1). Eles continuam a migrar até a zona de diferenciação na região vascular, chamada cilindro central podendo causar pouca ou nenhuma lesão. Este processo inclui tanto forças mecânicas quanto secreções enzimáticas do nematóide. Na região do cilindro central, o nematóide estabelece o seu sítio de alimentação. Em resposta aos sinais do nematóide, as células adjacentes à sua cabeça se desenvolvem em “células gigantes”. Dali em diante, os J2s sofrem três mudas e se tornam adultos. A fêmea adulta se mantém sedentária, produzindo grandes massas de ovos e galhas, enquanto machos migram para o solo. Na maioria das vezes a reprodução é partenogênica. O crescimento e a reprodução do nematóide dependem da indução das células gigantes, as quais se acredita ser a sua única fonte de alimentação. Observações citológicas indicam que estas células gigantes são resultantes de sucessivas mitoses sem que haja a citocinese, ou seja, não há

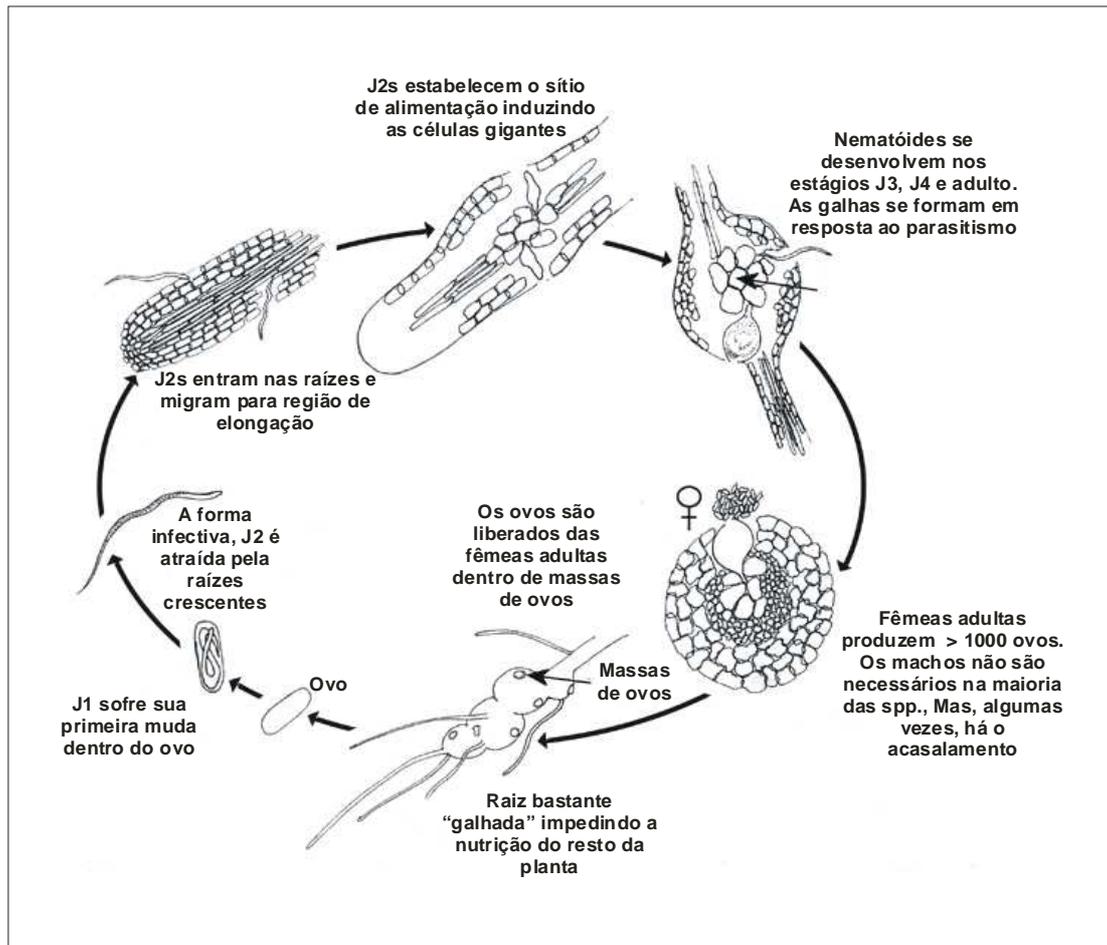


Figura 1- Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. Este gênero possui seis estágios de desenvolvimento: um estágio de ovo, um estágio larval dentro do ovo (= juvenil de 1^o estágio ou J1), três estágios larvais que se alimentam da planta (= juvenis de 2^o, 3^o e 4^o estágio ou J2, J3 e J4). O J2 é a forma infectiva e induz a formação do sítio de alimentação e das células gigantes, nos estágios de J3 e J4 pode-se observar o intumescimento da raiz devido às galhas formadas. E por último, um estágio adulto (= fêmea) que se alimenta da planta e produz ovos, geralmente, por partenogênese. Os ovos são liberados no solo em uma massa gelatinosa iniciando novo ciclo, i, (Figura adaptada do site: <http://www.apsnet.org/education/lessonsPlantPath/RootKnotNema/discycleFull.htm>).

divisão do citoplasma celular para formar células filhas. Consequentemente, as células se tornam multinucleadas com grandes núcleos e nucléolos. Estas células gigantes, comparadas às células normais, apresentam ainda, aumento na densidade do citoplasma por causa da proliferação das organelas e os vacúolos se tornam anormais (Huang, 1985, Bird e Kaloshian, 2003).

1.4.1.2. Nematóides no Brasil

O número de nematóides fitoparasitas encontrados no Brasil chega à pelo menos 238 espécies, sendo alguns deles largamente distribuídos por culturas de grande importância econômica. Em geral, os nematóides do gênero *Meloidogyne* são os que acarretam os problemas mais graves, o que pode ser decorrente da grande capacidade de adaptação de tais fitoparasitas aos diversos agrossistemas (Costa e Campos, 2001). A lavoura mais atingida, no Brasil, segundo esta pesquisa, é a cana-de-açúcar com perda de 15,3% no período de 1999, e prejuízo de R\$ 781 milhões. No arroz, as perdas alcançaram 10% e o prejuízo foi de R\$ 378,7 milhões e na soja, até outubro de 1999 (10,6% e R\$ 926,6 milhões). (Costa e Campos, 2001).

No Brasil, os nematóides do gênero *Meloidogyne* não são um problema grave para a cultura do amendoim. No entanto, para algumas espécies forrageiras como *Arachis pintoi* e *A. glabrata* são atacadas por *M. javanica* raça 4 (Carneiro *et al.*, 2003). Já em outros países como nos Estados Unidos e Índia *Meloidogyne* spp. chegam a causar 12% de perdas para o amendoim cultivado (Bailey, 2002). Os principais nematóides são os nematóides das galhas, *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Neal) Chitwood (Koenning e Barker, 1992; McSorley *et al.*, 1992), *M. hapla* Chitwood (Culbreath *et al.*, 1992; Schmitt e Barker, 1998) e *M. javanica* (Treb) Chitwood (Nelson *et al.*, 1989 e Sharma e McDonald, 1990, Tomaszewski *et al.*, 1994, Lordello *et al.*, 1997).

1.4.1.3. Nematóides no Amendoim

Meloidogyne arenaria raça 1, *M. hapla*, *M. javanica*, e *M. haplanaria* n. sp. (Eisenback *et al.*, 2003) impedem o desenvolvimento das plantas de amendoim, provocando sua murcha, perda de cor, podridão dos ginóforos, das vagens e das raízes. E ainda em associação com fungos de solo que incluem *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, ocasionam perdas da ordem US\$ 5 bilhões por ano nos Estados Unidos (Williamson e Hussey, 1996). As galhas que se formam podem ter o tamanho de uma cabeça de alfinete (*Meloidogyne hapla*) ou de intumescências com o dobro do diâmetro da raiz (*Meloidogyne arenaria*) (Figura 2) (Williamson e Hussey, 1996).



Figura 2. Galhas do fitonematóide *Meloidogyne arenaria* formadas nas raízes do amendoim.

1.4.1.4. Estratégias de Controle dos Nematóides no Amendoim

O controle de nematóides na cultura do amendoim se baseia principalmente em (i) rotação de culturas com espécies não hospedeiras ou antagonistas. Gramíneas como a grama batatais (*Paspalum notatum*), a grama seda (*Cynodon dactylon*), milho (*Pennisetum americanum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e *Crotalaria* estão entre as culturas mais efetivas na redução de populações de *Meloidogyne* e devem ser plantadas pelo menos durante um ano, mas preferencialmente dois anos antes de se retornar com a cultura do amendoim (Wang *et al.*, 2002, Rich e Kinloch, 2005). Infelizmente, as rotações têm pouco efeito sobre outro nematóide que também ataca o amendoim, *Pratylenchus* spp. (ii) A utilização de nematicidas fumigantes e não fumigantes é uma outra estratégia de combate aos nematóides das galhas mas tem ação limitada e indicação restrita por poluir muito o solo (Rich e Kinloch, 2005). (iii) A estratégia de busca por genótipos resistentes tem sido empregada em diversas culturas importantes, porém, dentro do germoplasma de *A. hypogaea* não foi encontrado nenhuma cultivar ou subespécie resistente a *M. arenaria* (Holbrook *et al.*, 1983). A resistência a este nematóide foi encontrada em diversas espécies silvestres de *Arachis* (Nelson *et al.*, 1989; Holbrook e Noe, 1990), então a utilização de parentes silvestres na introgressão desta resistência para amendoim cultivado é uma estratégia promissora (Simpson *et al.*, 2003).

1.5. Genes de Resistência

1.5.1. Resistência

As plantas necessitam se defender contra o ataque de patógenos, ou melhor, de organismos que causam doenças, incluindo, bactérias, fungos, vírus e nematóides. O controle das doenças de plantas é de fundamental importância e um dos principais objetivos de agricultores, programas de combate a doenças e da indústria agro-química. Plantas não possuem células de defesa móveis, mas ao contrário, suas defesas se baseiam em uma imunidade inata de cada célula e em um sistema de sinais que são originados a partir dos sítios de infecção (Jones e Dangl, 2006). Elas resistem ao ataque de patógenos através de respostas de defesa pré-formadas e também através de respostas induzidas (Hammond-Kosack e Jones, 1997). O patógeno emprega uma das três principais estratégias de ataque às plantas que são: (1) necrotrofia, (2) biotrofia, ou (3) hemibiotrofia. Os necrotróficos primeiramente matam as células hospedeiras e depois metabolizam seus nutrientes (Walton, 1996 *in* Hammond-Kosack e Jones, 1997). Os patógenos biotróficos e hemibiotróficos invadem células vivas e subvertem o metabolismo a favor do seu próprio crescimento e reprodução (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

Flor (1971) utilizando a interação entre o linho (*Linum usitatissimum*) e o seu fungo *Melampsora lini*, observou que não era somente a resistência da planta que era herdada, mas também a virulência do patógeno. Este trabalho originou o clássico modelo “gene-a-gene”, que propõe que para a resistência ocorrer, pares complementares de genes dominantes, um na planta hospedeira e outro no patógeno, são necessários. Uma perda ou uma alteração tanto no gene de resistência (*R*) da planta quanto no gene de avirulência (*Avr*) do patógeno resultará na doença (=compatibilidade). Este simples modelo serve para muitos patógenos biotróficos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides (Hammond-Kosack, 1997). O reconhecimento da invasão do patógeno mediado pelas proteínas *R*, inicia uma resistência forte e efetiva, impedindo o crescimento do patógeno (isto é denominado de interação incompatível ou incompatibilidade, onde a planta é resistente e o patógeno é avirulento). A ausência de reconhecimento específico permite o crescimento e difusão do patógeno (isto é

denominado de interação compatível ou compatibilidade, onde a planta é suscetível e o patógeno virulento) (Nimchuk *et al.*, 2003). No entanto, mesmo sem haver um reconhecimento específico, o sistema de defesa da planta estará ativado até certo nível, o nível basal, limitando assim a propagação da doença. O reconhecimento específico ao contrário, na maioria dos casos, promove uma super ativação das respostas de defesa basais, e frequentemente vêm acompanhadas por uma forma de morte celular programada, a chamada resposta de hipersensibilidade (*HR*) (Van der Hoorn e Jones, 2004). A morte celular localizada associada à *HR* impede o avanço do patógeno nos tecidos não infectados. Concomitantemente com o aparecimento da *HR* ocorre o aumento da síntese de várias famílias de proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas *PR* (*Pathogenesis-related proteins*), (Durrant e Dong, 2004). Muitas dessas proteínas exibiram atividade antimicrobiana tanto *in vitro* quanto *in vivo*. As proteínas *PR* são expressas em regiões não inoculadas da planta permitindo um maior espectro da resistência conhecido como resistência sistêmica adquirida ou *SAR* (*Systemic Acquired Resistance*), (Ryals *et al.*, 1996) e por causa desta correlação, o aumento da expressão de genes *PR* é frequentemente utilizado como marcadores para *SAR* (Durrant e Dong, 2004).

1.5.2. Genes *R* e suas proteínas

As proteínas codificadas pela maioria dos genes de resistência *R* já caracterizados, possuem motivos encontrados em outras proteínas receptoras e de transdução de sinal. As proteínas *R* estão divididas em cinco classes: classe 1 formada pela proteína *PTO* de tomate, possui uma região catalítica com uma serina-treonina quinase e o motivo de miristilação no amino-terminal (Loh *et al.*, 1998 *in* Martin *et al.*, 2003). A classe 2 engloba o maior grupo de proteínas de resistência (exs.: *MI* de tomate e *RPS2* de *Arabidopsis* que conferem resistência à *Meloidogyne incognita* e *Pseudomonas syringae* respectivamente), possui uma região com repetições de leucina (*LRRs- Leucine Rich-repeats*) na porção do carboxi-terminal e um domínio de ligação a nucleotídeos (*NBS - Nucleotide-binding site*) na porção amino-terminal (Bent *et al.*, 1994; Milligan *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2003). Enquanto a região *LRR* é muito variável, a região *NBS* apresenta motivos conservados (Kobe e Deisenhofer, 1994; Belkhadir *et al.*,

2004). Estes genes que codificam para estas proteínas são muito abundantes nos genomas de plantas, sendo estimado em 1% no genoma de *Arabidopsis* (Meyers *et al.*, 1999). Nenhuma outra função, além, da resistência a doenças lhes foi atribuída até o momento (Belkhadir *et al.*, 2004). A classe NBS-LRR dos genes de resistência podem ainda ser subdividida. Esta divisão é baseada na sua habilidade de codificar para outros domínios reconhecíveis. Uma subclasse (ou também classificada como classe 3 por Martin *et al.*, 2003) codifica para o domínio TIR, que tem homologia com o domínio Toll do gene de *Drosophila* e homologia com os receptores interleucina-1 (Interleukin-1 Receptor) de genes de mamíferos na porção N-terminal da proteína (Hulbert *et al.*, 2001). As proteínas NBS-LRR sem o domínio TIR codificam tipicamente para uma estrutura *coiled-coil* próxima ao N-terminal, e algumas vezes na forma de zíper de leucina (*leucine zipper*). As proteínas *R* das três primeiras não possuem domínios transmembrânicos (TM) e têm localização intracelular (Martin *et al.*, 2003). A classe 4 é formada pelas proteínas CF (*Cladosporium fulvum*) de tomate. Elas não possuem domínio NBS, no entanto, possuem domínio transmembrana e um domínio LRR extracelular, bem como uma pequena porção putativamente citoplasmática sem motivos conhecidos (Martin *et al.*, 2003). A classe 5 é formada pela proteína XA21 de arroz que além de possuir o domínio TM e LRR extracelular possui uma região serina-treonina quinase (STK) citoplasmática (Song *et al.*, 1995). Algumas poucas proteínas *R* não se agrupam nas cinco classes anteriores porque possuem motivos estruturais diferentes, as agem especificamente contra certos patógenos, como exemplos temos: MLO de cevada e RPW8 de *Arabidopsis* que conferem resistência ao fungo *Blumeria graminis* (Buschges *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2001), *HS1^{PRO1}* de beterraba que confere resistência ao nematóide de cisto *Heterodera schachtii* (Cai *et al.*, 1997). Os produtos dos genes de resistência não atuam sozinhos no controle das reações de defesa, outros genes estão envolvidos na resistência mediada pelos genes *R* (von Loon *et al.*, 2006).

1.5.2.1. Genes *R* e a identificação destas resistências aos nematóides *Meloidogyne* spp.

Em nematologia o termo resistência é usado para descrever a habilidade de uma planta de inibir ou suprimir o desenvolvimento ou reprodução de um

nematóide (Trudgill, 1991). Esta resistência pode ir de baixa ou moderada a elevada. Uma planta altamente ou completamente resistente não permite a reprodução de nematóides ou qualquer vestígio de infecção. Plantas parcialmente ou moderadamente resistentes permitem algum nível de reprodução dos nematóides. Já as plantas susceptíveis permitem o seu desenvolvimento normal (Cook e Evans, 1987 *in* Davis *et al.*, 2000).

Diversos genes de resistência a nematóides (*Nem-R*) foram isolados a partir de plantas, todos conferindo resistência aos endoparasitas sedentários (Tabela 2) (Williamson e Kumar, 2006). O primeiro gene de resistência a ser clonado foi *Hs1^{pro-1}* de beterraba e que confere resistência ao nematóide de cisto

Tabela- 2 – Genes de resistência a nematóides (*Nem-R*) já clonados e mapeados. (Tabela adaptada do artigo Williamson e Kumar, 2006)

Clonado	Genes	Classe de Gene R	Planta	Nematóide	Referência
	<i>Hs1^{pro-1}</i>	-	Beterraba	Nematóide de cisto de beterraba: <i>Heterodera schachtii</i>	Cai <i>et al.</i> , 1997
	<i>Mi-1</i>	NBS-LRR não-TIR	Tomate	Nematóides das galhas: <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> ; Afídeo de Batata: <i>Macrosiphum euphoribiae</i> ;	Milligan <i>et al.</i> (1998); Vos, <i>et al.</i> (1998)
	<i>Hero A</i>	NBS-LRR não-TIR	Tomate	Mosca-branca: <i>Bemisia tabaci</i>	Bleve-Zacheo, <i>et al.</i> (1998); Ernst <i>et al.</i> (2002)
	<i>Gpa2</i>	NBS-LRR não-TIR	Batata	Nematóide de cisto da batata: populações específicas de <i>G. pallida</i>	Van der Vossen, <i>et al.</i> , 2000
	<i>Gro1-4</i>	NBS-LRR não-TIR	Batata	Nematóide de cisto da batata: <i>G. rostochiensis</i> (Ro1)	Paal <i>et al.</i> , 2004
	<i>Rhg1 e Rhg4</i>	LRR (Domínio Transmembrânico Extracelular e Domínio Citossólico Serina-Treonina Quinase)	Soja	Nematóide de cisto da soja: <i>Heterodera glycines</i> Tipo 0	Hauge <i>et al.</i> , 2001; Lightfoot e Meksem, 2002
Mapeado					
	<i>H1</i>	-	Batata	Nematóide de cisto da batata: <i>G. rostochiensis</i> (Ro1 e Ro4)	Bakker <i>et al.</i> , 2004
	<i>Mi-3</i>	-	Tomate	Nematóides das galhas: <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i>	Yaghoobi <i>et al.</i> , 2005
	<i>Mi-9</i>	-	Tomate	Nematóides das galhas: <i>M. incognita</i>	Ammiraju <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cre1</i>	-	Trigo	Nematóide de cisto de cereal: <i>Heterodera avenae</i>	De Majnik <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cre3</i>	-	Trigo	Nematóide de cisto de cereal: <i>Heterodera avenae</i>	De Majnik <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ma</i>	-	Ameixa	Nematóides das galhas – todas as espécies testadas	Claverie <i>et al.</i> , 2004
	<i>Has-1^{og}</i>	-	Arroz	Nematóide de cisto: <i>Heterodera sacchari</i>	Lorieux. <i>et al.</i> , 2003
	<i>Me3</i>	-	Pimenta	Nematóides das galhas: <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> e alguns isolados de <i>M. hapla</i>	Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2001
	<i>Rmc1</i>	-	Batata	Nematóides das galhas: <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. falax</i> e alguns isolados de <i>M. hapla</i>	Roupe van der Voort, <i>et al.</i> , 1999

Heterodera schachtii (Cai *et al.*, 1997). Os genes *NemR* clonados a partir de tomate como o *Mi-1* e o *Hero A*, conferem resistência a várias espécies de nematóides das galhas (Milligan *et al.*, 1998 ; Vos *et al.*, 1998) e a outras duas espécies de nematóide de cisto que atacam batata (Ernst *et al.*, 2002), respectivamente. Muitas das variedades modernas de tomate possuem o gene dominante e único *Mi*. Este gene tem sido um exemplo clássico mostrando que o uso de gene de resistência reduz a necessidade de aplicação de pesticidas (Barker, 2003). Todos esses genes são membros da classe NBS-LRR dos genes *R*, que não contem o domínio TIR no amino-terminal (Williamson e Kumar, 2006).

O primeiro sucesso alcançado na geração de plantas resistentes a nematóides de interesse comercial foi com a introgressão do gene *Mi* identificado na espécie silvestre *Solanum peruvianum* (*ex-Lycopersicon peruvianum*), (Smith, 1944; Spooner *et al.* 1993; Peralta e Spooner 2001; Peralta *et al.*, 2005), e transmitido para *Solanum esculentum* (tomate). Este gene confere resistência aos nematóides das galhas: *M. incognita*, *M. hapla* e *M. arenaria*.

Outros genes de resistência aos nematóides das galhas também já foram identificados. O gene *Me* identificado em *Phaseolus vulgaris*, feijão (Omwega e Roberts, 1992), em *Capsicum annuum*, pimenta (Hendy *et al.*, 1985 in Blevé-Zacheo *et al.*, 1998) e o gene *N*, também identificado em pimenta (Hare *et al.*, 1957 in Thies *et al.*, 2000), conferem resistência aos nematóides *M. arenaria* raça 1 e 2, *M. hapla* e *M. javanica*. Já o gene *Mex-1* confere resistência a *M. exigua* em café (Noir *et al.*, 2003)

1.5.2.2. Prospecção de Genes de Resistência

Genes *R* têm diversas similaridades estruturais, independentemente da espécie da planta da qual são isolados ou do tipo de patógeno que reconhecem. Apesar de já haver genes de resistência a nematóides identificados em espécies silvestres e cultivares resistentes derivados destas, eles ainda são poucos (Vrain, 1999 e Roberts, 2002). Existe a necessidade de se identificar um maior número de genes e de cloná-los, para assim, poder estudar os mecanismos de defesa, ou seja, a natureza destas defesas e também para desenvolver

cultivares resistentes (Vrain, 1999). Uma estratégia básica para se localizar genes de resistência em plantas é a construção de um mapa genético baseado em marcadores moleculares associados ao gene de resistência encontrado (Vrain, 1999). Estes marcadores podem ser RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) que estão associados com um fragmento de DNA que sempre co-segrega com a característica de resistência nos cruzamentos (Vrain, 1999).

Outra metodologia amplamente empregada é a utilização das seqüências de genes candidatos que utiliza regiões conservadas dos genes que se deseja isolar para a construção de *primers* de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). A similaridade das seqüências de aminoácidos das regiões NBS e LRR permite a construção de *primers* para isolar regiões de genes *R* de outras espécies por amplificação de DNA através da técnica de PCR (Aarts *et al.*, 1998). Em alguns trabalhos, *primers* foram construídos para a região NBS e o produto da provável tradução indica similaridade com genes de resistência conhecidos. Regiões análogas a genes de resistência de diversas espécies de *Arachis* foram isoladas e clonadas e serão utilizadas como marcadores moleculares para o isolamento de genes de resistência (Bertioli *et al.*, 2003, Yüksel *et al.*, 2005).

Uma outra estratégia ainda, pode ser a geração de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Os ESTs são uma forma complementar, mas extremamente rápida de identificação de novos genes (Höfte *et al.*, 1993). ESTs são seqüências curtas de DNA produzidas a partir de clones de cDNA escolhidos aleatoriamente e sequenciados uma única vez (Gautheret *et al.*, 1998). Além de serem amplamente explorados na identificação de genes novos, vêm também sendo utilizados para a criação de extensos catálogos de genes (Aaronson *et al.*, 1996 in Gautheret *et al.*, 1998; Zafar *et al.*, 2002). Estes catálogos permitem a comparação de similaridades de seqüências a genes já conhecidos sugerindo assim sua função (Matthews *et al.*, 2001). Estes clones de cDNA podem ser mapeados assim como clones genômicos têm sido mapeados. O mapeamento dos clones de cDNA indica a posição dos genes, alguns com função e padrão de expressão conhecidos, em regiões do genoma que podem ser correlacionadas com fenótipos. Assim, a associação de marcadores gerados pelo clone de cDNA com fenótipos pode aumentar o entendimento ou o relacionamento com as vias

e mecanismos bioquímicos que afetam características agrônômicas como resistência (Matthews *et al.*, 2001). ESTs podem ser convertidos em marcadores baseados em PCR através de *primers* desenhados a partir de suas seqüências. Se estes *primers* se mostrarem polimórficos, o clone definido é chamado de STS (*Sequenced Tagged Site*) (Matthews *et al.*, 2001).

1.6. ESTs de Leguminosas

Os genomas da maioria das culturas entre as leguminosas são grandes e complexos. Por exemplo, soja é um poliplóide formado possivelmente há 15 mil anos atrás (Schlueter *et al.*, 2004 *in* Doyle *et al.*, 2004) e alfafa é um autotetraplóide com genomas de aproximadamente 1200 Mb e 1600 Mb respectivamente. O amendoim cultivado tem um genoma de 2800 Mb e a ervilha de 4000 Mb (Boerma *et al.* 2001). Genomas destes tamanhos dificultam significativamente o desenvolvimento de mapas físicos ordenados, bem como a identificação e a localização de genes importantes. Relações de sintenia dentro de famílias botânicas possibilitam o uso de espécies com genomas bem menores para facilitar no entendimento das espécies com genomas muito grandes. Alguns exemplos foram o seqüenciamento completo dos genomas menores como o de *Arabidopsis thaliana* (128 Mb) (*The Arabidopsis-Genome Initiative*, 2000) e arroz (425 Mb) (Sasaki e Burr, 2000) que promoveram uma plataforma para a análise do genoma de espécies mais complexas como milho, canola e trigo.

Para simplificar a análise de genomas entre as leguminosas, foram propostas, em paralelo, duas espécies como modelos de estudo, ambas diplóides, autocompatíveis, com genoma pequeno e ciclo de vida curto. A primeira, *Medicago truncatula*, ($2n = 4x = 32$), tem genoma de 450 Mb, parece ter sintenia com alfafa (importante forrageira) e algum grau de sintenia com ervilha e soja (Bell *et al.*, 2001) e a segunda espécie, *Lotus japonicus*, ($2n = 12$), e genoma de 472,1Mb (Handberg *et al.*, 1992 *in* Sato *et al.*, 2001).

O seqüenciamento de todo genoma de *M. truncatula* está sendo executado (Cheung *et al.*, 2006) e até o momento (março/2007) já foram gerados 225.487 ESTs, e concomitantemente foram gerados 150.631 ESTs para *L. japonicus* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html).

Como os genomas de soja e amendoim são muito grandes, uma alternativa é o seqüenciamento de ESTs ao invés do genoma todo. Shoemaker *et al.* (2002) já geraram 12.000 ESTs não-redundantes de soja. O estudo destes ESTs já permitiu a identificação de genes de diferentes bibliotecas (situações) e também permitiu a construção do quadro histórico da evolução genética da soja (Nelson e Shoemaker, 2006). Neste trabalho apresentamos a primeira geração de ESTs de espécie silvestre de amendoim *Arachis stenosperma*.

1.7. Análise da expressão gênica

O estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos em nível molecular. Por exemplo, estes estudos podem ser utilizados na identificação de rede de genes expressos de fundamental importância no desenvolvimento de determinada estrutura, ou na resposta de um organismo a um estímulo externo. O estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir para a caracterização de resistências, pois possibilita a identificação de genes-chave de redes pela comparação da expressão gênica durante o desenvolvimento de uma estrutura sob condições normais e em organismos carregando uma mutação ou submetidos a algum tipo de estresse (Park *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Gorantla *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). O conjunto de dados da expressão diferencial de vários genes sob diferentes condições, pode ser usado para reconstruir as vias reguladas por estes genes, predizer onde eles atuam e identificar novos genes associados ao processo. Para o entendimento da função de um gene, é fundamental o estudo de onde e quando ele é expresso. Recentemente, várias estratégias foram desenvolvidas para permitir o estudo da função de vários genes simultaneamente, entre elas: a genética reversa (geração de mutações específicas em genes de interesse), *screens* mutagênicos (geração de mutações randômicas e *screening* de um pool de mutantes para se identificar fenótipos de interesse) e bioinformática (a análise dos dados gerados por todas as estratégias acima) (Guimarães *et al.*, 2005). As estratégias acima, associadas aos projetos genoma, que têm como objetivo o seqüenciamento do genoma inteiro de vários organismos, têm possibilitado o estudo sistemático da expressão diferencial de genes em nível de genoma como um todo. A análise da

expressão diferencial de genes em resposta ao ataque de um patógeno constitui, portanto, ferramenta importante no isolamento de genes de resistência ou de fatores envolvidos com a interação patógeno-hospedeiro (Guimarães *et al.*, 2005).

1.8. BAC -Bacterial Artificial Chromosome

No final dos anos 80, com a criação dos YACs (*Yeast Artificial Chromosome*) (Burke *et al.*, 1987), se tornou possível a clonagem de grandes fragmentos de DNA (Mbp) e conseqüentemente, a exploração de genomas baseada em bibliotecas de grandes genomas se tornou factível. No entanto, os YACs possuíam sérios inconvenientes como vetores de clonagem (Anderson, 1993), pois 50% dos clones eram quimeras ou possuíam rearranjos nos insertos, tais como deleções, transposições e inversões (Neil *et al.*, 1990; Burke, 1990; Venter *et al.*, 1996; Cai, *et al.*, 1998). Tais clones não poderiam ser usados nas pesquisas de seqüenciamento e mapeamento. E ainda outra desvantagem era que a manipulação e isolamento dos insertos em YACs era muito difícil (Woo *et al.*, 1994).

No início dos anos 90, uma nova alternativa surgiu com o desenvolvimento dos vetores BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) (Shizuya *et al.*, 1992). Ao contrário do seu nome, BACs não são realmente cromossomos artificiais de bactéria, mas sim fatores F modificados. Embora possam transportar insertos de até 500 kb de comprimento, os mais comuns possuem entre 80-200 kb (Shizuya *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996; Tomkins *et al.*, 1999). A grande maioria dos vetores BAC possui as características normais de seleção de plasmídeos como gene de resistência a antibióticos, sítios de clonagens múltiplas e gene repórter (Choi e Wing, 1999 *in* Peterson *et al.*, 2000). Os clones BACs têm diversas vantagens em relação aos YACs, tais como, eficácia de transformação, não apresentam os quimerismos e nem rearranjos dos insertos; estes são bastante estáveis e relativamente fáceis de manipular e de serem propagados comparados aos clones baseados em vírus e leveduras; Marra, *et al.*, 1997; Yüksel e Paterson, 2005). Por tais motivos estes vetores suplantaram os YACs e se tornaram o vetor dominante, sendo usado em grande escala no seqüenciamento e no mapeamento físico (Cai *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 1999).

Nas bibliotecas BAC, cada clone é armazenado individualmente e ordenadamente, tornando-as um grande instrumento da pesquisa da genética moderna. Estas bibliotecas foram desenvolvidas para diversas espécies vegetais de importância econômica: amendoim (Yüksel e Paterson, 2005); milho (Messing *et al.*, 2004); soja (Danesh *et al.*, 1998; Tomkins *et al.*, 1999); arroz (Ammiraju *et al.*, 2006); trigo (Akhunov *et al.*, 2005; Devos *et al.*, 2005); café (Noir *et al.*, 2004) entre vários outros.

As bibliotecas BACs podem ser utilizadas em várias aplicações, entre elas:

(a) Isolamento de genes de interesse: a propriedade de ser o próprio molde para seqüenciamento de DNA e molde para reações de PCR permitiu o desenvolvimento do seqüenciamento de BAC-ends (Venter *et al.*, 1996), promoveu avanços no mapeamento baseado em STS (*Sequence Tagged Site*) (Venter *et al.*, 1998) e permitiu uma maneira rápida de procurar regiões genômicas bem definidas em genes fenotipicamente significantes (Bouck *et al.*, 1998).

(b) Mapeamento físico: o vetor BAC trouxe comodidades para clonagens de grandes fragmentos que combinadas com o desenvolvimento de métodos de grande escala para DNA *fingerprinting* (Marra *et al.*, 1997), com o agrupamento das seqüências em *contigs* (Ding *et al.*, 1999), o seqüenciamento de extremidades do BAC (BAC-end), e o mapeamento baseado em STS auxiliaram na ligação entre marcadores de DNA no mapeamento físico. Conseqüentemente muitos genes interessantes e importantes têm sido isolados (Cai *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 1999). O mapeamento físico em larga escala já resultou na construção de vários *contigs* de BAC, englobando cromossomos inteiros e/ou grupos de cromossomos completos (Mozo *et al.*, 1999; Janda *et al.*, 2006).

(c) Ligação entre mapas genéticos e físicos: muitas sondas de DNA usadas para construir mapas genéticos podem ser localizadas diretamente nos BACs permitindo uma maneira de superpor mapas genéticos diretamente nos mapas físicos baseados em BACs. Esta característica facilita a clonagem baseada em mapas de genes responsáveis por fenótipos específicos (Sanchez *et al.*, 1999; Lamoureux *et al.*, 2006), bem como o estudo de sintonia, ou seja, comparação de regiões homólogas entre genomas (Rana *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004; Jakse *et al.*, 2006).

- (d) Identificação de regiões cromossomais de interesse: BACs têm sido empregados com sucesso como sondas de experimentos de hibridização de fluorescência *in situ* (FISH- Fluorescence in situ hybridization) (Gómez *et al.*, 1997; Mokros *et al.*, 2006). A localização no cromossomo de seqüências de DNA clonadas baseada em FISH permite que os mapas físicos e moleculares sejam diretamente sobrepostos nas estruturas dos cromossomos, e subsequentemente permite informações úteis sobre as relações entre estrutura cromossomal, seqüência de DNA e recombinação genética (Peterson *et al.*, 1999; Messing *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2004; Akhunov *et al.*, 2005).
- (e) Seqüenciamento de genomas: muitos seqüenciamentos de genomas completos têm empregado a estratégia de clonagem em BACs (Venter *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2006) e muitos outros.
- (f) Comparação entre genomas.

O mapeamento físico permite uma visão de como os clones de mapas genéticos estão distribuídos pelo genoma. Estes mapas fornecem maneiras para clonagem posicional, já que na essência são como andar sobre os cromossomos. O mapeamento físico de *Arachis* possibilitará a localização cromossômica de genes de interesse, o que auxilia no processo de melhoramento assistido, além de possibilitar a análise genômica comparativa entre *Arachis* e outras espécies, especialmente aquelas da família das leguminosas, possibilitando seleção assistida por marcadores e isolamento de genes de interesse.

2. PROBLEMA

O amendoim cultivado foi originado a partir de um ou poucos eventos de hibridização entre espécies de *Arachis* de genomas diferentes (A e B). Essas plantas sofreram alotetraploidização espontânea e se tornaram geneticamente distantes de seus parentes silvestres. O amendoim cultivado apresenta pequena base genética e alta suscetibilidade a doenças e seca, enquanto que seus parentes silvestres apresentam altos níveis de resistência. Visando aumentar a base genética do amendoim cultivado, busca-se a identificação de genes de resistência em germoplasma silvestre para sua introgressão em amendoim.

Ainda são poucos os estudos em genética e genômica de *Arachis*, e poucos os genes de resistência isolados a partir dessas espécies.

3. HIPÓTESES

- Espécies silvestres de *Arachis* apresentam maior diversidade genética do que o amendoim cultivado e contêm genes de resistência a fatores bióticos.
- A análise da expressão gênica diferencial de plantas de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* possibilitará a identificação de genes associados à resistência ao nematóide.
- O desenvolvimento de ferramentas genéticas, como bibliotecas do tipo BAC, possibilitarão o isolamento de genes de interesse do amendoim silvestre e sua comparação com o genoma de outras leguminosas.

4. JUSTIFICATIVAS

Da planta modelo:

- 1) O amendoim cultivado é a quarta cultura entre as oleaginosas, sendo importante na produção de amêndoas para consumo em natura ou produção de óleo para dieta e indústria. É muito suscetível a pragas e doenças e as perdas com os patógenos são bastante expressivas economicamente e merecem um combate alternativo, isto é, sem o uso de agroquímicos grande tão prejudiciais ao meio ambiente.
- 2) Existe um banco de germoplasma de mais de 100 espécies silvestres de *Arachis* sendo estas consideradas, a grande fonte de novos genes de resistências aos patógenos do amendoim cultivado, e aquele está disponível para o seu estudo.
- 3) Há falta de conhecimento sobre genes de resistência dentro da família das leguminosas. O *Arachis* apesar de possuir um grande genoma, possui particularidades importantes que podem ser extrapoladas para outras espécies, se tornando também um modelo paralelo de estudo dentro da família, ao lado de *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*.
- 4) Os clones gerados nas bibliotecas poderão ser usados diretamente como marcadores ligados a genes ou gerar seqüências microsátélites e assim auxiliar

no mapeamento genético de *Arachis*, contribuindo assim com os resultados gerados para os projetos dos quais este trabalho está inserido.

Da praga modelo:

- 1) *M. arenaria* é um fitoparasita de grande importância econômica. É uma praga de amplo espectro, que agride várias culturas, amendoim, milho, maçã, pimenta, tabaco, ervilha, várias hortaliças e está distribuído no mundo todo.
- 2) *M. arenaria* raça 1 consegue infectar as espécies silvestres deste estudo. Muitas outras, inclusive *M. arenaria* raça 2, *M. incognita* e *M. javanica* raça 4 (esta última, infecta algumas espécies silvestres), foram testadas sem sucesso quanto ao parasitismo. É parasita biotrófico obrigatório e também, hospedeiro natural do tomateiro tornando sua manutenção (multiplicação) e manipulação relativamente fácil.

Da estratégia escolhida:

- 1) Projetos que envolvem a produção e análise de *ESTs* estão aflorando pelo mundo, gerando um grande volume de informações básicas a respeito da expressão gênica diferencial em diferentes situações de várias espécies.
- 2) A geração de *ESTs* permitirá o acúmulo de informação através da criação de um banco de dados de genes diferencialmente expressos, o que não está disponível em *Arachis*. Este banco de dados será um recurso com diversas utilidades, como o desenvolvimento de marcadores moleculares, busca de homólogos de genes já identificados como importantes na interação planta-patógeno e etc.
- 3) A Embrapa e a Universidade Católica de Brasília oferecem a estrutura necessária para a produção de bibliotecas de cDNA, para o seqüenciamento em larga escala e para a análise através de bioinformática das seqüências.
- 4) Colaboração com CIRAD- *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*). Este centro possui estrutura física e técnica adequada para a geração, manipulação e manutenção de grande

número de clones, como aparelhos de robótica. Estes são imprescindíveis durante o processo de construção e validação das bibliotecas BAC.

5. OBJETIVO GERAL

Desenvolver ferramentas para o isolamento de genes relacionados com resistência.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudar a interação planta-nematóide (*M. arenaria* raça 1) através do estudo histopatológico.
- 2) Estudar a expressão gênica de plantas sabidamente resistentes e susceptíveis através de seqüenciamento massal de cDNA.
- 3) Gerar um banco de dados de genes expressos de *Arachis* relacionados com a resistência a *M. arenaria* raça 1.
- 4) Validação da expressão diferencial de alguns genes candidatos através da técnica de *Northern blot*.
- 5) Construção, validação e procura de RGAs (Genes Análogos de Resistência - *Resistance Gene Analogs*) em bibliotecas BAC dos parentais silvestres do amendoim cultivado.

Este trabalho é parte integrante dos projetos, “Prospecção e análise da expressão de genes envolvidos com resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* em germoplasma silvestre de *Arachis* spp.” e do projeto ARAMAP, “The identification of resistances to biotic stress in wild *Arachis* germoplasm, and the development of tools for breeding by genetic mapping and comparative genomics”. O primeiro é financiado pelo Banco Mundial e Embrapa e o segundo pela Comunidade Européia.

Vários grupos estão envolvidos neste estudo: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (DF-Brasil), Universidade Católica de Brasília (DF-Brasil), Unesp-Botucatu (SP-Brasil), Universidade de Aarhus (Dinamarca), Sainbury’s Laboratory (Inglaterra) e Instituto de Botânica Del Nordeste (Argentina). Cada grupo está desenvolvendo uma parte deste estudo multidisciplinar que uma vez integrado permitirá a criação de um mapa genético, de um mapa físico e da identificação de genes de resistência em *Arachis* spp.

Este trabalho também permite a excelente combinação da biotecnologia e dos recursos genéticos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é possuidora de um dos bancos de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* mais completos do mundo.

O trabalho foi dividido em quatro partes: inicialmente se estudou a interação do nematóide *M. arenaria* raça 1 com duas espécies silvestres diplóides e com o amendoim cultivado. Procurou-se estudar como se dá o desenvolvimento do nematóide nestas espécies e identificar o mecanismo de defesa na espécie resistente, visou-se ainda a quantificação da reprodução do nematóide nas espécies analisadas. A segunda parte do trabalho visou a identificação *in silico* de genes diferencialmente expressos entre bibliotecas de raízes *A. stenosperma* (espécie resistente) inoculadas e não inoculadas com o nematóide. A terceira parte visou a validação através de experimentos de *Northern blot* dos genes diferencialmente expressos identificados na análise *in silico*. A expressão destes mesmos genes foi investigada num sistema compatível. A quarta parte do trabalho procurou desenvolver uma ferramenta genômica - bibliotecas BAC- das espécies parentais do amendoim cultivado, que entre outras aplicações, permitirá o isolamento dos genes diferencialmente expressos identificados e analisados.

Capítulo 1

Desenvolvimento Pós-infecção e Histopatologia de *Meloidogyne arenaria* raça 1 em *Arachis* spp.

Este capítulo contém a tradução do manuscrito em preparação referente aos resultados do estudo histopatológico (Anexo I).

1. INTRODUÇÃO

Os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são endoparasitas obrigatórios que induzem transformações complexas nas suas plantas hospedeiras. Os juvenis de segundo estágio (J2) invadem as raízes pela zona de alongação, e migram entre as células e estabelecem um sítio de alimentação na zona de diferenciação do cilindro vascular (Wyss *et al.*, 1992; Williamson e Hussey, 1996). *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Neal) Chitwood (Koenning e Barker, 1992; McSorley *et al.*, 1992); *M. hapla* Chitwood (Culbreath *et al.*, 1992; Schmitt *et al.*, 1998); *M. javanica* (Treub) Chitwood (Tomaszewski *et al.*, 1994) e *M. haplanaria* (Eisenback *et al.*, 2003) são as quatro espécies descritas que parasitam o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.). Entre estes, o que causa maiores danos à cultura nos Estados Unidos é *M. arenaria* raça 1. As perdas na produção podem exceder 50 % em campos infestados (McSorley *et al.*, 1992).

O controle dos nematóides das galhas é limitado e inclui a aplicação de nematicidas no solo, os quais são economicamente dispendiosos, têm baixa eficácia e ainda, são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (Bird e Kaloshian, 2003). Como existem diversos efeitos negativos associados ao uso destes químicos, o emprego de plantas resistentes é bastante considerado como uma forma de controle para os nematóides das galhas. A resistência ao nematóide *M. arenaria* raça 1, *M. javanica* e *M. hapla* foi observada em muitas espécies silvestres de amendoim (Banks, 1969; Nelson *et al.*, 1989; Holbrook e Noe, 1990; Sharma *et al.*, 1999).

M. arenaria raça 1, conhecido como o nematóide do amendoim, é o mais agressivo dentre as quatro espécies de nematóides das galhas que ataca esta cultura. A resistência a este nematóide foi caracterizada em duas espécies silvestres, *A. cardenasii* e *A. batizocoi*. A primeira espécie inibe completamente o desenvolvimento do nematóide e esta resistência foi acompanhada por uma reação de hipersensibilidade (Nelson *et al.*, 1990). A segunda provocou a redução do número total de nematóides invasores que conseguiram chegar à maturidade, produzir ovos e aumentou o período do ciclo de vida do nematóide. Nesta espécie não foi observada reação de hipersensibilidade (Nelson *et al.*, 1990). As duas espécies foram usadas para a geração dos cultivares resistentes de *A. hypogaea* COAN e NemaTAM através da introgressão dos

genes (Simpson, 1991) envolvendo um complexo de híbridos anfidiplóides inter-específicos (Simpson *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2003).

Foi realizada uma busca dentre várias espécies silvestres de *Arachis* do banco de germoplasma de *Arachis* da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, para se identificar e caracterizar novas fontes de resistências e também para identificar parentais contrastantes quanto a resistência à *M. arenaria* raça 1 que poderiam ser usados na formação de uma população e na construção de um mapa genético (Moretzsohn *et al.*, 2005). Numa primeira sondagem as espécies *A. stenosperma* (acesso V10309) e *A. duranensis* (acesso K7988) pareciam ser resistente e suscetível respectivamente (Leal-Bertioli, S.C.M., comunicação pessoal).

As espécies silvestres de *Arachis* são tidas como importantes fontes de genes para resistência a vários fungos, vírus e nematóides (Stalker, 1984, Wynne *et al.*, 1991). Os objetivos do presente trabalho são: i) confirmar a resistência ou a susceptibilidade de *A. stenosperma* (acesso V10309) e *A. duranensis* (acesso K7988), utilizando *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST como controle de susceptibilidade; ii) examinar a interação de *M. arenaria* raça 1 com *A. stenosperma*, *A. duranensis* e *A. hypogaea*, para determinar quando e como a resistência é expressa; iii) compreender os mecanismos de resistência à *M. arenaria* raça 1 comparando as respostas histológicas de resistência e susceptibilidade nas espécies de *Arachis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Nematóide e Preparação do Inóculo

Todos os experimentos foram conduzidos na Quarentena da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e com o nematóide *M. arenaria* raça 1 isolado de amendoim e gentilmente cedido pelo Dr. D. W. Dickson (Universidade da Flórida, Gainesville, EUA). Foi efetuada uma eletroforese da enzima esterase fenótipo A2 para confirmar a identidade do nematóide (Carneiro e Almeida, 2001). Os nematóides foram multiplicados alternadamente em amendoim (*Arachis hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST) e tomate (*Solanum esculentum* cv. Santa Cruz). Os ovos foram extraídos de raízes infectadas utilizando-se 0,5% NaOCl (Hussey e Barker, 1973). Os ovos foram eclodidos em funis modificados de Baermann e os juvenis de segundo estágio (J2) foram coletados por centrifugação e contados em lâminas de Peter sob microscópio de luz (Vrain, 1977).

2.2. Avaliação do Fator de Reprodução do Nematóide em *Arachis* spp.

Duas espécies silvestres de *Arachis* (*A. stenosperma* acesso V10309 e *A. duranensis* acesso K7988) foram avaliadas quanto à resistência ao nematóide *M. arenaria* raça 1 sob condições de casa de vegetação (25 – 30 °C). A espécie comercial e suscetível *Arachis hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST foi utilizada como controle. Plantas das diferentes espécies foram crescidas e mantidas em vasos plásticos (3000 cm³) contendo uma mistura de solo de estéril. As plantas com quatro semanas de idade foram inoculadas com 10.000 ovos/planta (Pi - população inicial). Os ovos foram introduzidos a 3 cm de profundidade ao redor da base do caule das plantas. Os vasos foram dispostos num delineamento em blocos completamente casualizados com oito repetições. Setenta e cinco dias após inoculação (DAI), os diferentes tratamentos foram avaliados através da extração dos ovos e dos J2s a partir de todo sistema radicular, utilizando-se 1% NaOCl. A população final (Pf) foi quantificada utilizando-se lâmina de Peter sob

microscópio de luz e o fator de reprodução ($Fr = Pf/Pi$) foi calculado (Oostenbrink, 1966). As médias dos fatores de reprodução foram comparadas pelo Teste de Tukey com diferença de probabilidade de 5%. Os tratamentos com $Fr < 1,00$ foram considerados como resistentes à *M. arenaria* raça 1.

2.3. Estudos Histopatológicos

Quarenta e cinco plântulas cada espécie de *Arachis* foram transplantadas para copos plásticos de 200 cm³ contendo a mistura estéril de duas partes de MaxPlant e uma parte de areia fina. Plantas com duas semanas de idade contendo de seis a oito folhas expandidas foram inoculadas com 5000 juvenis de segundo estágio (J2)/planta. Foram utilizadas uma planta como controle para cada espécie. As plantas controles receberam somente água destilada com o mesmo volume do inóculo. As raízes inoculadas foram removidas e lavadas cuidadosamente nos seguintes pontos: 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 32, 48 e 63 dias após inoculação (DAI). Várias pontas de raiz, (segmentos de 1 a 3 cm de comprimento) foram analisadas sob uma lupa estereoscópica e sob o microscópio de luz (Axiophoto, Zeiss) utilizando-se a técnica de clarificação com NaOCl e coloração com fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983). Esta técnica foi utilizada para facilitar a identificação dos sítios de infecção. Para os cortes finos, as pontas das raízes com algum intumescimento foram cortadas e fixadas em 2% glutaraldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio pH 7,0 a 4 °C por 48 horas. As pontas foram lavadas três vezes por dez minutos em 0,1 M cacodilato de sódio pH 7,0. Pós-fixadas em 2% tetróxido de ósmio em 0,1 M cacodilato de sódio pH 7,0 por duas horas e lavadas novamente por três vezes por cinco minutos cada vez no mesmo tampão. O material sofreu desidratação seriada por 30 minutos cada em etanol (20% - 100%), seguida de duas desidratações adicionais com 100% etanol. As amostras foram infiltradas com resina Spurr em um volume constante de 100% etanol por 4-6 h (1V:3V; 2V:3V; 3V:3V; 4V:3V) e polimerizadas a 70 °C por 24 h. Os tecidos emblocados foram cortados com ultramicrotomo em secções de 0,5 – 1,4 µm de espessura e colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina (1% w/v, em bórax, pH 8,9). Os cortes foram examinados em microscópio de luz (Axiophoto, Zeiss).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação do Fator de Reprodução do Nematóide em *Arachis* spp.

O fator de reprodução (Fr) de *M. arenaria* raça 1 após 75 DAI (Tabela 1) nas três espécies de *Arachis* mostrou que o controle *Arachis hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST é suscetível (Fr = 16,4), *A. duranensis* (K7988) é moderadamente suscetível (Fr = 3,5) e que *A. stenosperma* (V10309) é altamente resistente ou imune (Fr = 0). Estes resultados são adequados para o objetivo de se encontrar, entre as espécies silvestres, parentais contrastantes em relação à resistência a nematóides.

3.2. Observações Histológicas das Raízes Infectadas das Espécies Suscetíveis *A. hypogaea* cv IAC-Tatu-ST e *A. duranensis* K7988

Observações macroscópicas aos 3-8 DAI das raízes clarificadas e coradas com fucsina ácida revelaram que vários J2 penetraram com sucesso as raízes através da região apical de ambas as espécies. Muitos J2 entraram nas raízes e migraram em grupos através do córtex (Fig. 1a e 1b). A penetração foi observada até 11 dias. Aos nove DAI, J2/J3 em forma de salsicha, foram observados no cilindro vascular iniciando o estabelecimento do sítio de alimentação. Aos 11-13 DAI, as raízes infectadas começaram a aumentar o seu diâmetro nas duas espécies de amendoim. Foi possível observar juvenis de terceiro estágio (J3) em *A. duranensis* (Fig. 1c) e suas raízes começaram a formar pequenos intumescimentos, já nas raízes de *A. hypogaea*, foram observados J3-J4 e galhas maiores e mais largas nos sítios de infecção do nematóide (Fig. 1d). Aos 15-19 DAI, observações macroscópicas mostraram que nas duas espécies o sítio de alimentação já estava estabelecido. Aos 32 e 48 DAI, fêmeas com massas de ovos já foram observadas em *A. hypogaea*, enquanto até 63 DAI foram observadas fêmeas com forma globóide nas raízes de *A. duranensis* (Figs. 1e e 1f). O desenvolvimento de *M. arenaria* raça 1 nas raízes de *A. hypogaea* foi mais rápido que em *A. duranensis*. Análises microscópicas mostraram claramente o atraso na evolução do desenvolvimento

dos nematóides nas raízes da espécie silvestre suscetível, *A. duranensis* comparado com o amendoim cultivado. Nas duas espécies, os nematóides foram localizados perto dos tecidos vasculares indicando que a formação das galhas foi iniciada em células pouco diferenciadas do parênquima. As células hospedeiras de *A. hypogaea* que se encontravam na porção anterior da cabeça do nematóide começaram a aumentar de tamanho a partir de 8 DAI (Fig. 2a), prevendo o estágio final de diferenciação em células gigantes. Aos 16-19 DAI, as células gigantes que constituíam o sítio de alimentação em *A. hypogaea* possuíam uma forma oval e continham um grande vacúolo e outros vários pequenos e também muitos pequenos núcleos (três a nove por célula gigante), (Figs. 2b e 2c). Porém apenas aos 16 DAI, foi possível observar o nematóide iniciando a indução da formação de célula gigante em *A. duranensis*. A parede celular estava começando o processo de espessamento (Fig. 2d). Aos 19 DAI foi observado célula gigante induzida com muitos vacúolos (Fig. 2e) e aos 32 DAI, células gigantes bem desenvolvidas em *A. duranensis*. Suas células gigantes também apresentaram uma forma oval e eram multinucleadas (Fig. 2f). Os nematóides induziram um maior número de células gigantes, entre oito e dez em *A. duranensis* que em *A. hypogaea* com quatro a seis.

3.3. Observações Histológicas das Raízes Infectadas da Espécie Resistente *A. stenosperma* V10309

Observações macroscópicas aos 3-9 DAI revelaram um número reduzido de J2 na região sub-apical das raízes de *A. stenosperma* (Fig. 1g) comparado com a distribuição dos nematóides nas raízes das espécies suscetíveis. Foram observados nematóides na superfície da raiz com suas cabeças localizadas nas primeiras camadas de células, indicando que a penetração teve progresso até 17 e 19 DAI (Figs. 1h e 1i). Nestes pontos, bem perto da região anterior dos nematóides localizados dentro do cilindro vascular das raízes, as células hospedeiras foram coradas com fucsina ácida e mostraram uma coloração marrom-amarelada escura. Nestas amostras, quando o J2 (corado com cor de rosa) tentou induzir o sítio de alimentação, ocorreu uma reação de hipersensibilidade (Figs. 1h) e os J2s parecem estar mortos no local da necrose, mostrando uma coloração marrom; talvez todo o tecido estivesse ficando

oxidado (Fig. 1i). A análise macroscópica demonstrou que os J2s levaram de oito a 19 DAI para penetrar na ponta da raiz e migrar até o cilindro vascular. A reação de hipersensibilidade nunca foi observada na região do córtex durante o início da penetração. Todo J2 encontrado no cilindro vascular estava associado com uma reação de hipersensibilidade.

A análise microscópica aos 8 DAI mostrou J2 no cilindro vascular. As células hospedeiras próximas da porção anterior do nematóide mostraram coloração azul-escura e com citoplasma desorganizado e sem núcleos visíveis (Fig. 2g). A maioria dos nematóides observada também mostrou o conteúdo celular desorganizado, contendo o acúmulo de um material com cor azul escuro (dados não mostrados). Os cortes finos mostraram J2s na epiderme, córtex e na região vascular. As regiões necrosadas apresentaram coloração cor azul-escura (Fig. 2h). Não foram observados nematóides em forma de salsicha e nem sítios de alimentação estabelecidos nas raízes infectadas. Conseqüentemente nenhuma célula gigante foi induzida em qualquer dos pontos analisados. Também não foram observados hipertrofia do tecido e hiperplasia das células. A reação de hipersensibilidade ocorreu ao redor das células da cabeça do nematóide no cilindro vascular e nunca no córtex ou na epiderme, mesmo durante seu trajeto até os vasos (Fig. 2i). Não foi possível encontrar nematóides após 19 DAI e o sistema radicular analisado aos 32-63 DAI mostrou algumas raízes necrosadas.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, apresentamos pela primeira vez, um estudo em nível histopatológico do desenvolvimento do ciclo de infecção de *M. arenaria* raça 1 em raízes de duas espécies silvestres de amendoim, *A. stenosperma* (V10309) e *A. duranensis* (K7988); e nas raízes do amendoim cultivado, *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST. Os primeiros objetivos do trabalho foram a confirmação de genótipos contrastantes entre as espécies silvestres de *Arachis* (*A. stenosperma* e *A. duranensis*) com relação à resistência ao nematóide *M. arenaria* raça 1 e a comparação destes com *A. hypogaea*. Foi realizada também a comparação da penetração do nematóide das galhas e o seu desenvolvimento nas espécies de amendoim.

A. hypogaea cv. IAC-Tatu-ST é a variedade mais plantada no Brasil e foi escolhida como espécie suscetível controle. O fator de reprodução (Fr) desta variedade (Fr = 16,4) é semelhante ao Fr da variedade comercial americana, Florunner (Fr = 15,5), um dos amendoins mais cultivados nos EUA (Holbrook e Noe, 1990).

Apesar de *A. duranensis* K7988 ter apresentado um fator de reprodução (Fr = 3,5) inferior a *A. hypogaea*, foi mesmo assim, considerado suscetível, pois de acordo com Oostenbrink (Fr < 1) ou com o conceito de Hussey e Jansen (2002), que diz que para um genótipo ser considerado resistente tem que apresentar reprodução do nematóide menor que 10% do genótipo suscetível. Foi demonstrado que *A. stenosperma* V10309 tem alto nível de resistência ou pode-se dizer que é imune pois não ocorreu reprodução de *M. arenaria* raça 1 nas suas raízes (Fr = 0), (Tabela 1).

Os juvenis de segundo estágio de *M. arenaria* raça 1 penetraram nas raízes da espécie suscetível *A. duranensis*, estabeleceram sítio de alimentação e induziram a formação de células gigantes, com algumas diferenças da espécie comercial suscetível, sendo elas: (i) o desenvolvimento dos nematóides após penetração foi bastante afetado pelo genótipo hospedeiro, com 32 DAI para completar o ciclo de vida em *A. hypogaea* e mais de 63 DAI *A. duranensis*; (ii) o tamanho das galhas: pequenas galhas em *A. duranensis* e grandes em *A.*

hypogaea; (iii) o número de células gigantes: maior em *A. duranensis* (8-10) que em *A. hypogaea* (4-6).

Os dados aqui obtidos sugerem que *A. stenosperma* apresenta pelo menos dois tipos de resistência ao nematóide *M. arenaria* raça 1. Um dos tipos de resistência suprimiu a penetração dos J2s e o outro impediu o desenvolvimento após penetração. A resistência em plantas pode ocorrer em diversos níveis. O fracasso do J2 em penetrar na espécie resistente, *A. stenosperma* talvez esteja indicando que existam barreiras físicas e químicas em suas raízes. Tais barreiras foram sugeridas previamente para raízes resistentes de uva (Anwar e McKenry, 2000), uma cultivar de algodão (Anward *et al.*, 1994), uma cultivar de soja (Dropkin e Nelson, 1960), uma cultivar de pimenta (Pegard *et al.*, 2005) e de café (Anthony *et al.*, 2005). Esta resistência indica também que as raízes de *A. stenosperma*, não atraíram os J2s ou talvez que até os repeliram. Uma outra alternativa é que os J2s poderiam ter penetrado e depois saído das raízes, apesar disto não ter sido observado. Foi mostrado que o exsudado de *Curcumis sativus* possui um triterpeno, substância que repele J2 de *Meloidogyne* (Hayene e Jones, 1976). Da mesma forma, Tanda e colaboradores (1989) demonstraram que o exsudado de raízes de gergelim (*Sesamun indicum*) tinha efeito nematicida ao J2 de *Meloidogyne*.

Nelson *et al.*, (1990) não observaram diferenças durante a penetração nas raízes das espécies resistentes silvestres de *Arachis*, *A. cardenasii* e *A. batizocoi*, e uma espécie suscetível. Isto também foi observado em soja (*Glycine max*) (Herman *et al.*, 1991) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), (Sydenham *et al.*, 1996).

Além disso, na espécie resistente, *A. stenosperma*, os J2s permaneceram na forma de vermes e reunidos nas células do cilindro vascular. Não foi observado, desenvolvimento dos J2s, nem formação de galhas e nem massas de ovos. Isto sugere que este amendoim silvestre tenha um mecanismo de defesa bioquímico, pós-penetração, o qual bloqueia o desenvolvimento e a reprodução do nematóide. A resposta pós-penetração de incompatibilidade nas raízes de *A. stenosperma* foi considerada uma clássica reação de hipersensibilidade (HR). Esta HR ocorreu mais tarde no ciclo de infecção (8-19 DAI). Diversos trabalhos mostraram que HR é responsável pela resistência ao nematóide em outras espécies de plantas, como em tomate (Dropkin, 1969),

tabaco (Ghannam *et al.*, 2005), café (Rodrigues *et al.*, 2000, Anthony *et al.*, 2005), pimenta (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, Pegard *et al.*, 2005), e a HR nestas espécies difere no tempo que leva para aparecer (ocorrer); algumas em horas após penetração e noutras apenas após dias. Pesquisadores têm proposto que plantas resistentes que expressam HR logo no início do ciclo (12-48h após infecção) e nos tecidos mais externos da raiz (i.e., epiderme e córtex), teriam sua resistência facilmente quebrada por nematóides com nova virulência (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, Castagnone-Sereno *et al.*, 2001). Ao contrário, se a HR ocorrer mais tarde no ciclo de infecção e em tecidos mais internos da raiz (i.e., perto ou dentro do cilindro vascular), bloquearia irreversivelmente o desenvolvimento do nematóide, prevenindo assim, a seleção de um genótipo virulento. A resposta de hipersensibilidade foi também um mecanismo de resistência para *A. cardenasii* (Nelson *et al.*, 1990), e semelhantemente à *A. stenosperma*, esta HR, ocorreu mais tarde no ciclo de infecção, 7 DAI e 8 DAI, respectivamente.

Como a resistência da espécie silvestre pode ser transferida para *A. hypogaea*, *A. stenosperma* e *A. duranensis* foram utilizadas como parentais, resistente e suscetível, numa população segregante (Moretzsohn *et al.*, 2005). Genes de resistência serão mapeados e uma estratégia molecular foi escolhida, uma biblioteca de ESTs foi construída para se tentar identificar genes de resistência em *A. stenosperma* (Proite *et al.*, 2007; Cap. 2). A comparação dos genes expressos em raízes não inoculadas e inoculadas com *M. arenaria* mostrou oito genes diferencialmente expressos que podem estar envolvidos com a resistência na espécie silvestre. A expressão diferencial foi confirmada por *Northern blot* (Cap. 3).

Tabela 1- Análise da reprodução de *M. arenaria* raça 1 em *Arachis* spp^a. e a reação das variedades.

<i>Arachis</i> spp.	Peso fresco de Raiz (g)	Nematóides/ Peso fresco de Raiz (g)	Número de Ovos e J2s ^b	Fator de Reprodução ^c
<i>A. stenosperma</i> (V10309)	8.7	0	3038	0 c (R)
<i>A. duranensis</i> (K7988)	17.0	1781	470	3.5 b (MS)
<i>A. hypogaea</i> cv IAC-Tatu-ST	11.7	13811	0	16.4 a (S)

^a escala de reação de variedades segundo Moura e Régis (1987):

Resistente (R) = 0 – 40 ovos e J2s;

Moderadamente Resistente (MR) = 41 – 267 ovos e J2s;

Moderadamente Suscetível (MS) = 268 – 688 ovos e J2s;

Suscetível (S) > 689 ovos e J2s.

^b média do número de ovos produzidos a partir de 8 plantas analisadas após 75 DAI.

^c números com diferentes letras minúsculas, diferem uma da outra pelo teste de Tukey com 5 % de probabilidade. S = suscetível, MS = moderadamente suscetível, R = resistente.

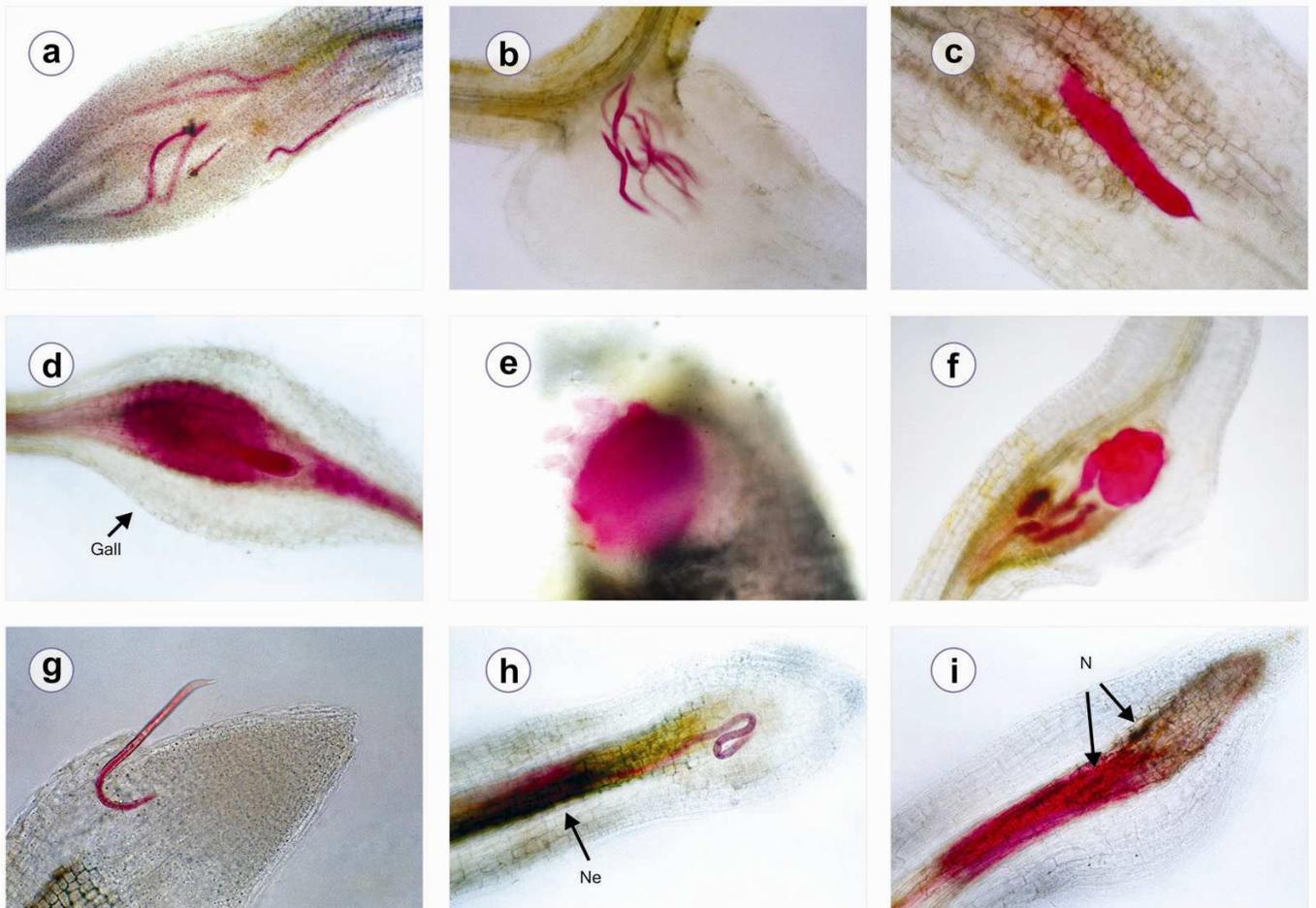


Figura 1- Processo de infecção de *Meloidogyne arenaria* raça 1 nas raízes infectadas de *Arachis* spp. As preparações de fucsina ácida mostram o atraso no ciclo de vida do nematóide em *A. duranensis* acesso K7988 (**a**, **c**, **f**) em relação a *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST (**b**, **d**, **e**) e a resistência ao nematóide em *A. stenosperma* acesso V10309 (**g**, **h**, **i**) devida à baixa penetração e à reação de hipersensibilidade (**g**, **h** e **i**). (**b**) *A. hypogaea* - 6 DAI, observam-se vários juvenis de 2^o estágio (J2) penetrando na raiz; (**d**) *A. hypogaea* - 11 DAI, observa-se juvenil de 4^o estágio (J4) e o intumescimento da raiz ou galha formada; (**e**) *A. hypogaea* - 32 DAI, observa-se fêmea madura liberando ovos, indicando final de um ciclo de infecção). (**a**) *A. duranensis* - 8 DAI; observam-se vários J2s penetrando na raiz; (**c**) *A. duranensis* - 11 DAI; é observado J3; (**f**) *A. duranensis* - 63 DAI, observa-se fêmea não madura e células gigantes. (**g**) *A. stenosperma* - 8 DAI; observam-se poucos J2s penetrando na raiz; (**h**) *A. stenosperma* - 17 DAI, continua-se a se observar a penetração de juvenis de 2^o estágio e a oxidação do tecido da raiz no eixo vascular quando os J2s tentaram induzir sitio de alimentação (coloração marrom-amarelada); (**i**) *A. stenosperma* - 19 DAI, observam-se nematóides no interior do cilindro vascular com coloração marrom evidenciando que estão oxidados e mortos. **DAI**= dias após inoculação, **Ne**= Necrose causada pela reação de hipersensibilidade, **N**= nematóide.

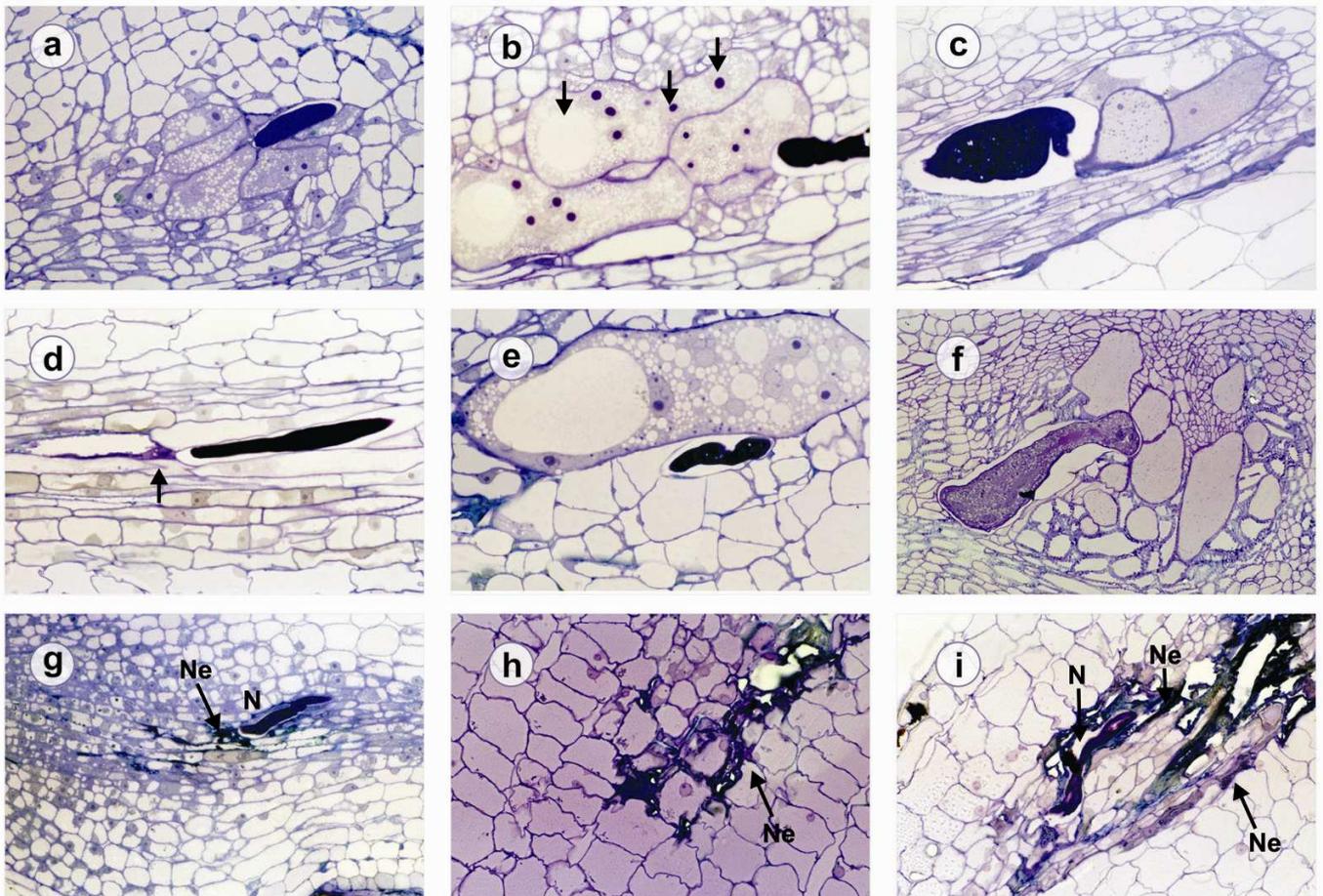


Figura 2- Desenvolvimento do nematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1 analisado através de seções longitudinais de raízes infectadas de *Arachis* spp. coradas com azul de toluidina. (a) *A. hypogaea* - 8 DAI, é observado células gigantes indicando que o sítio de alimentação já está instalado. (b) *A. hypogaea* - 16 DAI, células gigantes multinucleadas e com forma oval (setas indicam vacúolos e nucléolos) e (c) *A. hypogaea* - 19 DAI, observa-se fêmea imatura com células gigantes com citoplasma bastante denso. (d) *A. duranensis* - 16 DAI, observa-se o início da indução de formação das células gigantes indicado pelo espessamento da parede celular (seta); (e) *A. duranensis* - 19 DAI, observa-se célula gigante bem formada com muitos vacúolos e multinucleada; (f) *A. duranensis* - 32 DAI, é observado nematóide em forma larval – juvenil de quarto estágio (J4) e várias células gigantes com citoplasma bastante denso. (g) *A. stenosperma* - 8 DAI, observa-se juvenil de segundo estágio (J2) no cilindro vascular e o início de uma reação de hipersensibilidade - HR (seta); (h) e (i) *A. stenosperma* - 16 DAI e 19 DAI, é observado típica necrose no tecido radicular na região do cilindro vascular indicando reação de hipersensibilidade à infecção do nematóide. **DAI**= dias após inoculação, **N**= nematóide e **Ne**= Necrose – HR.

Capítulo 2

Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria* raça 1 e o desenvolvimento de marcadores moleculares

*Os resultados apresentados neste capítulo gerou o artigo publicado na revista ***BMC Plant Biology*** (Proite K, Leal-Bertioli SC, Bertioli DJ, Moretzsohn MC, da Silva FR, Martins NF, Guimarães PM. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. 2007 Feb 15;7:7.- (Anexo III).

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os genomas de *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* estão sendo seqüenciados (Young *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2006). Estas duas espécies representam os dois principais modelos de leguminosas que possuem genomas relativamente pequenos (450 Mpb e 472 Mpb, respectivamente). Os genomas de outras leguminosas são bem maiores, chegando até mais de 100 vezes o genoma de *Lotus* (Bennett e Smith, 1976). O transcriptoma de uma espécie particular pode ser amostrado através de coleções de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) gerados a partir de tecidos diferentes e de estágios diferentes de desenvolvimento ou de organismos sujeitos a diferentes condições de estresse (Zhang *et al.*, 2004). Os ESTs são pequenos fragmentos de cDNA parcialmente seqüenciados que representam a expressão gênica em um dado momento e que depois podem ser comparados a um banco de dados. A similaridade entre as seqüências permite que suas possíveis funções sejam identificadas, promovendo assim, a acumulação de informação genética e a identificação de novos genes.

O crescimento, o desenvolvimento e as respostas das plantas ao ataque de patógenos são caracterizados por diferenciações dos tecidos e das células. Estas mudanças globais são reguladas pela expressão específica de genes.

A análise de ESTs tem sido empregada intensivamente numa variedade de projetos genomas, principalmente com o objetivo de identificar novos genes e realizar o mapeamento genético (Eujayl *et al.*, 2002 e 2004). Os dados de ESTs têm sido usados na comparação quantitativa da expressão de genes entre duas bibliotecas de cDNA distintas. A acumulação exponencial de seqüências ESTs em banco de dados públicos permite uma outra oportunidade de se obter um número muito grande de genes diferencialmente expressos, através da análise *in silico* (Jeong *et al.*, 2006). Tanto a análise *in silico*, quanto a de coleções de perfis de expressão de ESTs têm sido conduzidos a fim de se identificar genes envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento e crescimento da planta, bem como em respostas aos estresses em inúmeros exemplos vegetais (Federova *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006) e outros. Os perfis de expressão são inferidos pela freqüência de ocorrência de um EST qualquer. A redundância do transcrito (ou melhor, o conjunto de ESTs

reunidos em clusters/número total de ESTs) é medida pela abundância de um cDNA em bibliotecas não normalizadas (Cho *et al.*, 2005). Em outras palavras, a informação adquirida pela escolha aleatória de cDNAs representa os níveis relativos de expressão dos genes numa dada biblioteca. A significância desta análise de expressão digital, que novamente, é feita através do cálculo das freqüências de ESTs em diferentes bibliotecas de cDNA foi anteriormente, validada estatisticamente (Audic *et al.*, 1997, Ewing *et al.*, 1999; Stekel *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2006).

ESTs também são valiosos marcadores moleculares, especialmente em projetos de mapeamento comparativo, pois são mais conservados entre diferentes espécies (Ma *et al.*, 2004). Constituem uma nova fonte de marcadores porque estão fisicamente associados com regiões codificadoras do genoma (Eujayl *et al.*, 2002). Os marcadores contemporâneos que se utilizam dos dados de ESTs são os polimorfismos de base única (*SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms*) (Picoult-Newberg, *et al.*, 1999), os conjuntos de ortólogos conservados (*COSs – Conserved Orthologue Sets*) (Fulton *et al.*, 2002), e os marcadores microssatélites (*SSR- Simple Sequence Repeats*) derivados de ESTs (*ESTs-SSRs*) (Cordeiro *et al.*, 2001 e 2006). Os marcadores microssatélite ou *SSRs (Simple Sequence Repeats)*, estão sempre presentes nos genomas eucarióticos e consistem em repetições de 2-5 nucleotídeos num segmento contínuo (Fraser *et al.*, 2004), e são amplamente utilizados como marcadores moleculares. Entre as vantagens de se empregar os *SSRs* como marcadores temos: alto conteúdo informativo, herança co-dominante, reprodutibilidade e especificidade de *locus* (Powell *et al.*, 1996). Este último tem especial importância e relevância quando se é considerado sua aplicação na genotipagem dos *SSRs* para coleções de germoplasma, para o qual geralmente se necessita um grande investimento na aquisição de dados de diferentes fontes (Eujayl *et al.*, 2002).

Os *ESTs-SSRs* possuem a vantagem sobre outros sistemas de marcadores gênicos de serem marcadores baseados em PCR, o que os torna mais eficientes que os marcadores baseados em hibridização como os marcadores *RFLP* (Sledge *et al.*, 2005). Os *primers* de microssatélites desenhados a partir dos bancos de ESTs são tanto de baixo custo quanto eficientes de serem gerados, desde que já haja bibliotecas de cDNA

sequenciadas. Como são gerados a partir de seqüências de genes expressos, em geral são mais informativos que os gerados a partir de seqüências genômicas, as quais podem ser derivadas de seqüências de DNA não codificadoras (Cordeiro *et al.*, 2001; Eujayl *et al.*, 2002). Além disso, uma porcentagem alta de *primers* de *EST-SSRs* poderão amplificar seqüências através de várias espécies comparadas com os microssatélites genômicos (Eujayl *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2006), tornado-os mais aplicáveis em estudos de comparação genética.

A análise de ESTs associados às respostas de resistência em germoplasma silvestre, e seu mapeamento em mapa genético de *Arachis*, recentemente desenvolvido por este grupo (Moretzsohn *et al.* 2005), possibilitará a seleção assistida por marcadores genéticos, o que acelerará o melhoramento da cultura. Desta forma, será possível, em cada fase da seleção, a escolha dos indivíduos que contêm o máximo do genótipo desejado, diminuindo o tempo do processo de seleção. Além disso, estas seqüências poderão ser utilizadas no isolamento de genes de resistência e sua transferência direta para espécies cultivadas através da transformação de plantas.

Até o momento, apenas 25.000 ESTs, todos oriundos de amendoim cultivado *A. hypogaea*, estavam disponíveis no GenBank (*GenBank update*). Destes, menos de 10% têm função putativa associada à resistência. Desta forma, uma maior varredura do genoma de *Arachis*, incluindo principalmente espécies silvestres com resistência comprovada a fungos e nematóides, se faz necessária.

No presente capítulo, descrevemos pela primeira vez, os padrões de expressão dos genes da espécie silvestre e resistente a fungos e nematóides *A. stenosperma* acesso V10309. Os ESTs analisados foram gerados a partir de três bibliotecas de cDNAs de raiz, sob as seguintes condições; (1) raiz sem estresse (2) raiz após inoculação com o fitonematóide *M. arenaria* raça 1. As bibliotecas raiz inoculada com nematóide e raiz não inoculada foram geradas com RNAs extraídos em três pontos distintos e específicos do ciclo do nematóide, onde sabidamente ocorre uma reação de defesa (ver Cap. 1). Objetivou-se caracterizar, principalmente, genes responsáveis pela resistência a *M.arenaria* em *A.stenosperma*. A escolha do método da análise de ESTs *in silico* visou identificar genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno,

de genética muito complexa, mas cujo nível de expressão determina resistência ou suscetibilidade (Ellingboe, 2000).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Construção das bibliotecas de cDNA

Sementes de *A. stenosperma* (acesso V10309) foram germinadas e as plantas foram mantidas em casa de vegetação por três meses. RNA total foi extraído de (i) raízes sadias e não inoculadas; (ii) raízes infectadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. arenaria* raça 1 por planta. As raízes inoculadas e raízes não inoculadas foram coletadas nos pontos 2, 6 e 10 dias após a inoculação (DAI). Todo o material coletado foi imediatamente congelado em N₂ líquido.

O RNA total das raízes de cada ponto foi extraído e reunido após extração individual. Para a extração de cerca de um miligrama de RNA total de cada conjunto (inoculado e não inoculado) utilizou-se o protocolo de extração do reagente *Trizol Reagent*[®] (Invitrogen), com algumas modificações para se eliminar a grande quantidade de polissacarídeos existente nas raízes: (i) utilizou-se a proporção de 200mg de raiz para cada mL de *Trizol*; (ii) o RNA foi centrifugado a 14.000 g após a homogeneização com *Trizol* e o sobrenadante foi precipitado com 0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M NaCl juntamente com o isopropanol; (iii) a qualidade e limpeza do RNA foi analisada por espectrometria e em gel de agarose utilizando-se tampão de amostra com 1% formamida; (iv) quando necessário realizou-se limpeza do RNA com o *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen); Para a extração de RNA poli A⁺ utilizou-se 1 mg de RNA total de cada ponto (dia) e o kit *Oligotex Spin Column* (Qiagen) de acordo com as orientações do fabricante, salvo algumas modificações: (i) incubou-se RNA total e resina de oligo-dT por 30 minutos sob agitação; (ii) nas três eluições, ressuspendeu-se a resina com o volume máximo recomendado (100µL) da solução OEB e pipetou-se a solução a 70 °C.

As bibliotecas de cDNA foram confeccionadas com *SMARTTM cDNA Library Construction Kit* (BD Clontech/USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram obtidos cDNAs longos e completos preservando a seqüência 5' do mRNA. Utilizou-se uma seqüência de oligo-dT modificada denominada

CDSIII/3'PCR Primer, que inicia a síntese da primeira fita do cDNA a partir da intersecção da cauda poli-A com a região codante. Ao alcançar a extremidade 5' do mRNA a enzima acrescenta algumas deoxi-citidinas na extremidade 3' do cDNA. Então, um outro oligonucleotídeo chamado *SMART IV Oligo*, que serve com um pequeno e curto molde estendido se anela às deoxi-citidinas na extremidade 5' do mRNA. Como o *SMART IV Oligo* possui uma seqüência de Gs na sua extremidade 3' forma com a seqüência de Cs um molde estendido. Desta forma foram gerados cDNAs fita simples com extremidade 5' completas do mRNA, bem como, uma seqüência complementar ao *SMART IV Oligo*, que serve então, como um sítio de iniciação universal (âncora *SMART*) para as amplificações subseqüentes. Os cDNAs foram fracionados e clonados no vetor Lambda TriplEx2 do kit SMART™ c-DNA Library Construction (BD Clontech/USA). Ver figura 1.

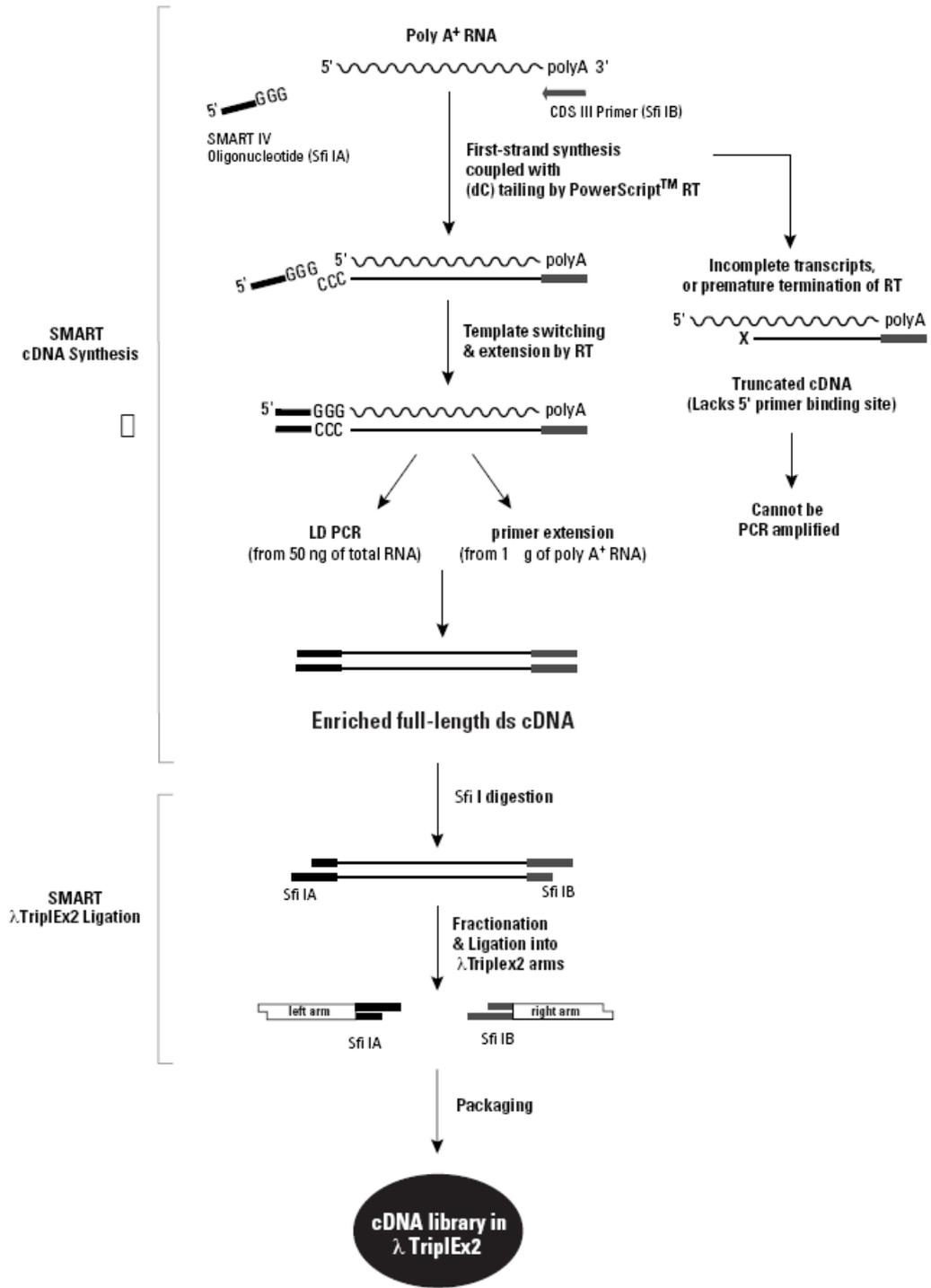


Figura 1- Esquema de clonagem do kit SMART cDNA Library Construction- (PT3000-1). O lado direito do esquema mostra o destino dos transcritos incompletos causado pela degradação de RNA ou pela terminação prematura da transcrição reversa.

O sequenciamento foi efetuado a partir de plasmídeos. Para isto foi efetuada a excisão em massa *in vivo* e a circularização dos plasmídeos. Os plasmídeos foram excisados dos fagos recombinantes através da mediação da enzima *Cre recombinase*. Como a bactéria hospedeira *E.coli* BM 25.8 não possui o sistema de seleção dos transformantes via *Lac-Z*, após a excisão foi efetuada uma mini-preparação de plasmídeos e transformação em *E. coli* XL1-Blue Tet^R.

2.2. Seqüenciamento dos ESTs

Os plasmídeos selecionados, randomicamente, foram isolados por mini-preparação de plasmídeos pelo método de lise alcalina e os insertos de cDNA foram seqüenciados a partir da extremidade 5' utilizando-se o *primer* específico PT2F2 – 5'-GCGCCATTGTGTTGGTACCC-3'. Foi utilizado o seqüenciador automático (*Applied Biosystems Automated DNA Sequencer* 3100 e 377) pelo método dideoxy-terminator usando o kit *BigDye terminator cycle Sequencing* (*Applied Biosystem*). Para análise de controle de qualidade dos fragmentos seqüenciados utilizou-se o programa PHRED (Ewing *et al.* 1998). A qualidade mínima de *cut-off* foi definida para uma qualidade média 20 dentro da janela de comprimento de 50 bases. Para corte de seqüência de vetor foram usados Pregap4 ([http://staden.sourceforge.net/.](http://staden.sourceforge.net/)) nos módulos: (a) *sequencing vector clip* e (b) *cloning vector clip*.

2.3. Análise computacional dos ESTs

Para retirada de DNA ribossomal, cauda poli-A⁺, seqüências de baixa qualidade, vetor e adaptador utilizou-se a metodologia descrita em Telles e da Silva (2001). Para formação dos *clusters* utilizou-se o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999). A anotação foi baseada no BLASTx (Altschul *et al.*, 1990), contra o banco de dados de todos os organismos e mínimo e-value de 10⁻⁶. As seqüências mais abundantes foram aglomeradas em *contigs* únicos e classificadas de acordo com KOG (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*), segundo suas funções putativas (<http://www.ncbi.nih.gov/COG/new/shokog.cgi>).

Para as seqüências geradas a partir das bibliotecas de raízes de *A. stenosperma* inoculada e não inoculada com *M. arenaria* raça 1, após a

construção dos *contigs*, foi realizada a subtração eletrônica que permitiu a identificação de genes expressos diferencialmente nos conjuntos, resistente e suscetível em resposta à infecção por *M. arenaria* raça 1 (Teste de Fisher, $P < 0.005$).

2.4 Desenvolvimento de Marcadores Microssatélite

Marcadores microssatélite ou SSRs foram buscados nos bancos de ESTs através do programa TROLL, foram analisados e processados pelo software desenvolvido por Martins *et al.*, 2006 (Anexo II). Os ESTs selecionados foram convertidos em marcadores baseados em PCR através de *primers* desenhados a partir das seqüências flanqueadoras aos microssatélites. Os marcadores EST-SSRs foram caracterizados para polimorfismos numa população de genoma AA e em dezesseis acessos de amendoim cultivado com representantes de cada uma das seis variedades de amendoim descritas. As condições das reações de PCR e dos géis de prata foram descritas em Moretzsohn *et al.*, (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESTs diferencialmente expressos

A fim de se identificar os fatores moleculares envolvidos na resistência de *A. stenosperma* a *M. arenaria* raça 1, foram construídas três bibliotecas de cDNA de raízes não inoculadas (1) e inoculadas com o nematóide (2). Foram seqüenciados 8000 clones dos quais 5704 seqüências (71,3%) foram aproveitadas após análise de qualidade, formando um total de 3500 *clusters*. Foram obtidos 2537 *singlets* (seqüências únicas) e o total de *contigs* (agrupamentos) foi de 963. Estas seqüências foram depositadas no GenBank (EH41934 – EH048197). Dos 3500 *clusters* analisados, 44,1% não apresentaram similaridade com genes com funções conhecidas. Através de uma análise *in silico*, foi feita a comparação dos genes expressos nas duas bibliotecas contrastantes (raízes inoculadas e não inoculadas com nematóide) utilizando-se

o teste de Fisher ($P < 0.005$). Na figura 2 é apresentada uma classificação funcional nas diversas categorias de expressão gênica da biblioteca de raízes inoculadas (RM) de acordo com KOG (<http://www.ncbi.nih.gov/COG/new/shokog.cgi>).

Oito genes apresentaram expressão diferencial significativa pelo teste de Fisher e alguns estão relacionados à defesa (Tabela 1). O contig 821 contém seqüências que têm sua expressão inibida pelo fitohormônio auxina; *auxin-repressed protein like (ARP)*. Este gene foi induzido em raízes inoculadas com nematóide (Tabela 1). O hormônio vegetal auxina, representado pelo ácido indol-3-acético (IAA) regula uma variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento, incluindo, dominância apical, respostas de tropismo, formação de raiz lateral, diferenciação vascular, divisão embrionária e alongamento de brotos (Davies, 1995 *in* Okushima *et al.*, 2005). Em nível celular, a auxina modula o alongamento, divisão e diferenciação celular através da regulação transcricional de genes específicos (Leyser, 2002 *in* Okushima *et al.*, 2005). No entanto, se conhece pouco sobre os genes que têm expressão reprimida pela auxina. É sabido que a auxina é importante para a infecção de raízes por nematóides das galhas e de cisto, nas primeiras horas do processo de infecção (De Almeida Engler *et al.*, 1999), modula também a expressão da citocinina na formação de raízes laterais que por sua vez é necessária para o estabelecimento do sítio de alimentação do nematóide (Lohar *et al.* 2004). O gene da citocinina oxidase/desidrogenase, contig 433, aparece 20 vezes mais expresso na biblioteca RN (raízes não inoculadas) Esta enzima é responsável pela degradação do hormônio citocinina (Schmülling *et al.*, 2003), (Tabela 1). Outro gene importante que apresentou diferença na sua expressão é o da proteína metalotioneína do tipo 2, que aparece mais expressa nas raízes não inoculadas (RN) que nas inoculadas. Potenza *et al.* (2001) demonstraram através de *Northern blot* que em raízes de alfafa inoculadas com *M. incognita*, ocorre uma diminuição da expressão de metalotioneína, quando comparada com a raiz não inoculada. Acredita-se que estas proteínas funcionem como “coletoras de metais” e que são induzidas por pequenas GTPases (Racs) que são importantes na regulação de sinais de transdução em eucariotos (Wong *et al.*, 2004). Além disso, em experimentos com células de arroz, a expressão das metalotioneínas foi diminuída quando estas foram tratadas com os indutores de respostas

associadas à defesa como a fosforilação oxidativa-ROS (caliculina A e/ou quitooligossacarídeo), indicando a associação desta proteína com a resposta de hipersensibilidade (Wong *et al.* 2004). Por outro lado, quando houve um aumento da expressão da metalotioneína, ocorreu a diminuição de ROS e conseqüentemente uma diminuição da resistência a doenças (Wong *et al.* 2004). Temos ainda como ESTs diferencialmente expressos, o gene da enzima resveratrol sintase (*rs*) que teve expressão aumentada na biblioteca de raízes inoculadas (RM); gene da enzima álcool desidrogenase com maior expressão em na biblioteca de raízes não inoculadas (RN); uma outra metalotioneína, agora do tipo 3 expressa somente na biblioteca de raízes inoculadas (RM) e ainda dois genes com homologia a proteínas hipotéticas, um com homologia à proteína de arroz e outra de tabaco, para estas duas a análise *in silico* revelou um aumento na expressão quando as raízes foram inoculadas com o nematóide.

A enzima álcool desidrogenase faz parte do metabolismo primário em plantas e cataliza a redução do acetoaldeído em etanol sob anoxia. Teve expressão induzida em folhas de *Arabidopsis* infectadas com fungo *Alternaria* (Schenk *et al.*, 2000) e seu mRNA foi rapidamente acumulado durante a resposta de hipersensibilidade em batata (Matton *et al.*, 1990), ao contrário do observado na biblioteca de raízes inoculadas com o nematóide que teve sua expressão reprimida. Esta enzima está também bastante correlacionada com a deposição de lignina em *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2006). A enzima metalotioneína do tipo 3 geralmente é mais expressa em raízes e tem função associada à desintoxicação de metais como cádmio, zinco e cobre a fim de prevenir mutações celulares. Plantas que expressam esta metalotioneína, bem como a do tipo 2, têm grande tolerância a solos ricos em metais pesados como zinco e cádmio, acredita-se que são responsáveis pela mitigação dos danos causados por ROS (Chiang *et al.*, 2006). Foi proposto por estes autores que tais genes poderiam ser usados como candidatos na fitorremediação de solos contaminados. Metalotioneína do tipo 3 (MT3) também está envolvida com respostas de defesa em plantas. Foi induzida em arroz quando inoculado com o fungo *Magnaporthe grisea* (Kim *et al.*, 2001; Jantasuriyarat *et al.*, 2005). Esta (MT3), somente foi expressa nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* com nematóide, evidenciando possível papel na resposta de defesa desta espécie. O gene da enzima resveratrol sintase também foi exclusivo de uma das bibliotecas,

sendo que somente foi expresso na de raízes não inoculadas. Esta enzima é responsável pela formação da fitoalexina resveratrol. Esta por sua vez, está envolvida com respostas à infecção de fungos, e foi identificado primeiramente em amendoim e videira (Hart, 1981; Arora e Strange, 1991). Como este gene está associado a respostas de defesa, é de se estranhar não ter sido identificado em raízes inoculadas da espécie resistente *A. stenosperma*, pode ser que somente seja induzido especificamente ao ataque de fungos. Os genes com homologia aos genes de proteínas hipotéticas não têm função conhecida.

Foram observados ainda, outros genes relacionados à resistência que somente foram expressos na RM (raízes inoculadas) como PR-10 - proteínas relacionadas à patogênese, proteínas *germin-like* (GLP), proteínas *heat-shock*, peroxidases (Tabela 1).

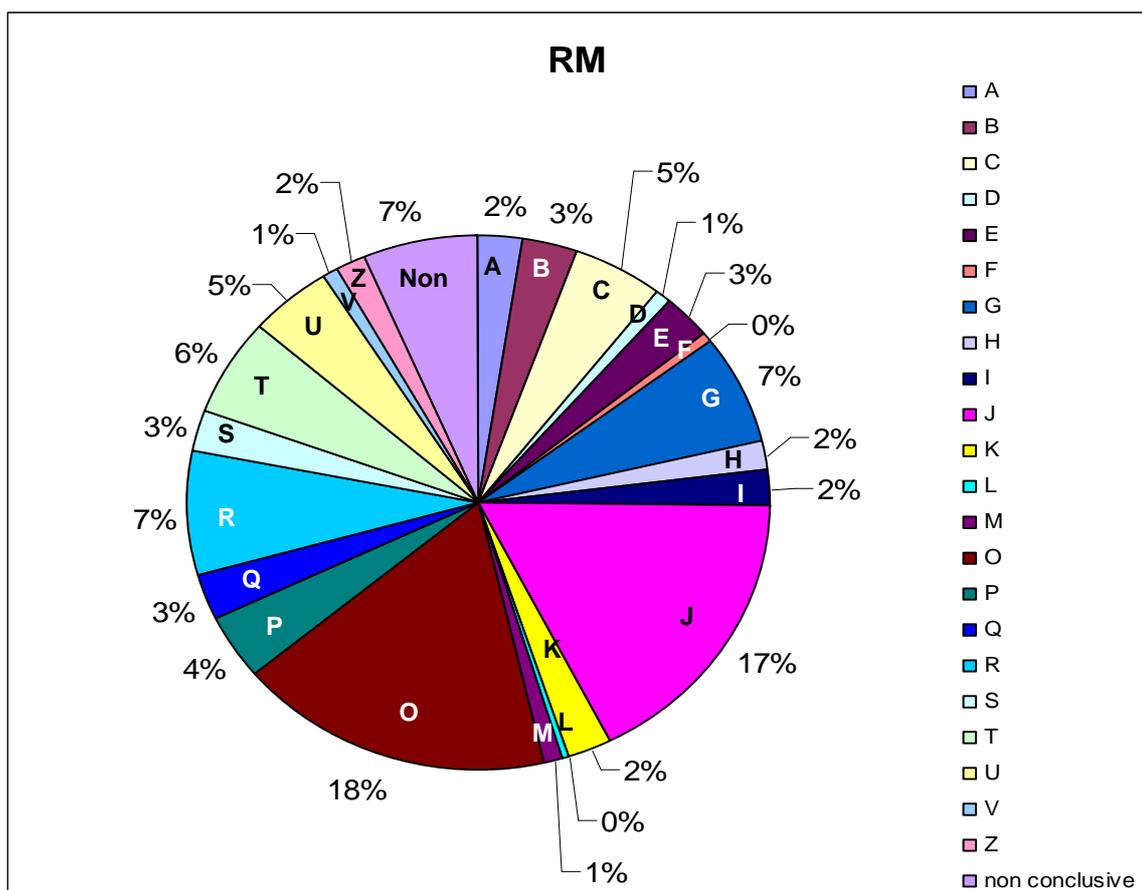


Figura 2- Representação gráfica das funções dos genes expressos das bibliotecas de raízes de *Arachis stenosperma* inoculadas com o nematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1.

PROCESSO CELULARES E DE SINALIZAÇÃO

- M Parede Celular/membrana/biogênese de envelope
- N Motilidade Celular
- O Modificação Pós-Transcricional, Turnover Protéico, Chaperonas
- T Mecanismos de Transdução de Sinal
- U Tráfego Intracelular, Secreção e Transporte Vesicular
- V Mecanismos de Defesa
- W Estruturas Extracelulares
- Y Estrutura Nuclear
- Z Citoesqueleto

PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DE INFORMAÇÃO

- A Processamento e Modificação de RNA
- B Estrutura e Dinâmica da Cromatina
- J Tradução, Estrutura Ribossomal e Biogênese
- K Transcrição
- L Replicação, Recombinação e Reparo

METABOLISMO

- C Produção e Conversão de Energia
- D Controle do Ciclo Celular, Divisão Celular, Divisão Cromossômica
- E Transporte e metabolismo de Aminoácidos
- F Transporte e metabolismo de Nucleotídeos
- G Transporte e metabolismo de Carboidratos
- H Transporte e metabolismo de Coenzimas
- I Transporte e metabolismo de Lipídeos
- P Transporte e metabolismo de Íons Inorgânicos
- Q Biossíntese, Transporte e Catabolismo de Metabólicos Secundários

POUCO CARACTERIZADO

- R Apenas Função Geral Preditada
- S Função Desconhecida

Tabela 1 - ESTs diferencialmente expressos nas bibliotecas de raízes de *Arachis stenosperma* RN (raízes não inoculadas) e RM (raízes inoculadas com *Meloidogyne arenaria* raça 1) associados com possíveis respostas de defesa.

Contig	Nº de Leituras	Bibliotecas	Homologia com BLASTx	Função putativa	Teste de Fisher ^c
821	115	RN (9) ^a , 1RM (25), 2RM (81)	(AAX84677.1) ^b Proteína Reprimida por Auxina - ARP1	Regulação do Crescimento e Desenvolvimento	X
154	60	RN (50), 1RM (2), 2 RM (8)	(P43390- MT2_ACTCH) Proteína Metalotioneína do tipo 2	Reação Oxidativa Seqüestrador de ROS Resistência	X
433	44	RN (40), 1RM (2), 2RM (2)	(CAB79732.1) Enzima Citocinina Oxidase/Desidrogenase	Análise do hormônio citocinina	X
532	39	RN (35), 1RM (2), 2RM (2)	(AAO72531.1) Enzima Álcool Desidrogenase ADH1	Lignificação e defesa em Plantas	X
874	38	1RM (18), 2RM (20)	(AAT02527) Proteína Metalotioneína do tipo 3b	Desintoxicação de Metais e defesa em plantas	X
185	25	RN(1), 1RM (11), 2RM(13),	(BAD83567.1) Proteína Hipotética [<i>Nicotiana tabacum</i>]	Gene com homologia a genes mitocondriais e Sem função conhecida	X
214	20	1RM (11), 2RM (9)	(NP_919162.1) Proteína Hipotética [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	Sem função conhecida	X
440	18	RN (17), 1RM (1)	(AAF71253) Enzima Resveratrol Sintase	Síntese da Fitoalexina Resveratrol	X
37	5	1RM (3), 2RM (2)	(CAA69931.1) Proteína de Resistência - PR10-1	Resistência e defesa em plantas	
61	4	1RM (2), 2RM (2)	(T07629) Proteína <i>heat shock</i> Classe I	Resistência e defesa em plantas e manutenção celular (<i>house-keeping genes</i>)	
143	3	1RM (1), 2RM (2)	(AAC83463.1) Peroxidase	ROS – Espécies de Oxigênio Reativo	
156	3	1RM (1), 2RM (2)	(CAB65369.1) Proteína <i>Germin-like</i> - GLP	Resistência e defesa em plantas	

^a Número de leituras (reads) encontrados nas bibliotecas inoculadas (RM) e não inoculadas (RN).

^b Número de acesso no GenBank.

^c ESTs diferencialmente expressos e estatisticamente validados pelo Teste de Fisher ($P < 0.005$).

3.2. Marcadores microssatélite desenvolvidos

Além dos clones diferencialmente expressos, foi possível identificar 206 microssatélites dentro das seqüências dos ESTs. Sendo 119 deles formados por dinucleotídeos e 79 por trinucleotídeos. A maioria dos microssatélites encontrados era curta, com apenas 6-10 repetições. Os dinucleotídeos eram formados por TC ou AT (102/119). Cento e oitenta e oito *primers* foram desenhados e 165 caracterizados. Sessenta e sete marcadores EST-SSRs tiveram polimorfismo numa população diplóide AA e quatro para o amendoim cultivado (Moretzshon *et al.*, 2005, Proite *et al.*, 2007). Estes ESTs podem ser

utilizados como marcadores gênicos em mapas genéticos de *Arachis*, contribuindo para o melhoramento genético através de seleção assistida por marcadores moleculares da cultura. Estes marcadores estão sendo mapeados assim como clones genômicos, indicando a posição dos genes, alguns com função e padrão de expressão conhecidos, em regiões do genoma que podem ser correlacionadas com os diferentes fenótipos. Assim, a associação de marcadores gerados pelo clone de cDNA com fenótipos poderá aumentar o entendimento ou o relacionamento com as vias e mecanismos bioquímicos que afetam características agronômicas como resistência (Matthews *et al.* 2001). Os ESTs selecionados serão convertidos em marcadores baseados em PCR através de *primers* desenhados a partir de suas seqüências *STS* (*Sequenced Tagged Site*) (Matthews *et al.* 2001).

4. CONCLUSÕES

Através da análise da expressão diferencial identificou-se o grande aumento de genes reprimidos pelo hormônio auxina, o que talvez, seja uma indicação de que a infecção do nematóide induziu o gene *arp* o que hipoteticamente poderia estar evidenciando uma diminuição do hormônio na planta impedindo assim o estabelecimento do sítio de alimentação do nematóide. No entanto, não há relatos identificando a auxina como fator iniciador de uma resposta de hipersensibilidade, como foi observado nas raízes infectadas. A diminuição da expressão do gene de citocinina oxidase/desidrogenase pode ser um indício da escassa presença de citocinina, hormônio chave para a manutenção dos sítios de alimentação dos nematóides (Schmülling *et al.*, 2003). Os genes das metalotioneínas do tipo 2 e 3 parecem estar envolvidas com reação de hipersensibilidade e respostas de defesa, respectivamente. Os outros genes diferencialmente expressos observados neste trabalho têm funções atribuídas com defesa, no entanto, sua expressão nas raízes inoculadas não foi induzida, como talvez fosse o esperado. A análise *in silico*, permitiu a escolha de genes que foram utilizados como sondas em experimentos de *Northern blot* (Cap. 3), utilizando-se o RNA total de plantas resistentes desafiadas e não

desafiadas com o nematóide para confirmação da expressão diferencial dos mesmos e sua distribuição temporal.

A análise da expressão gênica diferencial utilizando-se *Northern blot* é um método eficiente para se identificar genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno. A identificação e isolamento de diferentes genes de resistência oriundos de germoplasma silvestre e sua introgressão em material cultivado possibilitará o acúmulo (piramidização) de genes de resistência, dificultando a quebra da resistência pelo patógeno. Considerando-se que genes de resistência encontram-se distribuídos no genoma em *clusters* (Aarts *et al.* 1998), há grande chance de se encontrar vários genes próximos que confirmam resistência a outras pragas (ex. *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*) através de “*chromosome walking*” (Stein *et al.* 2000) e também através do estudo da segregação. Pretende-se, numa etapa posterior, isolar os genes candidatos, caracterizá-los e transferí-los para outras espécies de importância econômica por transformação direta de plantas. A transformação dos ESTs-SSRs em marcadores gênicos bem como seu mapeamento permitirá elucidar ou corroborar seu possível papel na resistência aos nematóides.

Considerando que estes patógenos causam danos expressivos à cultura do amendoim, o isolamento de genes de resistência e sua introgressão para cultivares comerciais do amendoim contribuirão para o aumento da produtividade, beneficiando os produtores, a agroindústria e o meio ambiente que será poupado da aplicação massiva de agroquímicos.

Capítulo 3

Análise da expressão diferencial de genes de raízes de *Arachis stenosperma* e de *A. hypogaea* infectadas com o fitonematóide *Meloidogyne arenaria* raça 1

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem mecanismos tanto pré-formados quanto induzidos para impedir a invasão de patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Barreiras mecânicas existentes, metabólitos secundários e proteínas antimicrobianas devem ser evitadas ou subjugadas pelos patógenos para que estes consigam invadir com sucesso e colonizar os tecidos vegetais. Uma vez havendo o contato, os patógenos produzem e liberam compostos que induzem outras defesas tais como, o reforço da parede celular, produção de fitoalexinas e síntese de proteínas de defesa entre vários outros (Van Loon *et al.*, 2006). Todas as plantas possuem uma resistência basal, mas são suscetíveis quando o patógeno consegue vencer esta resistência ou são resistentes quando impedem que o patógeno tenha sucesso no seu ataque. O que determina se uma planta se torna suscetível ou resistente é a rapidez e magnitude com que tais mecanismos de defesa são ativados e expressos e também pela eficácia com que estes mecanismos de defesa funcionam contra patógenos com diferentes modos de ataque (Wan *et al.*, 2002).

A infecção por nematóides resulta em danos físicos aos tecidos vegetais, particularmente durante a fase de migração, mas também durante a fase de estabelecimento e expansão do sítio de alimentação (Gheysen e Fenoll, 2002). O processo de infecção causa mudanças severas na estrutura radicular da planta como consequência de alterações da expressão de genes na raiz hospedeira (Wang, *et al.*, 2003). A transformação das células normais da raiz em estruturas de alimentação inclui mudanças morfológicas e fisiológicas complexas (Escobar *et al.*, 1999; Williamson e Hussey, 1996). A complexidade e o dinamismo deste sistema sugerem que deva haver o envolvimento de vários genes. Alterações na expressão de genes correlacionados com respostas de defesa foram observadas em inúmeras interações planta-nematóide, incluindo extensinas (Van der Eycken *et al.*, 1996), catalases (Niebel, *et al.*, 1995; Goellner *et al.*, 2001), ciclinas (de Almeida Engler *et al.*, 1999), fitohormônios (Goverse *et al.*, 2000b) e outros (Gheysen e Fenoll, 2002).

Vários estudos elucidaram diferentes etapas desta interação e a análise de ESTs é uma ferramenta adicional aos métodos de genética e bioquímica

tradicionais. A análise de ESTs tem sido empregada extensivamente numa variedade de projetos, primeiro com a finalidade de identificação de genes e seu mapeamento (Jeong *et al.*, 2006), mas também têm sido utilizados na comparação quantitativa da expressão de genes entre diferentes bibliotecas de cDNA (Maleck *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). A acumulação exponencial de seqüências ESTs em bancos de dados públicos permite se obter um número massivo de genes diferencialmente expressos, via análise *in silico* (Fedorova *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2002; Casu *et al.*, 2004; Alkharouf *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006). As duas análises, tanto *in silico*, quanto do perfil de expressão gênica dos tecidos têm conduzido à identificação de genes envolvidos nos vários aspectos das interações planta-nematóide (Alkharouf *et al.*, 2004 e 2006). O resultado destas análises, o qual é efetuado pelo cálculo das freqüências dos ESTs em diferentes bibliotecas, já foi previamente validado estatisticamente (Audic e Claverie, 1997; Ewing *et al.*, 1999; Stekel *et al.*, 2000). Uma vantagem adicional em se usar a freqüência de dados de ESTs para estimar a expressão gênica é a capacidade de se poder distinguir diferenças entre seqüências bastante relacionadas, similares, o qual não é possível através de outras técnicas de estudo de expressão, incluindo análise de micro-arranjos (Park *et al.*, 2006).

Na análise *in silico* dos ESTs de raízes de *Arachis stenosperma* (Cap. 2), foram identificados oito genes com expressão diferenciada, sendo os mais expressos os genes *arp*, *ckx* e *mt2* que possuem homologias com os genes da proteína reprimida por auxina, da enzima citocinina oxidase/desidrogenase e da proteína metalotioneína do tipo 2, respectivamente.

1.1. Gene da Protéina Reprimida por Auxina - *arp*

Depois de penetrado na raiz, o J2 migra entre as células até alcançar o eixo vascular. Os fatores que determinam a seleção de uma célula pelo nematóide para formação do sítio de alimentação ainda não são bem conhecidos (Goverse *et al.*, 2000a). Não se sabe o que faz com que uma dada célula esteja propícia para ser escolhida e induzida a se tornar uma célula gigante, talvez o nematóide reconheça tipos celulares e/ou seu estado de diferenciação (Scheres *et al.*, 1997 *in* Goverse, *et al.*, 2000a). Associado ao fato de que a formação das células gigantes envolve processos de diferenciação celular, diversos trabalhos

mostram a manipulação de genes ligados ao ciclo celular pelos nematóides. Os padrões de expressão de duas ciclinas quinases-dependentes (CDKs- *cdc2aAt* e *cdc2bAt*) e duas ciclinas mitóticas (*Arath;cycB1;1* e *Arath;cycA2;1*) foram analisados (de Almeida Engler *et al.*, 1999). A expressão destes genes está associada com a divisão ativa de células e, quando infectadas por nematóides, as células gigantes passam a super-expressar tais genes nos sítios de alimentação durante as primeiras horas de infecção (Niebel *et al.*, 1996; de Almeida Engler *et al.*, 1999).

Os fitohormônios auxina e citocinina são considerados fatores chave no controle do progresso do ciclo celular em plantas, através da regulação da expressão e/ou da atividade dos genes CDKs e ciclinas-mitóticas (Goverse *et al.*, 2000a). Diversas observações apontaram para um papel da auxina na indução do sítio de alimentação por nematóides das galhas e de cisto (Goverse *et al.*, 2000a, b). Sugere-se que os nematóides de fato, induzam o acúmulo local de auxina controlando sua distribuição na raiz. Isto poderia ser parte de uma série de eventos que resultariam na indução da formação do sítio de alimentação (Balasubramanian e Rangarwami, 1962 *in* Goverse *et al.*, 2000a, b; Hutangura *et al.*, 1999).

O gene da proteína reprimida por auxina, *arp*, (*Auxin-repressed protein*, *ARP*) e o seu papel no crescimento e desenvolvimento das plantas é relativamente pouco estudado. Depois que este gene foi isolado de morango (Reddy e Poovaiah, 1990), outros genes homólogos ao *arp* também foram isolados de ervilha (Stafstrom *et al.*, 1998), de falsa-acácia, uma leguminosa arbórea (Park and Han, 2003), tabaco (Steiner *et al.*, 2003) e pimenta (Hwang *et al.*, 2005). Os genes *arp* têm relações estreitas com genes relacionados a dormência (*drm*), isto é, têm seqüências muito parecidas e respondem similarmente aos mesmos estímulos (Reddy e Poovaiah, 1990). Já foi mostrado que a expressão do gene *drm* é reprimida pela auxina exógena em receptáculos de morango (Reddy e Poovaiah, 1990), em hipocótilos de *Robinia pseudoacacia* e de pepino (Park e Han, 2003; Shimizu *et al.*, 2006), e também em *Pinus contorta* (Brinkler *et al.*, 2004). No entanto, em outros trabalhos, de modo contrário, este gene foi induzido pela ação direta deste fitohormônio (Kim *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007). De um modo geral, a ativação da expressão do gene *arp* está relacionada a respostas de estresse, tanto biótico, como exemplos

causado por: fungos (Jung e Hwang, 2000; Skiba *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2005; Coram e Paing, 2006), rizóbio (Manthey *et al.*, 2004) e nematóides (Alkharouf *et al.*, 2004); Yin *et al.*, 2006; quanto abiótico, por exemplo: estresse hídrico (Kohler *et al.*, 2003), estresse à luz UV (Liu *et al.*, 2002), estresse salino e de baixa temperatura (Hwang *et al.*, 2005) e estresse químico por BHT (di-terc-butil metil fenol), um indutor artificial de SAR (Resistência Sistêmica Adquirida) (De Nardi *et al.*, 2006).

1.2. Gene da enzima citocinina-oxidase/desidrogenase - *ckx*

As citocininas (CK) são uma classe de hormônio vegetal que tem papel em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo regulação da divisão celular, dominância apical, formação e atividade dos meristemas de brotos, senescência de folhas, crescimento de raízes e respostas ao estresse (Mok e Mok, 2001; Brenner *et al.*, 2005; Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Sua homeostase é regulada pela taxa de síntese de novo, taxa de importação, quebra dos conjugados de citocininas, os quais na sua maioria, são glicosídeos, e ainda pela taxa de exportação e catabolismo (Mok e Mok, 2001).

Grande parte do conhecimento que se tem hoje sobre a atividade biológica das citocininas é baseada em experimentos que estudaram os efeitos da adição exógena deste hormônio a um sistema ou ao aumento do conteúdo endógeno (Faiss *et al.*, 1997 e Rupp *et al.*, 1999 *in* Werner *et al.*, 2003). Apesar dos experimentos de “ganho de função” terem resultado em informações significativas sobre os processos influenciados pelas citocininas, eles nem sempre refletem as verdadeiras funções *in vivo*. A adição de citocininas poderia desencadear processos que podem não estar sob o controle de citocininas. Já plantas que têm seu conteúdo endógeno reduzido parecem ser mais informativas, pois a falta de CK causa perda de função o que é evidenciado por fenótipos com características fisiológicas e de desenvolvimento específicas de plantas deficientes deste hormônio (Werner *et al.*, 2003).

Genes que codificam para as proteínas citocinina oxidase/desidrogenases (CKXs) foram isolados de milho (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999, Brugière *et al.*, 2003; Massonneau *et al.*, 2004), *Arabidopsis* (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2001; Schmölling *et al.*, 2003), *Dendrobium*, uma espécie de

orquídea (Yang *et al.*, 2003a), arroz (Ashikari *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2007), cevada e trigo (Laloue e Fox, 1989; Galuszka *et al.*, 2004).

A enzima, citocinina oxidase/desidrogenase foi inicialmente identificada como uma oxidase (Pačes *et al.*, 1971), mas atualmente é classificada como uma desidrogenase (Galuszka *et al.*, 2004; Popelková *et al.*, 2006). Os genes de *ckx* de milho foram os primeiros a serem clonados (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999). São responsáveis pela maioria do catabolismo e inativação do hormônio citocinina em uma reação irreversível e de uma única etapa enzimática (Fig. 1). A degradação de citocinina é importante na regulação da sua acumulação e na distribuição dos seus metabólitos nos tecidos vegetais (Galuszka *et al.*, 2000, 2004; Davies, 2004). Citocinina tem papel importante para formação e manutenção do sítio de alimentação de nematóides nos estágios mais avançados do ciclo de infecção (Lohar *et al.*, 2004).

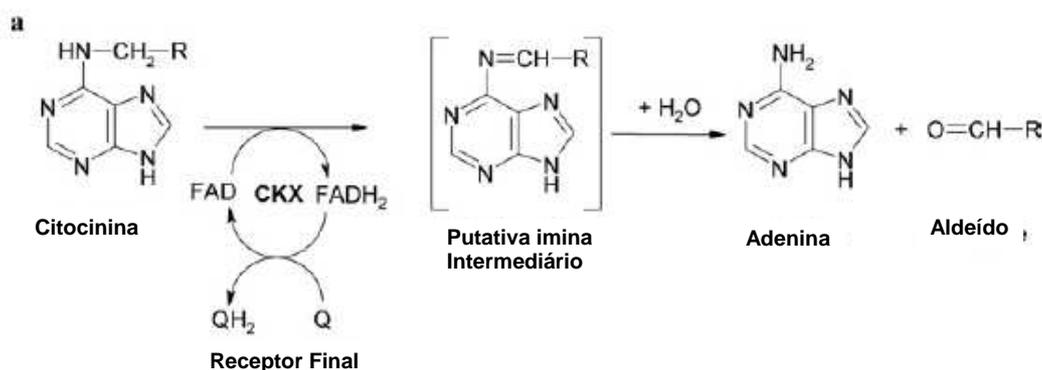


Figura 1 - Reação analítica (degradação) do hormônio citocinina pela enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKX). [Figura retirada do artigo Popelková *et al.*, 2006]

1.3. Interação Auxina-Citocinina

Fitohormônios geralmente agem de forma conjunta, um influenciando o outro. Interações entre citocinina e auxina já foram descritas diversas vezes e podem ter tanto efeito sinérgico, quanto antagônico, havendo um controle mútuo na sua expressão ou na sua abundância (Coenen e Lomax, 1997; Li *et al.*, 2006). Em raízes de milho, tabaco e ervilha já foi demonstrado que citocinina induz a expressão de auxina (Bourquin *et al.*, 1990 e Bertel e Eliasson, 1992 *in*

Coenen e Lomax, 1997). Acredita-se que a auxina age diretamente sobre CKX (Palni *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1995; Swarup *et al.*, 2002), controlando assim seus níveis e ainda, que dessa forma os dois hormônios juntos regulariam a expressão dos componentes do ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1993; Soni *et al.*, 1995). Auxina e citocinina têm papel importante no ciclo celular controlando a regulação transcricional de vários genes envolvidos no processo (Guo *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que a expressão dos genes do ciclo celular *cdc2a* e *cycD3* é aumentada pela ação conjunta destes dois hormônios (Hemerly *et al.*, 1993, Nogué *et al.*, 2000; Pozo *et al.*, 2005), (Fig. 2) e um dos efeitos desta regulação é a modulação da taxa de proliferação das células. Niebel *et al.* (1996) mostraram que tanto o nematóide das galhas quanto os nematóides de cisto induzem a expressão do gene *cdc2a* logo nas primeiras horas de iniciação do sítio de alimentação. Sua expressão se mantém alta até 7 DAI e depois diminui até cessar.

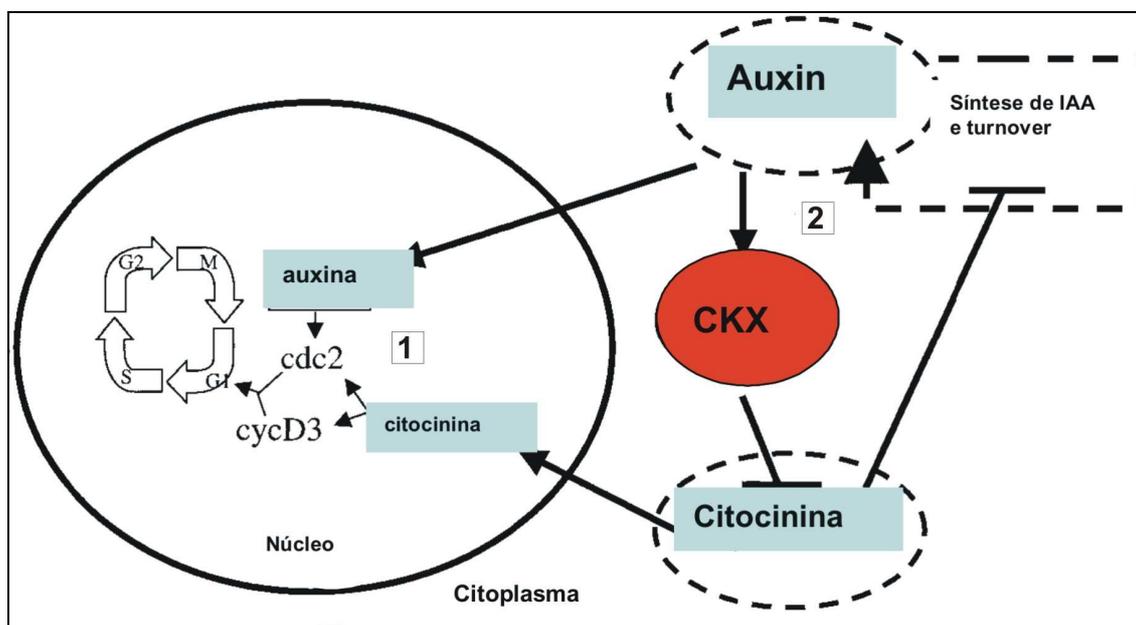


Figura 2- Influência de auxina e citocinina nas células vegetais. Citocinina e auxina regulam a proliferação de células vegetais através (1) do controle da expressão dos componentes *cdc2* e *cycD3* do ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1993; Nogué *et al.*, 2000), (2) enquanto a abundância dos dois hormônios é controlada através de enzimas que regulam estes hormônios tal como a CKX (Zhang *et al.*, 1995). [Figura adaptada do artigo Swarup *et al.*, 2002].

De Almeida Engler e colegas (1999) também mostraram que a expressão deste gene ocorre no meristema radical, bem como no cilindro vascular quando J2s dos nematóides das galhas ou os nematóides de cisto estão migrando pelas raízes. A atividade deste gene se manteve até 9 DAI nas células gigantes, galhas e sincícios. Estes autores acreditam que a indução destes genes durante a infecção seja devida ao aumento dos níveis de auxina causado pelos nematóides, o que está de acordo com outros trabalhos que também observaram alterações nos níveis dos hormônios citocinina e auxina em raízes infectadas com nematóides (Bird, 1962; Yu e Viglierchio, 1964; Viglierchio e Yu, 1968 *in* De Almeida Engler *et al.*, 1999; Lohar *et al.*, 2004).

1.4. Metalotioneínas– MT

Metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular (4–8 kDa), ricas em cisteínas (Cys) que, contêm grupamentos tiol responsáveis pela ligação das MTs à vários metais, tais como: cádmio, zinco, cobre, alumínio e outros (Coyle *et al.*, 2002). Estudos demonstraram que as MTs estão envolvidas na manutenção da homeostase de metais essenciais bem como na desintoxicação de metais do organismo (Cobbett e Goldsbrough, 2002; Hall, 2002; Delhaize *et al.*, 2004), mas também estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo a retirada de espécies reativas oxidativas (ROS), (Akashi *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004), regulação do crescimento celular, proliferação e atividade de metaloenzimas e de fatores de transcrição (Palmiter, 1998; Haq *et al.*, 2003). E ainda, estão envolvidas no metabolismo de drogas metálicas, respostas de estresse, bem como, apoptose celular (Thornalley e Vasak, 1985).

As MTs, possuem composição bastante heterogênea e estão agrupadas em 15 famílias definidas de acordo com critérios taxonômicos (<http://www.unizh.ch/mtpage/classif.html>; Binz e Kagi, 1999). As MTs de plantas que pertencem à família 15, geralmente possuem dois domínios curtos ricos em resíduos de cisteína (quatro a oito resíduos cada um) e uma região espaçadora mais longa (30-50 resíduos) que não possui este aminoácido. A distribuição dos resíduos de cisteínas e o comprimento da região espaçadora são usados para subdividir as MTs de plantas em quatro tipos, MT 1 a 4 (Robinson *et al.*, 1993; Cobbett e Goldsbrough, 2002). Os genes das MTs do tipo 1 são mais expressos

nos tecidos vasculares de folhas e raízes, enquanto as do tipo 2 são expressas principalmente nas partes aéreas, folhas, brotos e em algumas espécies em raízes (Zhou e Goldsbrough, 1994, 1995; Hsieh *et al.*, 1995, 1996 *in* Guo *et al.*, 2003). As MT3 são expressas predominantemente em folhas e em frutos frescos maduros (Ledger e Gardner, 1994 *in* Guo *et al.*, 2003). MTs do tipo 4 diferem das outras MTs de plantas por terem três domínios ricos em cisteínas que são separados por regiões espaçadoras que contêm de 10 a 15 resíduos. Este tipo é o que tem menor número de proteínas identificadas. A expressão de genes desta MT é restrita a sementes (Kawashima *et al.*, 1992; White e Rivin, 1995 *in* Guo *et al.*, 2003). A grande maioria de MTs identificadas em plantas são de angiospermas (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

1.5. Resveratrol sintase - RS

Fitoalexinas são metabólitos secundários antimicrobianos e de baixo peso molecular produzidos por plantas após ataque de patógenos (Hammerschmidt, 1999). A fitoalexina, trans-resveratrol, pertence ao grupo dos estilbenos o qual ocorre naturalmente num número limitado de plantas de famílias distantes (Schröder *et al.*, 1988). Sua síntese é induzida em plantas pelo ataque de fungos patogênicos (Morrissey e Osbourn, 1999), e sua função seria de impedir o desenvolvimento do patógeno. Estilbeno sintases são enzimas chaves na síntese de estilbenos e são distinguíveis de acordo com a especificidade ao substrato. Resveratrol é sintetizado pela enzima resveratrol sintase (RS) utilizando como substrato uma molécula de 4-coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, ambas comuns em plantas (Schröder *et al.*, 1988) (Fig. 3).

Resveratrol sintase (RS) foi inicialmente identificada em amendoim (*A. hypogaea*, Fabaceae) (Schöppner e Kindl, 1984) e depois em videiras (*Vitis vinifera*, Vitaceae) (Sparvoli *et al.*, 1994); *Festuca versuta* e *F. arundinacea* (Poaceae) (Powell *et al.*, 1994); na planta medicinal ruibarbo, *Rheum palmatum* e *R. tataricum* (Poligonaceae) (Kashiwada *et al.*, 1988; Samappito *et al.* 2003); e em sorgo (Yu *et al.* 2005).

Em amendoim foram isolados quatro genes *rs* (Lanz *et al.*, 1990; Schroder *et al.*, 1988) e juntamente com *rs* de videiras foram transferidos para outras espécies que não os possuem como: tabaco, canola, arroz, trigo, cevada e alfafa

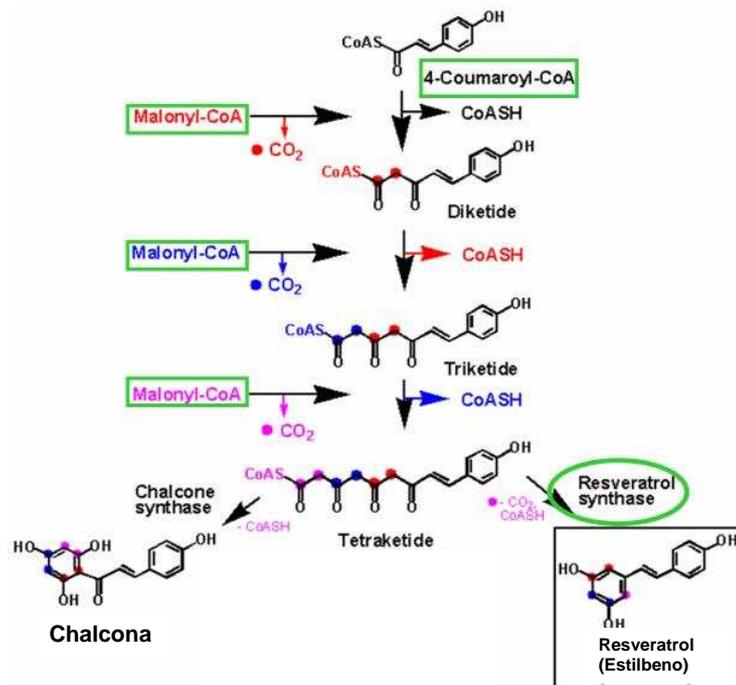


Figura 3 - Reação de síntese do estilbeno resveratrol pela enzima resveratrol sintase.

Estes transgênicos mostraram aumento na resistência contra vários fungos incluindo, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans* e *Phoma medicaginis* (Hain *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1994; Stark-Lorenzen *et al.*, 1997; Leckband, e Lorz, 1998; Hipskind e Paiva, 2000).

1.6. Proteínas Hipotéticas – HP1 e HP2

O gene *Ashp1* de *A. stenosperma*, tem proteína deduzida com homologia à uma proteína hipotética mitocondrial. E o gene *Ashp2* com proteínas hipotéticas de arroz sem função definida.

A aquisição da mitocôndria através de endossimbiose, e do subsequente “re-embaralhamento” da informação genética durante a evolução, produziu os genomas mitocondriais modernos, os quais codificam apenas um pequeno subconjunto de produtos gênicos necessários para suportar as funções mitocondriais (Burger *et al.*, 2003; Reichert e Neupert, 2004).

Consequentemente, genomas nucleares têm papéis cruciais na biogênese e na função mitocondrial (Chinnery, 2003). Estima-se que 10% dos genes eucarióticos codifiquem proteínas que são dirigidas, ou melhor, que têm como alvo a mitocôndria, após a sua síntese nos ribossomos citoplasmáticos (Reichert e Neupert, 2004). Reciprocamente, vias de sinalização mitocondriais influenciam a expressão de genes nucleares, um processo denominado regulação retrógrada, (Butow e Narayan, 2004; Chase, 2007) e também regulam outras funções celulares, mais notadamente nas vias de sinalização de morte celular (Bras *et al.* 2005). Uma idéia que vem sendo sedimentada é que a transcrição nas mitocôndrias de plantas é um processo “relaxado” que em geral, exhibe pouco controle e modulação (Holec *et al.*, 2006). Ao contrário, eventos pós-transcricionais tais como processamento e controle da estabilidade do mRNA parecem ser os principais mecanismos envolvidos no controle da expressão gênica nas mitocôndrias de plantas (Finnegan e Brown, 1999; Johnson *et al.*, 2005).

Sabe-se que o metabolismo da planta geralmente representa uma mistura de mudanças entre respostas de defesa, ao ataque do nematóide sejam elas, respostas que resultem em resistência ou respostas que resultem em susceptibilidade. Neste capítulo temos como objetivos, (i) analisar a expressão, através de análise por *Northern blot*, de alguns dos genes diferencialmente expressos encontrados pela análise *in silico* dos ESTs gerados a partir de bibliotecas de raiz do acesso resistente *Arachis stenosperma* V10309 inoculada com o fitonematóide, *Meloidogyne arenaria* raça 1. (Cap. 2), (ii) verificar e comparar a expressão destes mesmos genes em raízes infectadas e não infectadas de *A. hypogaea* cv IAC-Tatu-ST, cultivar suscetível a este nematóide e (iii) tentar correlacionar a expressão ao fenótipo observado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Plantas de *Arachis* e bioensaio com *Meloidogyne arenaria* raça 1

Foram utilizadas doze plantas de cada espécie, *A. stenosperma* (V10309), e *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST com dois meses de idade. Seis plantas serviram como controles, e seis plantas tiveram suas raízes inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. arenaria* raça 1 por planta. Os dois conjuntos (inoculado e não inoculado) foram coletados nos pontos 4, 9 e 16 dias após a inoculação (DAI), seguindo o resultado do estudo histopatológico. As raízes foram coletadas e congeladas em N₂ líquido até a extração do RNA total.

2.2. Validação da análise *in silico* por *Northern Blot*

O RNA total foi isolado a partir das raízes não inoculadas e inoculadas das espécies suscetível e resistente conforme descrito no cap. 2. Depois foi fracionado por 5 h a 50 V em gel desnaturante 1,2% agarose, 0,77 M formaldeído 37% em tampão 1X MOPS pelo método-padrão, transferido para membrana de nylon Hybond-N (Amersham, Arlington, IL), e a membrana foi fixada através de exposição à luz UV. As membranas foram hibridizadas com os seguintes ESTs diferencialmente expressos: (1) proteína reprimida por auxina (*Auxin-Repressed Protein*, contig 821), (2) citocinina-oxidase/desidrogenase (*Cytokinin-oxidase/dehydrogenase*, contig 433), (3) metalotioneína tipo 2 (*type-2 Metallothionein*, contig 154), (4) resveratrol sintase (*Resveratrol Synthase*, contig 440), (5) proteína hipotética com homologia a proteína hipotética de fumo (*Hypothetical Protein Nicotiana tabacum*, contig 185) e (6) proteína hipotética com homologia a proteína hipotética de arroz (*Hypothetical Protein Oryza sativa*, contig 214). Os ESTs foram re-amplificados por PCR utilizando-se os primers direto, PT2F2 – 5'-GCGCCATTGTGTTGGTACCC-3' e reverso, PT2R2- 5'-CCGCATGCATAAGCTTGCTC-3'. Os produtos das reações de PCR foram purificados para retirada de excesso de primer, enzima e de outros reagentes com a coluna S-400 HR *MicroSpin Column* (Amersham, Arlington, IL). Estes clones foram re-sequenciados para se certificar sua identidade. Os ESTs foram

marcados com o kit *Ready-to-Go* (Pharmacia) pelo método *random priming* (Sambrook e Russell, 2001). Todos os filtros foram pré-hibridizados a 65°C por no mínimo 3 h e hibridizados a 65 °C por 16-20 h em 5 X SSC, 5 X Solução de Denhardt, 0,5% SDS e 0,02 mg/mL de esperma de salmão desnaturado. Após hibridização as membranas foram lavadas 2 vezes a 65 °C por 15 min. em 1 X SSC e 0,1% SDS e depois em 0,1 X SSC e 0,1% SDS. As membranas foram expostas em filme de raio-X, (BIOMAX – Kodak). Para a quantificação, os sinais de hibridização foram corrigidos pela normalização da intensidade do rRNA 28S corado com brometo de etídeo através de métodos de densitometria, utilizando-se o programa *Biolmage Intelligent Quantifier* (*Intelligent Quantifier*, *Biolmage Systems, Inc.*, Jackson, MI, USA). Foi gerado um gráfico com valores arbitrários para esta correção.

2.3. Análise *in silico* das Proteínas Preditas

A tradução dos genes diferencialmente expressos foi realizada através do programa *ExpASY Translate Tool* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>; Gasteiger *et al.*, 2003). Para o alinhamento múltiplo das proteínas preditas dos ESTs diferencialmente expressos e suas proteínas homólogas foi utilizado o programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Thompson *et al.*, 1994) e utilizado o programa *BOXSHADE 3.21* para melhor visualização dos motivos e domínios similares entre as proteínas (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Programa *BLAST 2 Sequences* foi empregado para a comparação de identidades entre as seqüências protéicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>; Tatusova e Madden, 1999). Os programas *TargetP 1.1*, *WolfPSORT* e *PSORT* foram utilizados para procurar possíveis endereçamento e localização das proteínas preditas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson *et al.* 2007; <http://wolfpsort.org/>-Horton *et al.*, 2006; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>). Para identificação dos sítios de glicosilação foi utilizado o programa *NetNGly* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGly/>). Para o cálculo da massa molecular foi usado o programa *Peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins *et al.*, 1997) e os programas *PROSITE* e *MotifScan* para procurar motivos, domínios,

famílias ou sítios que indicassem função da proteína (http://br.expasy.org/prosite/-de Castro *et al.*, 2006; http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan: Falquet *et al.*, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Análise temporal da expressão do gene *arp* (proteína reprimida por auxina, contig 821)

Em raízes inoculadas de *A. stenosperma* com nematóide, o gene da proteína reprimida por auxina, a partir daqui denominado *Asarp*, foi o EST mais abundante com 115 seqüências (Cap. 2). A análise *in silico* mostrou que este gene é diferencialmente expresso, sendo sua expressão induzida nas raízes inoculadas (Tabela 1). Na análise temporal, foi observado que este gene foi expresso nas duas espécies, *A. stenosperma*, resistente, e *A. hypogaea*, suscetível. Quando as raízes foram inoculadas com nematóide ocorreu a indução da expressão do *Asarp* nos dois sistemas. Uma diferença é a intensidade desta expressão, sendo mais forte na espécie resistente (Fig. 4). E de modo similar, nas raízes não infectadas, esta expressão foi mais intensa em *A. stenosperma* (Fig. 4), sendo quase duas vezes maior que em *A. hypogaea* (Fig. 5).

3.1.1. AsARP e outras proteínas ARP

Uma análise da seqüência protéica predita do gene *arp* de *A. stenosperma* mostrou grande homologia de seqüência com membros da família da proteína ARP/DRM (auxin-repressed/dormancy protein). A proteína deduzida tem 120 aminoácidos e uma massa molecular com cerca de 12,5 kDa, calculada pelo programa *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>). Através do programa PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) foi predito que a proteína AsARP está localizada no citoplasma. Não foram encontrados motivos de sinalização para alvo organelar ou de seqüências de peptídeo sinal. Um alinhamento múltiplo das seqüências protéicas deduzidas de AsARP e de todas as outras ARP/DRM disponíveis nos bancos de dados, através do programa Clustal W, revelou a presença de duas regiões conservadas, uma na extremidade N-terminal (Motivo 1) e outra na

Tabela 1 – Comparação entre os resultados da expressão de genes de raízes de *Arachis stenosperma* inoculadas com o nematóide *Meloidogyne arenaria* através da análise *in silico* dos ESTs e *Northern blot*.

Gene	Análise <i>in silico</i>	<i>Northern blot</i>
Proteína reprimida por auxina (<i>Asarp</i>)	Induzida	Induzida
Citocinina oxigenase/desidrogenase (<i>Asckx</i>)	Reprimida	4 DAI ^a -Induzida 9 e 16 DAI-Reprimida
Metalotioneína do tipo 2 (<i>Asmt2</i>)	Reprimida	Reprimida
Resveratrol sintase (<i>Asrs</i>)	Reprimida	Induzida
Proteína hipotética 1 (<i>N. tabacum</i>) (<i>Ashp1</i>)	Induzida	Induzida
Proteína hipotética 2 (<i>Oryza sativa</i>) (<i>Ashp2</i>)	Induzida	Induzida

^aDAI= dias após inoculação.

extremidade C-terminal (Motivo 2). (Anexo IV – Fig.1).

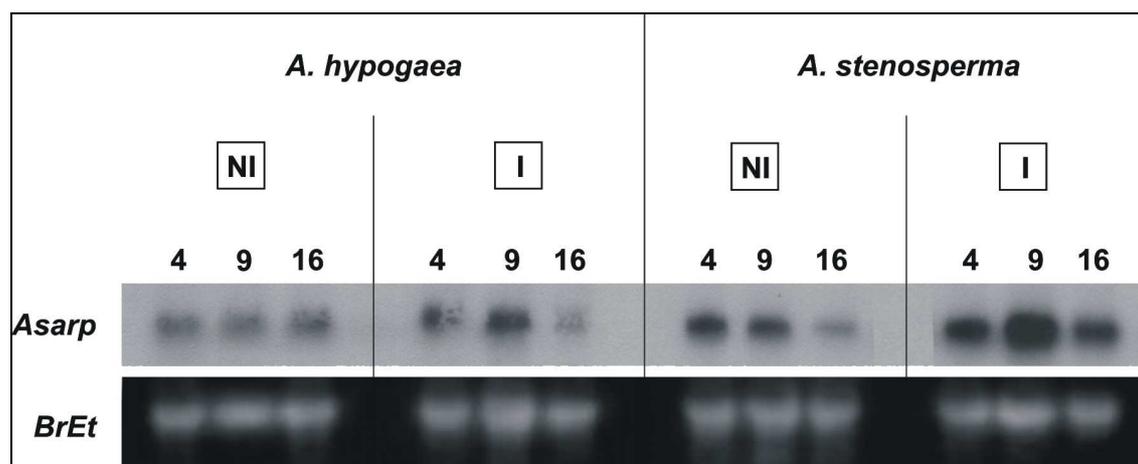


Figura 4 - Análise temporal da expressão do gene *Asarp* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após a inoculação. BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel.

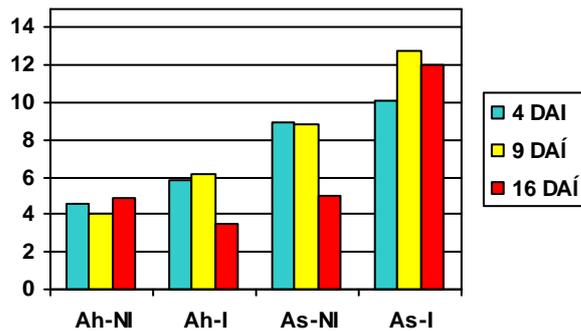


Figura 5- Quantificação das bandas dos sinais de hibridização do gene *Asarp* durante a análise temporal da expressão dos genes; os valores correspondem a densitometria realizada pelo programa Biolumage Intelligent Quantifier. Ah= *Arachis hypogaea*; As= *A. stenosperma*; NI= não inoculado; I= inoculado.

3.2. Análise temporal da expressão do gene *ckx* (gene da enzima citocinina-oxidase/desidrogenase, contig 433)

O gene *ckx* foi um dos genes diferencialmente expressos na análise dos ESTs de bibliotecas de raízes não inoculadas e inoculadas de *A. stenosperma* com o nematóide *M. arenaria*. Na análise temporal da expressão do gene *ckx*, (a partir daqui denominado *Asckx*), observamos que em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (4 DAI), houve uma indução na expressão do gene comparado às raízes não inoculadas, no entanto aos 9 e 16 DAI, a expressão foi reprimida (Fig. 6). Este resultado discorda em parte com o apresentado pela análise *in silico* dos ESTs, visto que nesta análise a expressão do gene *Asckx* era reprimida em raízes inoculadas de *A. stenosperma* (Tabela 1). Todavia, esta diferença pode ser função do conjunto de RNAs analisados em cada experimento, uma vez que as bibliotecas de ESTs foram desenvolvidas com o conjunto de transcritos entre os dias 2, 6 e 10 DAI, enquanto a análise da expressão pelo *Northern blot* foi feita individualmente ponto a ponto entre os dias 4, 9 e 16 DAI. De qualquer maneira, a análise *in silico* pôde nos orientar na escolha dos genes diferencialmente expressos, pois teve natureza qualitativa (diferencialmente expresso). Um padrão de expressão diferente foi observado nas raízes da espécie suscetível, *A. hypogaea*, onde a expressão de *Asckx* foi induzida em todos os pontos observados durante a infecção com nematóide (Fig. 6). Adicionalmente cabe destacar que a expressão deste gene foi maior nas raízes

de *A. hypogaea* não inoculadas que nas de *A. stenosperma* também não inoculadas.

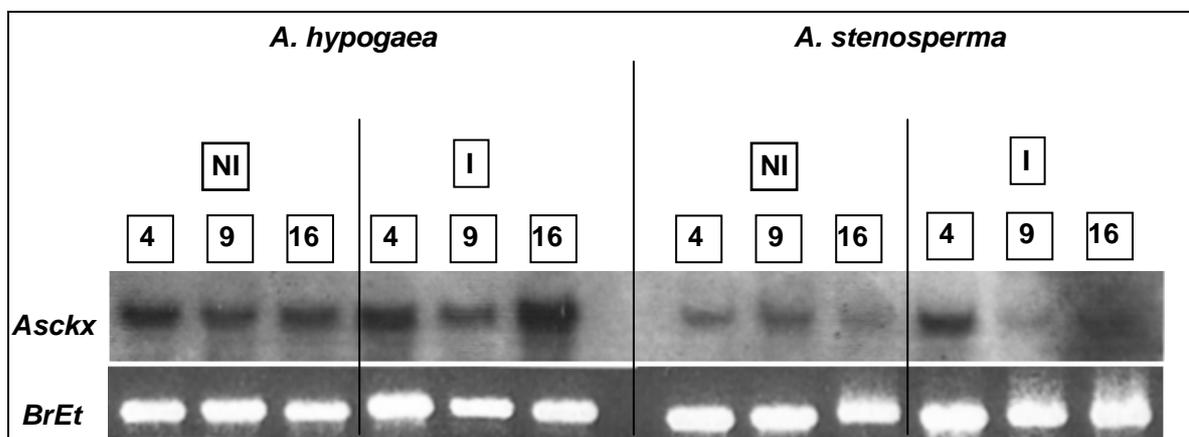


Figura 6 - Análise temporal da expressão do gene *Asckx* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após inoculação (DAI). BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel.

3.2.1. AsCKX e outras proteínas CKXs

A busca por genes que codificam CKX de plantas no banco de dados GenBank através do programa *BLAST search*, mostrou que há 28 genes anotados (Tabela 2). A massa molecular predita para *Asckx* é de 59,7 kDa e segundo programa *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson *et al.* 2007) e parece ser secretada (Tabela 2). A comparação através do programa *BLAST2 Sequences*, entre as seqüências das diferentes CKXs e a CKX de *A. stenosperma* (AsCKX) mostrou baixa identidade entre elas, que varia de 34% com a OsCKX8 de arroz a 45% com a AtCKX3 de *Arabidopsis*.

Tabela 2- Características das proteínas CKXs de plantas.

Nome do Gene ^a	Número de Acesso ^b	Tamanho (aa)	Massa ^c (kDa)	Localização Subcelular (TargetP) ^d	Localização Subcelular (WolfPSORT) ^e	Sítios de Glicosilação ^f	Referências ^g
<i>AsCKX</i>		532	59,7	S/1	Citoplasma/RE	4/4	-
<i>AtCKX1</i>	NM_129714	575	64,9	M/2	Cloroplasto	8/5	1,2
<i>AtCKX2</i>	NP_565455	501	55,6	S/5	Mitocôndria	3/3	1,2
<i>AtCKX3</i>	NP_200507	523	59,4	M/5	Vacúolo	4/2	1,2
<i>AtCKX4</i>	NM_119120	524	58,1	S/2	Extracelular	4/4	1,2
<i>AtCKX5</i>	NP_177678	540	60,4	S/1	Vacúolo	3/2	1,2
<i>AtCKX6</i>	Q9LY71	504	56,5	S/1	Extracelular	4/4	1,3
<i>AtCKX7</i>	NP_850863	524	57,9	-	Citoplasma	6/6	1
<i>OsCKX1</i>	Q9LDE6	532	56,0	S/3	RE	6/5	4
<i>OsCKX2</i>	AB205193	565	60,0	S/5	Cloroplasto	2/1	4
<i>OsCKX3</i>	AK103272	527	58,4	S/2	Cloroplasto	Nenhum sítio predito	4
<i>OsCKX4</i>	AK121317	525	58,0	S/1	RE	3/3	4
<i>OsCKX5</i>	AK101022	534	58,2	S/1	Citoplasma/RE	2/1	4
<i>OsCKX6</i>	BAD17196	527	57,4	S/2	Cloroplasto	3/3	4
<i>OsCKX7</i>	BAD17197	524	56,9	S/2	Cloroplasto	4/4	4
<i>OsCKX8</i>	CAE05712.2	532	57,6	S/1	Cloroplasto	Nenhum sítio predito	4
<i>OsCKX9</i>	AAT58842	521	58,3	S/4	Cloroplasto/Núcleo/Citoplasma	5/5	4
<i>OsCKX10</i>	BAD61939	550	59,9	S/4	Cloroplasto	1/1	4
<i>OsCKX11</i>	BAD09964	518	55,3	-	Citoplasma	Nenhum sítio predito	4
<i>ZmCKX1</i>	AF044603	534	57,2	S/5	Citoplasma/RE	8/5	5,6
<i>ZmCKX2</i>	CAE55200	519	57,9	S/1	Cloroplasto	3/3	5,6
<i>ZmCKX3</i>	CAE55201	525	58,5	S/1	Cloroplasto	3/3	5,6
<i>HvCKX1</i>	AF362472	137	15,6	-	Citoplasma	1/1	7
<i>HvCKX2</i>	AAN16383	526	58,8	S/2	Citoplasma	5/5	7
<i>HvCKX3</i>	AAO50082	520	58,2	S/3	Cloroplasto	5/5	7
<i>TaCKX</i>	AF362471	137	15,5	S/5	Mitocôndria	-	7
<i>DsCKX</i>	CAC17752	536	60,4	-	Cloroplasto	2/2	8
<i>StCKX</i>	ABH01255	130	15,3	M/4	Mitocôndria	1/1	9

^aNome dos genes é dado seguindo denominações do GenBank: *As*- *Arachis stenosperrma*, *At*- *Arabidopsis thaliana*, *Os*- *Oryza sativa*, *Zm*- *Zea mays*, *Hv*- *Hordeum vulgare*, *Ta*- *Triticum aestivum*, *Ds*- *Dendrobium spp.*, *St*- *Solanum tuberosum*;

^bSeqüências podem ser encontradas com o número de acesso no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>);

^cMassa Molecular calculadas com o *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins et al., 1997);

^dLocalização Subcelular/Classe de segurança (1= alta até 5 = baixa) calculado com TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson et al. 2007); S= via de secreção, M = mitocôndria, e C = cloroplasto e “-“ = sem predição;

^e Localização Subcelular calculada com WolfPSORT (<http://wolfpsort.org/>; Horton et al., 2006);

^fTodos os sítios de N-glicosilação preditos/ Os sítios preditos de glicosilação com mais de 50% de probabilidade calculados com NetNGly (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGly/>);

^gReferências: 1- Bilyeu et al. 2001; 2- Werner et al. 2001; 3- Werner et al., 2003; 4- Ashikari et al., 2005; 5- Morris et al. 1999; 6- Houba-Hérin et al. 1999; 7- Submetido diretamente ao CoreNucleotide Bank por Galuszka et al., 2001; 8- Yang et al. 2002; 9- Submetido diretamente ao Protein Bank por Nisha, K.K. e Purushothama, M.G. (26/06/2006).

O alinhamento de *AsCKX* com outras seqüências de CKXs de plantas pelo programa Clustal W mostrou que o domínio de ligação ao FAD - Flavina adenina dinucleotídeo (Fig. 7) é bem conservado no N-terminal.

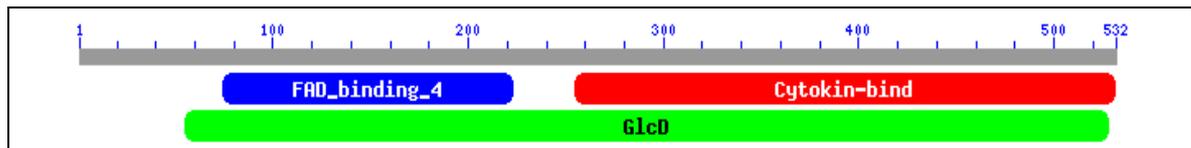


Figura 7 - Domínios conservados entre as diferentes CKXs de plantas. [Figura desenhada pelo site de busca de seqüências protéicas BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Outros dois domínios conservados são o domínio de glicosilação e o de ligação à citocinina. (Fig. 7 e Anexo IV – Fig. 2). No motivo *GHS* do domínio de ligação ao FAD, a proteína *AsCKX* teve a histidina substituída por uma alanina (Anexo IV – Fig. 2). As massas moleculares das CKXs calculadas a partir das seqüências protéicas são uniformes variando entre 56-64,9 kDa (Tabela 2). As CKXs da maioria das plantas mostraram ser glicoproteínas, possuindo sítios preditos de glicosilação com probabilidade acima de 50% (Tabela 2).

3.3. Análise temporal da expressão do gene *mt2* (gene da metalotioneína 2, contig 154)

Entre os ESTs diferencialmente expressos foi identificado o gene da metalotioneína do tipo 2, denominado aqui, *Asmt2*. O gene desta MT2 foi o segundo gene com maior número de clones identificados entre os ESTs. E de acordo com a análise *in silico* teve expressão reprimida nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* (Tabela 1). Na análise temporal da sua expressão, foi observado que este gene tem forte expressão em raízes de *A. stenosperma* (Fig. 8), tecido que geralmente apresenta expressão mais acentuada de MTs do tipo 1. Após inoculação o gene *Asmt2* foi reprimido (Fig. 8). Nas raízes de *A. hypogaea*, no entanto, não foi observada a expressão deste gene, em nenhuma das condições, nem na condição não inoculada e nem na condição inoculada com nematóide (Fig. 8).

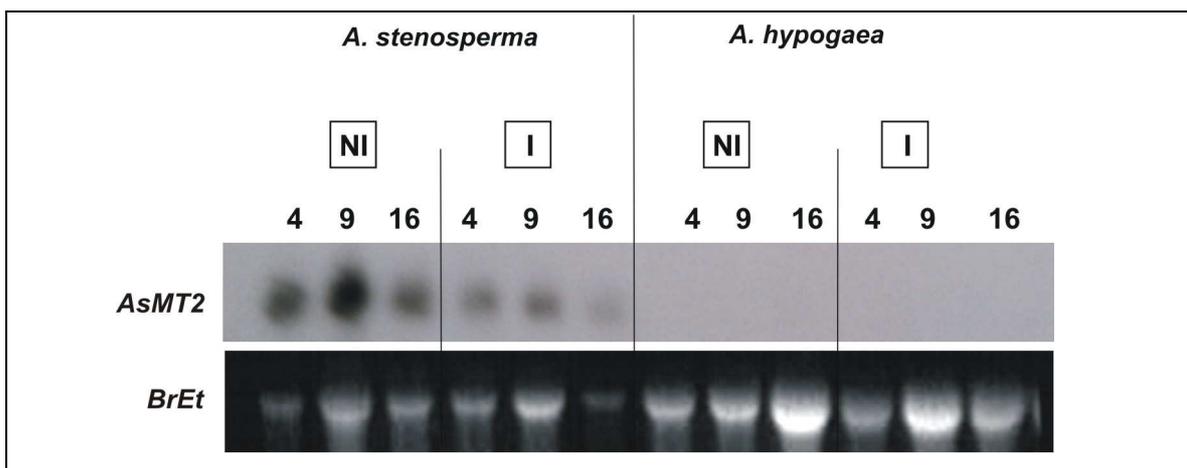


Figura 8 - Expressão temporal da expressão do gene *Asmt2* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após a inoculação. BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel. O tempo de exposição do filme foi de duas horas.

3.3.1. AsMT2 e outras proteínas MT2s

A proteína AsMT2, deduzida a partir da seqüência do gene *Asmt2* tem 82 aminoácidos e uma massa molecular com cerca de 7,99 kDa, calculada pelo programa *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins *et al.* 1997). Através dos programas TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson *et al.* 2007) e WolfPSORT (<http://wolfpsort.org/>; Horton *et al.*, 2006), foi predito que esta proteína está localizada no cloroplasto. A análise das proteínas mostrou grande variação entre as seqüências de AsMT2 e MT2s de outras espécies. As identidades variam de 41% com OsMT2b de arroz até 73% com MtMT2 de *Medicago truncatula*. O alinhamento múltiplo de diversas seqüências protéicas de MT2 através do programa Clustal W, mostrou alta conservação nos dois domínios de resíduos de cisteína, β -domínio, na extremidade N-terminal e α -domínio no C-terminal (Anexo IV, Fig. 3).

3.4. Análise temporal da expressão do gene *rs* (gene da enzima resveratrol sintase, contig 440)

O gene da enzima resveratrol sintase (*rs*) foi um dos genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de raízes de *A. stenosperma* inoculada e não inoculada com nematóide. Na análise *in silico* dos ESTs este gene (*Asrs*), teve a expressão reprimida em raízes inoculadas de *A. stenosperma* (Tabela 1). Já na análise temporal, a expressão do gene *Asrs* nas raízes desafiadas foi induzida como observado através do *Northern blot*, sendo mais pronunciada em *A. hypogaea* (Fig. 9). Pôde-se ainda observar que este gene foi expresso nas raízes não inoculadas de ambas as espécies (Fig. 9).

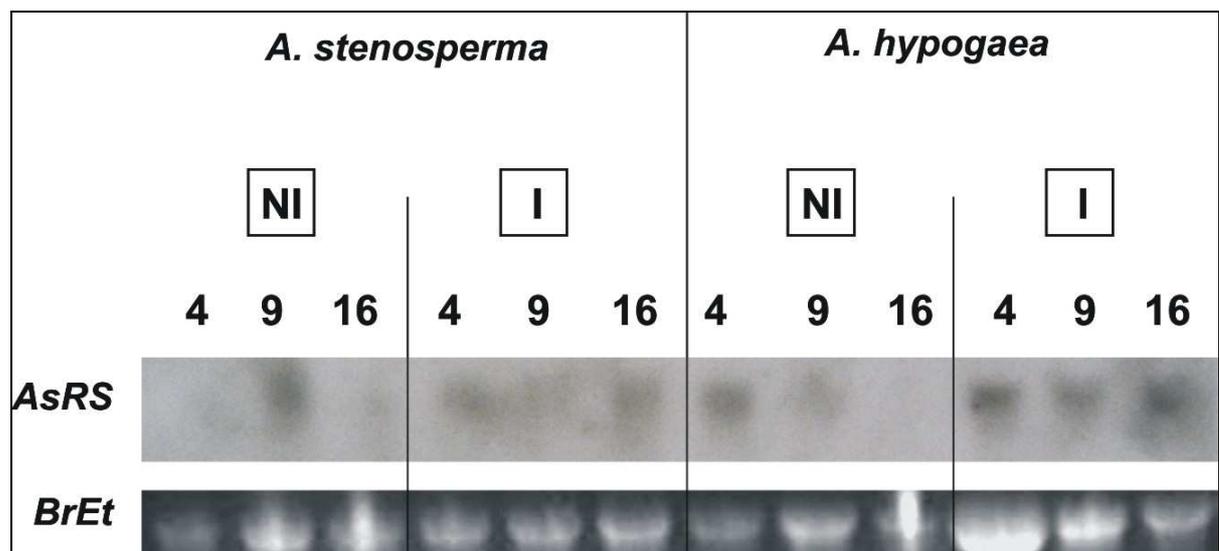


Figura 9 – Análise temporal da expressão do gene *Asrs* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após a inoculação. BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel.

3.4.1. AsRS e outras proteínas RS

A proteína AsRS é constituída por 389 aminoácidos e tem massa molecular predita pelo programa *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins *et al.* 1997), de 42,8 kDa. Não teve predição de localização subcelular pelo programa TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services>

/TargetP/; Emanuelsson *et al.* 2007), mas foi indicada como citoplasmática de acordo com o programa WolfPSORT (<http://wolfpsort.org/>; Horton *et al.*, 2006). Uma comparação da seqüência de AsRS e outras enzimas resveratrol sintases mostrou que esta tem grande homologia com as RSs de *A. hypogaea*, com 95%, 96% e 98% de identidade com AhRS1, AhSTS2 e AhRS3, respectivamente. A menor identidade observada foi de 65% com RtSTS de *Rheum tataricum*. O alinhamento múltiplo de várias seqüências protéicas de resveratrol sintases é mostrado no anexo IV- Fig. 4. Por toda seqüência há segmentos idênticos e a seqüência como um todo mostra homologia com a enzima chalcona sintase, outra estilbeno sintase.

3.5. Análise da expressão temporal dos genes *Ashp1* e *Ashp2* (genes homólogos às proteínas hipotéticas de *Nicotiana tabacum* e *Oryza sativa*, contigs 214 e 185)

Os outros dois genes diferencialmente expressos identificados nas bibliotecas de raízes inoculadas e não inoculadas de *A. stenosperma* são homólogos a genes de proteínas hipotéticas de *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* e *Oryza sativa*. Foram aqui, denominados: *Ashp1* e *Ashp2* (*A. stenosperma* hypothetical protein). Segundo a análise *in silico* ambos tiveram sua expressão induzida nas raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematóide (Tabela 1).

Gene Ashp1

A expressão temporal do gene *Ashp1* de raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* inoculadas e não inoculadas com nematóide foi monitorada através de experimentos de *Northern blot* (Fig. 10). O gene *Ashp1* foi expresso e acumulado tanto em raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas, quanto nas inoculadas com *M. arenaria*. Porém este acúmulo foi maior nas raízes da espécie resistente (Fig. 10).

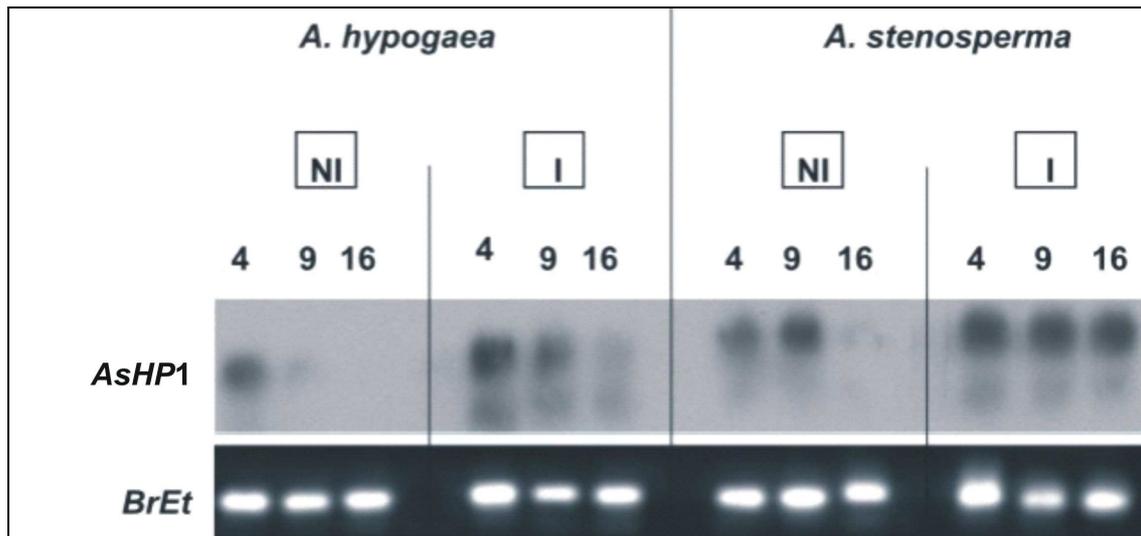


Figura 10 - Análise temporal da expressão do gene *Ashp1* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após a inoculação. BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel.

O gene *Ashp1* somente tem homologia com os genes *ArthMp003* de *Arabidopsis*; *NitaMp027* de *N. tabacum* e *MtrDRAFT_AC138017g30v2* de *M. truncatula*, respectivamente e foram identificados como genes mitocondriais sem função conhecida. Este é o primeiro relato da expressão deste gene mitocondrial, demonstrando que ele, não somente, é transcrito como tem forte acúmulo em raízes de *A. stenosperma* e de *A. hypogaea* (Fig. 10).

AsHP1 e outras proteínas hipotéticas

O gene *Ashp1* tem 94%, 92% e 90% de identidade com os genes mitocondriais: *ArthMp003* de *Arabidopsis*; *NitaMp027* de *N. tabacum* e *MtrDRAFT_AC138017g30v2* de *M. truncatula*, respectivamente (Anexo IV - Fig. 5). Todas as proteínas preditas destes genes possuem um motivo conservado “PWITDGISPWPFASESVLPSQCPIHP” (Anexo IV - Fig. 5). No entanto, não existem domínios caracterizados para estas proteínas. Na busca por motivos que indicassem o endereçamento destas proteínas somente foi possível prever a localização subcelular em duas das quatro seqüências analisadas, evidenciando que os motivos, na região N-terminal, utilizados para prever a sub-localização estão ausentes em algumas das seqüências (Tabela 3). Outras

Tabela 3- Características das proteínas hipotéticas similares à AsHP1.

Nome do Gene ^a	Número de Acesso ^b	Tamanho (aa)	Massa ^c (kDa)	Localização Subcelular (TargetP) ^d	Referências ^e
<i>Ashp1</i>		59	6,5	M/4	-
<i>ArthMp003</i>	NP_085475	107	11,9	-	1
<i>NitaMp027</i>	YP_173374	92	10,7	-	2
<i>MtrDRAFT_AC138017g30v2</i>	ABO79948	95	10,7	M/4	3

^aNome dos genes é dado seguindo denominações do GenBank: *As*- *Arachis stenosperma*, *ArthMp003*- *Arabidopsis thaliana*, *NitaMp027*- *Nicotiana tabacum*, *MtrDRAFT_AC138017g30v2*- *Medicago truncatula*;

^bSeqüências podem ser encontradas com o número de acesso no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>);

^cMassa Molecular calculadas com o *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins *et al.* 1997);

^dLocalização Subcelular/Classe de segurança (1= alta até 5 = baixa) calculado com TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson *et al.* 2007); S= via de secreção, M = mitocôndria, e C = cloroplasto e “-“ = sem predição.

^eReferências de submissão das seqüências: 1 - Unseld *et al.*, 1997; 2- Sugiyama *et al.*, 2005; 3 – Submissão direta por Shaull, S., Lin, S., Dixon, R., May, G., Sumner, L., Gonzales, B., Cook, D., Kim, D. e Roe, B.A., 2002 (The International Medicago Genome Annotation Group).

características das proteínas hipotéticas mitocondriais são apresentadas na tabela 3.

Gene *Ashp2*

O segundo gene homólogo a proteínas hipotéticas identificado nas análises *in silico* das bibliotecas de raízes inoculadas e não inoculadas de *A. stenosperma* foi o gene, aqui denominado *Ashp2*. Este gene apresentou homologia somente com genes de proteínas hipotéticas de arroz. Embora a função do gene *Ashp2* seja desconhecida, observamos que foi transcrito e teve maior acúmulo nas raízes inoculadas com nematóide da espécie resistente. No entanto, na espécie suscetível, *A. hypogaea*, este acúmulo foi maior nas raízes não inoculadas (Fig. 11).



Figura 11 – Análise temporal da expressão do gene *Ashp2* em raízes de *Arachis stenosperma* e *A. hypogaea* não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne arenaria* raça 1. Os pontos avaliados foram 4, 9 e 16 dias após a inoculação. BrEt = rRNA 28S corado com brometo de etídeo correspondente a cada amostra aplicada no gel.

AsHP2 e outras proteínas hipotéticas

A proteína AsHP2 predita do gene *Ashp2* apresenta 47-75% de identidade com proteínas hipotéticas sem função conhecida, de *O. sativa* (Anexo IV – Fig. 6). A tabela 4 mostra algumas características dessas proteínas. Como em alguns

Tabela 4- Características das proteínas hipotéticas similares à AsHP2.

Nome do Gene ^a	Número de Acesso ^b	Tamanho (aa)	Massa ^c (kDa)	Identidade com AsHP2 ^d (%)
<i>Ashp2</i>		137	15,1	-
<i>OsI_003050</i>	EAY75203	136	15,0	75
<i>Os01g0652700</i>	NP_001043739	178	19,9	74
<i>OsI_020349</i>	EAY99116	179	20,0	74
<i>Os11g0683600</i>	NP_001068462	198	18,9	56
<i>Os12g0563600</i>	NP_001067038	203	21,9	47

^aNome dos genes é dado seguindo denominações do GenBank: *As-* *Arachis stenosperma*, *ArthMp003-* *Arabidopsis thaliana*, *NitaMp027-* *Nicotiana tabacum*, *MtrDRAFT_AC138017g30v2-* *Medicago truncatula*;

^bSeqüências podem ser encontradas com o número de acesso no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>);

^cMassa Molecular calculadas com o *peptide-mass tool* (<http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html>; Wilkins *et al.* 1997);

^dIdentidade da proteína predita AsHP2 com outras proteínas hipotéticas de arroz dado pelo programa BLAST 2 Sequences.

dos casos anteriores, não foi encontrado nenhum domínio conservado que pudesse prever a sub-localização celular.

4. DISCUSSÃO

4.1. Expressão do gene *Asarp*

Diversos trabalhos relacionam a formação dos sítios de alimentação com a presença e abundância do hormônio auxina. Hutangura e colaboradores (1999) mostraram que há uma acumulação de auxina nas células precursoras das células gigantes e que esta foi eliminada nas primeiras 96h de infecção do nematóide das galhas, sugerindo que este hormônio deva ter papel na formação das galhas em *Trifolium repens*. Este resultado, segundo Doyle e Lambert (2003) é consistente com a sua hipótese de que a proteína corismato mutase I de *M. javanica* seja responsável pela diminuição dos níveis de auxina nas células gigantes recém formadas. Goverse *et al.* (2000b) e Mazarei *et al.* (2004) mostraram também que a auxina atua de forma proeminente nos estágios iniciais do desenvolvimento das células de alimentação induzidas por nematóides de cisto através da sua acumulação rápida e local. Esses autores sugerem que o balanço entre o transporte de auxina e a sua síntese seja crítico na formação e no desenvolvimento do sítio de alimentação. Demonstraram, ainda, que plantas mutantes, insensíveis à auxina, são resistentes aos nematóides. Voisin *et al.* (1999) observaram que concentrações elevadas de auxina permitiram a quebra de resistência ao nematóide *M. arenaria* em *Prunus cerasifera*.

Considerando os relatos da literatura, que descrevem uma relação inversa entre a presença de auxina e a expressão do gene *arp*, pode-se supor que houve uma diminuição dos níveis de auxina nos pontos 4, 9 e 16 DAI nas raízes inoculadas com nematóides das galhas, tanto em *A. stenosperma* (resistente) como em *A. hypogaea* (suscetível) (Fig. 4). Neste sentido, os resultados aqui observados estão de acordo com os dados da literatura, que mostraram que a partir de 4 DAI os níveis de auxina diminuem durante a infecção com nematóides. Cabe ressaltar que este resultado foi sempre descrito em sistemas compatíveis, onde a indução e formação de células gigantes ou sincícios se dão geralmente, em até 4 DAI. Entretanto para a espécie resistente, *A. stenosperma*, o desenvolvimento do ciclo de infecção do nematóide não se enquadra nestes períodos, não havendo então, sinalização para a redução dos níveis de auxina.

Isto claro, tomando-se a premissa de que os níveis do hormônio auxina estão elevados durante os primeiros estágios da infecção. Plantas desta espécie devem, de alguma forma, ter o transporte de auxina nas raízes bloqueado, impedindo assim que os juvenis que penetraram no sistema radicular não consigam induzir o sítio de alimentação. De fato, foi observado no estudo histopatológico que a incapacidade de induzir sítio de alimentação, realmente é um dos pontos de resistência desta espécie (Cap. 1).

Os resultados aqui obtidos mostraram que ocorreu um acúmulo da expressão do gene *Asarp* nas raízes tanto da espécie suscetível (sistema compatível), quanto da espécie resistente (sistema incompatível). O aumento do sinal do gene *Asarp* pode ser devido tanto ao aumento transcricional da expressão do gene, quanto ao aumento da vida média do seu mRNA. Em *A. hypogaea*, observamos que este gene foi induzido, mas teve uma expressão quase duas vezes menor que em *A. stenosperma* (Fig. 5). É importante salientar que mesmo nas raízes não inoculadas de *A. stenosperma*, a expressão do *Asarp* já se mostrava bem mais elevada que em *A. hypogaea*. Considerando estes resultados, podemos supor que o gene *Asarp* deve ter papel nesta resposta de defesa e o seu nível de expressão pode estar associado à resistência. Corroborando esta suposição, a indução do gene *arp* já foi demonstrada em respostas a vários estresses. Em folhas e caules lesionados de pimenta foi observada a indução do gene *arp* tanto num sistema compatível (inoculado com *Xanthomonas campestris*), quanto num sistema incompatível (inoculado com *Phytophthora capsici*), enquanto em plantas controles, não inoculadas, não foi observado a sua expressão (Jung e Hwang, 2000). Em outro estudo com um sistema compatível, foi observada a indução do gene *arp* em raízes de soja inoculadas com o nematóide de cisto *Heterodera glycines* (Alkharouf *et al.*, 2004). O gene *arp* também foi induzido em vagens imaturas infectadas com fungo de uma variedade de *A. hypogaea* que é resistente à seca e também tolerante à aflatoxina (Luo *et al.*, 2005). Ainda, em outros estudos de genes expressos em situação de estresse biótico, onde o gene *arp* foi induzido temos: plântulas de *Brassica napus* tratada com oligoquitosano, substância que mimetiza estresse biótico (Yin *et al.*, 2006); folhas e caules da leguminosa *Lathyrus sativus* (Chícharo) infectadas com *Mycosphaarella pinodes* (Skiba *et al.*, 2005); em grão-de-bico (*Cicer arietinum*) após ser inoculado com o fungo

Ascochyta rabiei (Coram e Paing, 2006) e raízes de *Medicago trunculata* noduladas com rizóbio e micorriza arbuscular (Manthey *et al.*, 2004).

Outros trabalhos demonstraram que o gene *arp* também é induzido em respostas a estresses abióticos. Como exemplos podem ser citados, folhas de café tratadas com BHT (di-terc-butil metil fenol), um indutor artificial de SAR, resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*), (De Nardi *et al.*, 2006); raízes de álamo que sofreram estresse hídrico (Kohler *et al.*, 2003); folhas de ervilha irradiadas com luz UV-B (Liu *et al.*, 2002) e raízes de pimenta submetidas ao estresse salino (Hwang *et al.*, 2005). Também é interessante notar que a expressão do gene *arp* foi induzida em raízes de pimenta com estresse de baixa temperatura (4 °C) e foi reprimido em folhas de *Brassica rapa* sob condições de estresse de alta temperatura (32 °C) (Hwang *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2003).

Os resultados aqui obtidos mostraram que indução do gene *Asarp* pode ter papel na resposta de defesa à infecção de raízes por nematóides em *A. hypogaea* e em *A. stenosperma*. No entanto, o aumento do seu acúmulo na espécie suscetível, demonstra tão somente uma reação de resistência basal, mas ainda, insuficiente para conferir resistência. A expressão de alguns genes relacionados com defesa é mais rápida e/ou pronunciada em interações incompatíveis que em compatíveis (Chittoor *et al.* 1997), como observado em *A. stenosperma*, que teve uma expressão quase duas vezes maior.

4.2. Proteínas ARP

Através do programa PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) foi predito que a proteína ARP esta localizada no citoplasma. Esta mesma localização foi descrita para a ARP de *Elaeagnus umbellata* (*EuNOD-ARP*), (Kim *et al.*, 2007). A proteína *AsARP* tem 100% de identidade com a ARP de *A. hypogaea* e 35% de identidade com *AtARP2* de *A. thaliana*. Utilizando-se o programa MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan: Falquet *et al.*, 2002), não foi possível a identificação de similaridades entre os motivos conservados (Motivo 1 e 2) observados na maioria das proteínas ARP (Anexo IV – Fig.1), e outros motivos estruturais já conhecidos. Porém, considerando o grau de identidade/similaridade entre as proteínas ARP das diversas espécies

analisadas, esses segmentos possivelmente devem corresponder a domínios estruturais.

4.3. Expressão do gene *Asckx*

O padrão de atividade e os níveis de transcritos de *ckx* sugerem que o controle transcricional da expressão deste gene seja feito pelo hormônio citocinina (Brugière *et al.*, 2003; Gaudinová, *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2007). Diversos trabalhos mostraram que tanto citocinina endógena quanto a aplicação exógena, estimulam a atividade, ou seja, a indução do gene citocinina oxidase/desidrogenase - *ckx*. Esta indução foi observada em culturas de células de fumo (Terrine e Laloue, 1980), em culturas de calos de várias plantas (Chatfield e Armstrong, 1986; Palmer e Palni, 1987; Motyka *et al.*, 1996), em raízes de *Arabidopsis*, *Dendrobium*, milho, trigo, cevada e arroz (Schmülling *et al.*, 2001, 2003; Brugière *et al.*, 2003; Aval'baev *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2003b; Galuszka *et al.*, 2004; Hirose *et al.*, 2007). No conjunto, estes resultados demonstram uma resposta de retroalimentação negativa, indicando que a própria citocinina induz sua degradação, pelo menos em parte, pela indução da expressão do gene *ckx*, modulando assim os níveis de citocinina e conseqüentemente sua ação no tecido (Kakimoto, 2003; Lee *et al.*, 2007). Com base nesses trabalhos é possível inferir que a indução da expressão de *Asckx* em raízes de *A. hypogaea* (4, 9 e 16 DAI) e *A. stenosperma* (4 DAI) inoculadas com nematóide pode ser devida à presença de citocinina no tecido, o que provoca sua rápida degradação.

Foi observado que durante a infecção de raízes com nematóides, na formação do sítio de alimentação e durante os estágios mais desenvolvidos das galhas, a planta produz citocinina (Lohar *et al.*, 2004). Esta produção foi demonstrada através da indução do promotor do gene *ARR5* (*Arabidopsis response regulator*), que é um gene que responde ao hormônio citocinina (Lohar *et al.*, 2004). Outros trabalhos mostraram que a citocinina também é produzida pelo próprio nematóide na infecção (Bird e Loveys, 1980; Meutter *et al.*, 2003), mas o seu papel durante o parasitismo ainda não está esclarecido (Bird, 2004). Lohar e colaboradores (2004) super-expressaram o gene *ckx* de milho e de *Arabidopsis* em raízes transgênicas de *Lotus japonicus* e observaram que houve

uma redução de 50% no número de galhas, indicando que raízes com resistência à citocinina, ou seja, insensíveis ao hormônio citocinina eram menos suscetíveis aos nematóides das galhas. Os mesmos autores demonstraram que num sistema compatível, a expressão e/ou acumulação de citocinina não ocorre durante a penetração e migração dos J2s, mas somente, na formação do sítio e nas células adjacentes às células gigantes nos estágios mais avançados do ciclo de infecção. Os pontos nos quais observamos aumento da expressão de *Asckx* correspondem, na espécie suscetível, aos estágios de instalação e desenvolvimento do sítio de alimentação (Cap. 1). No entanto, na espécie resistente (sistema incompatível) ocorreu a indução do gene *Asckx* aos 4 DAI, que segundo, o estudo histopatológico (Cap. 1) corresponde ao período de penetração dos J2s. Esta indução pode ser um indício de que neste momento havia uma maior concentração do hormônio citocinina nas raízes infectadas. Como nesta espécie não há formação de sítio de alimentação, foi possível observar a repressão deste gene nos pontos seguintes analisados (9 e 16 DAI). Em função do exposto, pode-se inferir que *A. stenosperma*, de alguma forma impede a acumulação de citocinina durante a infecção com nematóide, o que pode estar promovendo ou contribuindo para sua resistência a este patógeno.

4.4. AsCKXs e outras proteínas CKXs

A lista de organismos que tem atividade CKX inclui algumas espécies não vegetais tais como, *Dictyostelium discoideum* (Armstrong e Firtel, 1989) e *Saccharomyces cerevisiae* (Van Kast e Laten, 1987).

Grande parte das proteínas CKXs possuem estruturas similares como o domínio de ligação ao FAD, o domínio de ligação à citocinina e um domínio de glicosilação (Fig. 7). Algumas diferenças nas seqüências podem ser explicadas por modificações pós-transcricionais (Schmülling *et al.*, 2003). As CKXs da maioria das plantas mostraram ser glicoproteínas, no entanto, nem todas são glicosiladas e foi sugerido que esta diferença seja importante para a localização da enzima, bem como para a regulação da sua expressão (Motyka *et al.*, 2003). Estas enzimas utilizam o FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) como cofator e como qualquer cofator, este elemento não participa diretamente da reação, mas é fundamental para que a mesma ocorra. No caso das CKXs o domínio FAD

serve como carreador de elétrons. Flavinas são bem conhecidas como cofatores nos sítios ativos de muitas enzimas (flavoproteínas). As enzimas CKXs são flavoproteínas que não utilizam o oxigênio como receptor de elétrons e por isso foram reclassificadas como citocininas desidrogenases -EC. 1.5.99.12 (Galuszka *et al.*, 2001). Dentro do domínio de ligação ao FAD, o motivo *GHS* foi encontrado nas posições 92-94 da maioria das CKXs, sugerindo que a enzima deve se ligar covalentemente (Morris *et al.* 1999; Bilyeu *et al.* 2001) ao FAD através do resíduo de histidina (Houba-Hérin *et al.*, 1999). Na AsCKX a glicina deste motivo foi substituída por alanina, outro aminoácido alifático. Dentre todas as seqüências analisadas e que possuíam este motivo, AsCKX foi a única que apresentou uma substituição nessa posição (Anexo IV – Fig. 2).

A análise das seqüências das diferentes CKX mostrou haver baixa identidade entre elas, mas apesar das diferenças, pelo menos um terço de todas as posições são altamente conservadas (Schmülling *et al.*, 2003). Existem ainda motivos curtos encontrados nas duas extremidades que também são bem conservados, como as seqüências GLWEVPHWLNL no N-terminal e PGQXIF no C-terminal (Schmülling *et al.*, 2003). Mesmo com um alto grau de variabilidade entre as seqüências, a existência de posições conservadas indica que os aminoácidos conservados são funcionalmente importantes. Algumas dessas seqüências parecem ser específicas das enzimas CKX, podendo ter papel no reconhecimento do substrato e no transporte de elétrons (Schmülling *et al.*, 2003). Existem ainda vários outros sítios de reconhecimento para diferentes proteínas quinases e sítios de miristoilação, mas que não são bem conservados entre as diferentes CKXs (dado não mostrado).

Através dos programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007) e WolfPSORT (Horton *et al.*, 2006) foram feitas análises das seqüências para predição da localização subcelular de cada uma das CKXs (Tabela 2). E ainda a mesma análise mas com outro programa, PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>), indicou que todas as CKXs analisadas tem endereçamento extracelular (dados não mostrados). Segundo estes programas as chances de acerto são de até 96%, no entanto, muito dos resultados foram ambíguos. Estas falhas ocasionais ou ambigüidades nas predições podem ser devido ao fato de que algumas proteínas não tenham destino exclusivo, mas sim, alvos duplos ou múltiplos. Isto já havia sido observado em outros estudos (Emanuelsson *et al.*,

2001; Schwacke *et al.*, 2003). Uma análise feita por Werner *et al.*, (2003) também mostrou a necessidade de experimentos *in vivo* para a confirmação das predições.

Um papel para as CKXs extracelulares pode ser o controle da quantidade de citocinina (CK) importada de algum tecido ou exportada dos tecidos produtores de CKs (Jones and Schreiber 1997; Mok and Mok 2001). Outra importante função seria a degradação das CKs derivadas do ciclo celular. O nível de CKs aumenta drasticamente durante curtos períodos do ciclo celular entre as fases G₂ e M (Redig *et al.*, 1996). Não se sabe como o nível original de CKs é reajustado rapidamente, mas acredita-se que CKXs extracelulares devam estar envolvidas, através do transporte de CKs associadas com ciclo celular para fora da célula. Uma vez no meio extracelular, poderiam ser degradadas (Redig *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 2003). O transporte de CKs para fora da célula em divisão permitiria que células vizinhas fossem informadas que uma divisão celular estaria ocorrendo (Werner *et al.*, 2003)

A CKX de *A. stenosperma* (AsCKX) foi predita ser endereçada para o retículo endoplasmático e ser secretada (Tabela 2). Se este for o caso, poderia ser uma CKX extracelular e estaria atuando, de alguma forma, durante o processo de endoreduplicação celular iniciado pelos nematóides justamente na formação do sítio de alimentação e na indução das células gigantes. Neste sentido, o gene *Asckx* foi induzido nas raízes de *A. hypogaea* após a infecção (Fig. 6).

4.5. Interação dos genes *Asarp* e *Asckx*

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os dados obtidos por outros autores quanto a interação de auxina e citocinina durante o processo de infecção do nematóide. Foi observado, presente no trabalho, uma baixa expressão do gene *Asarp*, indicando talvez, que houvesse a presença de auxina e uma forte expressão de *Asckx*, sugerindo também que houvesse a presença de citocinina nas raízes infectadas com nematóides na espécie suscetível, *A. hypogaea*. Já nas raízes infectadas de *A. stenosperma*, que é resistente, observamos o contrário, ou seja, alta expressão do gene *Asarp*, indicando a ausência de auxina e baixa expressão do gene *Asckx*, indicando ausência de

citocinina. Os dois hormônios, como já ressaltado, são importantes no processo de infecção dos nematóides. A resistência em *A. stenosperma* pode ser derivada desta regulação, pela planta, dos níveis destes hormônios tão importantes durante a infecção.

4.6. Expressão do gene *Asmt2* e a reação de hipersensibilidade

Genes de resistência a nematóides têm sido identificados em várias espécies de plantas e a maioria está associada com uma típica resposta de hipersensibilidade nas células da raiz ao redor do nematóide (Nelson *et al.*, 1990; Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Ghannam *et al.*, 2005; Anthony *et al.*, 2005; Pegard *et al.*, 2005).

Como descrito em mais detalhes no capítulo 1, a expressão fenotípica de resistência nas raízes de *A. stenosperma* infectadas com *M. arenaria* foi caracterizada por uma resposta de hipersensibilidade (HR), (Fig. 12). A HR é uma ativação local do programa de morte celular (PCD – *Programmed Cell Death*) em resposta ao ataque de patógenos (Mittler *et al.*, 1999). Acredita-se que a HR atue como um mecanismo de defesa que inibe o crescimento de patógenos dentro dos tecidos vegetais infectados. Por matar as células no sítio ou ao redor do sítio de infecção, este processo gera uma barreira física composta por células vegetais mortas e limita a disponibilidade de nutrientes ao patógeno, por causa da rápida desidratação que acompanha a morte celular (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 2004). A morte programada de células que ocorre durante a HR é acompanhada pelo aumento da produção de espécies ou intermediários de oxigênio reativos, os ROS ou ROI (*Reactive Oxygen Species* ou *Reactive Oxygen Intermediates*). Estes por sua vez, são formas reduzidas do oxigênio atmosférico (O_2) (Mittler, 2002). Ao contrário do oxigênio atmosférico, ROS são capazes de oxidações irrestritas de vários componentes celulares que podem resultar na destruição oxidativa da célula (Dat, *et al.*, 2000; Hammond-Kosack e Jones, 1996). A rápida geração e acumulação de ROS, como superóxido (O_2^-) e peróxido de oxigênio (H_2O_2), durante os estágios iniciais da sinalização de defesa das plantas é conhecido como queima oxidativa (Apel e Hirt, 2004). No entanto, a acumulação de ROS isoladamente não é suficiente para iniciar resistência a doenças e patógenos (Heath, 2000). Adicionalmente, os

ROS agem ainda como agentes de transdução de sinal induzindo outros mecanismos de defesa como as proteínas PRs (Hammond-Kosack e Jones, 1996) e SAR (Knight e Knight 2001).

Vários trabalhos mostraram que para ocorrer a HR é necessário não somente a produção como também o acúmulo de ROS (Lamb e Dixon, 1997; Mittler *et al.*, 1999; Hückelhoven e Kogel, 2003; Melillo *et al.*, 2006). Porém sob estresse oxidativo, plantas, muitas vezes, respondem ativando também um complexo sistema enzimático e não enzimático de seqüestradores de ROS, para poder manter a homeostase de oxi-redução e assim proteger as células contra os danos oxidativos (Mittler, 2002). Estes seqüestradores de ROS (*ROS scavengers*) são responsáveis pela desintoxicação celular (Apel e Hirt, 2004). Alguns seqüestradores, como ascorbato peroxidase e catalase são suprimidos durante a HR, um processo que potencializa a indução do programa de morte celular (PCD) e de outras defesas por permitir o aumento de ROS e diminuir a capacidade das células de retirar o H₂O₂ durante a reação (Mittler *et al.*, 1998; Apel e Hirt, 2004).

As metalotioneínas são também conhecidas por estar envolvidas no seqüestro de ROS, bem como na homeostase de metais conferindo proteção contra danos no DNA celular (Thornalley e Vasak, 1985; Kägi *et al.*, 1991; Hussain *et al.*, 1996; Akashi *et al.*, 2004; Cobbett e Goldsbrough, 2002, Wong *et al.*, 2004; Melillo *et al.*, 2006; Lü *et al.*, 2007). Trabalhos recentes mostraram que as MTs do tipo 2, são reprimidas durante o processo de resposta de hipersensibilidade (Mittler *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2004; Melillo *et al.*, 2006). Nos ensaios deste trabalho, a quantidade de expressão do gene *Asmt2* foi menor que o apresentado pelas raízes não infectadas e diminuiu ao longo do tempo em raízes de *A. stenosperma* infectadas com o nematóide (Fig.8), sendo que essa diminuição acompanhou a HR observada por volta dos 16 DAI (Fig. 12 e Cap. 1). De modo semelhante, Wong e colaboradores (2004) mostraram que a *OsMT2b* de arroz era expressa em vários tecidos, sendo mais forte em raízes, inflorescências imaturas e culturas de células. Observaram que em mutantes *lesion mimics* a expressão de *OsMT2b* era reduzida, ou seja, durante a fase de queima oxidativa em células induzidas ocorria a repressão da expressão do gene *OsMT2b*. Para confirmar este resultado, super-expressaram

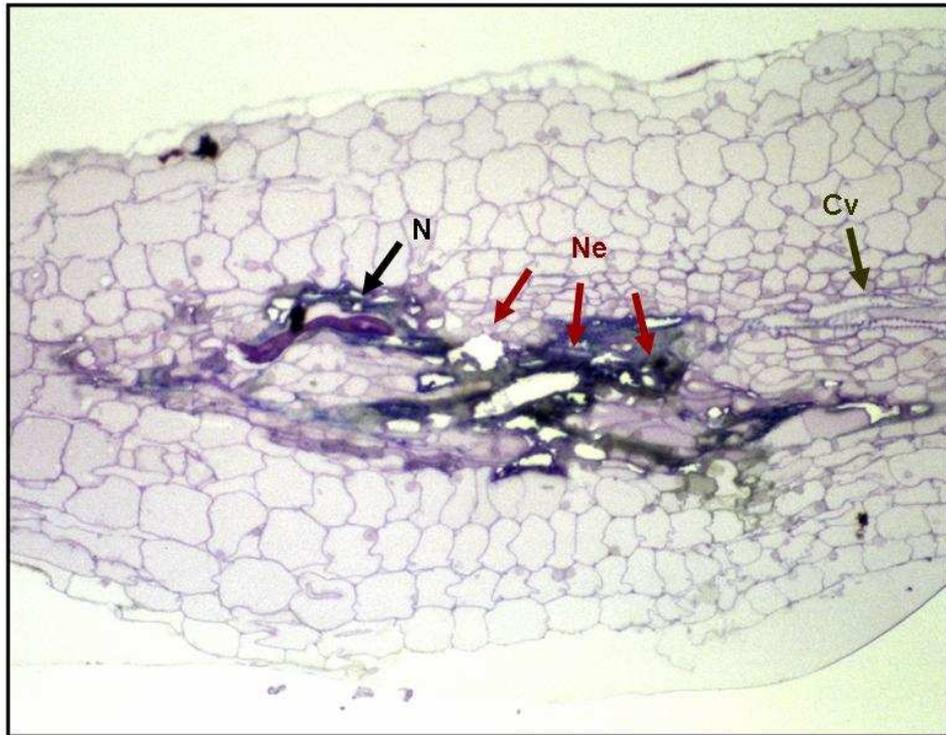


Figura 12 – Reação de hipersensibilidade na raiz de *Arachis stenoperma* infectada com *Meloidogyne arenaria* 16 DAI. N = Nematóide; Ne = Necrose (HR) e Cv = Cilindro vascular.

o gene *OsMT2b* em plantas transgênicas e observaram que houve um aumento na susceptibilidade de plantas de arroz ao fungo *Magnaporthe grisea* e à bactéria *Xanthomonas oryzae*.

A resposta de hipersensibilidade em raízes infectadas com nematóides geralmente ocorre em interações incompatíveis entre uma planta resistente e um nematóide avirulento. Na interação incompatível entre *A. thaliana* e o nematóide de cisto *Heterodera glycines* foram observados os sintomas de HR e a produção de H_2O_2 (Waetzig *et al.*, 1999), e na interação entre tomate e *M. incognita* foi também observado a expressão de peroxidases e de superóxido dismutase, enzimas envolvidas na produção e neutralização de ROS (Zacheo e Bleve-Zacheo, 1988).

Para avaliar se a oxidação por ROS em raízes de tomate infectadas por nematóides das galhas, num sistema incompatível, era inibida por seqüestradores de ROS, Melillo *et al.*, (2006) trataram raízes infectadas com

inibidores específicos para os diferentes tipos de ROS. Como resultado da inibição de ROS obtiveram a supressão da reação de hipersensibilidade. Observaram ainda que durante a HR, não somente, altos níveis de concentração de ROS foram produzidos, mas que a produção de H₂O₂ (um tipo de ROS) era mais acentuada, sugerindo um papel direto deste componente como agente antimicrobiano. Nos resultados aqui apresentados, na resposta da interação incompatível entre *A. stenosperma* e *M. arenaria*, a diminuição da expressão do gene *Asmt2* e a ocorrência de reação de hipersensibilidade nas raízes infectadas (Figs. 8 e 12) sugerem que esta metalotioneína do tipo 2 em *A. stenosperma* atue como um seqüestrador de ROS. Ou seja, sua repressão pode estar associada à supressão dos mecanismos de desintoxicação de ROS, que por sua vez é crucial para que ocorra a morte celular (HR), como foi observada nos estudos histológicos. Num sistema compatível foi observado que também ocorre a queima oxidativa, no entanto, tem curta duração (menos de 24 horas); está limitada ao primeiro estágio da infecção; parece estar ligada à supressão da morte celular ou de outras defesas e resulta na infecção da planta hospedeira (Melillo *et al.*, 2006). Todavia, no sistema compatível, analisado neste trabalho, não foi possível observar a expressão de *Asmt2* na espécie suscetível *A. hypogaea* (Fig. 8). Não observamos expressão nem na condição não inoculada, o que não era esperado, pois, este gene, de acordo com a literatura tem em geral, expressão forte em raízes de várias plantas (Guo *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004; Melillo *et al.*, 2006; Lü *et al.*, 2007). Luo e colaboradores (2005) observaram a indução de MT em vagens imaturas de *A. hypogaea* resistente à seca e a aflatoxina submetidas ao estresse. Outros trabalhos mostraram diferentes tipos de MTs, bem como, diferentes padrões de expressão para respostas de defesa tanto à infecção com nematóides quanto a outras interações planta-patógeno. Ainda nas interações planta-nematóide, Potenza *et al.* (2001) também identificaram uma MT diferencialmente expressa em bibliotecas de cDNA de raízes de uma espécie suscetível de alfafa, inoculadas e não inoculadas, com *M. incognita*. Numa análise temporal da expressão (24-98 h após a inoculação), observaram que a metalotioneína do tipo 1 era expressa tanto na espécie suscetível quanto na resistente. A expressão na espécie suscetível não se alterou após a inoculação, enquanto na espécie resistente houve um aumento em 72 h e depois uma forte diminuição em 98 h. Neste último

ponto esse resultado se assemelha ao observado em *A. stenosperma*, embora os sistemas sejam distintos, as MTs de diferentes tipos e não ocorra HR na interação entre alfafa e nematóide. Um padrão diferente de expressão de MTs foi observado em outras interações planta-nematóide. Nas interações de soja (MT1) e arroz com *H. glycines* e tomate (MT2) com *Globodora rostochiensis*, foi observado uma indução na expressão de MTs (Klink *et al.*, 2005; Alkharouf *et al.*, 2006; Uehara *et al.*, 2007). A indução de MTs também foi observada em outras interações planta-patógeno ou em outros tipos de estresses, incluindo, MT1 em folhas de arroz infectadas com *M. grisea* (Kim *et al.*, 2001); tabaco infectado com vírus (Choi *et al.*, 1996); MT2 em trigo infectado com *Fusarium graminearum* (Golkari *et al.*, 2007); MT2 em tomate infectado com *Pseudomonas syringae* (Mysore *et al.*, 2003) e tabaco na resposta ao estresse do tratamento com cobre, e durante senescência (Thomas *et al.*, 2005).

Como exposto, as MTs estão envolvidas em diversos aspectos da biologia das plantas incluindo senescência, homeostase de metais e respostas de defesa. Como interpretação dos resultados deste trabalho, tendo como base os dados da literatura descritos acima, é possível supor que: (i) AsMT2 funcione como um seqüestrador de ROS na interação entre a espécie resistente, *A. stenosperma*, e o nematóide, *M. arenaria*; (ii) a diminuição da sua expressão após inoculação proporcione o acúmulo de elementos ROS, ou seja, que não sejam retirados da resposta de infecção permitindo assim, o surgimento da resposta de hipersensibilidade e conseqüentemente a morte celular no sítio de de alimentação do nematóide.

4.7. AsMT2 e outras proteínas MT2s

A homologia existente entre as proteínas MT2s é devida, principalmente, aos domínios ricos em cisteína, β -domínio, na extremidade N-terminal e ao α -domínio no C-terminal (Anexo IV – fig. 3). As identidades das MT2 e AsMT2 variam muito e pode ir de 41% a 73% entre MT2 de arroz e de *M. truncatula*, respectivamente. O tamanho da região espaçadora é bem variável entre as diferentes MT2s, como já descrito na literatura (Cobbett e Goldsbroug, 2002). Através do programa TargetP foi possível a inferência sobre a localização

protéica de AsMT2. Esta proteína foi predita estar localizada no cloroplasto, no entanto, para as demais MT2s analisadas, nenhuma localização foi determinada.

4.8. Expressão do gene *Asrs*

A síntese da fitoalexina resveratrol é regulada diretamente através da ação da enzima resveratrol sintase (RS), que por sua vez é regulada pelo controle transcricional dos genes *rs*, isto é, maior expressão do gene *rs* implica em maior produção de resveratrol (Chung *et al.*, 2003).

A regulação da expressão do gene *rs* e conseqüentemente a síntese de resveratrol foi estudada em sistemas de culturas de células de amendoim e videira (Fritzemeier *et al.*, 1983; Keen and Ingham, 1976 *in* Chung *et al.*, 2001; Commun *et al.*, 2003) bem como *in planta* (Chung *et al.*, 2001). Foi observado por Chung e colaboradores que o gene *rs* não foi expresso em folhas mas em raízes e vagens de plantas de amendoim saudáveis sob condições de campo e sem sintomas aparentes de infecção. Já em plantas mantidas sob condições mais controladas como plantas crescidas em meio de cultura semi-sólido e estéril, não foi observada tal expressão. Outros trabalhos já demonstraram que a produção de resveratrol somente ocorre sob condições de estresse, seja por infecção com microorganismos, irradiação UV, estresse hormonal, ou injúria do tecido (Hain *et al.*, 1993; Ingham, 1976 e Arora e Strange, 1991 *in* Chung *et al.*, 2001). Sendo assim, Chung *et al.* (2001) acreditam que a expressão observada em raízes saudáveis (não infectadas) tenha sido devido ao meio onde as plantas foram crescidas (campo). No solo existem microorganismos que ali habitam comumente. Como também observou a expressão em plantas crescidas em meio de cultura com ágar mais sólido, os autores inferiram que o próprio crescimento da raiz no solo poderia causar pequenos ferimentos, o que seria suficiente para induzir a expressão do gene da RS. Neste sentido, é possível que a baixa expressão observada em raízes não inoculadas de *Arachis*, apresentada no presente estudo, também seja conseqüência do atrito das raízes com o solo durante o crescimento.

Diversos trabalhos mostraram a indução do gene *rs* como resposta à infecção por fungos como: *B. cinerea* (Hain *et al.*, 1993; Adrian *et al.*, 1997), *Phytophthora infestans* (Thomzik *et al.*, 1997), *Rhizopus stolonifer* (Sarig *et al.*,

1997), *Plasmopara viticola* (Langcake, 1981), *Septoria nodorum* e *Puccinia recondita* (Serazetdinov *et al.*, 2005). A indução também foi observada devida a estresses abióticos incluindo luz UV e ferimento em folhas e raízes de amendoim e em resposta aos hormônios AS (ácido salicílico), JA (ácido jasmônico), e etefon (liberador de etileno), (Chung *et al.*, 2003). No entanto não existem relatos onde haja a correlação da indução do gene *rs* em resposta à infecção com nematóides das galhas. Observamos que nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* ocorreu uma leve indução deste gene e uma expressão um pouco mais acentuada em *A. hypogaea* (Fig. 9). Porém, caso exista alguma relação entre a expressão da RS e a resistência a nematóides, esta expressão não foi suficiente em *A. hypogaea* para conferir proteção, uma vez que nessa espécie ocorreu uma infecção típica. Uma possibilidade é que a indução tenha sido apenas uma resposta aos ferimentos causados pelos nematóides durante a penetração. Neste sentido, a menor expressão do gene *rs* observada em *A. stenosperma* pode ser devido a menor taxa de penetração dos nematóides nessa espécie, como observado nos ensaios histopatológicos, resultando em menos danos às raízes. Em videira, a enzima resveratrol sintase foi expressa em raízes não inoculadas e inoculadas com *Phylloxera*, nematóide parasita dessa planta, que como *Meloidogyne* é biotrófico obrigatório. Porém não houve diferenças na sua expressão (Kellow *et al.*, 2004).

O estudo da expressão do gene resveratrol sintase tem sido importante uma vez que é a enzima responsável pela catálise do resveratrol, que atua não somente como uma fitoalexina, mas também pelo seu papel na saúde humana. Já foi mostrado que o resveratrol possui atividades antioxidantes, na prevenção do câncer e na diminuição da pressão arterial, aliviando problemas cardiovasculares (Pettit *et al.*, 2000; Leiro *et al.*, 2004, 2005; Campos-Toimil *et al.*, 2005).

4.9. AsRS e outras enzimas resveratrol sintase

As diferentes proteínas resveratrol sintase têm 313-395 aminoácidos, e com massa molecular em torno de 43 kDa. A localização subcelular não foi possível ser predita pelo programa TargetP, no entanto pelo programa WolfPSORT foi predito para todas as RSs localização no citoplasma, como também inferido para

AsRS. A identidade entre RSs da mesma espécie é sempre maior que entre as espécies, como foi observado pelo alinhamento múltiplo. Todas as RSs têm grande homologia com a estilbeno sintase, chalcona sintase.

4.10. Expressão dos genes das proteínas hipotéticas *Ashp1* e *Ashp2*

Considerando que *Ashp1* corresponde a priori a um gene mitocondrial e que o RNA mitocondrial corresponde apenas a uma pequena parcela do RNA total extraído para o experimento da análise temporal da expressão, a expressão do gene *Ashp1* deve ser alta para ser detectada pelo *Northern blot*. A identificação dos genes homólogos das outras espécies se deu através do seqüenciamento total do genoma mitocondrial de *Arabidopsis* e de *N. tabacum* e não há relatos sobre sua expressão (Unsel et al., 1997; Sugiyama et al., 2005).

Como a função dessas proteínas hipotéticas é desconhecida não é possível fazer nenhuma inferência para explicar o acúmulo dos mRNAs do gene *Ashp1* nas raízes inoculadas com nematóide, apenas podemos ressaltar que é um gene mitocondrial expresso e que tem expressão diferencial entre raízes infectadas e não infectadas nos sistemas compatível e incompatível.

Pela comparação das seqüências protéicas observamos que a proteína predita a partir da seqüência do gene *Ashp2* faz parte da família de proteínas denominada DUF538 (Marchler-Bauer et al., 2005). Esta família é formada por várias proteínas sem função conhecida. Nas raízes de *A. hypogaea*, espécie suscetível foi observado maior acúmulo de mRNA de *Ashp2* nas raízes não inoculadas, ao contrário, nas raízes de *A. stenosperma*, espécie resistente, este maior acúmulo foi observado nas raízes quando inoculadas com nematóide. Uma possibilidade é que este gene possa estar relacionado com a resistência em *A. stenosperma*, porém não é possível qualquer inferência adicional mais embasada.

5. CONCLUSÕES

A partir do que foi exposto podemos concluir que a análise *in silico* e a validação dos genes diferencialmente expressos pelo tratamento estatístico do teste de Fisher, foram eficientes no contexto da seleção dos genes com expressão diferencial nas raízes de *A. stenosperma* durante a infecção com o nematóide *M. arenaria* raça 1. A comprovação desta expressão diferencial através dos experimentos de *Northern blot* foi possível para a maioria dos genes analisados, evidenciando que esta estratégia é válida, principalmente se for considerado a informação qualitativa, ou seja, genes diferencialmente expressos.

Na análise da expressão destes genes nos sistemas compatível (*A. hypogaea* x *M. arenaria*) e incompatível (*A. stenosperma* x *M. arenaria*) é possível inferir que, principalmente, os genes *Asarp*, *Asckx*, *Asmt2* e *Ashp2* estejam envolvidos no processo de resistência de *A. stenosperma*. A indução ou repressão destes genes tanto na espécie suscetível quanto na resistente, juntamente com a expressão fenotípica observada durante todo o processo de infecção com o nematóide corroboram esta idéia. O esquema a seguir mostra o resumo geral de como se dá a resistência e susceptibilidade em *A. stenosperma* e *A. hypogaea* a *M. arenaria* raça 1 (Fig. 13).

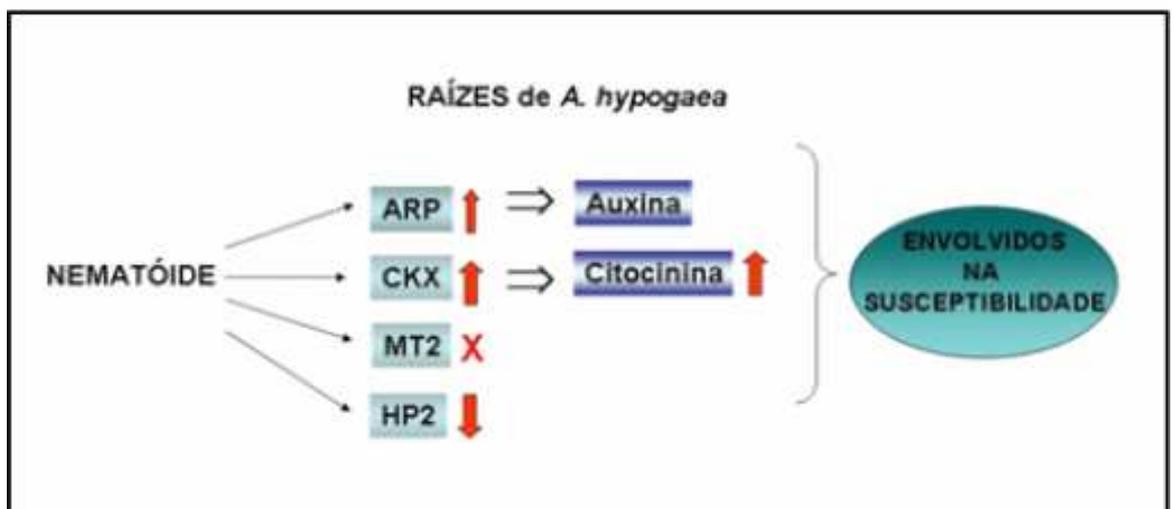
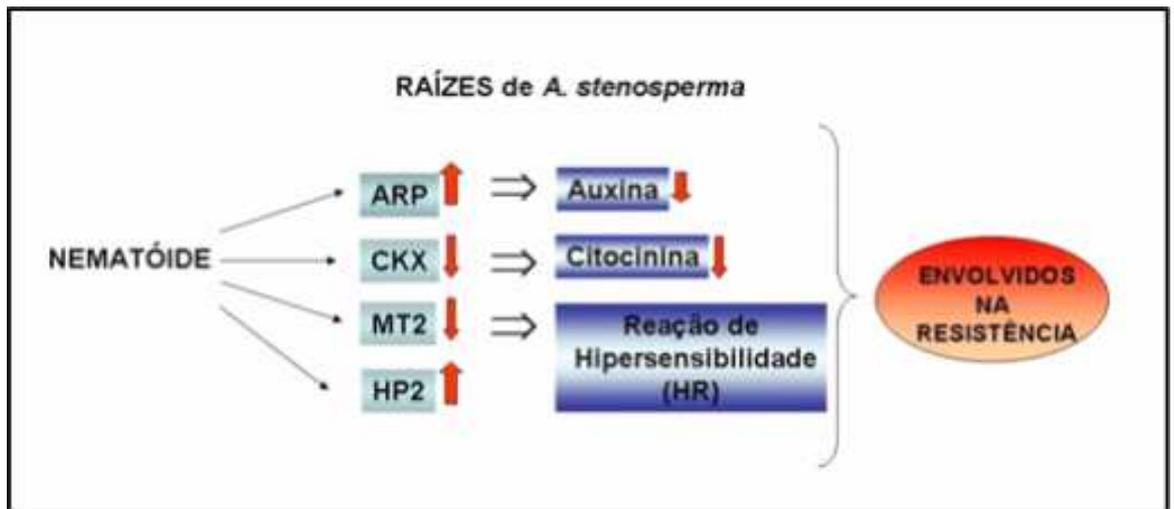


Figura - 13 Esquemas das possíveis funções dos genes *Asarp*, *Asckx*, *Asmt2* e *Ashp2* nas raízes de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* em relação ao processo de infecção com nematóide.

Capítulo 4

Bibliotecas BAC dos genomas ancestrais diplóides do amendoim cultivado alotetraplóide

Este capítulo contém a tradução do manuscrito em preparação referente aos resultados da construção das bibliotecas BAC (Anexo V).

Bibliotecas BAC dos genomas ancestrais diplóides do amendoim cultivado alotetraplóide

P. M. Guimarães^{1*}, K. Proite^{1,2}, O. Garsmeur³, A. D'Hont³, S. C. M. Leal-Bertioli¹, e D. J. Bertioli⁴

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF, Brasil; ²Departamento de Biologia Celular IB-Universidade de Brasília – (UnB), Campus Universitário, CEP 70.910-900, Brasília, DF, Brasil; ³CIRAD Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Developpement (CIRAD), UMR 1096, Avenue Agropólis, TA 40/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France. ⁴Universidade Católica de Brasília, Campus II, SGAN 916, CEP 70.790-160, Brasília, DF, Brasil;

*E-mail: messenbe@cenargen.embrapa.br

Tel.: +55 61 3448 4787

Fax: +55 61 3340 3624

1. RESUMO

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* é um alotetraplóide de origem recente, com genoma do tipo AABB. Como em vários outros poliplóides parece ter sido imposto a um gargalo genético na origem da espécie, através da hibridização de duas espécies silvestres diplóides, seguido da duplicação espontânea dos cromossomos. Portanto, o estudo do genoma do amendoim é dificultado tanto pela baixa diversidade genética da cultura quanto pela sua poliploidia. Ao contrário do amendoim cultivado, a maioria das espécies silvestres de *Arachis* é diplóide com alta diversidade genética. O estudo de genomas diplóides de *Arachis* é por isso, atrativo, pois simplifica a construção de mapas genético e físico, e o isolamento de alelos silvestres. Os dois prováveis genomas silvestres parentais do amendoim cultivado são *A. duranensis* Krapov. e WC Gregory, e *A. ipaënsis* Krapov. e WC Gregory, com genomas do tipo AA e BB respectivamente. Portanto, foram construídas e caracterizadas duas bibliotecas de grandes insertos clonados em vetores do tipo BAC - *Bacterial Artificial*

Chromosome, uma para cada espécie. As bibliotecas possuem conteúdo equivalente a 7,4 e 5,3 genomas respectivamente. Possuem baixa contaminação com DNA de organelas e um tamanho médio de inserto de 106 kb. As duas bibliotecas foram, ainda, usadas para o isolamento de clones contendo genes de cópia única já mapeados geneticamente e genes análogos de resistência.

2. INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) é a segunda cultura mais importante dentre as leguminosas em todo mundo ficando atrás somente da soja. Teve uma produção de 33 milhões de toneladas em 2003/04 (USDA-FAS 2006). O amendoim é produzido em todas as regiões tropicais e subtropicais, mas é particularmente importante na África, Ásia e nos Estados Unidos (FAOSTAT, 2003). É uma espécie alotetraplóide (AABB) com uma estreita base genética (Halward *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1996). Esta baixa diversidade genética resultou na ausência de variabilidade para algumas características importantes, limitada disponibilidade de combinações alélicas e conseqüentemente restrições na produtividade. Ademais, níveis muito baixos de polimorfismo no amendoim cultivado têm dificultado a caracterização genética e genômica. Já as espécies silvestres diplóides, ao contrário do amendoim cultivado possuem alta diversidade genética e têm sido selecionadas durante a evolução em diferentes ambientes e estresses bióticos, constituindo uma rica fonte de diversidade alélica (Nelson *et al.*, 1990).

O amendoim cultivado foi pouco estudado por causa das dificuldades de se trabalhar com o seu genoma. Apenas alguns poucos mapas de ligação foram publicados. Todos utilizaram espécies silvestres para que se pudesse permitir a geração suficiente de marcadores polimórficos. Mapas construídos com marcadores do tipo RFLP foram desenvolvidos por Halward *et al.*, (1993), baseados no cruzamento de duas espécies silvestres com genoma AA, *A. stenosperma* e *A. cardenasii*, e um mapa tetraplóide baseado no cruzamento entre TxAG-6 (um anfidiplóide sintético) e *A. hypogaea* (Burow *et al.* 2001). Recentemente, o nosso grupo desenvolveu um mapa do genoma AA de *Arachis*

com marcadores microssatélites baseado no cruzamento entre as espécies diplóides silvestres *A. stenosperma* e *A. duranensis* (Moretzsohn *et al.*, 2005) e um mapa do genoma BB, baseado no cruzamento entre as espécies *A. ipaënsis* e *A. magna* (Oliveira *et al.*, 2007 e dados não publicados). Para o amendoim há ainda relativamente, poucos dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis em bancos de dados. Existe apenas 13.525 ESTs para *A. hypogaea* no GenBank (Luo *et al.*, 2005a, b e c), e recentemente foram adicionados 6264 para o genoma AA da espécie silvestre *A. stenosperma*. (Cap. 2; Martins *et al.*, 2006; Proite *et al.*, 2007).

Complementando os mapas genéticos e os ESTs, as bibliotecas baseadas nos vetores do tipo cromossomo artificial de bactéria (*Bacterial Artificial Chromosome – BAC*) são ferramentas fundamentais para os estudos genômicos, sendo importantes para o mapeamento físico, na clonagem posicional, baseada em mapa e na análise da estrutura e função de genes. A fácil manipulação e propagação dos clones, sua alta estabilidade, e baixo grau de quimerismo comparado com os vetores do tipo cromossomo artificial de levedura (*Yeast artificial chromosome- YAC*), têm feito das bibliotecas BAC o sistema de clonagem escolhido (Dvorak *et al.*, 2004; Chalhoub *et al.*, 2004). Várias estratégias têm sido propostas para o mapeamento físico com clones contendo grandes insertos, como: métodos baseados em hibridização como a hibridização interativa usando clones individuais de cDNA ou clones genômicos como sondas (Mozo *et al.*, 1999), métodos baseados em perfil de restrição (Hong, 1997), métodos que integram sequenciamento da extremidade de clones BAC, perfil de restrição e sequenciamento de genoma (Mayer *et al.*, 1999); ou ainda recentemente foi desenvolvido um método baseado em oligonucleotídeos, os *overgos* (Gardiner *et al.*, 2004).

As bibliotecas BAC têm sido construídas para muitas culturas importantes e estão sendo desenvolvidas também para culturas economicamente menos importantes, como melão (Luo *et al.*, 2001), beterraba (Gaafar *et al.*, 2005), pepino (Nam *et al.*, 2005), girassol (Bouzidi *et al.*, 2006) e quinoa (Stevens *et al.*, 2006). Dentre as leguminosas, bibliotecas BAC estão disponíveis para *Phaseolus vulgaris* (Vanhouten e MacKensie, 1999), *Vigna radiata* (Liu *et al.*, 2004), *Glycine max* (Danesh *et al.*, 1998), *Trifolium pretense* (Sato *et al.*, 2005) e os legumes modelos *Lotus japonicus* (Kawasaki e Murakami, 2000) e *Medicago*

truncatula (Meksem *et al.*, 2000). Dentro do gênero *Arachis*, foi desenvolvida uma biblioteca BAC para o amendoim cultivado (Yüksel e Paterson, 2005). Como complemento para este recurso, descrevemos aqui a produção de bibliotecas BAC de espécies diplóides para os genomas silvestres AA e BB de *Arachis*. As duas espécies *A. duranensis* Krapov. e W.C. Gregory (genoma AA) e *A. ipaënsis* Krapov. e W.C. Gregory (genoma BB) foram identificadas como os prováveis ancestrais do amendoim (Kochert *et al.*, 1996. Seijo *et al.*, 2004), e por isso foram as espécies escolhidas para a construção das bibliotecas BACs. Estas bibliotecas permitirão, por exemplo, o isolamento de alelos silvestres que conferem grande resistência a doenças e pragas, e também facilitará a construção de um mapa físico. As bibliotecas BAC das espécies silvestres juntamente com a do amendoim cultivado permitirão excelentes comparações entre os genomas silvestres e cultivado e, ainda, poderá trazer uma maior compreensão da evolução dos genomas poliplóides.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plantas Utilizadas

As sementes foram obtidas da coleção do banco de germoplasma de *Arachis* mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN (Brasília-DF, Brasil). Plantas de *A. duranensis* V14167 (genoma AA) e *A. ipaënsis* KG30076 (genoma BB) foram crescidas e mantidas em condições controladas de casa de vegetação. Para a extração do DNA de alto peso molecular, folhas novas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a 80 °C negativos.

3.2. Isolamento do DNA de alto peso molecular

Os núcleos foram isolados a partir de folhas de acordo com Zhang *et al.*, (1995) com algumas modificações: 50 g de folhas novas foram maceradas em nitrogênio líquido e os núcleos liberados foram incubados em tampão 1X HB (10 µM de Tris-base, 10 µM de EDTA, 1 µM de Espermidina, 1 µM de Espermina, 800 µM de KCl e 500 µM de Sacarose) a 4°C adicionado de 0,2% de PVP 40. Polivinilpirrolidona foi acrescentada ao tampão de extração para reduzir a produção de polifenóis oxidados durante a homogeneização das folhas. Foi também acrescentado 1,5 mL/L de β-mercaptoetanol. Para eliminar o restante celular, este extrato foliar foi filtrado através de quatro camadas de fralda e duas camadas de Miracloth (250 µm), (Calbiochem, UK). Uma centrifugação a 850 g por 8 min. a 4 °C foi seguida por um gradiente de Percoll (37,5%) para separar os núcleos da matriz de pectina (Peterson *et al.*, 2000). Os núcleos foram ressuspensos no tampão de extração 1X HB sem β-mercaptoetanol e sem Triton 100X; centrifugado como anteriormente e o sedimentado foi ressuspensos num volume final de 1 mL de 1X HB previamente filtrado em filtro de 0,2 µm. A suspensão de núcleos foi embebida numa matriz gelatinosa de 1,2 % de agarose de baixo ponto de derretimento. (InCert Agarose, Cambrex-Bioscience, Rockland, Inc.). Uma alíquota da extração de núcleos foi avaliada em microscópio utilizando-se coloração DAPI para observar a integridade e pureza da preparação em relação à contaminação por organelas. Os *plugs* de agarose

contendo o DNA de alto peso molecular foram incubados por 16 h a 50 °C num tampão de lise (5% Sódio Lauril Sarcosil, 0.625 M EDTA pH 9,1, 50 mg Proteinase K), lavados por 1 h a 4 °C na solução de inativação (0,5M EDTA, pH 8,0, 0.1 µM PMSF), quatro vezes por 30 min. em TE 10/10 (10 mL/L Tris-HCl pH 8,0, 20 mL/L EDTA pH 8,0), quatro vezes por 30 min em TE 10/1 (10 mL/L Tris-HCl pH 8,0, 2 mL/L EDTA pH 8,0), e mantidos em TE 10/10 a 4 °C. Uma etapa extra de purificação do DNA de alto peso molecular foi conduzida entre as duas etapas de lavagem, a qual consistiu numa eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) em 1 % GTG SEAKEM agarose em tampão 0,5 X TBE. A eletroforese foi efetuada com o aparelho CHEF Mapper™ XA apparatus (Bio-Rad, U.K.) no seguinte programa: 6 V/cm, com 3 s de tempo de mudança e um ângulo de 120° por 40 min a 14 °C, com o objetivo de eliminar impurezas e fragmentos de tamanho pequeno.

3.3. Construção das Bibliotecas BAC

Os *plugs* de agarose contendo o DNA de alto peso molecular foram cortados em pequenos pedaços e incubados por três vezes em tampão da enzima de restrição 1X *Hind*III (Invitrogen, USA), no gelo com agitação. Este tampão foi trocado a cada 30 min. Sete unidades da enzima de restrição *Hind*III foi adicionada a cada *plug* cortado e incubado por quarto horas no gelo para permitir difusão da enzima para dentro dos *plugs*. Para as digestões parciais, as reações foram incubadas por 15 min. a 37 °C e depois para finalizar a reação foi adicionado 1/10 do volume total de 0,5 M EDTA, pH 8,0 e incubado em gelo por 10 min. O DNA de alto peso molecular parcialmente digerido foi separado e selecionado por tamanho em géis de 1 % GTG SEAKEM agarose em duas etapas a 14 °C num tampão 0,5X TBE: primeira seleção através do PFGE a 6 V/cm, com tempo de mudança de 1 s a 50 s, ângulo de 120° por 20 h; segunda seleção através de duas regiões selecionadas – *TOP* (fragmentos de 150 a 250 kb) e *BOTTOM* (80-150 kb) do gel da primeira seleção e estes fragmentos retirados do primeiro gel foram corridos num PFGE com seguinte programa, 6 V/cm, com tempo de mudança de 3 s e um ângulo de 120° por 20 h a 14 °C. Os fragmentos *TOP* e *BOTTOM* correspondendo a fragmentos, em média, de 100 kb foram então cortados do segundo gel e o DNA recuperado através de um

eletro-eluidor (BIO-RAD/electro-eluter, UK). A concentração do DNA foi estimada em gel 1% agarose em 1X TAE e algumas reações de ligação contendo diferentes razões de vetor/inserto foram testadas. (Vetor/Inserto). Todas as ligações tiveram volume final de 70 μ L e foram utilizados 30 ng de vetor comercial “pIndigo BAC-5 *Hind*III-Cloning Ready” (Epicentre, USA). Nos diferentes testes se variou a quantidade de inserto, que foi de 100 a 900 ng de DNA de alto peso molecular. Foram utilizadas para transformação, pelo processo de eletroporação, células competentes de *Escherichia.coli* (ElectroMAX DH10B) (Invitrogen, USA), os transformantes foram selecionados em placas de 2YT-X-gal-IPTG contendo 12.5 μ g/mL cloranfenicol. Colônias brancas positivas foram repicadas utilizando-se o robô Q-bot 2XY (Genetix) e transferidas para placas de 384 poços contendo 80 μ L de meio de cultura 2YT-cloranfenicol e 7% glicerol. As placas foram incubadas por 18-20 h a 37 °C e mantidas a -80 °C.

3.4. Screening das Bibliotecas BACs e Isolamento de DNA

Para se estimar o tamanho dos insertos nos clones BAC, clones individuais foram randomicamente selecionados, crescidos num pré-inóculo com 100 μ L de meio líquido 2YT contendo cloranfenicol (12,5 μ g/mL), incubado por 20-22 h a 37 °C. Três mililitros do mesmo meio foram inoculados com 3 μ L do pré-inóculo e incubado por 20h a 37 °C e 350 rpm. O DNA dos clones BAC foram isolados utilizando-se o robô QIAGEN BIO-ROBOT 9600 (Qiagen GmbH, Germany). O DNA extraído foi digerido com 10 U da enzima *Not*I para liberação dos insertos. Os clones digeridos foram separados em 1 % GTG SEAKEM agarose pelo PFGE a 14 °C, no tampão 0,5X TBE seguindo o programa, 6 V/cm, mudança de tempo de 5 s para 15 s, com ângulo de 120° por 15 h. Filtros de alta densidade foram montados utilizando-se o robô Q-bot 2XY (Genetix). Cada filtro de alta densidade continha 18432 clones com uma réplica de cada clone. As hibridizações foram conduzidas seguindo protocolo BAC de Clemson (<http://www.genome.clemson.edu/protocols>). Os filtros foram expostos por 1 dia em filme Fuji Medical X-Film (Super RX-100 NIF).

3.5. Sondas Genômicas

Para se estimar a contaminação com organelas, as duas bibliotecas foram hibridizadas com sondas do gene de cloroplasto de espinhacre, *Rubisco* (1,3 kb) e com o gene mitochondrial de trigo, citocromo oxidase, *cox I* (1,3 kb), (Vilarinhos *et al.*, 2003). As bibliotecas BAC foram também hibridizadas com sondas de genes de cópia única que foram definidas como marcadores-âncora em leguminosas. (Fredslund *et al* 2006) e com o gene análogo de resistência (*RGA*) de *Arachis* S1_A_36 (Genbank accession AY157808, Bertoli *et al* 2003). Este *RGA* foi isolado a partir do genoma AA de *A. stenosperma* e está co-localizado com um QTL para resistência ao fungo foliar *Cercosporidium personatum* (Moretzsohn, 2006 e dados não publicados).

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento do DNA de Alto Peso Molecular

Para reduzir os altos níveis de carboidratos e polifenóis presentes nas folhas, tanto de *A. duranensis*, quanto de *A. ipaënsis*, foi realizada uma modificação no protocolo de isolamento de núcleos onde se incluiu a combinação do tampão contendo PVP-40, filtração em Miracloth e centrifugação através do gradiente de Percoll. Foi também incluída uma etapa extra de purificação, onde os *plugs* de agarose foram submetidos a uma eletroforese de campo pulsado por 40 min. antes das digestões. Esta eletroforese promoveu a eliminação de fragmentos menores e de impurezas que não foram retiradas durante a extração, permitindo assim, uma maior eficiência de clonagem. A análise dos extratos de núcleos permitiu uma correta avaliação da quantidade e da qualidade da preparação de núcleos.

4.2. Bibliotecas BAC

A dupla seleção por tamanho usada produziu insertos de tamanho satisfatório que variaram de 100 a 120 kb para as duas bibliotecas, enquanto a razão 1:4 (vetor:inserto) nas ligações resultou num número maior de transformantes. A biblioteca BAC para o genoma AA (*A. duranensis*) contém

84096 clones advindos de cinco ligações diferentes, já a biblioteca do genoma BB (*A. ipaënsis*) contém 75648 clones originados também a partir de cinco ligações (Tabela 1). Uma análise foi feita com uma amostragem aleatória de cada biblioteca através da digestão dos clones com a enzima de restrição *NotI* e o tamanho médio dos insertos foi 112 e 100 kb para *A. duranensis* e *A. ipaënsis* respectivamente (Fig.1a e 1b).

A contaminação das bibliotecas BAC com organelas foi avaliada através do *screening* dos filtros de alta densidade com sondas específicas para mitocôndria e cloroplasto. Para *A. duranensis*, a contaminação dos clones BAC com cloroplasto foi de 0,363 % e de 0,016 % com mitocôndria. Em *A. ipaënsis* ocorreu uma contaminação de 0,081 % com cloroplasto e de 0,21% com DNA mitocondrial. Estes valores juntamente com as observações da coloração DAPI da preparação de núcleos refletiram um nível alto de pureza obtido com as modificações do protocolo de extração de núcleos de *Arachis*.

Baseado no tamanho médio dos insertos na biblioteca e no genoma haplóide de *A. duranensis* equivalente a 1260 Mb (Temsch e Greillhuber, 2001), a cobertura estimada para a biblioteca do genoma AA é de 7,4 genomas haplóides. Porém para *A. ipaënsis*, a determinação do conteúdo de DNA é controversa. É possível que o equivalente ao genoma haplóide de 2830 Mb descrito por Singh *et al*, (1996) esteja duas vezes super-estimado por causa de inconsistências de mensuração, como já foi descrito para outras espécies de *Arachis* (Temsch e Greillhuber, 2000; Temsch e Greillhuber, 2001). Considerando este aspecto, a biblioteca BAC do genoma BB de *A. ipaënsis* representa equivalentes a genomas haplóides que vão de 2,7 a 5,3 para esta espécie. Para se confirmar experimentalmente a estimativa teórica da cobertura do genoma nuclear de ambas espécies, os filtros de alta densidade foram hibridizados com sondas que correspondiam a marcadores-âncora. Estes são genes de cópia única em leguminosas que já foram localizados no mapa genético do genoma AA de *Arachis* (dados não publicados). Uma média de 5,6 clones por sonda foi identificada para o genoma AA e 4,5 clones para o genoma BB (Tabela 2). A hibridização das duas bibliotecas com o RGA de *Arachis*, S1_A_36, permitiu a identificação deste clone no genoma AA, mas de nenhum no genoma BB (Fig. 2).

5. DISCUSSÃO

O amendoim cultivado é um alotetraplóide com componentes genômicos AA e BB. Apesar de haver uma concordância de que estes genomas sejam derivados de ancestrais diplóides, as exatas espécies envolvidas têm sido objeto de estudo. Esta questão ainda não está completamente esclarecida, mas a análise de dados de marcadores moleculares, citogenética, morfologia e distribuição geográfica suportam que *A. duranensis* e *A. ipaënsis* sejam os ancestrais diretos do amendoim cultivado (Kochert *et al.* 1996, Seijo *et al.*, 2004).

O estudo das espécies diplóides parentes é portanto atrativo de várias maneiras: evita as complexidades do genoma tetraplóide, proporciona um caminho para o isolamento de alelos silvestres que conferem, por exemplo, resistência a doenças e poderá facilitar o estudo de elementos repetitivos distintos, bem como a evolução dos genomas AA e BB. Neste trabalho, duas bibliotecas BAC foram construídas representando os dois mais prováveis ancestrais do amendoim cultivado, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Acrescentando ao fato de serem os ancestrais, estas espécies possuem resistências a doenças fúngicas (Subrahmanyam *et al.*, 1983). O representante do genoma AA, *A. duranensis*, é a mesma espécie parental da população que foi utilizada para a construção de um mapa genético baseado em marcadores microssatélites. (Moretzsohn *et al.*, 2005) e, *A. ipaënsis* é o parental da população utilizada para mapear o genoma BB (Oliveira *et al.*, 2007). Este estudo irá facilitar o desenvolvimento de um mapa físico baseado em marcadores e da integração dos mapas genético e físico.

Algumas etapas foram adicionadas ao protocolo padrão de extração de núcleos a fim de se obter um DNA de alto peso molecular sem contaminação de polifenóis e carboidratos, os quais são abundantes em folhas de *Arachis*. Entre elas, as mais relevantes foram: a adição de PVP-40 ao tampão de extração de núcleos, a centrifugação do extrato foliar através do gradiente de Percoll (37.5%), a remoção das impurezas e dos fragmentos de pequeno tamanho dos *plugs* de agarose através do PFGE e a extensão do tempo de incubação dos *plugs* com o tampão da enzima anteriormente a digestão. O *screening* com sondas específicas para cloroplasto e mitocôndrias mostraram que a contaminação com DNA organelar foi baixa comparada com outras bibliotecas

BAC construídas também a partir de folhas (Ming *et al.*, 2001; Akhunov *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2005).

A cobertura da biblioteca do genoma AA foi teoricamente equivalente a 7,4 genomas haplóides. A fim de testar ainda mais esta cobertura foram utilizados marcadores-âncora, que consistem em seqüências gênicas que definem um locus único nos mapas de ligação de várias espécies dentre as leguminosas (Fredslund *et al.*, 2006). As sondas utilizadas foram amplificadas por PCR a partir do DNA de *Arachis* e foram mapeadas em diferentes grupos de ligação no mapa genético do genoma AA (dado não publicado). O número de clones identificados por quatro marcadores-âncoras usados na biblioteca AA foi 5,6; que de alguma forma é menor que o esperado pelo cálculo teórico da cobertura do genoma. De acordo com Zhang e Wu (2001) em alguns casos a cobertura real das bibliotecas BAC de grandes insertos é menor que a calculada, isto é devido particularmente à densidade alta ou baixa dos sítios de restrição da enzima utilizada em certas regiões do genoma ou ainda, devido a dificuldades na clonagem de inserto muito grandes ou muito pequenos. Por outro lado, é amplamente aceito que 99 % de cobertura já é alcançada com 4,7 vezes, o genoma haplóide (Zhang *et al.*, 1995). Portanto, o genoma de *A. duranensis* está bem representado e a sua biblioteca será bastante apropriada para diversas aplicações. A cobertura do genoma BB é mais difícil de se estimar. De acordo com Singh *et al.* (1996), os valores médios 2C de DNA (tamanho do genoma) para *A. ipaënsis* é de 5,6 pg (densitometria de Feulgen) onde C representa a constância da quantidade de DNA de um genoma haplóide não replicado (Swift, 1950). O mesmo estudo indicou que os valores 2C para *A. duranensis*, *A. hypogaea* e *A. monticola* variaram de 1,7 até 2,0 vezes maior que os dados obtidos por citometria de fluxo (Temsch e Greillhuber, 2001). Como o novo dado para *A. ipaënsis* através de citometria de fluxo não está disponível, foi considerado o valor C para as espécies entre 2,8 a 5,3 pg, e por isso, a biblioteca BAC teve cobertura a equivalentes de 2,8 a 5,3 do genoma haplóide. O número de clones na biblioteca BAC do genoma BB que foram identificados com marcadores-âncora foi de 4,5 clones, e este resultado parece suporta que houve uma cobertura maior que a estimada. Como os marcadores-âncora são cópia única, os BACs identificados permitirão comparações com regiões

ortólogas dos diferentes genomas AA e BB de *Arachis* e de outros genomas como os das leguminosas e *Lotus* e *Medicago*.

A biblioteca de *A. duranensis* hibridizou com o RGA, S1_A_36, um RGA que co-segrega com um QTL para resistência a *C. personatum* (Moretzsohn, 2006 e dados não publicados). Esta simples comparação pôde indicar a presença de alelos genoma-específicos, contudo mais experimentação se faz necessária para confirmar esta inferência. O sequenciamento dos clones BAC contendo o RGA pode possibilitar a identificação de microssatélites ligados ao RGA de interesse, e promover assim mais marcadores para trilhar o QTL nas populações segregantes.

Em resumo, descrevemos aqui a produção de bibliotecas BAC para os genomas AA e BB de *Arachis*. Estas bibliotecas serão uma excelente fonte para o isolamento de genes, construção e correlação dos mapas físico e genético, isolamento de sondas para análise de citogenética, o estudo da evolução dos dois tipos de genoma e pela comparação com o genoma tetraplóide, para o estudo da evolução de genomas poliplóides.

Tabela 1: Características das bibliotecas BAC de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* derivadas de colônias aleatoriamente escolhidas.

Espécie	Número de Ligações	Tamanho do Genoma (Mb)	Número de Clones	Tamanho médio de inserto(kb)	DNA Mitocondrial(%)	DNA de Cloroplasto(%)	Cobertura Estimada do Genoma
<i>A. duranensis</i>	5	1260 ^a	84096	112	0,21	0,016	7.4x
<i>A. ipaënsis</i>	5	1415-2830 ^b	75648	100	0,081	0,363	5.3-2.8 ^b x

^a Tensch e Greilhuber, 2001

^b Singh *et al*, 1996

Tabela 2: Clones utilizados para hibridização de DNA com os filtros de alta densidade das bibliotecas BAC e número de clones positivos.

Sondas	Número de clones que hibridizaram com as bibliotecas BAC	
	<i>A. duranensis</i>	<i>A. ipaënsis</i>
RGA S1_A_36	1	0
Leg083	2	5
Leg128	4	4
Leg092, Leg149, Leg178 (combinação)	19	Não testado

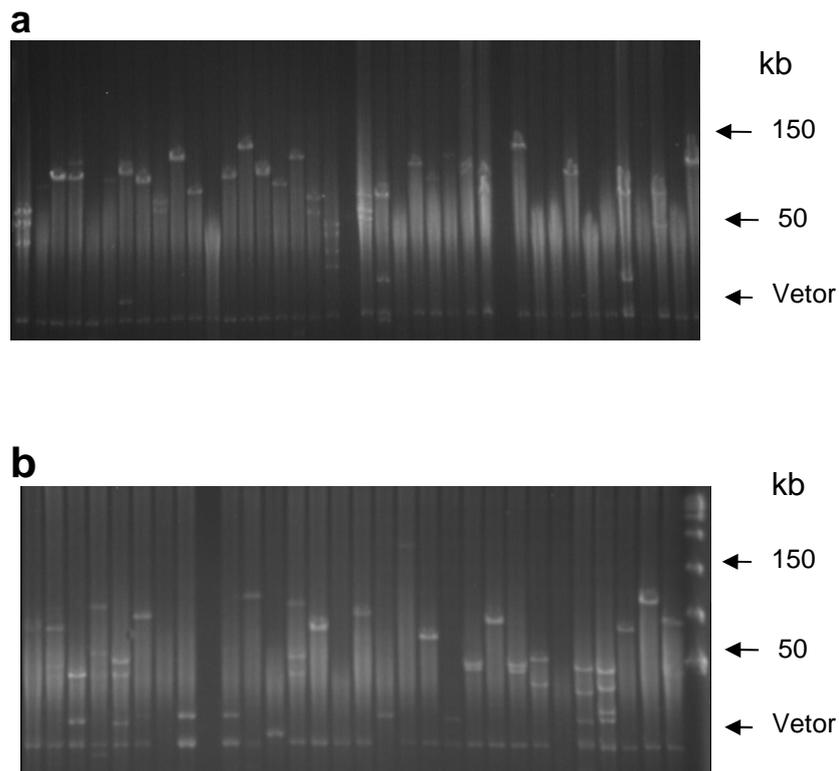


Figura 1 - Gel de eletroforese de campo pulsado de clones selecionados randomicamente das bibliotecas BAC de *A. duranensis* (a) e *A. ipaënsis* (b). Os insertos foram liberados do vetor plndigo BAC-5 *Hind*III após digestão com a enzima *Not* I. O marcador utilizado foi o Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs) e os tamanhos são dados em kb.

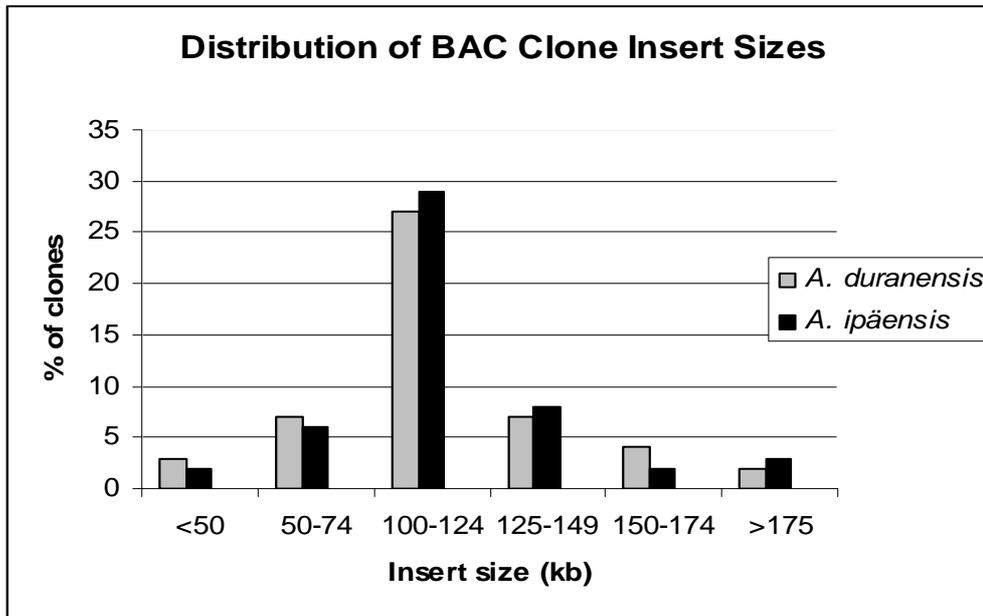


Figura.2 – Distribuição do tamanho de insertos a partir dos clones BAC seleccionados randomicamente das bibliotecas BAC de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Os insertos foram liberados após digestão com *NotI*.

PERSPECTIVAS

O presente estudo permitiu a identificação de (i) uma espécie silvestre de *Arachis* resistente ao nematóide das galhas, (ii) seu mecanismo de resistência, bem como, (iii) a identificação de genes envolvidos na resistência. Desenvolveu, ainda, bibliotecas BAC que são importantes ferramentas genômicas.

Temos como perspectivas deste trabalho:

- A fenotipagem para identificação da resistência ao nematóide nas populações de *Arachis* silvestres (F3);
- A utilização dos ESTs para o estudo da expressão de genes em outros tratamentos através de experimentos de macro-arranjos;
- O isolamento de genes: RGAs, ESTs, retro-elementos através dos clones BAC;
- Estudar os genes diferencialmente expressos através de outras abordagens:
 - Real time-PCR, macro-arranjos com outros tratamentos;
 - Verificar se estes genes expressam suas proteínas;
 - Testar se realmente estão envolvidos na resistência onde pode-se utilizar experimentos como: RNA interferente, transformação de plantas susceptíveis, (se o gene estiver isolado);
- Seqüenciamento das extremidades dos clones BAC permitirá:
 - Desenvolvimento de marcadores para saturação do mapa genético;
 - Comparações entre os genomas AA e BB de *Arachis* (Marcadores-âncora)
- O sequenciamento completo de clones BAC que permitirá identificação de micro-estruturas conservadas entre *Arachis* e outras leguminosas.
- Produção de um mapa Físico – BAC-FISH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarts, M. G.; Lintel, T. E.; Hekkert, B.; Holub, E. B.; Beynon, J. L.; Stiekema, W. J. e Pereira, A.** (1998) Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 251-8.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J.; Weston, L. A. e Bessis, R.** (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mould. *Journal of Chemical Ecology* **23**:1689-1702.
- Akashi, K.; Nishimura, N.; Ishida, Y. e Yokota, A.** (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical Biophysical Research Communications* **323**, 72-78.
- Akhunov, E. D.; Akhunova, A. R. e Dvorak, J.** (2005) BAC libraries of *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* and *A. tauschii*, the diploid ancestors of polyploidy wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **111**:1617-1622.
- Alkharouf, N. W.; Khan, R. e Matthews, B.** (2004) Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. *Genome* **47(2)**:380-8.
- Alkharouf, N. W.; Klink, V. P.; Chouikha, I. B.; Beard, H. S.; MacDonald, M. H.; Meyer, S.; Knap, H.T.; Khan, R. e Matthews, B. F.** (2006) Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta* **224**: 838–852.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. e Lipman, D. J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410. *Annual Review of Plant Biology* **54**:605–27.
- Ammiraju, J., Veremis, J.; Huang, X.; Roberts, P. e Kaloshian, I.** (2003) The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* **106**:478–484.
- Ammiraju, J. S.; Luo, M.; Goicoechea, J.L.; Wang, W.; Kudrna, D.; Mueller, C.; Talag, J.; Kim, H.; Sisneros, N. B.; Blackmon, B.; Fang, E.; Tomkins, J.B.; Brar, D.; MacKill, D.; McCouch, S.; Kurata, N.; Lambert, G.; Galbraith, D.W.; Arumuganathan, K.; Rao, K.; Walling, J. G.; Gill, N.; Yu, Y.; SanMiguel, P.; Soderlund, C.; Jackson, S. e Wing, R. A.** (2006) The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*. *Genome Research* **16(1)**:140-147.

- Anderson C.** (1993) Genome shortcut leads to problems. *Science* **259**:1684–1687.
- Anthony, F.; Topart, P.; Martinez, A.; Silva, M. e Nicole, M.** (2005) Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* **54**, 476-482.
- Anwar, S. A. e McKenry, M. V.** (2002) Developmental response of a resistance-breaking population of *Meloidogyne arenaria* on *Vitis* spp. *Journal of Nematology* **34**:28-33.
- Anward, S. A.; Trudgill, D. L. e Philipps, M. S.** (1994) The contribution of variation in invasion and development rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. *Nematologica* **40**, 579-586.
- Apel, K. e Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399.
- Armstrong, D. J. e Firtel, R. A.** (1989) Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology* **136**:491–499.
- Arora, M. K. e Strange, R. N.** (1991) Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science* **78**:157-163.
- Ashikari, M.; Sakakibara, H.; Lin, S.; Yamamoto, T.; Takashi, T.; Nishimura, A.; Angeles, E. R.; Qian, Q.; Kitano, H. e Matsuoka, M.** (2005) Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. *Science* **309**:741-745.
- Audic, S. e Claverie, J.M.** (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research* **7**:986–995.
- Aval'baev, A. M.; Yuldashev, R. A.; Vysotskaya, L. B. e Shakirova, F. M.** (2006) Regulation of Gene Expression and Activity of Cytokinin Oxidase in the Roots of Wheat Seedlings by 24-Epibrassinolide. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **410**: 317–319.
- Banks, D. J.** (1969) Breeding for northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*, resistance in peanuts. *Journal of American Peanut Educational and Research Society* **13**, 78-80.
- Bailey, J.** (2002) Peanut Disease Management. North Carolina Peanut Production Guide. Chapter 6. 19pp.
- Bakker, E.; Achenbach, U.; Bakker, J.; Vliet, J.; Peleman, J.; Segers, B.; Heijden, S.; Linde, P.; Graveland, R.; Hutten, R.; Eck, H.; Coppoolse, E.; Vossen, E.; Bakker, J. e Goverse, A.** (2004) A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**:146–152.

- Barker, K.R.** (2003) Perspectives on Plant and Soil Nematology. Annual Review of Phytopathology **41**:1-25.
- Barreto, M.** Doenças do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Camargo, L.E.A, Eds. Manual de Fitopatologia–Doenças das Plantas Cultivadas. 4^a. ed., S.Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda., 2005, v.2, cap.10, p. 65-72.
- Bell, C. J.; Dixon, R. A.; Farmer, A. D.; Flores, R.; Inman, J.; Gonzales, R. A.; Harrison, J. J.; Paiva, N. L.; Scott, A. D.; Weller, J. W. e May, D.** (2001) The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. Nucleic Acids Research **29(1)**:114-117.
- Belkhadir, Y.; Subramaniam, R. e Dangl, J. L.** (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Current Opinion in Plant Biology **7**:391-399.
- Bennett, M. D. e Smith, J. B.** (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **274**: 227-274.
- Bent, A. F.; Kunkel, B. N.; Dahlbeck, D.; Brown, K. L.; Schmidt, R.; Giraudat, J.; Leung, J. e Staskawicz, B. J.** (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science **65**:1856–1860.
- Bertioli, D. J.; Leal-Bertioli, S. C. M.; Carneiro, R. G.; Valls, J. F. M.; Fávero, A. P.; Bruzzi, M.; Vello, N. A.; Moraes, S. e Guimarães, P. M.** The Brazilian *Arachis* germplasm bank: its diversity, disease resistances and resistance gene analogues. Molecular Genetics of Model Legumes. John Innes Centre, Norwich, p. 24-28 June 2000.
- Bertioli, D. J.; Leal-Bertioli, S. C.; Lion, M. B.; Santos, V. L.; Pappas, G. Jr.; Cannon, S. B. e Guimarães, P. M.** (2003) A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. Molecular Genetics and Genomics. **270(1)**:34-45.
- Bilyeu, K. D.; Cole, J. L.; Laskey, J. G.; Riekhof, W. R.; Esparza, T. J.; Kramer, M. D. e Morris, R. O.** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. Plant Physiology **125(1)**:378-86.
- Binz, P. A. e Kagi, J. H. R.** Metallothionein: molecular evolution and classification. (In) Metallothionein IV, Klaassen C. (Ed.), pp7-13, Birkhauser Verlag, Basel, (1999).

- Bird, A. F. e Loveys, B. R.** (1980) The involvement of cytokinins in a host-parasite relationship between the tomato (*Lycopersicon esculentum*) and a nematode (*Meloidogyne javanica*). *Parasitology* **80**:497-505.
- Bird, D. M. e Koltai, H.** (1999) Plant Parasitic Nematodes: Habitats, Hormones, and Horizontally-Acquired Genes. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**:183-194.
- Bird, D. M. e Kaloshian, I.** (2003) Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 115-123.
- Bird, D. M.** (2004) Signalling between nematodes and plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7(4)**:372-376.
- Blaxter, M. L.; De Ley, P.; Garey, J. R.; Liu, L. R.; Scheldeman, P.; Vierstraete, A.; Vanfleteren, J. R.; Mackey, L. Y.; Dorris, M.; Frisse, L. M. e Thomas, W. K.** (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**:71-75.
- Bleve-Zacheo, T.; Bongiovanni, M.; Melillo, M.T. e Castagnone-Sereno, P.** (1998) The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science* **133**:79-90.
- Boerma, H. R.; John, J. S. e Molen, J. Y.** (2001). U.S. Legume Crops Genomics Workshop. http://129.186.26.94/LegumeInitiative/LegGenomics_Paper10Oct01.html
- Boucher, G. e Lamshead, P. J. D.** (1994) Ecological biodiversity of marine nematodes in samples from temperate, tropical, and deep-sea region. *Conservation Biology* **9**:1594-1604.
- Bouck, J.; Miller, W.; Gorrell, J. H.; Muzny, D e Gibbs, R. A.** (1998) Analysis of the quality and utility of random shotgun sequencing at low redundancies. *Genome Research* **8**:1074-1084.
- Bouzidi, M. F.; Franchel, J.; Tao, Q.; Storno, K.; Mraz, A.; Nicolas, P. e Mouzeyar, S.** (2006) A sunflower BAC library suitable for PCR screening and physical mapping of targeted genomic regions. *Theoretical and Applied Genetics* **113**:81-89.
- Bras, M.; Queenan, B. e Susin, S. A.** (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry* **70**:231–239.
- Brenner, W. G.; Romanov ,G. A.; Kollmer, I.; Burkle, L. e Schmölling, T.** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal* **44(2)**:314-33.

- Brinkler, M.; Van Zyl, L.; Liu, W.; Craig, D.; Sederoff, R. R.; Clapham, D. H. e von Arnold S.** (2004) Microarray Analyses of Gene Expression during Adventitious Root Development in *Pinus contorta*. *Plant Physiology*, **135**:1–13.
- Brugière, M.; Jiao, S.; Hantke, S.; Zinselmeier, C.; Roessler, J.A.; Niu, X. M.; Jones, R. J.; Jeffrey E. e Habben, J. E.** (2003) Cytokinin Oxidase Gene Expression in Maize Is Localized to the Vasculature, and Is Induced by Cytokinins, Abscisic Acid, and Abiotic Stress. *Plant Physiology* **132**:1228–1240.
- Burger, G.; Gray, M. W. e B. Lang, F.** (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics* **12**:709-716.
- Burke, D. T.; Carle, G. F. e Olson, M. V.** (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors, *Science* **236**:806–811.
- Burke, D. T.** (1990) YAC cloning: options and problems. *GATA* **7**: 94-99.
- Burow, M. D.; Simpson, C. E.; Starr, J. L. e Paterson, A. H.** (2001) Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics* **159**:823–837
- Buschges, R.; Hollricher, K.; Panstruga, R.; Simons, G.; Wolter, M.; Adrie Frijters, A.; van Daelen, R.; van der Lee, T.; Diergaarde, P.; Groenendijk, J.; Töpsch, S.; Pieter Vos, P.; Salamini, F. e Schulze-Lefert, P.** (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**:695–705.
- Butow, R. A. e Narayan, G. A.** (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecules and Cell* **14**:1–15.
- Byrd, D.W.; Kirkpatrick, T. e Barker, K. R.** (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* **15**, 142-143.
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H. J.; Sandal, N. N.; Marcker, K. A.; Klein-Lankhorst, R. M.; Salentijn, E. M.; Lange, W.; Stiekema, W. J.; Wyss, U.; Grundler, F. M. e Jung, C.** (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* **275(5301)**:832-834.
- Cai, W.-W.; Reneker, J.; Chow, C.-W.; Vaishnav, M. e Bradley, A.** (1998) An anchored framework BAC map of mouse chromosome 11 assembled using multiplex oligonucleotide hybridization. *Genomics*, **54**, 387-397.
- Câmara, G. M. S.** (2000) Introdução à cultura do amendoim. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Série Extensão Agroindustrial **3**, 72pp.

- Campos-Toimil, M.; Elies, J. e Orallo, F.** (2005) Trans- and cis-resveratrol increases cytoplasmic calcium levels in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Molecular Nutrition and Food Research* **49**: 396–404.
- Carneiro, R. M. D. G. e Almeida, M. R. A.** (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* **25**, 35-44.
- Carneiro, R. M. D. G. Carneiro, R. G.; Neves, D. I. e Almeida, M. R. A.** (2003) Nova Raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no Estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* **27(2)**:219-221.
- Castagnone-Sereno, P.; Bongiovanni, M.; Djian-Caporalino, C.** (2001) New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes *Me1* and *Me3* in pepper. *Plant Breeding* **120**, 429-433.
- Casu, R. E.; Dimmock, C. M.; Chapman, S. C.; Grof, C. P.; McIntyre, C. L.; Bonnett, G. D. e Manners, J. M.** (2004) Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Molecular Biology* **54(4)**:503-17.
- Chalhoub, B.; Belcram, H. e Caboche, M.** (2004) Efficient cloning of plant genomes into bacterial artificial chromosome (BAC) libraries with large and more uniform insert size. *Plant Biotechnology Journal* **2**:181-188.
- Chase, C. D.** (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics* **23(2)**:81-90.
- Chatfield, J. M. e Armstrong, D. J.** (1986) Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissue of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Northern. *Plant Physiology* **80**: 493–499.
- Cheung, F.; Hass, B. J.; Goldberg, S. M. D.; May, G. D.; Xiao, Y. e Town, C. D.** (2006) Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology. *BMC Genomics* **7**:272.
- Chiang, H. C.; Lo, J. C. e Yeh, K. C.** (2006) Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environmental Science Technology* **40(21)**:6792-6798.
- Chinnery, P. F.** (2003) Searching for nuclear–mitochondrial genes. *Trends in Genetics* **19**:60–62.
- Chittoor, J. M.; Leach, J. E. e White, F. F.** (1997) Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **10(7)**:861-71.

- Cho, S. K.; Jung, K. W.; Jeung, J. U.; Kang, K. H.; Shim, K. S.; You, M. K.; Yoo, K. S.; Ok, S. H. e Shin, J. S.** (2005) Analysis of differentially expressed transcripts from planthopper-infested wild rice (*Oryza minuta*). *The Plant Cell Reports* **24(1)**:59-67.
- Cho, S. K.; Ok, S. H.; Jeung, J. U.; Shim, S.; Jung, K. W.; You, M. K.; Kang, K. H.; Chung, Y. S.; Choi, H. C.; Moon, H. P.e Shin, J. S.** (2004) Comparative analysis of 5211 leaf ESTs of wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports* **22(11)**: 839-847.
- Choi, D.; Kim, H. M.; Yun, H. K.; Park, J-A.; Kim, W. T. e Bok, S. H.** (1996) Molecular Cloning of a Metallothionein-Like Gene from *Nicotiana glutinosa* L. and Its Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology* **112**: 353-359.
- Choi, H-K.; Mun, J-H.; Kim, D-J.; Zhu, H; Baek, J-M.; Mudge, J.; Roe, B.; Ellis, N.; Doyle, J.; Kiss, G. B.; Young, N. D. e Cook, D. R.** (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101(43)**:15289-15294.
- Chung, M.; Park, M. R.; Chun, J. C. e Yun, S. J.** (2003) Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science* **164**:103-109.
- Chung, M.; Park, M. R.; Rehman, S. e Yun, S. J.** (2001) Tissue Specific and Inducible Expression of Resveratrol Synthase Gene in Peanut Plants. *Molecules and Cells* **12(3)**:353-359.
- Claverie, M; Dirlwanger, E.; Cosson, P.; Bosselut, N.; Lecouls, A.C.; Voisin, R.; Kleinhentz, M.; Lafargue, B.; Caboche, M.; Chalhoub, B. e Esmenjaud, D.** (2004) High-resolution mapping and chromosome landing at the root-knot nematode resistance locus *Ma* from *Myrobolan plum* using a large-insert BAC DNA library. *Theoretical and Applied Genetics* **109**:1318–1327.
- Cobbett, C. e Goldsbrough, P.** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**:159-82.
- Coenen, C. e Lomax, T. L.** (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* **2(9)**:351-356.
- Commun, K.; Mauro, M-C.; Chupeau, Y.; Boulay, M.; Burrus, M. e Jeandet, P.** (2003) Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**:317–323.
- CONAB.** Conjuntura Semanal. Especiais 16-20/09. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Companhia Nacional de Abastecimento – Conab*, 2004.

- CONAB.** Conjuntura Semanal. Especiais 24-28/06. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento – Conab*, 2006.
- Coram, T. E. e Pang, E. C.** (2006) Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. *Plant Biotechnology Journal* **4(6)**:647-666.
- Cordeiro, G. M.; Casu, R.; McIntyre, C. L.; Manners, J. M. e Henry, R. J.** (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant Science* **160(6)**:1115-1123.
- Cordeiro, G. M.; Elliott, F.; McIntyre, C. L.; Casu, R. E. e Henry, R. J.** (2006) Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* **113(2)**:331-343.
- Costa, M. J. N. e Campos, V. P.** (2001) Aspectos da sobrevivência de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* **25 (2)**:163-170.
- Coyle, P.; Philcox, J. C.; Carey, L. C. e Rofe, A. M.** (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59(4)**:627-47.
- Culbreath, A.K.; Beute, M.K.; Shewm, B. B.; Barker, K. R.** (1992) Effects of *Meloidogyne hapla* and *M. arenaria* on black rot severity in new *Cylindrocaldium*-resistant peanut genotypes. *Plant Diseases* **76**, 352-357.
- Danesh, D.; Peñuela, S.; Mudge, J.; Denny, R. L.; Nordstrom, H.; Martinez, J. P. e Young, N. D.** (1998) A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* **96**:196-202.
- Dangl, J. L.; Dietrich, R. A. e Richberg, M. H.** (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *The Plant Cell* **8**:1793–1807.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D. e Van Breusegem, F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**:779–795.
- Davies, P. J.** (2004) Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3a. Ed. .Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 16-35 pp.
- Davis, E. L.; Hussey, T. S.; Baum, T. J.; Bakker, J.; Schots, A.; Rosso, M. N. e Abad, P.** (2000) Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* **38**:365-396.
- De Almeida Engler, J.; De Vleeschauwer, V.; Burssens, S.; Celenza, J. L. Jr.; Inze, D.; Van Montagu, M.; Engler, G. e Gheysen, G.** (1999) Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *The Plant Cell* **11(5)**:793-808.

- De Castro, E.; Sigrist, C. J.; Gattiker, A.; Bulliard, V.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Gasteiger, E.; Bairoch, A. e Hulo, N.** (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* July 1; **34** (Web Server issue): W362–W365.
- De Majnik, J.; Ogonnaya, F. C.; Moullet, O. e Lagudah, E. S.** (2003) The *cre1* and *cre3* nematode resistance genes are located at homeologous loci in the wheat genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**:1129–1134.
- De Nardi, B. Dreos, R.; Del Terra, L.; Martellosi, C.; Asquini, E.; Tornincasa, P.; Gasperini, D.; Pacchioni, B.; Rathinavelu, R.; Pallavicini, A. e Graziosi, G.** (2006) Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. *Genome* **49(12)**:1594-1605.
- Delhaize, E., Ryan, P. R., Hebb, D. M., Yamamoto, Y., Sasaki, T. e Matsumoto, H.** (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:15249-15254.
- Devos, K. M.; Ma, J.; Pontaroli, A. C.; Pratt, L. H. e Bennetzen, J. L.** (2005) Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102(52)**:19243-19248.
- Ding, Y.; Johnson, M. D.; Colayco, R.; Chen, Y. L.; Melnyk, J.; Schmitt, H. e Shizuya, H.** (1999) Contig assembly of bacterial artificial chromosome clones through multiplexed fluorescence-labeled fingerprinting. *Genomics* **56**:237-246.
- Djian-Caporalino, C.; Pijarowski, L.; Fazari, A.; Samson, M.; Gaveau, L.; O'Byrne, C.; Lefebvre, V.; Caranta, C.; Palloix, A. e Abad, P.** (2001) High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* **103**:592–600.
- Doyle, E. A. e Lambert, K. N.** (2003) *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **16(2)**:123-131.
- Dropkin, V. H.** (1969) Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review of Phytopathology* **7**:101-122.
- Dropkin, V. H. e Nelson, P. E.** (1960) The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* **50**:442-447.
- Durrant, W.E. e Dong, X.** (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **24**:185-209.

- Dvorak, J.; Yang, Z. L.; You, F. M. e Luo, M. C.** (2004) Deletion polymorphism in wheat chromosome regions with contrasting recombination rates. *Genetics* **168**:1665-1675.
- Eisenback, J. D.; Bernard, E. C.; Starr, J. L.; Lee, T. A. e Tomaszewski, E. K.** (2003) *Meloidogyne haplanaria* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peanut in Texas. *Journal of Nematology* **35**:395-403.
- Ellingboe, A.** (2000) Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology* **107**:79-84.
- Emanuelsson, O. e Heijne, G.V.** (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochimica and Biophysica Acta* **1541**:114–119.
- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; von Heijne, G. e Nielsen, H.** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* **2**:953-971.
- Ernst, K.; Kumar, A.; Kriseleit, D.; Kloos, D. U.; Phillips, M. S. e Ganai, M. W.** (2002) The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *The Plant Journal* **31(2)**:127-136.
- Escobar, C.; De Meutter, J.; Aristizabal, F. A.; Sanz-Alferez, S.; del Campo, F. F.; Barthels, N.; Van der Eycken, W.; Seurinck, J.; van Montagu, M.; Gheysen G. e Fenoll, C.** (1999) Isolation of the LEMMI9 gene and promoter analysis during a compatible plant-nematode interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **12(5)**:440-449.
- Evangelista, A. R.; Lopes, J.; Abreu, J. G.; Neto, P. C. e Fraga, A. C.** (2004) Composição química de tortas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e mamona (*Ricinus communis* L.) – extração de óleo a frio. 1º Congresso de Plantas Oleaginosas, Óleos Vegetais e Biodiesel. Varginha-MG, Brasil, 2004.
- Eujayl, I.; Sledge, M. K.; Wang, L.; May, G. D.; Chekhovskiy, K.; Zwonitzer, J.C. e Mian, M. A.** (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics* **108**:414-22.
- Eujayl, I.; Sorrels, M. E.; Baum, M.; Wolters, P. e Powell, W.** (2002) Isolation on EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **104**:399-407.
- Ewing, B. e Green, P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8(3)**:186-194.
- Ewing, R. M.; Kahla, A. B.; Poirot, O.; Lopez, F.; Audic, S. e Claverie, J. M.** (1999) Large scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Research* **9**:950–959.

- Fabisiak, J. P.; Borisenko, G. G.; Liu, S. X.; Tyurin, V. A.; Pitt, B. R. e Kagan, V. E.** (2002) Redox sensor function of metallothioneins. *Methods in Enzymology* **353**:268-281.
- Falquet, L.; Pagni, M.; Bucher, P.; Hulo, H.; Christian, J. A. Sigrist, C. J. A.; Hofmann, K. e Bairoch, A.** (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research* **30(1)**:235-238.
- 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.
- Fedorova, M.; van de Mortel, J.; Matsumoto, P. A.; Cho, J.; Town, C. D.; VandenBosch, K. A.; Gantt, J. S. e Vance, C. P.** (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130**:519–537.
- Fernandes, J.; Brendel, V.; Gai, X.; Lal, S.; Chandler, V. L.; Elumalai, R. P.; Galbraith, D. W.; Pierson, E. A. e Walbot, V.** (2002) Comparison of RNA expression profiles based on maize expressed sequence tag frequency analysis and micro-array hybridization. *Plant Physiology* **128(3)**:896-910.
- Finnegan, P. M. e Brown, G. G.** (1999) Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria. *The Plant Cell* **2**:71–83.
- FAOSTAT Agriculture** - Food and Agriculture Organization (2003).
- Flor, H. H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**:275-296.
- Fraser, L. G.; Harvey, C. F.; Crowhurst, R. N. e De Silva, H. N.** (2004) EST-derived Microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, **108(6)**: 1010-1016.
- Fredslund, J.; Madsen, L. H.; Hougaard, B. K.; Nielsen, A. M.; Bertioli, D.; Sandal, N.; Stougaard, J. e Schausser, L.** (2006) A general pipeline for the development of anchor markers for comparative genomics in plants. *BMC Genomics* **7**:207.
- Freitas, F. O.; Peñaloza, A. P. S. e Valls, J. F. M.** O amendoim contador de história. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. **Documentos**, n.107. 2003. 12p.
- Fulton, T. M.; Van der Hoeven, R.; Eannetta, N. T. e Tanksley, S. D.** (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *The Plant Cell* **14(7)**:1457-1467.

- Gaafar, R. M.; Hohmann, U. e Jung, C.** (2005) Bacterial artificial chromosome-derived molecular markers for early bolting in sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics* **110**:1027-1037.
- Galuszka, P.; Frébort, I. Šebela, M. e Peč, P.** (2000) Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation* **32**:315–327.
- Galuszka, P.; Frébort, I.; Sebela, M.; Sauer, P.; Jacobsen, S. e Pec, P.** (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**:450–461.
- Galuszka, P.; Frébortová, J.; Werner, T.; Yamada, M.; Strnad, M.; Schmölling, T. e Frébort, I.** (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat, cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry* **271**:3990–4002.
- Gardiner, J.; Schroeder, S.; Polacco, M. L.; Sanchez-Villeda, H.; Fang, Z.; Morgante, M.; Landewe, T.; Fengler, K.; Useche, F.; Hanafey, M.; Tingey, S.; Chou, H.; Wing, R.; Soderlund, C. e Coe Jr., E. H.** (2004) Anchoring 9,371 maize expressed sequence Tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiology* **134**:1317-1326.
- Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D. e Bairoch, A.** (2003) *ExpASY*: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Research* **31**: 3784-3788.
- Gaudinová, A.; Dobrev, P.I.; Šolcová, B.; Novák, O.; Strnad, M.; Friedecký, D. e Motyka, V.** (2005) The Involvement of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase and Zeatin Reductase in Regulation of Cytokinin Levels in Pea (*Pisum sativum* L.) Leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* **24(3)**:188-200.
- Gautheret, D.; Poirot, O., Lopez, F.; Audic, S. e Claverie, J. M.** (1998) Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. *Genome Research* **8**:524-530.
- Ghannam, A.; Jacques, A.; De Ruffray, P.; Baillieul, F. e Kauffmann, S.** (2005) Identification of tobacco ESTs with a hypersensitive response (HR)-specific pattern of expression and likely involved in the induction of the HR and/or localized acquired resistance (LAR). *Plant Physiology and Biochemistry* **43**:249-259.
- Gheysen, G. e Fenoll, C.** (2002) Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* **40**:191-219.
- Goellner, M.; Wang, X.; Davis, E. L.** (2001) Endo- β -1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *The Plant Cell* **13**:2241-2255.
- Golkari, S.; Gilbert, J.; Prashar, S. e Procnier, J. D.** (2007) Microarray analysis of *Fusarium graminearum* –induced wheat genes: identification of

organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal* **5**:38–49.

Gómez, M. I.; Islam-Faridi, M. N.; Woo, S.-S.; Schertz, K. F.; Czeschin, Jr.; D.; Zwick, M. S.; Wing, R. A.; Stelly, D. M. e Price, H. J. (1997) FISH of a maize *sh2*-selected sorghum BAC to chromosomes of *Sorghum bicolor*. *Genome* **40**:475-478.

Gonzalez-Rizzo, S.; Crespi, M. e Frugier, F. (2006) The Medicago truncatula CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell* **18**:2680–2693.

Gorantla, M.; Babu, P. R.; Lachagari, V. B.; Reddy, A. M.; Wusirika, R.; Bennetzen, J. L. e Reddy, A. R. (2006) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of Experimental Botany* **58(2)**:253-65.

Goverse, A.; De Almeida Engler, J.; Verhees, J.; van der Krol, S.; Helder, J. H. e Gheysen, G. (2000a) Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology* **5-6**:747-61.

Goverse, A.; Overmars, H.; Engelbertink, J.; Schots, A.; Bakker, J. e Helder, J. (2000b) Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13(10)**:1121-1129.

Greenberg, J. T. e Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6 (3)**:201–211.

Gregory, W. C.; Krapovickas, A. e Gregory, M. P. Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: Summerfield, R.J.; Bunting, A.H. (Ed.) *Advances in Legume Science*. Kew, Royal Botanical Gardens; 1980, p.469-481.

Guimarães, P.M.; Proite, K.; Leal-Bertioli, S.C.M. e Bertioli, D. (2005) Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, ISSN 1676-1340 ; n° 85*.

Guo, J.; Song, J.; Wang, F. e Zhang, X. S. (2007) Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Molecular Biology* - Abril 19; [Online first].

Guo, W. J.; Bundithya, W. e Goldsbrough, P. B. (2003) Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* **159**:369-381.

- Hain, R.; Reif, H.-J.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P. H.; Stocker, R. H. e Stenzel, K.** (1993) Disease resistance results from phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**:153-156.
- Hall, J. L.** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53(366)**:1-11.
- Halward, T.; Stalker, H. T. e Kochert, G.** (1993) Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species *Theoretical and Applied Genetics* **37**:379-384.
- Halward, T. M.; Stalker, H. T.; Larue, E. A. e Kochert, G.** (1991) Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome* **34**:1013-1020.
- Hammerschmidt, R.** (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology* **37**:285–306.
- Hammond-Kosack, K. E. e Jones, J. D. G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**:1773–1791.
- Hammond-Kosack, K. E. e Jones, J. D. G.** (1997) Plant Disease Resistance Genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**:575-607.
- Haq, F.; Mahoney, M. e Koropatnick, J.** (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* **533**, 211-226.
- Hart, J. H.** (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **19**:437-458.
- Hauge, B. M.; Wang, M. L.; Parsons, J. D. e Parnell, L. D.** (2001) Monsanto. Nucleic acid molecules and other molecules associated with soybean cyst nematode resistance. U.S.P. No. 20030005491.
- Hayne, R. L. e Jones, C. M.** (1976) Effects of *Bi* locus in cucumber on reproduction, attraction and response of the plant to the southern root-knot nematode. *Journal of American Society of Horticulture and Science* **101**:422-424.
- Heath, M. C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**:321–334.
- Hemerly, A. S.; Ferreira, P.; De Almeida Engler, J.; Van Montagu, M.; Engler, G. e Inzé, D.** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell* **5**:1711–1723.
- Herman, M.; Hussey, R. S. e Boerma, H. R.** (1991) Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology* **23**:155-161.

- Hipskind, J. D. e Paiva, L.** (2000) Constitutive Accumulation of a Resveratrol-Glucoside in Transgenic Alfalfa Increases Resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **13**:551–562.
- Hirose, N.; Makita, N.; Kojima, M.; Kamada-Nobusada, T-M. e Sakakibara, H.** (2007) Overexpression of a Type-A Response Regulator Alters Rice Morphology and Cytokinin Metabolism. *Plant Cell Physiology* **48(3)**:523–539.
- Höfte, H.; Desprez, T.; Amselem, J.; Chiapello, H. e Caboche, M.** (1993) An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **4(6)**:1051-1061.
- Holbrook, C. C.; Knauff, D. A. e Dickson, D. W.** (1983). A technique for screening peanut for resistance to *Meloidogyne arenaria*. *Plant Disease* **67**:957-958.
- Holbrook, C. C. e Noe, J. P.** (1990) Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* sp. and implications on development of resistant peanut cultivars. *Peanut Science* **17**:35-38.
- Holec, S.; Lange, H.; Kühn, K.; Alioua, M.; Börner, T. e Gagliardi, D.** (2006) Relaxed Transcription in *Arabidopsis* Mitochondria Is Counterbalanced by RNA Stability Control Mediated by Polyadenylation and Polynucleotide Phosphorylase. *Molecular and Cellular Biology* **26(7)**:2869–2876.
- Hong, G.** (1997) A rapid and accurate strategy for rice contig map construction by combination of fingerprinting and hybridization. *Plant Molecular Biology* **35**:129-133.
- Horton, P.; Park, K-J.; Obayashi, T. e Nakai, K.** Protein Subcellular Localization Prediction with WoLF PSORT. Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06, Taipei, Taiwan. pp. 39-48, 2006.
- Houba-Hérin, N.; Pethe, C.; d’Alayer, J. e Laloue, M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* **17**:615–626.
- Huang, C.S.** (1985). Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. Pages 155-164 *in*: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. I, Biology and Control. J.N. Sasser and C.C. Carter, eds. North Carolina State Universtiy Graphics, Raleigh, NC.
- Huang, X. e Madan, A.** (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research* **9**: 868-877.
- Hückelhoven, R. e Kogel, K.H.** (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* **216**:891–902.

- Hulbert, S. H.; Webb, C. A.; Smith, S. M. e Sun, Q.** (2001) Resistance Gene Complexes: Evolution and Utilization. *Annual Review of Phytopathology* **39**:285-312.
- Hussain, S.; Slikker, W. Jr. e Ali, S. F.** (1996) Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. *Neurochemistry International* **29(2)**:145-152.
- Hussey, R. S. e Barker, K. R.** (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* **57**:1025-1028.
- Hussey, R. S.; e Janssenm G. J. W.** (2002) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr JL, Cook R, Bridge J, eds. *Plant resistance to parasitic nematodes*. Egham, UK:CABI Publishing, 43-69.
- Hutangura, P.; Mathesius, U.; Jones, M. G. K. e Rolfe, B. G.** (1999) Auxin accumulation is a trigger for root gall formation caused by rootknot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**:221-231.
- Hwang, E. W., Kim, K. A., Park, S. C., Jeong, M. J., Byun, M. O., e Kwon, H-B.** (2005) Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *Journal of Bioscience* **30**:101– 111.
- Jakse, J.;Telgmann. A.; Jung, C.; Khar, A.; Melgar, S.; Cheung, F.; Town, C.D. e Havey, M. J.** (2006) Comparative sequence and genetic analyses of asparagus BACs reveal no microsynteny with onion or rice. *Theoretical and Applied Genetics* **114(1)**:31-39.
- Janda, J.; Safar, J.; Kubalaková, M.; Bartos, J.; Kovarova, P.; Suchankova, P.; Pateyron, S.; Cihalikova, J.; Sourdille, P.; Simkova, H.; Faivre-Rampant, P.; Hribova, E.; Bernard, M.; Lukaszewski, A.; Dolezel, J. e Chalhoub, B.** (2006) Advanced resources for plant genomics: a BAC library specific for the short arm of wheat chromosome 1B. *The Plant Journal* **47(6)**:977-86.
- Jantasuriyarat, C.; Gowda, M.; Haller, K.; Hatfield, J.; Lu, G.; Stahlberg, E.; Zhou, B.; Li, H.; Kim, H.; Yu, Y.; Dean, R.A.; Wing, R. A.; Soderlund, C. e Wang, G-L.** (2005) Large-Scale Identification of Expressed Sequence Tags Involved in Rice and Rice Blast Fungus Interaction. *Plant Physiology* **138**:105–115.
- Jeong, S. C.; Yang, K.; Park, J. Y.; Han, K. S.; Yu, S.; Hwang, T. Y.; Hur, C. G.; Kim, S. H.; Park, P. B.; Kim, H. M.; Park, Y. I. e Liu, J. R.** (2006) Structure, expression, and mapping of two nodule-specific genes identified by mining public soybean EST databases. *Gene* **383**:71-80.
- Johnson, J. M.; Edwards, S.; Shoemaker, D. e Schadt, E. E.** (2005) Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments. *Trends in Genetics* **21**:93–102.

- Jones, J. D. D. e Dangl, J. L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.
- Jones, R. J. e Schreiber, B. M. N.** (1997) Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regulation* **23**:123–134.
- Jung, H. W. e Hwang, B. K.** (2000) Isolation, Partial Sequencing, and Expression of Pathogenesis-Related cDNA Genes from Pepper Leaves Infected by *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13(1)**:136–142.
- Jung, S.; Tate, P. L.; Horn, R.; Kochert, G.; Moore, K. e Abbot, A. G.** (2003) The Phylogenetic Relationship of Possible Progenitors of the Cultivated Peanut. *Journal of Heredity* **94(4)**:334–340.
- Kägi, J.** (1991) Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology* **205**:613–626.
- Kakimoto, T.** (2003) Perception and Signal Transduction of Cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**:605–27.
- Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Nishizawa, M. e Yamagishi, T.** (1988) Studies on rhubarb (*Rhei rhizoma*). XIV. Stilbene glucosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**:1545-1549.
- Kawasaki, S. e Murakami, Y.** (2000) Genome Analysis of *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* **113**:497-506.
- Kelley, J. M.; Field, C. E.; Craven, M. B.; Bocskai, D.; Kim, U. J.; Rounsley, S. D. e Adams, M. D.** (1999) High throughput direct end sequencing of BAC clones. *Nucleic Acids Research* **27**:1539-1546.
- Kellow, A. V.; Sedgley, M. e Heeswijck, R. V.** (2004) Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape *Phylloxera*: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation. *Annals of Botany* **93**:581-590.
- Kim, H. B.; Lee, H.; Oh, C. J.; Lee, N. H. e An, C. S.** (2007) Expression of *EuNOD-ARP1* Encoding Auxin-repressed Protein Homolog Is Upregulated by Auxin and Localized to the Fixation Zone in Root Nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Molecules and Cells* **23(1)**:115-121.
- Kim, S.; Ahn, I-P. e Lee, Y-H.** (2001) Analysis of Genes Expressed During Rice–*Magnaporthe grisea* Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14(11)**:1340–1346.
- Klink, V. P.; Alkharouf, N.; MacDonald, M. e Matthews, B.** (2005) Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of *Glycine max* (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Molecular Biology* **59**:965–979.

- Knight, H. and Knight, M. R.** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* **6**:262–267.
- Kobe B. e Deisenhofer J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS* **19**:425-420.
- Kochert, G.; Stalker, H. T.; Gimenes, M.; Galgaro, L.; Lopes, C. R. e Moore, K.** (1996) RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* **83**:11282-11291.
- Koenning, S. R. e Barker, K. R.** (1992) Relative damage functions and reproductive potentials of *Meloidogyne arenaria* and *M. hapla* on peanut. *Journal of Nematology* **24**:187-192.
- Kohler, A.; Delaruelle, C.; Martin, D.; Encelot, N. e Martin, F.** (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. *FEBS Letters* **542**:37-41.
- Krapovickas, A. e Gregory, W. C.** (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, **v.8**, p.1-186.
- Laloue, M. e Fox, J. E.** (1989) Cytokinin Oxidase from Wheat Partial Purification and General Properties. *Plant Physiology* **90**:899-906.
- Lamb, C. e Dixon, R. A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**:251–275.
- Lamoureux, D.; Bernole, A.; Le Clainche, I.; Tual, S.; Thareau, V.; Paillard, S.; Legeai, F.; Dossat, C.; Wincker, P.; Oswald, M.; Merdinoglu, D.; Vignault, C.; Delrot, S.; Caboche, M.; Chalhoub, B. e Adam-Blondon, A. F.** (2006) Anchoring of a large set of markers onto a BAC library for the development of a draft physical map of the grapevine genome Theoretical and Applied Genetics **113(2)**:344-356.
- Langcake, P.** (1981) Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, e-viniferin, a-viniferin and pterostilbene. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **18**:213–226.
- Lanz, T.; Schröder, G. e Schröder, J.** (1990) Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L. *Planta* **181**:169-175.
- Lavia, G., Fernández, A.; Simpson C.e Seijo, G.** (2001) Cytogenetic analysis in wild diploid *Arachis* species (Leguminosae). *Cytologia* **66**: 293-298.
- Leal-Bertioli, S. C. M.; Guimarães, P. M.; Bruzzi, M.; Carneiro, R. G.; Valls, J. F. M. e Bertioli, D. J.** (1999) Busca de resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. e seqüências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis*. *Boletim de Pesquisa-série EMBRAPA*. **Nº 20**.

- Leckband, G. e Lorz, H.** (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **96**:1004–1012.
- Lee, D-S.; Song, H. e Kim, Y. et al.** (2003) Identification and characterization of genes responding to temperature stresses in Chinese cabbage using cDNA microarray. *Plant and Animal Genome Conference XI*, 11–15 January 2003, San Diego, CA, p. 268.
- Lee, D. J.; Park, J. Y.; Ku, S. J.; Ha, Y-M.; Kim, S.; Kim, M. D.; Oh, M-H. e Kim, J.** (2007) Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* **277**:115–137.
- Leiro, J.; Alvarez, E.; Arranz, J. A.; Laguna, R.; Uriarte, E. e Orallo, F.** (2004) Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *Journal of Leucocyte Biology* **75**:1156-1165.
- Leiro, J.; Arranz, J. A.; Fraiz, N.; Sanmartin, M. L.; Quezada, E. e Orallo, F.** (2005) Effect of cis-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa-B signaling. *International Immunopharmacology* **5**:393-406.
- Leppik, E. E.** (1970) Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **8**:323-344.
- Li, L.; Cheng, H.; Gai, J. e Yu, D.** (2007) Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **226(1)**:109-123.
- Li, X.; Mo, X.; Shou, H. e Wu, P.** (2006) Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* **47(8)**:1112–1123.
- Lightfoot, D. e Meksem, K.** (2002). University of Illinois. Isolated polynucleotides and polypeptides relating to loci underlying resistance to soybean cyst nematode and soybean sudden death. Syndrome and methods employing same. U.S.P. No. 20020144310.
- Liu, C. J.; Bateson, M.; Ma, Z.Y.; Miyagi, M.; Lambrides, C. J. e Humphry, M** (2004) Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Theoretical and Applied Genetics* **110(1)**:151-156.
- Liu, L.; White, M. J. e MacRae, T. H.** (2002) Identification of ultraviolet-B responsive genes in the pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Reports* **20**:1067–1074.

- Lohar, D. P.; Schaff, J. E.; Lashey, J. G.; Kieber, J. J.; Bilyeu, K. D. e Bird, D. M.** (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal* **38**:203-214.
- Lordello, R. R. A.; Lordello, A. I. L. e Godoy, I. J.** (1997) Ocorrência de *Meloidogyne javanica* parasitando raízes e nódulos de amendoim no Paraguai. *Bragantia* **56**(1):87-89.
- Lorieux, M.; Reversat, G.; Garcia Diaz, S. X.; Denance, C.; Jouvenet, N.; Orieux, Y.; Bourger, N.; Pando-Bahuon, A. e Ghesquière, A.** (2003) Linkage mapping of *Hsa-1(Og)*, a resistance gene of African rice to the cyst nematode, *Heterodera sacchari*. *Theoretical and Applied Genetics* **107**:691–696.
- Lü, S.; Gu, H.; Yuan, X.; Wang, X.; Wu, A-W.; Ou, L. e Liu, J-Y.** (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic Arabidopsis. *Transgenic Research* **16**:177–191.
- Luo, M.; Wang, Y.H.; Frisch, D.; Joobeur, T.; Wing, R.A. e Dean, R.A.** (2001) Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon *Fusarium* wilt (Fom-2). *Genome* **44**:154–162.
- Luo, M.; Dang, P.; Guo, B. Z.; He, G.; Holbrook, C.; Bausher, M. G. e Lee, R. D.** (2005a) Generation of Expressed Sequenced tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut. *Crop Science* **45**:346-353.
- Luo, M.; Liang, X. Q.; Dang, P.; Holbrook, C. C.; Bausher, M. G.; Lee, R. D. e Guo, B. Z.** (2005b) Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Science* **169**:695-703.
- Luo, M.; Dang, P.; Bausher, M. G.; Holbrook, C. C.; Lee, R. D.; Lynch, R. E. e Guo, B. Z.** (2005c) Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut. (*Arachis hypogaea*). *Phytopathology* **95**:381-387.
- Ma, H-M.; Schulze, S.; Lee, S.; Yang, M.; Mirkov, E.; Irvine, J.; Moore, P. e Paterson, A. H.** (2004) An EST survey of the sugarcane transcriptome. *Theoretical and Applied Genetics* **108**(5):851-863.
- Machado, A. N.; Siewerdt, L.; Vahl, L. C. e Ferreira, O. G. L.** (2005) Estabelecimento e produção de amendoim-forrageiro em campo natural de planossolo, sob diferentes níveis de fósforo e potássio. *Revista Brasileira de Agrociência* **11**(4):461-466.
- Maleck, K.; Levine, A.; Eulgem, T.; Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, K. A.; Dangl, J. L. e Dietrich, R. A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**(4):403-10.

- Manthey, K.; Krajinski, F.; Hohnjec, N.; Firnhaber, C.; Pühler, A.; Perlick, A. M. e Küster, H.** (2004) Transcriptome Profiling in Root Nodules and Arbuscular Mycorrhiza Identifies a Collection of Novel Genes Induced During *Medicago truncatula* Root Endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **17(10)**:1063–1077.
- Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Cherukuri, P. F.; DeWeese-Scott, C.; Geer, L. Y.; Gwadz, M.; He, S.; Hurwitz, D. I.; Jackson, J. D.; Ke, Z.; Lanczycki, C. J.; Liebert, C. A.; Liu, C.; Lu, F.; Marchler, G. H.; Mullokandov, M.; Shoemaker, B. A.; Simonyan, V.; Song, J. S.; Thiessen, P. A.; Yamashita, R.A.; Yin, J. J.; Zhang, D. e Bryant, S. H.** (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Research* **33(Database issue)**:D192-6.
- Marra, M. A.; Kucaba, T. A.; Green, E. D.; Brownstein, B.; Wilson, R. K.; McDonald, K. M.; Hillier, L. W.; McPherson, J. D. e Waterston, R. H.** (1997) High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome Research* **7**:1072–1084.
- Martin, G. B.; Bogdanove, A. J. e Sessa, G.** (2003) Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**:23–61.
- Martins, W.; Sousa, D.; Proite, K.; Guimarães, P. M.; Moretzsohn, M. e Bertioli, D.** (2006) New softwares for automated microsatellite marker development. *Nucleic Acids Research* **34(4)**:e31.
- Massonneau, A.; Houba-Hérin, N.; Pethe, C.; Madzak, C.; Falque, M.; Mercy, M.; Kopeckny, D.; Majira, A.; Rogowsky, P. e Laloue, M.** (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany* **55(408)**:2549–2557.
- Matthews, B. F.; Devine, T. E.; Weisemann, J. M.; Beard, H. S.; Lewers, K. S.; MacDonald, M. H.; Park, Y. B.; Maiti, R.; Lin, J.; Kuo, J.; Pedroni, J. J.; Cregan, P. B. e Saunders, J. A.** (2001) Incorporation of sequence cDNA and genomic markers into soybean genetic map. *Crop Science* **41**:516-521.
- Matton, D. P.; Constabel, P. e Brisson, N.** (1990) Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Molecular Biology* **14(5)**:775-783.
- Mayer, K.; Schuller, C.; Wambutt, R.; Murphy, G.; Volckaert, G.; Pohl, T.; et al.** (1999) Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**:769-777.
- Mazarei, M.; Lennon, K. A.; Puthoff, D. P.; Rodermeil, S. R. e Baum, T. J.** (2004) Homologous soybean and *Arabidopsis* genes share responsiveness to cyst nematode infection. *Molecular Plant Pathology* **5(5)**:409-423.

- McSorley, R.; Dickson, D. W.; Candeanedo-Lay, E. M.; Hewlett, T. E. e Frederick, J. J.** (1992) Damage functions for *Meloidogyne arenaria* on peanut. *Journal of Nematology* **4**:193-198.
- Meksem, K.; Zobrist, K.; Ruben, E.; Hyten, D.; Quanzhou, T. e Zhang, H. B.** (2000) Two large-insert soybean genomic libraries constructed in a binary vector: applications in chromosome walking and genome wide physical mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **101**:747-755.
- Melillo, M. T.; Leonetti, P.; Bongiovanni, M.; Castagnone-Sereno, P. e Blevè-Zacheo, T.** (2006) Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytologist* **170**:501–512.
- Messing, J.; Bharti, A. K.; Karlowski, W. M.; Gundlach, H.; Kim, H. R.; Yu, Y.; Wei, F.; Fuks, G.; Soderlund, C. A.; Mayer, K. F. e Wing, R. A.** (2004) Sequence composition and genome organization of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101(40)**:14349-54.
- Meutter, J. S.; Tytgat, T.; Witters, E.; Gheysen, G.; Onckelen, H. V. e Gheysen, G.** (2003) Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology* **4(4)**:271-276.
- Meyers, B. C.; Dickerman, A. W.; Michelmore, R. W.; Pecherer, R. M.; Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W. e Young, N. D.** (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* **20**:317-332.
- Milligan, S. B.; Bodeau, J.; Yaghoobi, J.; Kaloshian, I.; Zabel, P. e Williamson, V. M.** (1998) The Root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell* **10**:1307-1319.
- Ming, R.; Moore, P. H.; Zee, F.; Abbey, C. A.; Ma, H. e Paterson, A. H.** (2001) Construction and characterization of a papaya BAC library as a foundation for molecular dissection of a tree fruit genome. *Theoretical and Applied Genetics* **102**:892-899.
- Miranda, C. H. B.; Vieira, A. e Cadisch, G.** (2003) Determinação da fixação biológica de nitrogênio no Amendoim forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância natural de ¹⁵N. *Revista Brasileira de Zootecnia* **32(6)**:1859-1865.
- Mitreva, M.; Blaxter, L. M. R.; Bird, D. M. e Carter, J. P.** (2005) Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* **21(10)**:573-581.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7(9)**:405-410.

- Mittler, R.; Feng, X. e Cohen, M.** (1998) Post-Transcriptional Suppression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase Expression during Pathogen-Induced Programmed Cell Death in Tobacco. *The Plant Cell* **10**:461–473.
- Mittler, R.; Herr, E. H.; Orvar, B. J.; Camp, W. V.; Willekens, H.; Inzé, D. e Ellis, B. E.** (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:14165-14170.
- Mok, D. W. e Mok, M. C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual*
- Mokros, P.; Vrbsky, J. e Siroky, J.** (2006) Identification of chromosomal fusion sites in Arabidopsis mutants using sequential bicolour BAC-FISH. *Genome* **49(8)**:1036-42.
- Moretzsohn, M. C.; Leoi, L.; Proite, K.; Guimarães, P. M.; Leal-Bertioli, S. C. M.; Gimenes, M. A.; Martins, W. S.; Grattapaglia, D. e Bertioli, D. J.** (2005) Microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **111**:1060-1071.
- Moretzsohn, M. C.** (2006) Desenvolvimento e mapeamento de marcadores microssatélites e identificação de QTLs ligados à produtividade e à resistência à mancha preta em *Arachis* spp. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006. 142 p.
- Morris, R. O.; Bilyeu, K. D.; Laskey, J. G. e Cheikh, N. N.** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **255(2)**:328-33.
- Morrissey, J. P. e Osbourn, A. E.** (1999) Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63(3)**:708–724.
- Motyka, V.; Faiss, M.; Strand, M.; Kamínek, M. e Schmöling, T.** (1996) Changes in Cytokinin Content and Cytokinin Oxidase Activity in Response to Derepression of ipt Gene Transcription in Transgenic Tobacco Calli and Plants. *Plant Physiology* **112(3)**:1035–1043.
- Motyka, V.; Vaňková, R.; Čapková, V.; Petrášek, J.; Kamínek, M. e Schmöling, T.** (2003). Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiology of Plant* **117**:11–21.
- Moura, R. M. e E. M. O. Régis.** (1987) Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda:Heteroderidae). *Nematologia Brasileira*, **11**:215-225.
- Mozo, T.; Dewar, K.; Dunn, P.; Ecker, J. R.; Fischer, S.; Kloska, S.; Lehrach, H.; Marra, M.; Martienssen, R.; Meier-Ewert, S. e Altmann, T.** (1999) A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics* **22**:271-275.

- Mun, J-H.; Kim, J-C; Choi, H-K.; Gish, J.; Debellé, F.; Mudge, J.; Denny, R.; Endré, G.; Saurat, O.; Dudez, A.; Kiss, G. B.; Roe, B.; Young, N. D e Cook, D. R.** (2006) Distribution of Microsatellites in the Genome of *Medicago truncatula*: A Resource of Genetic Markers That Integrate Genetic and Physical Maps. *Genetics* **172**:2541-2555.
- Mysore, K. S.; D'Ascenzo, M. D; He, X.; e Gregory B. Martin, G. B.** (2003) Overexpression of the Disease Resistance Gene *Pto* in Tomato Induces Gene Expression Changes Similar to Immune Responses in Human and Fruitfly. *Plant Physiology* **132**:1901–1912.
- Nam, Y. W.; Lee, J. R.; Song, K. H.; Lee, M. K.; Robbins, M. D.; Chung, S. M.; Staub, J. E. e Zhang, H. B.** (2005) Construction of two BAC libraries from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and identification of clones linked to yield component quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* **111**:150-161.
- Neil, D. L.; Villasante, A.; Fisher, R. B.; Vetrie, D.; Cox, B. e Tyler-Smith, C.** (1990) Structural instability oh human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acids Research* **18**:1421-1428.
- Nelson, R. R. e Shoemaker, R.** (2006) Identification and analysis of gene families from the duplicated genome of soybean using EST sequences. *BMC Genomics* **7**:204.
- Nelson, S. C.; Simpson, C.E. e Starr, J. L.** (1989) Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germoplasm. *Journal of Nematology* **21**(Suppl. 4S):654-660.
- Nelson, S. C.; Starr, J. L. e Simpson, C. E.** (1990). Expression of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. *Journal of Nematology* **22**:242-244.
- Niebel, A.; Heungens, K.; Barthels, M.; Inzé, D.; Van Montagu, N. e Gheysen, G.** (1995) Characterization of a Pathogen-Induced Potato Catalase and Its Systemic Expression Upon Nematode and Bacterial Infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **8**(3):371-378.
- Niebel, De Almeida Engler, J.; Hemerly, A.; Ferreira, P.; Inzé, D.; Van Montagu, N. e Gheysen, G.** (1996) Induction of *cdc2a* and *cyc1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *The Plant Journal* **10**(6):1037–1043.
- Nimchuk, Z.; Eulgem, T.; Holt III, B. F. e Dangl, J. L.** (2003) Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annual Review of Genetics* **37**:579-609.

- Nogué, F.; Grandjean, O.; Craig, S.; Dennis, E. e Chaudhury, A.** (2000) Higher levels of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation* **32**:275–283.
- Noir, S.; Anthony, F.; Bertrand, B.; Combes, M. C. e Lashermes, P.** (2003) Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* **52**:97-103.
- Noir, S.; Patheyron, S.; Combes, M. C.; Lashermes, P. e Chalhoub, B.** (2004) Construction and characterisation of a BAC library for genome analysis of the allotetraploid coffee species (*Coffea arabica* L.) *Theoretical and Applied Genetics* **122**:1604-1611.
- Okushima, Y.; Mitina, I.; Quach, H. L. e Theologis, A.** (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal* **43(1)**:29-46.
- Oliveira, W.; Gobbi, A.; Oliveira, E.; Moretzsohn, M.C.; Lopes, C.R. e Gimenes, M.** (2007) A Genetic Linkage Map of Arachis B Genome Using RAPD Markers *Plant and Animal Genome XV Conference*. 13-17 Jan. San Diego, Califórnia. Abstracts. P428.
- Omwega, C. O. e Roberts, P. A.** (1992) Inheritance of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean and the genetic basis of its sensitivity to temperature. *Theoretical and Applied Genetics* **83**:720-726.
- Oostenbrink, M.** (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouhogeschool, Wageningen*, **66**:1-46.
- Opperman, C. H. e Bird, D. M.** (1998) The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: A genetic model system for the study of plant-parasitic nematodes. *Current Opinion of Plant Biology*. **1**:342-346.
- Paal, J.; Henselewski, H.; Muth, J.; Meksem, K.; Menéndez, C. M.; Salamini, F.; Ballvora, A. e Gebhardt, C.** (2004) Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The Plant Journal* **38**:285–297.
- Pačes, V.; Werstiuk, E. e Hall, R. H.** (1971) Conversion of *N₆*-isopentenyladenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* **48**: 775–778.
- Palmer, M. e Palni, M. S.** (1987) Substrate effects on cytokinin metabolism in soybean callus culture. *Journal of Plant Physiology* **126**:365–371.

- Palmiter, R. D.** (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:8428-8430.
- Palni, L. M. S.; Burch, L. e Horgan, R.** (1988) The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism, *Planta* **174**:231-234.
- Park, S. e Han, K. H.** (2003) An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. *Tree Physiology* **23**:815–823.
- Park, S.; Sugimoto, N.; Larson, M. D.; Beaudry, R. e van Nocker, S.** (2006) Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiology* **141(3)**:811-24.
- Pegard, A.; Brizzard, G.; Fazari, A.; Soucaze, O.; Abad, P. e Djian-Caporalino, C.** (2005) Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* **95**:158-165.
- Peralta, I. E.; Knapp, S. e Spooner, D. M.** (2005) *Solanum arcanum* and *S. huaylasense*, two new wild tomato species segregated from *Solanum peruvianum* *Sensu Lato*. *Systematic Botany* **30(2)**:424–434.
- Peralta, I. E. e Spooner, D. M.** (2001) Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* **88**:1888–1902.
- Perry, R. N.** (1996) Chemoreception in Plant Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **34**:181-199.
- Peterson, D. G.; Lapitan, N. L. V. e Stack, S. M.** (1999) Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics* **152**:427-439.
- Peterson, D. G.; Tomkins, J. P.; Frisch, D. A.; Wing, R. A. e Paterson, A. H.** (2000) Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *Journal of Agriculture Genomics* **5** <http://www.ncgr.org/research/jag>.
- Pettit, G. R.; Lippert, J. W.; Herald, D. L.; Hamel, E. e Pettit, R. K.** (2000) Antineoplastic agents. 509. Synthesis of fluorocombstatin phosphate and related 3-halostilbenes. *Journal of Natural Products* **63**: 969–974.
- Picoult-Newberg, L.; Trey, E.; Ideker, T. E.; Pohl, M. G.; Taylor, S. L.; Donaldson, M. A.; Nickerson, D. A. e Boyce-Jacino, M. A.** (1999) Mining SNPs From EST Databases. *Genome Research* **9**:167-174.
- Pimratch, S., Jogloy, S.; Toomsan, B.; Jaisil, P.; Sikhinarum, J.; Kesmala, T. e Patanothai, A.** (2004) Evaluation of seven peanut genotypes for nitrogen

fixation and agronomic traits. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26(3)**:295-304.

Popelková, H.; Fraaije, M. W.; Novák, O.; Frébortová, J.; Bilyeu, K. D. e Frébort, I. (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin-dehydrogenase catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochemical Journal* **398**:113–124.

Potenza, C.; Thomas, S. H. e Sengupta-Gopalan, C. (2001) Genes Induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Science* **161**:289-299.

Powell, R. G.; TePaske, M. R.; Platner, R. D.; White, J. F. e Clement, S. L. (1994) Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. *Phytochemistry* **35**:335–338.

Powell, W.; Machray, G. C. e Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **7**:215-222.

Pozo, M. J.; Van Loon, L. C. e Pieterse, C. M. J. (2005) Jasmonates-signals in plant–microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**:211–222.

Proite, K.; Leal-Bertioli, S. C. M.; Bertioli, D. J.; Moretzohn, M. C. da Silva, F. R.; Martins, N. F. e Guimarães, P. M. (2007) ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology* **7**:7.

Rana, D.; Boogaart, T. V. D.; O’Neil, C. M.; Hysne, L.; Bent, E.; Macpherson, L.; Park, J. Y.; Lim, Y. P. e Bancroft, I. (2004) Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives. *The Plant Journal* **40**:725-733.

Ramos, L. P.; Kucck, K. R.; Domingos, A. K. e Wilhelm, H. M. (2003) Biodiesel *Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* no. **31**:28-37.

Reddy, A. S. N. e Poovaiah, B. W. (1990) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxinregulated gene. *Plant Molecular Biology* **14**:127–136.

Redig, P.; Shaul, O.; Inze, D.; Van Montagu, M. e Van Onckelen, H. (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* **391**:175–180.

Reichert, A. S. e Neupert, W. (2004) Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in Genetics* **20**:555–562.

Rich, J. R. e Kinloch, R. A. (2005) Peanut Nematode Management. Entomology e Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/>.

- Roberts, P. A.** (2002). Concepts and consequences of resistance. In: Plant resistance to parasitic nematodes. **Starr, J. L.; Cook, T. e Bridge, J.** (eds.). CABI International. UK. Chapter 1. p. 1-22.
- Robinson, N. J.; Tommey, A. M. Kuske, C. e Jackson, P.J.** (1993) Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal* **295**:1–10.
- Rocha, F. R.; Papini-Terzi, F. S.; Nishiyama, M. Y. Jr.; Vencio, R. Z.; Vicentini, R.; Duarte, R. D.; de Rosa, V. E. Jr.; Vinagre, F.; Barsalobres, C.; Medeiros, A. H.; Rodrigues, F. A.; Ulian, E. C.; Zingaretti, S. M.; Galbiatti, J. A.; Almeida, R. S.; Figueira, A. V.; Hemerly, A. S.; Silva-Filho, M. C.; Menossi, M. e Souza, G. M.** (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* **8(1)**:71.
- Rodrigues, A. C. F. O.; Abrantes, I. M. O.; Melillo, M. T. e Bleve-Zacheo, T.** (2000) Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica* **30**:201-210.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M. Jeroen N. A. M.; Overmars, H. P. M.; van Norel, A. Scholten, O. E.; Janssen, R. e Bakker, J.** (1999) Development of a PCR based selection assay for root-knot nematode resistance (*Rmc1*) by a comparative analysis of the *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* genome. *Euphytica* **106**:187–195.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H-Y. e Hunt, M. D.** (1996) Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* **8**:1809–1819.
- Sanchez, A. C.; Ilag, L. L.; Yang, D.; Brar, D. S.; Ausubel, F.; Khush, G. S.; Yano, M.; Sasaki, T.; Li, Z. e Huang, N.** (1999) Genetic and physical mapping of *xa13*, a recessive bacterial blight resistance gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **98**:1022-1028.
- Samappito, S.; Page, J. E.; Schmidt, J.; De-Eknamkul, W. e Kutchan, T. M.** (2003) Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tatarium*. *Phytochemistry* **62**:313-323.
- Sambrook, J. e Russel, D. W.** (eds.), 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarig, P.; Zutkhi, Y.; Monjauze, A.; Lisker, N. e BenArie, R.** (1997) Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**:337–347.
- Sasaki, T. e Burr, B.** (2000) International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology* **3(2)**:138-41.

- Sato, S.; Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Asamizu, E.; Kato, T. e Tabata, S.** (2001) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Research* **8**:311-318.
- Sato, S.; Isobe, S.; Asamizu, E.; Ohmido, N.; Kataoka, R.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Sakurai, N.; Okumura, K.; Klimenko, I.; Sasamoto, S.; Wada, T.; Watanabe, A.; Kohara, M.; Fujishiro, T. e Tabata, S.** (2005). Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research* **12**:301-364.
- Sato, S. e Tabata, S.** (2006) *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:128–132.
- Schenk, P. M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J. P.; Richmond, J.; Somerville, S. C. e Manners, M. J.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97(21)**:11655-11660.
- Schmitt, D. P. e Barker, K. R.** (1998) Incidence of plant-parasitic nematodes in the coastal plain of North Carolina. *Plant Disease* **72**:107-110.
- Schmülling, T.; Werner, T.; Riefler, M.; Krupkova, E.; Bartrina, Y. e Manns, I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116(3)**:241-52.
- Schöppner, A. e Kindl, H.** (1984) Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *Journal of Biological Chemistry* **259**:6806-6811.
- Schröder, G.; Brown, J. W. S. e Schröder, J.** (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *European Journal of Biochemistry* **172**:161 -169.
- Schwacke, R.; Schneider, A.; Graaff, E. Fischer; K.; Catoni, E.; Desimone, M.; Frommer, W. B.; Flügge, U. I. e Kunze, R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**:16–26.
- Seijo, J. G.; Lavia, G. I.; Fernández, A.; Krapovickas, A.; Ducasse, D. e Moscone, E. A.** (2004) Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (leguminosae). *American Journal of Botany* **91**:1294-1303.
- Serazetdinova, L.; Oldach, K. H. e Lörz, H.** (2005) Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology* **162**:985-1002.

- Sharma, S. B. e McDonald, D.** (1990) Global status of nematode problems of groundnut, pigeonpea, chickpea, sorghum and pearl millet. *Crop Protection* **9**:453-458.
- Sharma, S. B.; Ansari, M. A.; Varaprasad, K. S.; Singh, A.K. e Reddy, L. J.** (1999) Resistance to *Meloidogyne javanica* in wild *Arachis* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**:557-568.
- Shimizu, M; Suzuki,-K. e Miyazawa, Y.**-(2006) Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene *CsGRP1* and the auxin-induced peg formation during gravimorphogenesis of cucumber seedlings *Planta* **225**:13–22.
- Shizuya H.; Birren B.; Kim U. J.; Mancino V.; Slepak T.; Tachiiri Y. e Simon M.** (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:8794–8797.
- Shoemaker, R.; Keim, P.; Vodkin, L.; Retzel, E.; Clifton, S. W.; Waterston, R.; Smoller, D.; Coryell, V.; Khanna, A.; Erpelding, J.; Gai, X.; Brendel, V.; Raph-Schmidt, C.; Shoop, E. G.; Vielweber, C. J.; Schmatz, M.; Pape, D.; Bowers, Y.; Theising, B.; Martin, J.; Dante, M.; Wylie, T. e Granger, C.** (2002) A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. *Genome* **45(2)**:329-338.
- Simpson, C. E.** (1991) Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science* **18**:22-26.
- Simpson, C. E. e Starr, J. L.** (2001) Registration of “COAN” Peanut. *Crop Science* **41**:918.
- Simpson, C. E.; Starr, J. L.; Church, G. T.; Burow, M. D., Paterson, A. H.** (2003). Registration of “NemaTAM” Peanut. *Crop Science* **43**:1561.
- Singh, K. P.; Raina, S. N. e Singh, A. K.** (1996) Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Arachis* species. *Genome* **39**:890-897.
- Skiba, B.; Ford, R. e Pang, E. C. K.** (2005) Construction of a cDNA library of *Lathyrus sativus* inoculated with *Mycosphaerella pinodes* and the expression of potential defence-related expressed sequence tags (ESTs). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**:55–67.
- Sledge, M. K.; Ray, I. M. e Jiang, G.** (2005) An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **111(5)**:980-992.
- Smith, P.G.** (1944). Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*. **44**:413-416.

- Song, W. Y.; Wang, G-L.; Chen, L-L.; Kim, H-S.; Pi, L-Y.; Holsten, T.; Gardner, J.; Wang, B.; Zhai, W.X.; Zhu, L. H.; Fauquet, C. e Ronald, P.** (1995) A receptor kinase- like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**:1804–1806.
- Soni, R.; Carmichael, J. P.; Shah, Z. H. e Murray, J. A.** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *The Plant Cell* **7(1)**:85-103.
- Sparvoli, F.; Martin, C.; Scienza, A.; Gavazzi, G. e Tonelli, C.** (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* **24**:743-755.
- Spooner, D. M.; Anderson, G. J. e Jansen, R. K.** (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (*Solanaceae*). *American Journal of Botany* **80**:676–688.
- Stafstrom, J. P.; Ripley, B. D.; Devitt, M. L. e Drake, B.** (1998) Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. *Planta* **205**:547–552.
- Stalker, H. T.** (1984) Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* Leafspot resistance for peanut improvement. *Euphytica* **33**:529-538.
- Stalker, H.T. e Simpson, C.E.** Germplasm resources in *Arachis*. In: Patree, H.E.; Stalker, H.T. (Eds) *Advances in Peanut Science*, APRES, Stillwater, OK, 1995. Cap. 2, pp 14-53.
- Stark-Lorenzen, P.; Nelke, B.; Hänßler, G.; Mühlbach, H. P. e Thomzik, J. E.** (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Reports* **16(10)**:668-673.
- Stein, N.; Feuillet, C.; Wicker, T.; Schlagenhauf, E. e Keller, B.** (2000) Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13436-13441.
- Steiner, C.; Bauer, J.; Amrhein, N. e Bucher, M.** (2003) Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. *Biochimistry and Biophysica Acta* **1625**:123–133.
- Stekel, D. J.; Git, Y. e Falciani, F.** (2000) The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Genome Research* **10**:2055–2061.
- Stevens, M. R.; Coleman, C. E.; Parkinson, S. E.; Maughan, P. J.; Zhang, H. B.; Balzotti, M. R. e Kooyman, D. L.; Arumuganathan, K.; Bonifacio, A.; Fairbanks, D. J.; Jellen, E. N. e Stevens, J. J.** (2006) Construction of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAC library and its use in identifying genes encoding seed storage proteins. *Theoretical and Applied Genetics* **12**:1593-600.

- Subrahmanyam, P.; McDonald, D.; Gibbons, R. W. e Subba, R. P. V.** (1983) Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. *Phytopathology* **73**:253-256.
- Sugiyama, Y.; Watase, Y.; Nagase, M.; Makita, N.; Yagura, S.; Hirai, A. e Sugiura, M.** (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Molecular Genetics and Genomics* **272(6)**:603-615.
- Swarup, R.; Parry, G.; Graham, N.; Allen, T. e Bennet, M.** (2002) Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology* **49**:411–426.
- Swift, H.** (1950) The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Genetics* **36**:643-654.
- Sydenham, G. M.; McSorley, R. e Dunn, R. A.** (1996) Effects of resistance in *Phaseolus vulgaris* on development of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* **28**:485-491.
- Tanda, A.S.; Atwal, A.S. e Bajaj, Y. P. S.** (1989) In vitro inhibition of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Sesame root-exsudate and its amino acids. *Nematologica* **35**:115-124.
- Tatusova, T. A. e Madden, T. L.** (1999) Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, *FEMS Microbiology Letters* **174**:247-250.
- Temsch, E. M. e Greilhuber, J.** (2000) Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. *Genome* **43**:449-451.
- Temsch, E. M. e Greilhuber, J.** (2001) Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. *Genome* **44**:826-830.
- Terrine, C. e Laloue, M.** (1980) Kinetics of N-(Delta-Isopentenyl) Adenosine Degradation in Tobacco Cells: Evidence of a Regulatory Mechanism under the Control of Cytokinins. *Plant Physiology* **65(6)**:1090-1095.
- Thies, J. A. e Fery, R. L.** (2000) Characterization of resistance conferred by the *N* gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, *M. hapla*, and *M. javanica* in two sets of isogenic lines of *Capsicum annuum* L. *Journal of American Society and Horticulture Science* **125(1)**:71-75.
- Thomas, J. C.; Perron, M.; La Rosa, P. C. e Smigocki, A. C.** (2005) Cytokinin and the regulation of a tobacco metallothionein-like gene during copper stress. *Physiologia Plantarum* **123**:262–271.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**:4673-4680.

Thomzik, J. E.; Stenzel, K.; Stocker, R.; Schreier, P. H.; Hain, R. e Stahl, D. J. (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51(4)**:265-278.

Thornalley, P. J. e Vasak, M. (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica and Biophysica Acta* **827(1)**:36-44.

Tian, A. G.; Wang, J.; Cui, P.; Han, Y. J.; Xu, H.; Cong, L. J.; Huang, X. G.; Wang, X. L.; Jiao, Y. Z.; Wan, B. J.; Wang, Y. J.; Zhang, J. S. e Chen, S.Y. (2004) Characterization of soybean genomic features by analysis of its expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* **108(5)**:903-13.

Tomaszewski, E. K.; Khalil, M. A. M.; El-Deeb, A. A.; Powers, T. O. e Starr, J.L. (1994) *Meloidogyne javanica* parasitic on peanut. *Journal of Nematology* **26**:436-441.

Tomkins, J. P., Yu, Y., Miller-Smith, H., Frisch, D. A., Woo, S. S. e Wing, R. A. (1999) A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* **99**:419-424.

Trudgill, D. L. (1991) Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* **29**:167-192.

Trudgill, D. L. e Blok, V. C. (2001) Apomitic, Polyphagous Root-Knot Nematodes: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **39**:53-77.

Uehara, T.; Sugiyama, S. e Masuta, C. (2007) Comparative serial analysis of gene expression of transcript profiles of tomato roots infected with cyst nematode. *Plant Molecular Biology* **63**:185–194.

Unsold, M.; Marienfeld, J. R.; Brandt, P. e Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics* **15**:57–61.

USDA (2006) http://www.pecad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/CommodityView.cfm?cropid=2221000&selected_year=2006&rankby=production.

Valls, J. F. M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: Bandel, G.; Aguiar-Perecin, M.L.R.; Oliveira, G.C.X. (Ed.). 17^o Encontro sobre temas de genética e melhoramento, “genômica: uma abordagem em plantas”, v.17. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, 2000, p.51.

Valls, J. F. M. e Simpson, C. E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: Kerridge, P.C.; Hardy, B. (Eds.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali: **CIAT**, 1994, p.1-18.

- Valls, J. F. M. e Simpson, C. E.** (2005) New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia* **14**:35-64.
- Van der Eycken, W.; De Almeida Engler, J.; Inze, D.; Van Montagu, M. e Gheysen, G.** (1996) A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. *Plant Journal* **9(1)**:45-54.
- Van der Hoorn, R. A. e Jones, J. D. G.** (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:400-407.
- Van der Vossen, E. A.; Van der Voort, J. N.; Kanyuka, K.; Bendahmane, A.; Sandbrink, H.; Baulcombe, D. C.; Bakker, J.; Stiekema, W. J. e 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 Kast, C. A. e Laten, H.** (1987) Cytokinin utilization by adenine requiring mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* **83**:726–727.
- Van Loon, L. C.; Rep, M. e Pieterse, C.M.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**:135-62.
- Vanhouten, W. e Mackensie, S.** (1999) Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Molecular Biology* **40**:977-983.
- Venter, J. C.; Smith, H. O. e Hood L.** (1996) A new strategy for genome sequencing, *Nature* **381**: 364–366.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G. G., Kerlavage, A. R., Smith, H. O. e Hunkapiller, M.** (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science* **280**:1540-1542.
- Vilarinhos, A. D.; Piffanelli, P.; Lagoda, P.; Thibivilliers, S.; Sabau, X.; Carreel, F. e D'Hont, A.** (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla) *Theoretical and Applied Genetics* **106**:1102-1106.
- Voisin, R.; Rubio-Cabetas, M-J.; Minot, J-C. e Esmenjaud, D.** (1999) Penetration, Development and Emigration of Juveniles of the Nematode *Meloidogyne arenaria* in Myrobalan Plum (*Prunus cerasifera*) Clones Bearing the *Ma* Resistance Genes. *European Journal of Plant Pathology* **105(1)**:103-108.
- Vos, P.; Simons, G.; Jesse, T.; Wijbrandi, J.; Heinen, L.; Hogers, R.; Frijters, A.; Groenendijk, J.; Diergaarde, P.; Reijans, M.; Fierens-Onstenk, J.; de Both, M.; Peleman, J.; Liharska, T.; Hontelez, J. e Zabeau, M.** (1998) The tomato Mi-1

gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* **16(13)**:1315-1336.

Vrain, T. C. (1977) A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology* **9**:249-251.

Vrain, T. C. (1999) Engineering natural and synthetic resistance for nematode management. *Journal of Nematology* **31(4)**:424-436.

Waetzig, G. H.; Sobczak, M. e Grundler, F. M. W. (1999) Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* **1**:681–686.

Wan, J.; Dunning, F. M. e Bent, A. F. (2002) Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional and Integrative Genomics* **2(6)**:259-73.

Wang, K.-H.; Sipes, B. S. e Schmitt, D. P. (2002) *Crotalaria* as a cover crop for nematode management. *Nematropica* **32**:35-57.

Wang, J.; Potter, R. H. e Jones, M. G. K. (2003) Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica* *Molecular Plant Pathology* **4(5)**:361-371.

Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Van Onckelen, H e Schmülling, T. (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell* **15**:2532–2550.

Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M. e Schmülling, T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **8(18)**:10487-10492.

Wilkins, M. R.; Lindskog, I.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J. C.; Hochstrasser, D. F. e Appel, R. D. (1997) Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* **18(3-4)**:403-408.

Williamson, V. M. e Hussey, H. R. (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* **8**:1735-1745.

Williamson, V. M. e Gleason, C. A. (2003) Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:327-333.

Williamson, V. M. e Kumar, A. (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* **22(7)**:396-403.

- Wong, H. L.; Sakamoto, T.; Kawasaki, T.; Umemura, K. e Shimamoto, K.** (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* **135**:1447-1456.
- Woo, S-S.; Jiang, J.; Gill, B. S.; Paterson, A. H. e Wing, R. A.** (1994) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Research* **22**:4922-4931.
- Wynne, J. C.; Beute, M. K e Nigam, S. N.** (1991) Breeding for disease resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Annual Review of Phytopathology* **29**:279-303.
- Wyss, U.; Grundler, F. M. W. e Munch, A.** (1992) The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in root of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* **38**:98-111.
- Xiao, S.; Ellwood, S.; Calis, O.; Patrick, E.; Li, T.; Coleman, M. e Turner, J.G.** (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* **291**:118–120.
- Yaghoobi, J.; Yates, J. L. e Williamson, V. M.** (2005) Fine mapping of the nematode resistance gene *Mi-3* in *Solanum peruvianum* and construction of a *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. *Molecular Genetics and Genomics* **274**:60–69.
- Yang, S.; Yu, H.; Xu, Y. e Goh, C. J.** (2003a) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology* **51(2)**:237-248.
- Yang, S.; Yu, H.; Xu, Y. e Goh, C. J.** (2003b) Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCCKX1*. *FEBS Letters* **555(2)**:291-296.
- Yi, G.; Lee, J. M.; Lee, S.; Choi, D. e Kim, B-D.** (2006) Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* **114(1)**:113-130.
- Yin, H; Li, S.; Zhao, X.; Du, Y. e Ma X.** (2006) cDNA microarray analysis of gene expression in *Brassica napus* treated with oligochitosan elicitor. *Plant Physiology and Biochemistry* **44(11-12)**:910-6.
- Young, N. D.; Cannon, S. B.; Sato, S.; Kim, D.; Cook, D. R.; Town, C. D.; Roe, B. A. e Tabata, S.** (2005) Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **(137)**:1174–1181.
- Young, N. D.; Weeden, N. F. e Kochert, G.** (1996) Genome mapping in legumes (Family Fabaceae). In: A.H. Paterson (ed.). *Genome mapping in plants*. R.G. Landes, Austin, TX.

- Yu, C. K. Y.; Springob, K.; Schmidt, J.; Nicholson, R. L.; Chu, I. K. e Lo, C.** (2005) A stilbene synthase gene (SbSTS1) is involved in host and non-host defense responses in sorghum. *Plant Physiology* **138**:393–401.
- Yu, J.; Hu, S.; Wang, J.; Wong, G. K.; Li, S.; Liu, B.; Deng, Y.; Dai, L.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Cao, M.; Liu, J.; Sun, J.; Tang, J.; Chen, Y.; Huang, X.; Lin, W.; Ye, C.; Tong, W.; et al.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296(5565)**:79-92.
- Yüksel, B.; Estill, J. C.; Schulze, S. R. e Paterson, A. H.** (2005) Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut. *Molecular Genetics and Genomics* **274(3)**:248-263.
- Yüksel, B. e Paterson, A. H.** (2005) Construction and characterization of a peanut *HindIII* BAC library. *Theoretical and Applied Genetics* **111**:630-639.
- Zacheo, G. e Bleve-Zacheo, T.** (1988) Involvement of superoxide dismutases and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**: 313–322.
- Zafar, N.; Mazumder, R. e Seto, D.** (2002) *BMC Bioinformatics* **3 (1)**:12.
- Zhang, H. B; Choi, S.; Woo, S-S.; Li, Z. e Wing, R. A.** (1996) Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Molecular Breeding* **2**:11-24.
- Zhang, H. B.; Zhao, X.; Ding, X.; Paterson, A. H. e Wing, R. A.** (1995) Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *The Plant Journal* **7**:175-184.
- Zhang, H.-H. e Wu, C.** (2001) BAC as tools for genome sequencing. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**:195–209.
- Zhang, H.; Sreenivasulu, N.; Weschke, W.; Stein, N.; Rudd, S.; Radchuk, V.; Potokina, E.; Scholz, U.; Schweizer, P.; Zierold, U.; Langridge, P.; Varshney, R. K.; Wobus, U. e Graner, A.** (2004) Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. *The Plant Journal* **40(2)**:276-290.
- Zhang, H. B. e Wu, C.** (2001) BAC as tools for genome sequencing. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**:195-209.
- Zhang, K.; Qian, Q.; Huang, Z.; Wang, Y.; Li, M.; Hong, L.; Zeng, D.; Gu, M.; Chu, C. e Cheng, Z.** (2006). Gold Hull and Internode2 encodes a primarily multifunctional cinnamyl-alcohol dehydrogenase in rice. *Plant Physiology* **140**:972–983.

Zhang, R.; Zhang, X.; Wang, J.; Letham, D. S.; McKinney, S. A. e Higgins, T. J. V. (1995) The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. *Planta* **196**:84-94.

Zhou, G. K.; Xu, Y. F. e Liu, J. Y. (2005) Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *Journal of Plant Physiology* **162**:686-696.

ANEXO I

(Artigo em preparação)

Post-Infection Development and Histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp.

Karina Proite^{1,2§}, Regina M.D.G. Carneiro², Rosana Falcão², Ana Cristina M. Gomes², Soraya C.M. Leal-Bertioli², Patrícia M. Guimarães², David J. Bertioli³

§ Corresponding author

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus I, Brasília, DF, Brazil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Final W5 Norte, CP 02372, Brasília-DF, Brazil.

³Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação, Campus II, SGAN 916, Brasília, DF, Brazil.

E-mail addresses:

KP: proite@cenargen.embrapa.br

RMDGC: recar@cenargen.embrapa.br

RF: falcao@cenargen.embrapa.br

ACMG: anagomes@cenargen.embrapa.br

SCML: soraya@cenargen.embrapa.br

PMG: messenbe@cenargen.embrapa.br

DJB: david@pos.ucb.br

Abstract

The reproductive behaviour of the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* race 1 was compared on two wild species of *Arachis* (*A. duranensis* and *A. stenosperma*) and cultivated peanut (*A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST). The three species were considered moderately susceptible, resistant, and susceptible respectively. Penetration and development of the root-knot nematode in the resistant species was reduced in comparison with susceptible plants. Several cell features, including dark-blue cytoplasm and altered organelle structure were observed in the central cylinder of *A. stenosperma*, indicating a hypersensitive response (HR) of the infested host cells. Neither giant cells, nor nematodes developed beyond the second-stage were found on *A. stenosperma*. *A. duranensis* showed a delay in the development of nematodes in the roots compared to *A. hypogaea*. The two wild peanut species were chosen to be the contrasting parents of a segregating population for mapping and further investigation of resistance genes.

Keywords: *Arachis* spp., *Meloidogyne arenaria*, hypersensitive response, resistance.

Introduction

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are sedentary endoparasites that have very complex biotrophic relationships with their host plants. Second-stage juveniles (J2) invade roots in the zone of elongation and then migrate intercellularly and establish a feeding site in the zone of differentiation of the vascular cylinder (Wyss *et al.*, 1992; Williamson and Hussey, 1996). *Meloidogyne arenaria* race 1 (Neal) Chitwood (Koenning and Barker, 1992; McSorley *et al.*, 1992); *M. hapla* Chitwood (Culbreath *et al.*, 1992; Schmitt *et al.*, 1998); *M. javanica* (Treb) Chitwood (Tomaszewski *et al.*, 1994) and *M. haplanaria* (Eisenback *et al.*, 2003) are the four described *Meloidogyne* species that parasitise cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). The most damaging

nematode species for peanut in the United States is *M. arenaria* race 1. Losses to this nematode can exceed 50 % in severely infested fields (McSorley *et al.*, 1992).

Control of root-knot nematodes is difficult, soil nematicides are costly, not always effective and they are detrimental to the environment and human health (Bird and Kaloshian, 2003). Because of this, plant resistance is currently considered as the method of choice for controlling root-knot nematodes. Resistance to *M. arenaria* race 1, *M. javanica* and *M. hapla* has been observed in many wild species of peanut (Banks, 1969; Nelson *et al.*, 1989; Holbrook and Noe, 1990; Sharma *et al.*, 1999). The most damaging of these four species is the peanut root-knot nematode *M. arenaria* race 1. Resistance against this nematode has been characterized for two wild species, *A. cardenasii* and *A. batizocoi*. The first one, completely inhibits nematode development and resistance was accompanied by a hypersensitive host reaction (Nelson *et al.*, 1990). The second one, caused a reduction in the total number of invading nematodes that reached maturity and produced eggs, and increased the time required for *M. arenaria* to complete its life cycle. No hypersensitive reaction associated with this resistance was observed (Nelson *et al.*, 1990). Both species were used to generate resistant *A. hypogaea* cultivars COAN and NemaTAM by a backcross introgression pathway (Simpson, 1991) involving a complex interspecific amphiploid hybrid (Simpson *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2003).

In order to identify and characterize new sources of resistance, and to identify contrasting parents that would be suitable for the construction of a population and genetic mapping, an initial screening of a number of wild *Arachis* spp. resistant to *M. arenaria* race 1 was done using plants of the *Arachis* Germoplasm Bank of EMBRAPA, Brazil. *A. stenosperma* accession V10309 and *A. duranensis* accession K7988 were found to be resistant and susceptible parents, respectively. The objectives of the present work were: i) to confirm the resistance or susceptibility of *A. stenosperma* accession V10309 and *A. duranensis* accession K7988, using *A. hypogaea* as a control for susceptibility; ii) to examine the interaction of *M. arenaria* race 1 with *A. stenosperma*, *A. duranensis* and *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST, to determine when and how resistance is expressed; iii) understand resistance mechanisms to *M. arenaria*

race 1 comparing histological responses of the resistant and susceptible *Arachis* spp.

Materials and Methods

Nematode and Inoculum preparation

All experiments were conducted at the Quarantine of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology and with *M. arenaria* race 1 isolate from peanut, kindly provided by Dr. D. W. Dickson (University of Florida, Gainesville, USA). To confirm the identification, an electrophoresis was conducted (Carneiro and Almeida, 2001) and the esterase phenotype A2 was confirmed. Nematodes were multiplied alternately on peanut (*Arachis hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST) and tomato (*Solanum esculentum* cv. Santa Cruz). Eggs were extracted from infected roots using 0,5% NaOCl (Hussey and Barker, 1973). Second-stage juveniles (J2) were collected from the roots and eggs suspension, using modified Baermann funnels. Eggs or freshly hatched J2 were collected by centrifugation and counted using Peter's slides under a light microscope (Vrain, 1977).

Nematode reproductive behaviour

Two wild species of *Arachis* (*A. stenosperma* accession V10309 and *A. duranensis* accession K7988) were evaluated under greenhouse conditions (25 - 30 °C) for resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. The susceptible commercial *A. hypogaea* variety Tatu was used as control. Plants were grown from seed in plastic pots (3000 cm³ volume) containing a moist, steam-sterilized soil (85 % sand, 10 % of silt and 5% of clay). When plants were four weeks-old, they were inoculated with 10,000 eggs/plant (Pi=initial inoculum level), extracted from infected tomatoes, using 0.5 % of NaOCl solution following Hussey and Barker's method (1973), but using a mixer instead of manual agitation. Nematode eggs were introduced into 3-cm-deep holes around the collar region of the plant.

The pots were arranged in a complete randomised block design with 8 replications. Seventy five days after plant inoculation (DAI), the different treatments were evaluated by extracting eggs and J2 from the entire root system, using 1% of NaOCl. The final population density (Pf) was quantified using a Peters slide under the microscope and the nematode reproductive factor (RF= Pf/Pi) was calculated (Oostenbrink, 1966). Averages of reproduction factors were compared by the Tukey test with significant difference at the 5% probability level. We considered treatments with RF < 1.00 as resistant to *Meloidogyne* spp.

Histopathological studies

Fifteen seedlings with two replicates of each *Arachis* species were transplanted to 200 cm³ plastic cups containing a sterilized mixture of 2 parts of peat and 1 part of fine sand. Two week old plants with six to eight expanded leaves were inoculated with 5,000 J2/plant. Distilled water without nematodes was added in control plants. Roots were removed from the cups and carefully washed at the following sampling times: 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 32, 48 and 63 days after inoculation (DAI). Several root tips (1-3 cm segments) were analysed using stereomicroscopy and light microscopy (Axiophoto, Zeiss) using the technique for clearing (NaOCl) and staining (acid fuchsin) plant tissues described by Byrds et al. (1983). This technique was used to facilitate localisation of the infection sites. For fine cuttings, root-tips with swellings were excised and fixed in 2% glutaraldehyde in 0,1 M sodium cacodylate buffer pH 7,0 at 4 °C for 48 hours. They were rinsed three times for ten minutes in 0,1 M sodium cacodylate buffer pH 7,0, post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0,1 M sodium cacodylate buffer pH 7,0 for two hours and rinsed again in the same buffer three times for five minutes each. After dehydration in a graded series of ethanol (20% to 100%) followed by two additional steps in absolute ethanol, samples were infiltrated with increasing volumes of Spurr's resin in a constant volume of 100% ethanol for 4-6 h (1V:3V; 2V:3V; 3V:3V; 4V:3V) and polymerized at 70 °C for 24 h. Embedded tissues were cut into 0.5-1.4-µm-thick sections with an ultramicrotome and the sections were placed on glass slides, stained with

toluidine blue (1% (w/v) in borax, pH 8.9). The sections were examined with the light microscope (Axiophoto, Zeiss).

Results

Reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp.

The reproductive behaviour (RF) of *M. arenaria* race 1 after 120 DAI (Table 1) in three species of *Arachis* showed that the control *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST was considered susceptible (RF=16.4), *A. duranensis*, (K7988) moderately susceptible (RF= 3.5) and *A. stenosperma* (V10309) highly resistant or immune (RF=0). These results fit well with the objective to find among the wild species contrasting in their response to challenge with nematodes.

Histological observations of infected susceptible *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST and *A. duranensis* K7988

At 3-8 DAI macroscopic observation of cleared root stained with acid fuchsin revealed that many J2s had successfully penetrated roots through the apical region in both species. Many J2s entered into the roots and migrated in groups through the cortex (Fig 1a and 1b). Penetration features were still observed until 11 days. At 9 DAI swollen J2/J3 were observed in the vascular cylinder initiating the establishment of the feeding site. At 11-13 DAI, infected roots began to enlarge in both peanut species and we could observe J3 in *A. duranensis* with slightly swollen roots (Fig 1c) and J3-J4 in *A. hypogaea* roots forming large galls at the nematode infection sites (Fig 1d). At 15-19 DAI, macroscopic observation showed that in both species feeding sites had already been established. At 32 and 48 DAI females with egg-masses were observed in *A. hypogaea*, while at 63 DAI, in *A. duranensis*' roots, we still observed a globose female (Figs 1e and 1f). The development of *M. arenaria* race 1 in *A. hypogaea* roots was faster than in *A. duranensis*.

Microscopic analysis showed clearly the delay in nematode development in the moderately susceptible wild species, *A. duranensis*, compared to the susceptible cultivated peanut. In both species, nematodes were localised close to vessels indicated that the formation of galls was initiated in weakly differentiated parenchyma cells. *A. hypogaea* host cells in front of the nematode head began to increase in size at 8 DAI (Fig 2a), predicting their final step of differentiation to giant cells. The giant cells formed feeding sites with a regular oval shape, each one containing one large vacuole, several small vacuoles and some small nuclei (three to nine per giant cell) at 16 DAI (Fig 2b) and at 19 DAI (Fig 2c). However, it was only at 16 DAI, that we could observe nematodes beginning to induce the formation of giant cells in *A. duranensis*. At 16 DAI the cell wall was beginning to undergo a thickening process and to form ingrowths (Fig 2d). At 19 DAI we could observe induced giant cells with many vacuoles (Fig 2e) and at 32 DAI well developed giant cells. These giant cells in *A. duranensis* also presented an oval shape and multiple nuclei (Fig 2f). Nematodes induced more giant cells, eight to ten each, in *A. duranensis* and four to six each in *A. hypogaea*.

Histopathological observations of resistant wild peanut, *A. stenosperma* V10309 challenged roots

At 3-9 DAI macroscopic observation revealed a much reduced number of J2 in the sub-apical region (Fig 1g) compared with the distribution of nematodes in infected susceptible roots. Nematodes were observed at the root surface with their heads located in the first cell layers, indicating that penetration was in progress until 17 and 19 DAI (Figs 1h and 1i). Close to the head region of nematodes localised inside the vascular cylinder of the roots, host cells stained with acid fuchsin showed a dark yellow-brown stained color, indicating that when J2 nematodes (colored in pink) tried to induce a feeding site, a hypersensitive reaction (HR) occurred (Fig 1h). The J2s at these sites of necrosis were brown, indicating that they had died, it is possible that the whole region around the nematode was oxidizing (Fig 1i). Macroscopic examination at 8 -19 DAI, demonstrated that J2s took about this time to penetrate and migrate from the root tip through cortex into developing vascular cylinder. The HR never occurred in

the cortex region in the beginning of invasion. Every J2 found in the vascular cylinder were associated with a hypersensitive reaction.

Microscopic analysis at 8 DAI showed J2 in the vascular cylinder. Close to the anterior portion of nematode, host cells showed a dark-blue-stained and collapsed cytoplasm in which nuclei were not visible (Fig 2g). Most of the nematodes observed also displayed a disorganized cellular content showing accumulation of dark-blue stained material (data not shown). Observations by thin sections showed J2s in the epidermis, cortex and vascular region and embedded tissue stained with toluidine blue showed dark blue coloration at the necrosis sites (Fig 2h). No swollen nematodes or feeding sites were established in infected roots and consequently no giant cell was induced at any time sample analysed. We neither observed hypertrophy of the tissue or hyperplasia of the cells. The hypersensitive reaction occurred around the cells of the nematode head in the vascular cylinder and never in cortex or epidermis, even through its pathway to vessels (Fig 2i). We did not find any nematode beyond 19 DAI although the root system analysed at 32-63 DAI showed some degraded and necrotic roots.

Discussion

Here we present a time course histological study of the development of the infective cycle of *M. arenaria* race 1 on roots of two wild species of peanut, *A. stenosperma* and *A. duranensis* and the cultivated peanut, *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST. Firstly this work aimed to confirm contrasting genotypes between two wild *Arachis* species (*A. stenosperma* and *A. duranensis*) with regard to *M. arenaria* race 1 resistance and to compare them with the commercial *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST. Secondly we compared the root-knot nematode penetration and subsequent development in these peanut species.

A. hypogaea cv. IAC-Tatu-ST is one of the most traditional cultivated peanut varieties in Brazil and it was chosen as a susceptible control for *M. arenaria* race 1. Considering the reproduction factor (RF), this data showed that the Brazilian commercial peanut (RF=16.4) presented similar RF to the American

commercial variety Florunner (RF=15.496), one of most cultivated peanuts in the U.S.A. (Holbrook *et al.*, 2000).

Although *A. duranensis* K7988 had inferior reproduction factor (RF=3.5) than *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST, it was considered susceptible: according to the Oostenbrink or Hussey and Janssen (2002) concepts: only plants with RF<1 or <10% of the replication in the susceptible genotype, respectively, are considered to be resistant. We demonstrated that *A. stenosperma* V10309 has high level of resistance (immunity) showing no nematode reproduction (RF=0) (Table1).

Second stage juveniles of *M. arenaria* race 1 penetrated roots of the susceptible wild species *A. duranensis*, established the feeding sites and induced giant cells in the same way as the cultivated species. Nevertheless, there were some differences: (i) 32 DAI for a complete life cycle in *A. hypogaea*, and over 63 DAI in *A. duranensis*; (ii) galls were small in *A. duranensis* and large in *A. hypogaea* and (iii) giant cells were larger in *A. duranensis* (8-10).

Our data suggested that *A. stenosperma* has at least two kinds of resistance to *M. arenaria* race 1. One kind of resistance suppressed nematode penetration by J2 and the other kind blocked development after penetration. Plant resistance can occur at several levels. Failure of J2 to penetrate the resistant *A. stenosperma* may indicate physical or chemical root barriers. Such barriers were suggested previously for resistant grape rootstock (Anward and McKerry, 2000; Ferris *et al.*, 1982), cotton (Anward *et al.*, 1994), soybean (Dropkin and Nelson, 1960), pepper (Pegard *et al.*, 2005) and coffee cultivars (Anthony *et al.*, 2005). It also may indicate that the roots did not attract or perhaps even repelled the J2s, or that J2s penetrated and then left the roots. Such protection has been shown for *Curcumis sativus* where a triterpene, curcubitacin that repelled *Meloidogyne* J2 was isolated from root exudates (Hayene and Jones, 1976). Similarly, amino acids exuded from *Sesamun indicum* roots have a nematostatic effect on *Meloidogyne* J2 (Tanda *et al.*, 1989).

Some authors reported no differences in nematode penetration, between susceptible and resistant roots, for instance of two wild *Arachis*, *A. cardenasii* and *A. batizocoi*, both resistant to *M. arenaria* (Nelson *et al.*, 1990). This was also observed in soybean, *Glycine max* (Herman *et al.*, 1991) and on common bean, *Phaseolus vulgaris*, (Sydenham *et al.*, 1996),

Moreover, in the resistant species *A. stenosperma*, the J2s that did not penetrate remained vermiform and clustered in vascular cylinder cells. No development, no galling and no egg masses were observed. This suggested that this wild peanut also has a very active post-penetration biochemical defense mechanism which blocked nematode development and reproduction. The post-penetration response of the incompatible *A. stenosperma* roots was considered a classical HR. This HR occurred after 8-19 DAI. There are many reports in other plants that show HR is responsible for resistance to nematodes, for instance in tomato (Dropkin, 1969), tobacco (Ghannam *et al.*, 2005), coffee (Rodrigues *et al.*, 2000, Anthony *et al.*, 2005), and pepper (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, Pegard *et al.*, 2005). The time that HR occurs differs between plants, for some it occurs hours after penetration, and others only after days. Researchers have proposed that early HR occurring in the outer tissues of the root (i.e., the epidermis and root cortex) and immediately after penetration 12h-48h, would be relatively easily overcome by newly virulent nematodes (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, Castagnone-Sereno *et al.*, 2001). Instead, if the HR occurs later and deeper in the root (i.e. close to or within the vascular cylinder) this would irreversibly block any further nematode development, thus making selection of new virulent genotypes less likely. The hypersensitive response was also the mechanism of nematode resistance for the wild *A. cardenasii* (Nelson *et al.*, 1990), and similarly to *A. stenosperma*, its reaction was a late HR, occurring after 7 days post inoculation..

In order to enable the mapping of the genes responsible for nematode resistance, *A. stenosperma* and *A. duranensis* were used as resistant and susceptible parentals to produce a segregating F2/F3 population. This population was used to make the first microsatellite-based genetic map in *Arachis* (Moretzsohn *et al.*, 2005). Bioassays in F3 will allow the mapping of the resistance genes, although these bioassays have not yet been done because of the difficulties doing a large bioassay in quarantine conditions. In a parallel approach to identify genes that are responsive to nematode challenge ESTs have been generated from inoculated and control roots of *A. stenosperma* (Proite *et al.*, 2007). An analysis of the genes expressed in control and inoculated roots will be published elsewhere.

References

- Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M. and Nicole, M. Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54:476-482.
- Anwar, S.A. and KcKenry, M.V. 2002. Developmental Response of a Resistance-Breaking Population of *Meloidogyne arenaria* on *Vitis* spp. *Journal of Nematology* 34(1):28-33.
- Anward, S. A., Trudgill, D.L. and Philipps, M.S. 1994. The contribution of variation in invasion and development rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. *Nematologica* 40:579-586.
- Banks, D.J. 1969. Breeding for northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*, resistance in peanuts. *Journal of American Peanut Educational and Research Society* 13:78-80.
- Bird, McK.D. and Kaloshian, I. 2003. Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:115-123.
- Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M., Melillo, M.T., Castagnone-Sereno, P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science* 133:79-90.
- Byrd, D.W.; Kirkpatrick, T. and Barker, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1):142-143.
- Carneiro, R.M.D.G. and Almeida, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. and Djian-Caporalino, C. 2001. New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes *Me1* and *Me3* in pepper. *Plant Breeding* 120:429-433.
- Culbreath, A.K., Beute, M.K., Shew, B.B. and Barker, K.R. 1992. Effects of *Meloidogyne hapla* and *M. arenaria* on black rot severity in new *Cylindrocaldium*-resistant peanut genotypes. *Plant Diseases* 76:352-357.
- Dropkin, V.H. 1969. Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review of Phytopathology* 7:101-122.
- Dropkin, V. H. and Nelson, P.E. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50:442-447.

- Eisenback, J.D., Bernard, E.C., Starr, J.L., Lee, T.A. and Tomaszewski, E.K. 2003. *Meloidogyne haplanaria* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a Root-knot Nematode Parasitizing Peanut in Texas. *Journal of Nematology* 35(4):395-403.
- Ghannam, A., Jacques, A., De Ruffray, P., Baillieul, F. and Kauffmann, S. 2005. Identification of tobacco ESTs with a hypersensitive response (HR)-specific pattern of expression and likely involved in the induction of the HR and/or localized acquired resistance (LAR). *Plant Physiology and Biochemistry* 43:249-259.
- Hayene, R.L. and Jones, C.M. 1976. Effects of Bi locus in cucumber on reproduction, attraction and response of the plant to the southern root-knot nematode. *Journal of American Society of Horticulture and Science* 101: 422-424.
- Holbrook, C.C. e Noe, J.P. 1990. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* sp. and implications on development of resistant peanut cultivars. *Peanut Science* 17:35-38.
- Hussey, R.S. and Barker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57:1025-1028.
- Hussey, R.S. and Janssen, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. Pp. 43-69 in J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge, eds. *Plant resistance to parasitic nematodes*. Egham, UK:CABI Publishing.
- Koenning, S.R. and Barker, K.R. 1992. Relative Damage Functions and Reproductive Potentials of *Meloidogyne arenaria* and *M. hapla* on Peanut. *Journal of Nematology* 24(1):187-192.
- McSorley, R., Dickson, D.W., Candeanedo-Lay, E.M.; Hewlett, T.E. and Frederick, J.J. 1992. Damage functions for *Meloidogyne arenaria* on peanut. *Journal of Nematology* 4:193-198.
- Moretzsohn, M.C., Leoi, L., Proite, K., Guimaraes, P.M., Leal-Bertioli, S.C., Gimenes, M.A., Martins, W.S., Valls, J.F., Grattapaglia, D. and Bertioli, D.J. 2005. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor. Appl. Genet.* 111(6):1060-1071.
- Nelson, S.C.; Simpson, C.E. e Starr, J.L. 1989. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. *Germoplasm. Supplement to Journal of Nematology* 21(4S):654-660.
- Nelson, S.C.; Starr, J.L. e Simpson, C.E. 1990. Expression of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. *Journal of Nematology* 22(2):242-244.
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Meded Landbouw. Wageningen*, 66:1-46.

- Pegard, A, Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O, Abad, P. and Djian-Caporalino, C. 2005. Histological Characterization of Resistance to Different Root-Knot Nematode Species Related to Phenolics Accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Proite, K.; Leal-Bertioli, S.C.; Bertioli, D.J.; Moretzsohn, M.C.; da Silva, F.R.; Martins, N.F. and Guimarães, P.M. 2007. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology* Feb 15;7:7.
- Rodrigues, A.C.F. de O., Abrantes, I.M.de O., Melillo, M.T. and Bleve-Zacheo, T. 2000. Ultrastructural Response of Coffee Roots to Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica* 30(2):201-210.
- Schmitt, D.P. and Barker, K.R. 1998. Incidence of plant-parasitic nematodes in the coastal plain of North Carolina. *Plant Disease* 72:107-110.
- Sharma, S.B., Ansari, M.A., Varaprasad, K.S., Singh, A.K., and Reddy, L.J. 1999. Resistance to *Meloidogyne javanica* in wild *Arachis* species. *Genetic Resources and Crop Evolutio* 46:557-568.
- Simpson, C.E. 1991. Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science* 18:22-26.
- Simpson, C.E., Starr, J.L. 2001. Registration of "COAN" Peanut. *Crop Science* 41:918.
- Simpson, C.E. and Starr, J.L., Church, G.T., Burow, M.D. and Paterson, A.H. 2003. Registration of "NemaTAM" Peanut. *Crop Science* 43:1561.
- Stalker, H.T. 1984. Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* leafspot resistance for peanut improvement. *Euphytica* 33:529-538.
- Starr, J.L., Schuster, G.L. and Simpson, C.E. 1990. Characterization of the Resistance to *Meloidogyne arenaria* in an Interspecific, *Arachis* spp. Hybrid. *Peanut Science* 17:106-108.
- Sydenham, G.M., McSorley, R. and Dunn, R.A. 1996. Effects of resistance in *Phaseolus vulgaris* on development of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 28:485-491.
- Tanda, A.S., Atwal, A.S. and Bajaj, Y.P.S. (1989) In vitro inhibition of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Sesame root-exsudate and its amino acids. *Nematologica*, 35:115-124.
- Tomaszewski, E.K.; Khalil, M.A.M.; El-Deeb, A.A.; Powers, T.O. and Starr, J.L. 1994. *Meloidogyne javanica* Parasitic on Peanut. *Journal of Nematology* 26(4):436-441.

- Vovlas, N., Rapoport, H.F., Díaz, R.M.J. and Castillo, P. 2005. Differences in Feeding Sites Induced by Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp., in Chickpea. *Phytopathology* 95:368-375.
- Vrain, T.C. 1977. A Technique for the Collection of Larvae of *Meloidogyne* spp. and a Comparison of Eggs and Larvae as Inocula. *Journal of Nematology* 9(3):249-251.
- Williamson, V.M. and Hussey, H.R. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant cell* 8:1735-1745.
- Williamson, V.M. and Gleason, C.A. 2003. Plant-Nematode Interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:327-333.
- Wynne, J.C. , Beute, M.K. and Nigam, S.N. 1991. Breeding for Disease Resistance in Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) *Annual Review Phytopathology* 29:279-303.
- Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Munch, A. 1992. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in root of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111.

Table 1- Reproduction of *M. arenaria* race 1 on *Arachis* spp. accessions in a greenhouse test.

<i>Arachis</i> spp.	Fresh weight/g	Root Nematodes/g fresh root weight	Reproduction Factor ^a
<i>A. stenosperma</i> (V10309)	8.7	0	0 c (R)
<i>A. duranensis</i> (K7988)	17.0	1781	3.5 b (MS)
<i>A. hypogaea</i> cv. IAC-Tatu- ST	11.7	13811	16.4 a (S)

^a numbers with different lower-case differ from one another by Tukey test at the level of 5 %. S = susceptible, MS = moderately susceptible, R = resistant.

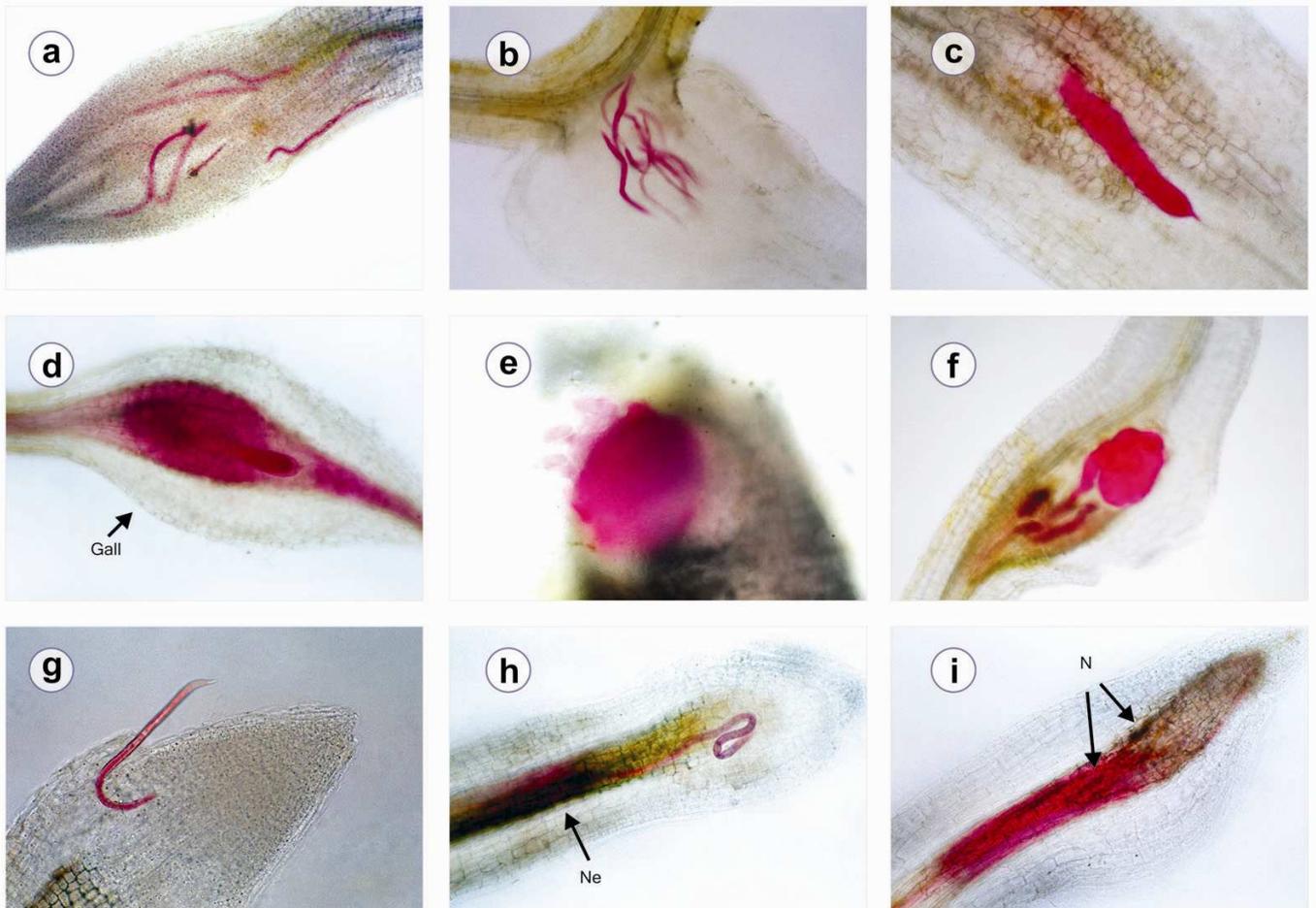


Figure 1- Acid fuchsin preparations of the development of *Meloidogyne. arenaria* on infected roots of cultivated peanut *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST, (b = 6 DAI; d = 11 DAI; e = 32 DAI), wild peanut *A. duranensis* accession K7988, (a = 8 DAI; c = 11 DAI; f = 63 DAI), and wild peanut *A. stenosperma* accession V10309, (g = 8 DAI; h = 17 DAI – Ne = Necrosis; i = 19 DAI- N - Nematode).

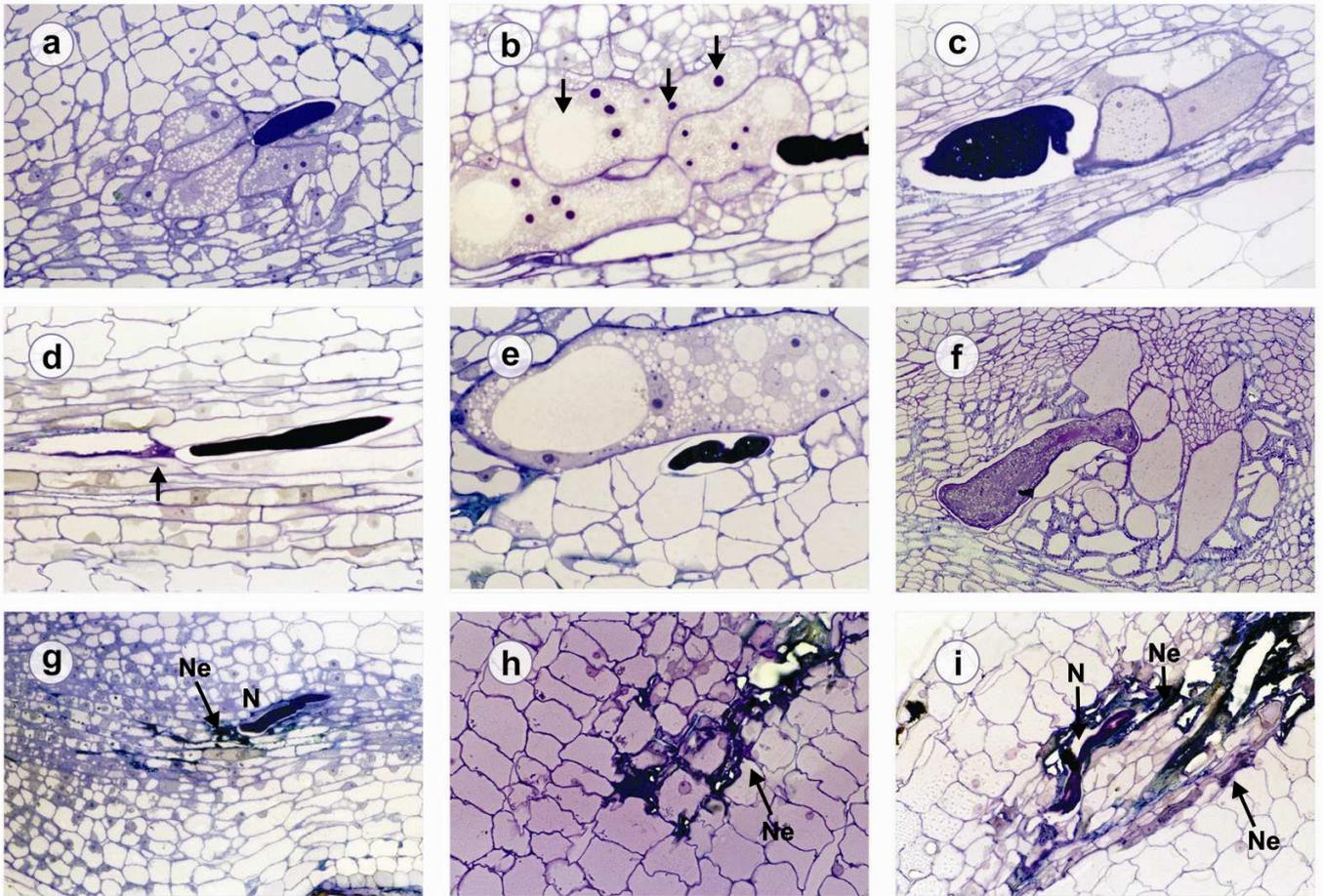


Figure 2- Longitudinal sections of infected roots of *Arachis hypogaea*, *A. duranensis* and *A. stenosperma* with *Meloidogyne arenaria* race 1. Sections were stained with toluidine blue and show the different timing through nematode infection process in the susceptible species *A. hypogaea* - **a**- 8 DAI, **b**- 16 DAI, (arrows show vacuoles and nucleoles) and **c**- 19 DAI -; *A. duranensis* -**d**- 16 DAI, (arrow shows thickening of the cell wall), **e**- 19 DAI and **f**- 32 DAI), *A. stenosperma* - **g**- 8 DAI, **h**- 16 DAI and **i**- 19 DAI- (N= Nematode and Ne = Necrosis – HR).

ANEXO II

Artigo publicado na revista Nucleic Acids Reserch:

Martins, W.; Sousa, D.; Proite, K.; Guimarães, P.M.; Moretzsohn, M.; Bertioli, D. New softwares for automated microsatellite marker development. **Nucleic Acids Research**, v.34, e31, 2006. doi:10.1093/nar/gnj030

ANEXO III

Artigo publicado na revista BMC Plant Biology:

Proite, K.; Leal-Bertioli, S.C.; Bertioli, D.J.; Moretzsohn, M.C.; da Silva, F.R.; Martins, N.F. and Guimarães, P.M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology** 2007 Feb 15; **7**:7.
doi:10.1186/1471-2229-7-7

Este artigo está disponível no endereço eletrônico:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/7/7>

ANEXO IV

Alinhamentos

Motivo 1

```

AsARP      1  MVLLLEKLDWDDVVAGPQPDRG-LGKLRKITTSQPLNIKAI---TSETDN--KYQRSMSMP
AhARP      1  MVLLLEKLDWDDVVAGPQPDRG-LGKLRKITTSQPLNIKAI---TSETDN--KYQRSMSMP
PaARP      1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
PvARP      1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
RpARP      1  MVLLLEKLDWDDVVAGPHPERG-LGKLRKLST-----NVKDE---GEGSKL--LNLSMPSTP
GmARP2     1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
PsDRM1     1  --MLDKLDWDDTVAGPQPERG-LEKLRKITT-----TLKDD--GASNOL--MR--STSIP
PtARP      1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
EoARP      1  MVLLLEKLDWDDVVAGPQPDRG-LGKLRKLSTTK-PLVIKAD---GEGESS--KYQRSISMP
MeARP      1  -MLLDKLDWDDVVAGPQPDRG-LGKLRKLSTTK-PLTIG---GGETS--KFQRSISMP
SaR5       1  MVLLDKLDWDDTVAGPQPERG-LGMLRKVPQ-PLNLKD---EGESS--KITMP
MaARP      1  MVLLLEKLDWDDTVAGPQPERG-LGRLRKVSPR-PLNAKEG---EGESS--KLAMP
SeARP      1  MVLIIDKLWDDVMAGPSPDKG-LGKLRKSLTIQTG---GES-EGESS--KYQRSISMP
SvARP      1  MVLIIDKLWDDVMAGPSPDKG-LGKLRKSLTVQTA---GESSGEGSS--KYQRSISMP
CaARP2     1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
CiARP      1  --MLEKLDWDDVVAGPQPDRG-LGRLRKITTTPLA---VKEVFEAESSSGKFORSISMP
GhARP      1  MVLLDKLDWDDVVAGPQPDRG-LGSLRKITTQPLS---IKDEGERKK---YQRSISLP
ClARP      1  MVLIIDKLWDDVAAGPQPDHG-LAQLRKVFVTPPKVV---TGESGGKF---FORSISMS
HaARP      1  -----MWDEVVAGPEPDHG-LTNLRRVSTMSEK---GGEGSSSSK---FQKSLSMP
CofaARP    1  MVLIIDKLWDDVIAGPQPERG-LGKLRKLPTQPLNVKTDGGAGEASSSK---YQRSMSMP
EuARP      1  MVLLDKLDWDDVAAGPQPESG-LGRLRKVITKPSALN---IKDVEGST---LQKSMSMP
BoARP      1  -----MWDETVAGPKPEHG-LGRLRNKINAQPIDIKGV---GEGSSSSSK---FQKSLSMP
AtARP4     1  -----MWDETVAGPKPEHG-LGRLRNKITTQPLDIK---GEGSSSSSKTVA---
AtARP1     1  MVLLLEKLDWDDVVAGPQPDRG-LGRLR-KITTQPINIRDI---GEGSSSSSKVVMHRSLTMP
AtARP5     1  MGVLENLWDDVVAGPRPEAGRGHLRRISTSLTSLN---NTTEG---MSVA
SaARP      1  -MLEKLDWDDVVAGPHPETG-LEKLRKATTARPLVID---KEADAGAAAGSYKRTQSMP
ZmARP      1  -MLDKLDWDDVVAGPRPETG-LEKLRKATTARPLVIN---KDADG---GSYKRAQSMP
CiaARP     1  MGLLDQLWDDTVAGPRPENGLGKLRK---HNTFAS---RSTSGK
PsDRM3     1  MGLLDQLWDDTVAGPRPENGLGKLRK---HNTFAA---RSSSSGK
LsARP      1  MSLLDHLGDDTVAGPMPENGLGKLRK---HPSLPS---RSISSDK
GmARP1     1  -----MWDVVAGPQPERG-XGKLRKISTR-PLDIKDIDAGEGSSSVN--KFQRSMTMP
PsDRM4     1  MSLLDHLGDDTVAGPLPENGLGKLRK---HPSLPS---RSISSDK
ParARP     1  MGLLDQLWDDTVAGPRPDIG-LGKLRK---HKTFSF---RSSSSAN
AtARP3     1  MGLLDHLGDDTVAGPRPENGLGKLRK---HHTFSF---RPSSSGN
CaARP1     1  MSLLDKLWDDTVAGPRPDSG-LGKLRKVFYLYSSSFKF---RQGNQK
PcARP      1  MGLLDKLWDDTVAGPRPENGLGKLRKT---GSAISA---MXSPSP
NtARP1     1  MGFLHHKLDWDDTVAGPAPDSG-LSKLRK---FNTFSG---RTASSP
AtARP2     1  MGFLHHKLDWDDTVAGPTPDNG-LGKLRK---HDSLST---VRSSSP
consensus  1  mvllldklwddvvagpqpperglgklrkittplik          gegss          yqrsmsmp

```

Motivo 2

```

AsARP      54 AT---PTTPGTPPTTPL---SATPRKPDNVWRSVFHFGSNSATKKTIGSDYFDKP-LPNSPT
AhARP      54 AT---PTTPGTPPTTPL---SATPRKPDNVWRSVFHFGSNSATKKTIGSDYFDKP-LPNSPT
PaARP      6  ST---PLTPTTPTTTPG---SG--RKA DNWRSVFHFGSNSATKKT LGAQMFDKP-LPNTTPT
PvARP      6  ST---PLTPTTPTTTPG---SG--RKA DNWRSVFHFGSNSATKKT LGAQMFDKP-LPNTTPT
RpARP      50 TT---PVTPTTPTTTPPL---SG--RKA DNWRSVFHFGSNSATKKT IGAQMFDKP-LPNTTPT
GmARP2     1  ---MTPTTPTTTPG---SA--RKA DNWRSVFHFGSNSATKKT IGAQMFDKP-LPNTTPT
PsDRM1     46 TT---PTTPVTPPTTTPS---SA--RKVDNVWRSVFHFGSNSATKKS IGAHVFDKP-LPNTTPT
PtARP      51 GT---PGTPTTPTVTPPT---TP-VSARSNVWRSVFHFGSNLATKN IGAHVFDKP-QPNTTPT
EoARP      53 TTPTTPTGTPATPTATPT---TPS SARKANWRSVFHFGSNLATKT IGAANYFDKP-QPNSPT
MeARP      50 AS---PGTPTTPTVTPPT---TPASVRKDNWRSVFHFGSNLATKGLGAQLFDKP-QPNSPT
SAR5       46 TT---PTTPVTPPTTPI---SA--R-KDNWRSVFHFGSNLSSKTMGNQVFDSP-QPNSPT
MaARP      48 MS---PGTPTGTPGTPTV---SA--RAKDNWRSVFHFGSNLASKSMGNQVFDKP-QPNSPT
SeARP      51 AS---PPTPGTPTVTPPTN---ISPTVRKENWRSVFHFGSNLATRR IGAEVFDKPSHPNAPT
SvARP      52 AS---PATPGTPTVTPPTN---ISPTVRKENWRSVFHFGSNLATKR IGAEVFDKPSHPNAPT
CaARP2     3  AT---PPTPGTPTVTPPTN---ISPTVRKENWRSVFHFGSNLATRR IGAEVFDKPSHPNAPT
CiARP      53 AS---PGA PSTPTVTPPT---TPLSARKDNWRSVFHFGSNLATRR IGAEVFDKPTHPNSPT
GhARP      51 NS---PVSGETPTVTPPT---TPTARKENWRSVFHFGSNLATKSI GSEVFDKP-QPNSPT
ClARP      53 AAT---PSTPGTPTTTPS---PT-ARKDNWRSVFHFGSNLATKGLGSAIFDKPEPN-SPT
HaARP      44 KS---PTTPGTPPTTTPS---PTAARKENWRSVFHFGSNLATKGI GSNYFDKPE TSKSPT
CofaARP    56 PSPATPATPGTPTTTPS---PTAARKENWRSVFHFGSNLATKGLGSDIFDKPQPN-SPT
EuARP      52 ASSVTPATPSTPAT---PGSARKENWRSVFHFGSNLATRGLGTEMFDKPSQPNSPT
BoARP      40 ---AVAGSPGTPTTTPG---SARKENWRSVFHFGSNLATRGMGTNIFDKPSHPNAPT
AtARP4     41 ---AVAGSPGTPTTTPG---SARKENWRSVFHFGSNLATRGMGTNIFDKPSHPNSPT
AtARP1     55 AA-VSPGTPTTPTTPT---TPRKDNWRSVFHFGSNLATRAIGSNIFDKPTHPNSPS
AtARP5     46 GSVSLPASPATPTVTPG---SGRKYVDWRSVFHFGSNTREIGANVFDKPSHPNSPT
SaARP      54 ST---PTTPVTPSSS---TTPPRGASNWRSVFHFGSNLATKSI GANIFDRP-QPNSPT
ZmARP      50 ST---PTTEVTPSSSSS---STTPRGA GNWRSVFHFGSNLATKGMGANIFDRP-QPNSPT
CiaARP     39 -EMETGIVRSYGEESL---EQVTRVTR---
PsDRM3     39 -ELEAGSVRSYGEESPS---EPATRVTRSIMIVKPPGYQS--GSPFAS PAGSVTPV
LsARP      39 -ESEGGNVRSYGVDSG---EGAVKVTRSIMIVKPPAGYQS-PSGSAPAS PAGSTPPL
GmARP1     1  ---MIVKPPGNQS-PSGSAPAS PAGSTPPV
PsDRM4     39 -ESEGGNVRSYGGDSL---EGAVKVTRSIMIVKPPAGYQS-PSGSAPAS PAGSTPPL
ParARP     39 GSSDGGNVGSYGEDST---EEATRVTRSIMIVKPPGYGSGNSGSPFIS PAGSTPPV
AtARP3     39 DQSEAGSARSYGEDSLP---EEAVKVTRSIMIIKPPGYQG--SSAPAS PAGSTPPL
CaARP1     43 FRHRDPSLKKAS---EDGMKVTRSIMIVKPPSGKSE---
PcARP      40 PEVEEGLXRLKERRASAXFXQLNDEAKQVTSITIMKPPGYLR---SLSLG-----
NtARP1     39 PPSFATLTPPLPPLLRISRYPGVLFQFSAVTLHVVAMLRLLILYLHLLRLLALQLP-
AtARP2     39 SLSSDQVTRSIMVTKGN---NNVRGLRKLKMDPDSPTCS---SNPGLTPTPGLPC
consensus  61 at  pgtpgtpttps  s  srrkdnwrsvfhfgsnlatkktigaqmfdkp  pnspt

```

```

AsARP      107  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
AhARP      107  VYDW  -----L Y S G E T R S K H-----
PaARP      57   VYDW  -----L Y S G K T R S S H R-----
PvARP      57   VYDW  -----L Y S G E T R S S H R-----
RpARP      101  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
GmARP2     49   VYDW  -----L Y S G E T R S R H R-----
PsDRM1     97   VYDW  -----M Y S G D T R S K H R-----
PtARP     103  VYDW  -----M Y S G E T K S E H R-----
EoARP     109  VYDW  -----L Y S G E T R S N H R-----
MeARP     103  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
SAR5       96   VYDW  -----M Y S G E T R S K H H R-----
MaARP      99   VYDW  -----L Y S G E T R S K H H R-----
SeARP     106  VYDW  -----L Y S G N T R S K H H E K C-----
SvARP     107  VYDW  -----L Y S G N T R S K H H E K L-----
CaARP2     58   VYDW  -----L Y S G N T R S K H H E K S-----
CiARP     107  VYDW  -----L Y S G E T R S K H H H-----
GhARP     103  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
ClARP     105  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
HaARP      97   VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
CofaARP    111  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
EuARP     106  VYDW  -----L Y S G E T R S K H R-----
BoARP      91   VYDW  -----L Y S D D T R S Q H R-----
AtARP4     92   VYDW  -----L Y S D D T R S K H R-----
AtARP1    108  VYDC  -----V D N E A Q R K E H V A L C L V G A W I K-----
AtARP5    100  VYDW  -----M Y S N E T R S K H R-----
SaARP     106  VYDW  -----L Y S D E T R S N H R-----
ZmARP     104  VYDW  -----L Y S D E T R S N H R-----
CiaARP
PsDRM3     88   SPFS  -----G T R E S F R F R R R S A S D A F E K-----KNQDRSSSSSPFDV
LsARP     90   SPFS  -----G A R E P F R F R R R S I S D A Y E S E I K T G Q N--RPSSSSPFDV
GmARP1     27   SPFS  -----G A R E S F R F R R R S T S D A Y E--K T G Q N--R S S S S P F D V
PsDRM4     90   SPFS  -----G A R E P F R F R R R S I S D A Y E S E V K T G Q N--RPSSSSPFDV
ParARP     92   SPFS  -----G G S S M G R F R R R S A S D A Y E K A S Q V G G G A R S S P R S P F D V
AtARP3     90   SPFS  P P L S P F S A N A G G K E P F R F R R R S T S D A F E K A A G G S E T G P R S S P P T -Y G M
CaARP1
PcARP
NtARP1     98   ----  -----H L H Q V Q H G G I I K S N Q K E K Q T G N D L Q T M I G S Y----
AtARP2     89  YALG  -----P F T A C K I P S S G E D D A A S L T T Y E W I V I N A L D R-
consensus  121  vydw  -----l y s g e t r s k h r-----

```

Figura 1- Alinhamento múltiplo de AsARP e outras proteínas da família ARP/DRM identificadas anteriormente. O alinhamento das seqüências e os resíduos conservados foram realizados utilizando-se os programas CLUSTAL W. e BOXSHADE Os resíduos idênticos estão na caixa preta. As proteínas da família ARP/DRM usadas neste alinhamento e seu número no GenBank são: AsARP, *A. stenosperma* (este estudo, EH046598); AhARP, *A. hypogaea* (39877909); PaARP, *P. acutifolius* (CX129764); PvARP, *P. vulgaris* (42575416); RpARP, *R.pseudoacacia* (AY009094, Park e Han, 2003); GmARP2, *Glycine max* (BU547869); PsDRM1, *P.sativum* (AF029242; Stafstrom *et al.*, 1998); SaARP, *Saccharum officinarum* (CA127125, Rocha *et al.*, 2007); EoARP, *Elaeis oleifera* (45325591); PtARP, *Populus trichocarpa x Populus deltóides* (CA823076, Kohler *et al.*, 2003); SAR5, *Fragaria ananassa* (FRRARP, Reddy e Poovaiyah, 1990); GhARP, *Gossypium hirsutum* (CD485647); CofaARP, *Coffea arabica* (AM232164, De Nardi *et al.*, 2006); SIARP, *Solanum lycopersicon* (DQ672601); SvARP, *Solanum virginianum* (AY572222); CaARP2, *Capsicum annuum* (AAR83888); EuARP, *Elaeagnus umbellata*, (AF091513, Kim *et al.*, 2007); BoARP, *Brassica oleracea* (AF458410); BrARP, *Brassica rapa* (AY185352, Lee *et al.*, 2003); AtARP4, *Arabidopsis thaliana* (NM_128942); AtARP5, *Arabidopsis thaliana* (DQ447038); AtARP1, *Arabidopsis thaliana* DRM1 (NM_179389); CiaARP, *Cicer arietinum* (36380786); PsDRM3, *P.sativum* (AF515795); LsARP, *Lathyrus sativus* (36302027, Skiba *et al.*, 2005); GmARP1, *G. max* (BE609714); PsDRM4, *P. sativum* (AF515796); ParARP, *Prunus armeniaca* (U93273); AtARP5, *Arabidopsis thaliana* (AT1G56220); CaARP1, *C. annuum* (AF082729, Jung e Hwang, 2000); PcARP, *Pinus contorta* (AW010624, Brinkler *et al.*, 2004); NtARP1, *Nicotiana tabacum* (AY183722); AtARP2, *Arabidopsis thaliana* (AT1G54070).

```

AtcKX1      1 MGLTSSLRFRHQNNKTFLLGTFMILVLSLSCIPGRTNLCSNHSVSTPKELPSSNPSDIRSSLV
AtcKX6      1 -----MLIVRSFTLLLSLSCIAFKLACCFSSSSISSLTKALP-----
HvCKX2      1 --MRQLL-----LQYLKFLFLGLLGLGAVTAEHVLKHD-VLASLGLTLP-----
HvCKX3      1 --MKQLL-----LQYLKFLFLGLLGLSRVTTEHVPKYD-VLASLGLTLP-----
OsCKX9      1 --MRPSL-----LQYLKFLFLGLLGLGGVVTMEHVPKQD-VPSLSLEELT-----
ZmCKX2      1 --MKPPS-----LVHCFKLLVLLALARLT-MHVPEDED-MLSPGLGALR-----
ZmCKX3      1 --MKPPSS-----LVHYFKLLVLLALARLT-MHVPEDED-VLSSLGLLRL-----
OsCKX4      1 --MKPSI-----VHCLKLLVLLALGGVT-MHVPEDEDDVVASLGLALR-----
AtcKX5      1 --MNREMT-----SFFLLLTFAICKLIIAVGLNVGPSELLRIGADVDG-----
OsCKX5      1 ---MA-----WCLVFMVFLIYCLISTVGLPVAPADEAAMQLGCVGGG-----
AsCKX      1 -MARFSILDKNFGMIVLLLCLEITSMILTNAEISTDLCPILFHAFTPTITLS-----
StcKX      1 -----
AtcKX2      1 -----MAN--LRLMITTITVLM-----ITKSSNG---TKIDLPKSLN-----
AtcKX4      1 -----MTNTLCLSLITLITLHFISLTPTLTKSDEG---TDVFLPISLN-----
AtcKX3      1 ---MASYNLRSQVRLIALITLITLITLSTPTTNTSPQP---WNILSHNEFA-----
DsCKX      1 -----MNLHAMPPFLNPTSLLHTTTLLMSILIQSPNSLP---TNLTHPTTS-----
HvCKX1      1 -----
TaCKX1      1 -----
ZmCKX1      1 -----MAVYYILLLAGLITACSHALAAAGTPALGDDRGRPWPAASIA-ALALD-----
OsCKX1      1 -----MAAIYLLIAALITIASSHALAAAHGAGGGVPLAAAAPLFPFGDLAAS-----
OsCKX2      1 -----MKQEQVRMAVLLMLNCFVKATAPPWPWPSASSASFLLDGLDGLGIA-----
OsCKX6      1 -----MAARCSIA-FMVMASCLISVV-----VSGGLPG---DLFAHSVA-----
OsCKX7      1 -----MAARCSIA-FMIMASCLISVV-----VSGGLPG---DLFALSVA-----
OsCKX10     1 -----MMPRAQLTTFLLIVTSEHSTVVPYLRAPVHGGVLTST-YDVSSLDIM-----
AtcKX7      1 -----MIAYIEPYHEENDAEASAATAAGKSTDGVSESLNIQ-----
OsCKX11     1 -----MMLAYMD-----HAAAAEPDAG-----AE-----
OsCKX3      1 -----MEVAMVCTRVNLLILILSLCSPYKFIQS-----PMD-----
OsCKX8      1 -----MEIKAMYLYAAVLAVLLCSSLVFIQS-----PTDV-----
consensus  1 1 1 1llliirllmlglg i mhv d vv lg l l

```

Domínio de ligação ao FAD

```

AtcKX1      61 SLDLEGYISFDVHNVAKDFGNRYQ-----LPLAHLHFRS VFDI SSMKHIVHLG S
AtcKX6      35 --LVGHLEFHDVHHASKDFGNRYQ-----LPLAVLHFRS VSDI AS TRHIWMMGT
HvCKX2      39 --LDGHFSFDLSAAAAMDFGNLSS-----FPVAVLHFGSVADIATVRHVFLMGE
HvCKX3      39 --LDGHFSFDLPAAAAADFGNLS-----FPVAVLHFGSVADIATVRHVFLMGE
OsCKX9      39 --LDGHFSFDVSAQAQDFGNLSS-----FPVAVLHFGSVADIATVRHVFLMGE
ZmCKX2      39 --LDGHFSFDVSAAMARDFGNQCS-----FLPAAVLHFGSVSDIATVRHVFLSLGE
ZmCKX3      40 --LDGHFSFDVSAAMARDFGNQCS-----FLPAAVLHFGSVSDIATVRHVFLSLGE
OsCKX4      39 --LDGHFSFDHAHAARDFGNRCS-----LPLAAVLHFGSVSDVAA TVRRVFLQGR
AtcKX5      43 --HFTVHPSDLASVSSDFGMLKSP-----EPLAVLHFRSAEDVARLVRTAY--GS
OsCKX5      40 --RLSVEPSDVMEASLDFGRILTS-----AEP LAVLHFRGAGDVAALVKAAAY--GS
AsCKX      50 --NKFACDNTTTLTASTDYG FVINE-----KPLAVLHFRSTHDI TELIKLSN SLP-
StcKX      1 -----
AtcKX2      33 --LTLSTDPSIISAASHDFGNITTV-----TPGGVICSSSTADISRLLQYAANGK-
AtcKX4      40 --LTVLTDPFISISAAASHDFGNITDE-----NPGAVLCESSSTTEVARLLRFANGGFS
AtcKX3      46 --GKLTSSSSSVESAATDFGHVTKI-----FPSAVLESSVEDITD LKLSFDSQ-
DsCKX      43 --THLRFDSL SLSAASSDFGD IHS-----LPSAVLESSPSDIAT LRLSHFSP
HvCKX1      1 -----
TaCKX1      1 -----
ZmCKX1      45 --GKLRTDSNATAAASTDFGNITSA-----LPAAVLYFSSSTGDLVA LLSAANSTPG
OsCKX1      45 --GKLRTDPNATVPASMDFGNITAA-----LPAAVLYFSGSPGDVAELLRAYAAPG
OsCKX2      46 --PLIRADEACTARASSDFGNLSVAGVGAPRLA-----LPAAVLYFSSSRPADIAALLRASCARP-
OsCKX6      35 --SKLRVDRDNTARASSDFGRIVAA-----APEAVLHFRATPAEIAELVRFSSASSP-
OsCKX7      35 --SKLRVDRNSTARASSDFGRIVAA-----APEAVLHFRATPAEIAELVRFSSASSP-
OsCKX10     44 --SKIRHTDHDAATKASSDFGHIVHA-----TPNGVFRFTFPADIAALTRLSLSQSP-
AtcKX7      38 --GEILCGGAAADIAGRDFGGMNCV-----KPLAVVREVGPE DIA--GAVKAAALR
OsCKX11     21 --PAVAAVDAAEFAAAMD FGLVSA-----RPAAVVREASDDVA--SAIRAAAR
OsCKX3      32 --FGPLNLLPTTTASSDFGRILVSH-----SPSAVLRKQAPRDISL LLSFLS-ASP
OsCKX8      31 --LCPVALLEPTPSSARDFGAVLSD-----APFAVMRESPDDIAL L LGALSSTAP
consensus  61 lhlh df dtsaaskdfgniss p avlhfrs adia lvrhivslg

```


Domínio de ligação ao FAD

AtCKX1	214	NVYQLEIVTGKGEVVTCS	EKRNS	SELF	FFSVLGG	LGQFGI	ITRARI	SLEPAP	HMVKWI	RVLY			
AtCKX6	187	NVHQLEIVTGKGEIINCT	KRQNS	SDLF	NGVLGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	---	---			
HvCKX2	189	NVNELEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	RAALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	QMV	RVLY			
HvCKX3	189	NVNELEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	RAALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	QMV	RVLY			
OsCKX9	189	NVNELEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	HAALGG	LGQFGI	ITRARI	PLEPAP	KMVR	RVLY			
ZmCKX2	186	NVNQLEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	YAALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	EMVR	RVLY			
ZmCKX3	192	NVNQLEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	YAALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	EMVR	RVLY			
OsCKX4	192	NVNQLEIVTGRGDIIVTCS	PEQNS	SDLF	YAALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	KMVR	RVLY			
AtCKX5	193	NVLELDVVTGKGEVMRCS	EEENT	RLFH	GVVLGG	LGQFGI	ITRARI	SLEPAP	QRVR	RVLY			
OsCKX5	195	NVYELDVVTGKGEVVTCS	ESNPN	DLFF	FGALGG	LGQFGI	ITRARI	ALEPAP	HRVR	RVLY			
AsCKX	206	NVYELDVIITGKGDHVTCS	AKKNS	SKLF	YGVVLGG	LGQFGI	ITRARI	ALGPAP	AKVW	RVLY			
StCKX	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
AtCKX2	178	NVLELDVIITGKGEMLTCS	RQLNP	PELF	YGVVLGG	LGQFGI	ITRARI	VLDPAP	KRAX	RVLY			
AtCKX4	201	NVHELDVIITGKGEMLTCS	EKLNP	PELF	YGVVLGG	LGQFGI	ITRARI	ALDPAP	KRAX	RVLY			
AtCKX3	195	NVLEMDVIITGKGEIATCS	KDMNS	DLFF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	KLEVP	AKR	RVLY			
DsCKX	189	NVHELDVIITGKGEMLTCS	ESNPN	DLFF	FSVLGG	LGQFGI	ITRARI	ALEKAP	QSVR	RVLY			
HvCKX1	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
TaCKX1	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
ZmCKX1	197	NVLEMDVIITGHGEMVVTCS	KQLNP	ADLF	DAVLGG	LGQFGI	ITRARI	AVEPAP	ARAR	RVLY			
OsCKX1	196	NVLELDVIITGHGEMVVTCS	KAVNS	DLF	DAVLGG	LGQFGI	ITRARI	AVEPAP	ARAR	RVLY			
OsCKX2	207	NVLELDVIITGVGEMVVTCS	KEKAP	DLF	DAVLGG	LGQFGI	ITRARI	PLAPAP	ARAR	RVLY			
OsCKX6	188	NVLELDVIITGRGDMVTCS	RDKEP	DLF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	GLEPAP	KRVR	RVLY			
OsCKX7	185	NVLELDVIITGTDMMVTCS	RDKDS	DLF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	GLMPAP	KRVR	RVLY			
OsCKX10	197	NVHELDVVTGMEMLTCS	PEVNS	ALFF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	RLPAP	KRVR	RVLY			
AtCKX7	190	NVTELDVVTGNQDVTCS	EIENS	SELF	FSVLGG	LGQFGI	ITRARI	LLQAP	ADMVR	RVLY			
OsCKX11	170	NVAQLEVVVTGDECHVCS	RSADP	DLF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	PLSPAP	QTVR	RVLY			
OsCKX3	183	NVVLQLEVVVTGRGEIVTCS	ETKDA	ELFN	AVLGG	LGQFGI	ITRARI	LLQEP	APKVR	RVLY			
OsCKX8	190	NVVLQLEVVVTGKGEVVTCS	ETEIPE	LFF	FAVLGG	LGQFGI	ITRARI	PLQLAP	PKVR	RVLY			
consensus	241	nvleldvvtgkgevvtcspe	nsdlff	favlgglgqfgi	itrari	alepap	krvr	wi	rvly				
AtCKX1	274	SDFS	AFSR	DOEY	LISKE	---	---	KT	FDY	VEGF	VIINR		
AtCKX6	237	---	---	TM	DQEQ	LISAG	---	---	HK	FDY	IEGF	VIINR	
HvCKX2	249	LD	FMSF	TE	DQEM	LISAE	---	---	KT	FDY	IEGF	VIINR	
HvCKX3	249	LD	FMSL	TE	DQEM	LISAE	---	---	KT	FDY	IEGF	VIINR	
OsCKX9	249	LD	FMSF	TE	DQEM	LISAE	---	---	KT	FDY	IEGF	VIINR	
ZmCKX2	246	SD	FESF	TE	DOEM	LIMAE	---	---	NS	FDY	IEGF	VIINR	
ZmCKX3	252	SD	FESF	TE	DOEM	LIMAE	---	---	NS	FDY	IEGF	VIINR	
OsCKX4	252	SD	FET	FTE	DOEK	LIASE	---	---	KT	FDY	IEGF	VIINR	
AtCKX5	253	SSF	KV	FTE	DOEY	LIS	MHGQ	---	---	LK	FDY	VEGF	VIINR
OsCKX5	255	SN	FTE	FTE	DOER	LISL	QHGG	---	---	RR	FDY	VEGF	VIINR
AsCKX	266	TD	FSE	FTE	DEEH	LISV	HGRSGS	---	---	NG	FDY	VEGF	VIINR
StCKX	22	DD	FSK	FTE	DQEH	LIS	SH	---	---	H	---	---	---
AtCKX2	238	SD	FT	FTE	DQER	LIS	MAN	---	---	D	---	---	---
AtCKX4	261	SD	FS	A	FTE	DQER	LIS	MTN	---	D	---	---	---
AtCKX3	255	TD	FSE	FTE	DQER	LIS	KT	---	---	G	---	---	---
DsCKX	249	TD	FEL	FTE	DQEL	LIS	KA	EGEG	---	---	W	KL	N
HvCKX1	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
TaCKX1	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ZmCKX1	257	TD	FAA	FSA	DOER	LITAP	RP	GGG	AS	F	GP	MS	Y
OsCKX1	256	AD	FAA	FSA	DOER	LITAP	RP	GGG	AS	F	GP	MS	Y
OsCKX2	267	TT	AA	AM	TA	DQER	LITAV	DRAG	GAG	AV	GG	MD	Y
OsCKX6	248	SD	V	T	FTE	DQEL	LIS	K	R	A	S	E	A
OsCKX7	245	SD	V	T	FTE	DQEL	LIS	K	R	A	S	E	A
OsCKX10	257	SD	V	H	P	FTE	DQEL	LIS	K	R	A	S	E
AtCKX7	250	TE	F	DE	FTE	DAEW	LVS	B	K	N	E	---	---
OsCKX11	230	AS	F	AD	Y	AA	DAEW	LVS	B	K	N	E	---
OsCKX3	243	DD	F	AT	FTE	DQEL	LVS	M	P	---	---	---	---
OsCKX8	250	DS	F	ET	FTE	DQEL	LVS	M	P	---	---	---	---
consensus	301	sdfs	ss	sf	tr	dqem	lis	ie	---	---	t	fdy	vegf

AtCKX1 313 SSFS-**END**STQASR**FKSDG**-**KTLYCLEVVKYFNPE**-----**EASSMDQETGKLLSBL**
 AtCKX6 271 LSFT-**AEEP**LEAS**QFKFDG**-**RTLYCLELAKYLKQD**-----**NKDVINQEVKETLSL**
 HvCKX2 288 SSFN-**POD**PERAS**RFE**TDR-**KVLF**CLE**MTKNFNPE**-----**EADIMEQEVHALLSQL**
 HvCKX3 288 SSFN-**POD**PERAS**SOFE**TDR-**KVLF**CLE**MTKNFNPE**-----**EAGIMEQ-IHALLS**QL****
 OsCKX9 288 SSFN-**POD**PVRS**SQFE**SDG-**KVLF**CLE**MTKNFNPD**-----**EADVMEQEVN**TLLS**QL**
 ZmCKX2 285 ASFK-**POD**PVQAS**SHFQ**SDG-**RVLY**CLE**LTKNFN**SG-----**DTDTMEQEV**VLLS**RRL**
 ZmCKX3 291 ASFK-**POD**PVEAS**SHFQ**SDG-**RVLY**CLE**LTKNFN**SD-----**QEV**TVLLS**RRL**
 OsCKX4 291 TSFK-**POD**PVQAS**QFQ**SDG-**RVLY**CLE**LTMNFN**HD-----**EADIMEQEV**GALLS**RRL**
 AtCKX5 293 SSFFSPRN**PVKISS**V**SSNG**-**SVLY**CLE**ITKNY**HDS-----**DSEIVDQEV**ELL**MKRL**
 OsCKX5 296 SSFFSPQN**PVKLSS**L**KHNS**-**GVLY**CLE**VTKNY**DDS-----**TAV**TVDQD**VEAL**LGEL****
 AsCKX 306 LSFFYP**MDVPR**IS**LSV**SQH-**NIIV**YLE**LAKYY**DD-----**SNQADIDED**VEN**L**IKGL****
 StCKX 61 SSFFSPSN**QTKVAS**L**SKN**-**KIM**YLE**IVKYY**DD-----**QNANTID**EEL**L**KLVKGL****
 AtCKX2 275 TSFF**PPSDQSKVAD**L**VKQH**-**GII**VYLE**VAKY**YD-----**PNLPI**ISKVID**T**LTKTL****
 AtCKX4 298 TSFF**PLSDQTRVAS**L**VNDH**-**RII**VYLE**VAKY**YD-----**TLPI**IDQVID**T**LSRTL****
 AtCKX3 293 STYY**PPSDHLRIAS**M**VKRH**-**RVI**YLE**VVKY**YD-----**TSQ**YTVNEE**ME**ELSDSL****
 DsCKX 292 SFF**SEKDLKKIKK**L**ASGNE**-**GVI**YLE**ASFY**YD**YGHMNF**S**RADKAQMDQD**IEEL**HRKL**
 HvCKX1 1 -----
 TaCKX1 1 -----
 ZmCKX1 305 G-**F**FTD**ADVA**R**IVA**L**AGERN**AT**TVYS**IE**ATLN**Y**DNA**T-----**AA**AAAVDQ**ELAS**VLT**TL**
 OsCKX1 302 GGFFSD**ADAA**R**VVA**L**AAARN**AT**AVYS**IE**ATLN**Y**AA**N-----**ATPSS**VDAAV**AA**AGDL****
 OsCKX2 327 SSFFSD**ADAE**A**RVA**L**AKE**AG**GVLY**F**LEG**AI**YFG**GA**AG**-----**PS**ADVD**K**RMV**VR**REL****
 OsCKX6 290 TPFFSR**FDID**R**LAG**L**ASE**SV**SGVI**Y**IEG**AM**Y**NES-----**TTAS**VDOK**L**TSV**LE**Q****
 OsCKX7 287 TPFFSS**SDIG**R**LAG**L**ASK**SV**SGVI**Y**IEG**AM**Y**NES-----**TST**MDQ**L**ES**L**IGQL****
 OsCKX10 299 SSFFS**ATD**L**AR**L**TG**L**ATD**GS**VAI**Y**IEG**AM**Y**Y**DDN**-----**TAS**VDOK**L**DAL**LE**EL****
 AtCKX7 290 PTVP**LHPD**H**EFD**PT**RLP**Q**SCGS**V**LYCLE**L**GLH**Y**RDS**DSN-----**STID**KR**VER**LIGRL****
 OsCKX11 270 PTVP**IPD**G**AH**FD**AS**L**L**PAN**AGP**V**LYCLE**V**ALY**Q**RGG**GG**DG**-----**GGDD**MKR**VR**GE**MM**Q**L**
 OsCKX3 279 SSIA**FPTN**V**DFN**PD**FG**T**KNN**E**KIY**Y**CIE**FA**VHDY**Q**NKN**I-----**NVE**QV**VE**IS**R**QM****
 OsCKX8 286 SSVA**FPAQ**L**NFS**PD**FG**S**KGR**K**KVY**Y**CIE**FA**VHDF**Q**QDS**S-----**RAD**HV**V**KLV**SA**K**L**
 consensus 361 ssffspndplrisslasdg kvlyclevtkyy d eadsmdqeve lls l

AtCKX1 362 NYIP**STL**FS**SEV**P**YIE**FL**DRVH**I**AER**KL**RAG**L**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**K**SS**I**YQ**F**ATE**V**ENN**
 AtCKX6 320 SY**VTST**L**FHT**T**EV**AY**EA**FL**DRVH**V**SE**V**KLR**S**KG**Q**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**KI**NE**FAR**G**VE**GN
 HvCKX2 337 RY**TPAS**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**S**SEM**KL**RAG**L**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**TI**HT**FA**E**Q**V**E**GK
 HvCKX3 336 RY**TPPS**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**S**SEI**KL**RAG**L**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**TV**HT**FA**K**Q**V**E**GK
 OsCKX9 337 RY**MPSS**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**S**SEM**KL**RAG**M**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**MI**HK**FA**K**E**V**E**GK
 ZmCKX2 334 RF**IQST**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**T**SEL**KL**RA**Q**SL**W**EV**PH**P**W**L**N**LIP**RS**IR**FA**E**V**E**FR
 ZmCKX3 340 RF**IQST**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**T**SEL**KL**RA**Q**GL**W**EV**PH**P**W**L**N**LIP**RS**IR**FA**E**V**E**FR
 OsCKX4 340 RY**ISST**L**FHT**D**VTY**IE**FL**DR**VH**T**SEL**KL**RA**Q**GL**W**EV**PH**P**W**L**N**LIP**RS**TV**HK**FA**K**E**V**E**FR
 AtCKX5 343 NF**IP**TS**VFT**T**DLQ**Y**VD**FL**DRVH**K**AEL**KL**R**S**KN**L**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**IS**D**FD**K**G**V**E**FR
 OsCKX5 346 NF**IP**GT**VFT**T**DL**P**Y**VD**FL**DR**VH**K**AEL**KL**R**G**K**M**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**RS**AS**R**IA**D**FD**R**G**V**E**FR
 AsCKX 356 KY**VPT**FK**F**ER**DV**L**YEG**FL**NR**Y**NFV**D**HLL**AA**QGL**AA**PK**S**W**L**D**L**FV**P**GS**R**IS**D**IN**E**G**V**FR**E
 StCKX 111 KY**LGG**F**M**F**K**K**D**V**S**F**VE**FL**NR**-----
 AtCKX2 325 SY**LPG**F**ISM**H**DVA**Y**FD**FL**NR**V**HVE**EN**KLR**S**L**G**L**W**EL**P**HP**W**L**N**LIP**V**PK**S**R**I**L**D**FH**N**G**V**V**R**D**
 AtCKX4 348 GF**APG**F**M**F**VQ**D**V**P**Y**FD**FL**NR**VR**NE**ED**K**L**R**S**L**G**L**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**V**PG**S**R**I**Q**D**FH**D**G**V**IN**G
 AtCKX3 343 NH**VR**G**F**M**Y**E**K**D**V**T**Y**MD**FL**NR**V**R**T**G**EL**N**L**K**S**K**G**Q**W**D**V**PH**P**W**L**N**LIP**V**P**K**T**Q**I**S**K**F**DD**G**V**F**K**G
 DsCKX 351 SF**VSG**F**A**F**R**N**DV**S**Y**M**G**FL**NR**V**H**D**G**EL**KL**R**AM**G**L**W**D**V**PH**P**WLN**L**LIP**V**S**K**S**N**I**M**D**F**H**I**G**V**F**K**G**
 HvCKX1 1 -----
 TaCKX1 1 -----
 ZmCKX1 358 SY**VE**G**F**A**F**Q**R**D**V**AY**AA**FL**DRVH**G**EE**V**AL**N**KL**L**GL**W**R**V**PH**P**WLN**L**LIP**V**PR**S**R**I**AD**F**D**R**G**V**F**K**G**
 OsCKX1 355 HF**EE**G**F**S**F**S**R**D**V**T**Y**IE**FL**DR**VY**G**EE**E**A**L**E**K**A**GL**W**R**V**PH**P**W**L**N**LIP**V**PG**S**R**I**AD**F**D**R**G**V**F**K**G**
 OsCKX2 381 RH**ER**G**F**V**F**A**Q**D**V**AY**AG**FL**DRVH**D**G**EL**KL**R**AG**L**W**D**V**PH**P**W**L**N**LIP**RS**GV**L**A**F**A**D**G**V**F**H**G**
 OsCKX6 342 SF**DK**G**F**V**F**T**K**D**V**S**Y**Q**FL**DR**V**RE**EE**R**IL**R**S**I**G**M**W**D**V**PH**P**W**L**N**LIP**V**Q**S**R**I**L**D**FD**T**G**V**F**R**G**
 OsCKX7 339 SF**EE**G**F**V**F**T**K**D**V**R**Y**Q**FL**DR**V**RE**EE**R**V**L**R**S**I**G**M**W**D**V**PH**P**WLN**L**LIP**V**PR**S**R**I**L**D**FD**A**G**V**F**K**G**
 OsCKX10 351 SF**V**R**G**F**V**F**V**R**D**AS**Y**VE**FL**DR**V**RE**EQ**N**L**R**S**AG**A**W**D**V**PH**P**WLN**L**LIP**V**PR**S**R**I**L**H**F**D**A**A**V**F**K**G
 AtCKX7 343 RF**NE**GL**R**F**EV**D**LP**Y**VD**FL**LR**V**K**R**S**E**E**I**A**K**EN**G**T**W**ET**PH**P**W**L**N**LIP**V**S**K**R**D**I**G**D**F**N**R**T**V**E**K**E**
 OsCKX11 326 KY**V**R**G**L**E**F**A**A**G**V**G**Y**VD**FL**SR**V**R**VE**DE**ARR**NG**S**W**AA**PH**P**WLN**L**LIP**S**SR**D**I**AA**F**D**R**A**V**L**NG**
 OsCKX3 331 SH**IA**SH**L**Y**S**VE**V**S**Y**FD**FL**NR**VR**ME**ES**L**R**N**S**GL**W**EV**PH**P**WLN**L**LIP**V**S**AG**I**S**D**F**R**D**L**L**M**D**S**
 OsCKX8 338 SY**L**R**P**H**V**Y**S**VE**V**S**Y**FD**FL**NR**VR**ME**ES**L**R**S**R**GL**W**D**V**PH**P**W**L**N**LIP**V**PK**H**G**I**T**Q**E**K**G**L**L**M**D**T
 consensus 421 syipgflfstdvtyvefldrvh eelklrakglwevphpwlnlfvprsrifdfrgvfkg

AtCKX1 422 ILTS--NNNG-PILLYPVNQSKWKKHTSLITPN---EDIFYLVAFLLPSAVP-NSSGKND
 AtCKX6 380 ILTD--TSNG-PVILYVFNKSKWDNQTSAVTPE---EEVYLVAILTSASP-GSAGKDG
 HvCKX2 397 ILED--NNNG-PILLYPVNKSQRWDNRRTSVVIPD---EEVYLVGFLSSA---IGPHS
 HvCKX3 396 ILED--NNNG-PILLYPVNKSQRWDNRRTSVVIPD---EEVYLVGFLSSA---MGPHS
 OsCKX9 397 ILKD--SNGG-PILLYPVNKSQRWDNRRTSVVIPD---EEVYLVAFLLSSA---LGPHN
 ZmCKX2 394 ILKD--SNGG-PILLYPVNKSQRWDNRRTSVVIPD---EEIFYLVGFLSSAP--SLSGHGS
 ZmCKX3 400 ILKD--SNGG-PILLYPVNKSQRWDNRRTSVVIPD---EEIFYLVGFLSSAP--SLSGYGS
 OsCKX4 400 ILKD--SNGG-PILLYPVNRTKWDNRRTSVVIPD---EEIFYLVGFLSSAP--SSSGHGS
 AtCKX5 403 ILGN--KTSG-PILLYVPMNKDKWDERSSAVTPE---EEVYLVALLRSALTDGEE-TQK
 OsCKX5 406 VLGS--RTAGGPILLYVPMNRHKWDPRSSVVTPE---EDVYLVAFLLRSVPGSTDPAGS
 AsCKX 416 IVYKQNTAIGIMLVFPMNKAQKWNDRMAVAIP---DEIFYLVSLHYSV---PDK
 StCKX
 AtCKX2 385 ILLKQ-KSASGLALLYPTNRNKWDNRMSAMTPE---IDEDVYIIGLLQSAT---PKD
 AtCKX4 408 ILLNQ-TSTS GVTLEYPTNRNKWNRMSMTPE---DEDFYVIGLLQSAGG---SQN
 AtCKX3 403 IILRN-NITS GPVLYVPMNRNKWNRMSAAIP---EDDFYVAVGFLRSAG---FDN
 DsCKX 411 IMKNS--KSM GPILVYPTKRSKWDKRMSTSIIP---DEDFYVSIIGILLSSSE---MND
 HvCKX1 25 -ILQ-GTDIA GPLVYVPLNKSQWDDGMSAVTTPA---EEVYVAVSMLFSSVA---N--D
 AtCKX1 25 -ILQ-GTDIA GPLVYVPLNKSQWDDGMSAVTTPA---EEVYVAVSMLFSSVA---N--D
 ZmCKX1 418 -ILQ-GTDIV GPLIYVPLNKSQWDDGMSAAVTPS---EDDFYVAVSLLFSSVA---PN--D
 OsCKX1 415 -ILQTADIA GPLIYVPMNKSKWDAAMS AVTPEGE-E-EEVYVAVSLLFSSVA---N--D
 OsCKX2 441 -ILS-RTPAM GPVLIYVPMNRNKWDSNMSAVITDD-DGDEDFYVTVGILLRSAAA---AG--D
 OsCKX6 402 -VfV-GANPV GVILLYPMNRNMWDDRMTAVSGN---DDDFYVAVGILLRSAAV---PG--D
 OsCKX7 399 -VFA-GANPV GVILLYPMNRNMWDDCMMAVASD---DDDFYVAVGILLRSAAV---IG--D
 OsCKX10 411 -ILR-NANPV GLILLYVPMNKDMWDDRMTAMTPE---EDDFYVAVGILLRSAAV---GSGGD
 AtCKX7 403 LVKN--GvN GPMLVYPLLRSRWDRTSVVIP---EGEIFYIVALLRFVPPCA-KVSS-
 OsCKX11 386 MLAD--GVD GPMILYVPMKSKWDPATSVVAVLP---N-GEIFYLVALLRFVPPCA-GGGPF
 OsCKX3 391 ISPD--NFE GLILLYVPLLRRKWDNTSVVLPDSGS TDQVMYAVGILLRSANPDDGCSHHC
 OsCKX8 398 VSAD--DFE GPILVYPLLTDKWDGNTSAVVP---AAPDGMVYIFGVLRSTDPAR-CGRAC
 consensus 481 illd tnnggpilvyvynkskwdermsavipd eevfylvgllrsav g d

AtCKX1 474 LEYLLKQNRVMNFCAAAN-----LNVKQYLPHYETQKEWKS-HFGK-RWETFAROKQA
 AtCKX6 432 VEELRRNRRIIEFSNKAASG-----IGLKQYLPHYTREREWKS-HFGD-KWGEFVRKSR
 HvCKX2 445 IEHTLNLNNQIIIEFSNKAASG-----IGVKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 HvCKX3 444 IKRTLNLNNQIIIEFSNKAASG-----IGVKQYLPHYSTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 OsCKX9 445 IKHTLDLNLNRIIEFSNKAASG-----IGVKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 ZmCKX2 445 IAHAMSLNSQIIVEFCBEAG-----IGMKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 ZmCKX3 451 IAHSMLNKNQIIVEFCBEAG-----IGMKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 OsCKX4 451 VEHAMNLNKNQIIVEFCBEAG-----VGMKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 AtCKX5 455 LEYLLKQNRRIIEFSNKAASG-----INVKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 OsCKX5 460 LEALERONREIIEFCBEAG-----IGAQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 AsCKX 466 YEASSTLKYQVLDIFCKNSG-----IGIKAYLPKNKTHEEWKE-HFGH-KWESFKDGD
 StCKX
 AtCKX2 436 LPEVESVNEKHIRFCNDSG-----IKIKQYLPHYTSKEDWIE-HFGS-KWDDFVSKRDL
 AtCKX4 458 WOELNLDKVIQFCNSG-----IKIKQYLPHYTRKEDWVK-HFGP-KWDDFVLRKIM
 AtCKX3 452 WEAFDQENMEILKFCEDDAN-----MGVIOYLPYHSSQEGWVR-HFGP-RWNIFVBRKYL
 DsCKX 459 LEHLESHNAEILKFCDDQAG-----MNYKQYLPHYTTEPEWKA-HYGA-RWDAFQQRKNT
 HvCKX1 73 LRRLEAQNQKILRFCDLAG-----IGYKEYLAHYTAHGDWVR-HFGG-KWQRFVEMKDK
 TaCKX1 73 LRRLEAQNQKILRFCDLAG-----IGYKEYLAHYTAHGDWVR-HFGG-KWQRFVEMKDK
 ZmCKX1 467 LARLQEQNRRIILRFCDLAG-----IQYKTYLARHTDRSDWVR-HFGA-AKWNRFVEMKDK
 OsCKX1 466 VAALQEQNRRIILRFCDLAG-----IGYKAYLAHYDSRSDWVR-HFGA-KWDRFVORRDK
 OsCKX2 493 VGRLEEQNDIILGFCEVAG-----IAYKQYLPYVGSQAEWQKR-HFGANLWPRFVORRDK
 OsCKX6 451 VERLEKENEAVLAFCDNEG-----IGCKQYLPHYASQDQWRS-HFGA-KWSRVTELRVK
 OsCKX7 448 VERLEKENEAVLAFCDNEG-----IGCKQYLPHYASQDQWRS-HFGA-KWSRVADLAKK
 AtCKX10 463 VEQLERENAAVLELCLDLAG-----GIGCRQYLPYHSSQEGWVR-HFGA-KWGRVADLAKK
 OsCKX7 455 VEKQVAVQNEIVHWCVKN-----GIDYKLYLPHYKSOEWEIR-HFGN-RWSRFVDRKAM
 OsCKX11 438 VDELVAQNNAIIDAQRN-----GYDYKLYLPHYKSOEWEIR-HFGA-KWSRFVDRKAM
 OsCKX3 448 LQELLLRHRRLAGAAAS-----GLCAKQYLAPHHPFAGWRH-HFGR-RWRFVDRKAR
 OsCKX8 452 VDSIMARHRRLVADEACRDGGGGRGIGAKQYLARQPSPARWRD-HFGA-GWRFVDRKAR
 consensus 541 vehleqn rielefcd ag igykqylphyttqeewkr hfga kwerfvdrkar

```

AtCKX1      526 YDPLAILAPGQRIFFOKTTGKLSPIQLAKSKATGSPQRYHYASILPKPRTV
AtCKX6      484 YDPLAILAPGHRIFOKAVSYS-----
HvCKX2      497 YDPLAILAPGQKIFOKKPAIFLSSLQYLL-----
HvCKX3      496 YDPLAILAPGQRIFFOKTFASIFLSS-----
OsCKX9      497 YDPLAILAPGQRIFFOKASASIFLPS-----
ZmCKX2      497 YDPLAILAPGQRIFFK--ASIFLPSL-----
ZmCKX3      503 YDPLAILAPGQRIFFK--ASIFLPL-----
OsCKX4      503 YDPLAILAPGQRIFFK--ASIFMPSL-----
AtCKX5      507 FDPRHILATGQRIFFQNPSISIFPPSSSSSSAASW-----
OsCKX5      512 FDPRAMLATGQGIFFDSP--PILAES-----
AsCKX       518 FDPKRILAPGQRFN-----
StCKX
AtCKX2      488 FDPKKLLSPGQDIF-----
AtCKX4      510 FDPKRLLSPGQDIFN-----
AtCKX3      504 YDPKMI LSPGQNIFFOKINSS-----
DsCKX       511 YDPKAILSPGQKIFTHLVDELCLSDH-----
HvCKX1      125 YDPKKLLSPGQDI-----
TaCKX1      125 YDPKRLLSPGQDI-----
ZmCKX1      520 YDPKRLLSPGQDIFN-----
OsCKX1      518 YDPKKLLSPGQDIFN-----
OsCKX2      547 YDPKAILSRGQGIFFTSPLA-----
OsCKX6      503 YDPYGI LSPGQRIFFSSLTP-----MALVAM-----
OsCKX7      500 YDPHRILSPGQRIFFSPAS-----MVVVSM-----
OsCKX10     517 YDPRAILSPGQGIFFPPPPSPPPPAAGEPITAS-----
AtCKX7      507 FDPMAILSPGQKIFNRSL-----
OsCKX11     490 YDPLAILAPGQNIFFARTFSSVAAAAAVIV-----
OsCKX3      499 FDPRCILGPGQGIFFPRDSSSNGAFASY-----
OsCKX8      510 FDP LHV L G P G Q G I F P R -- T D S A G S M -----
consensus  601 ydprailspgqrifqk  gs1

```

Figura 2- Alinhamento múltiplo de AsCKX e outras proteínas CKX identificadas anteriormente. O alinhamento das seqüências e os resíduos conservados foram realizados utilizando-se os programas CLUSTAL W. e BOXSHADE As seqüências de aminoácidos idênticas encontram-se na caixa preta. A lista de seqüências protéicas e número de acesso se encontram na tabela 2.


```

VlSTS1      1  --- MAS-VEEFRNAOR-AKGPATILAIQTATPDHCIYQSDYADYYFRVTKSEHMTDLKK
VrSTS1      1  --- MAS-VEEFRNAOR-AKGPATILAIQTATPDHCIYQSDYADYYFRVTKSEHMTDLKK
VvSTS1      1  --- MAS-VEEFRNAOR-AKGPATILAIQTATPDHCVYQSDYADYYFRVTKSEHMTDLKK
VvSTS2      1  --- MAS-VEEFRNAOR-AKGPATILAIQTATPDHCVYQSDYADYYFRVTKSEHMTDLKK
SbSTS1      1  MTTGKVT-LEAVRKAOR-AE GPATVLAIGTATPANCYQADYEDYYFRVTKSEHMTDLKE
AsRS        1  --- MVS-VSEIRNVOR-AE GPATVLAIGTANPSNVCVDSQTYADYYFRVTNSEHMTDLKK
AhRS3       1  --- MVS-VSGIRNVOR-AE GPATVLAIGTANPSNVCVDSQTYADYYFRVTNSEHMTDLKK
AhSTS1      1  --- MVS-VSGIRNVOR-AE GPATVLAIGTANPSNVCVDSQTYADYYFRVTNSEHMTDLKK
AhRS1       1  --- MVS-VSGIRNVOR-AE GPATVLAIGTANPSNVCVDSQTYADYYFRVTNSEHMTDLKK
AhSTS2      1  --- MVS-VSGIRNVOR-AE GPATVLAIGTANPSNVCVDSQTYADYYFRVTNSEHMTDLKK
RtSTS       1  --- MAP--EESRHAETA VNR AATVLAIGTANPPNCYQADDFDEYFRATNSDHLTHLKKQ
RpBAS       1  --- MAT--EEMK-----KLATVMAIGTANPPNCYQADDFDEYFRVTNSDHLINLKKQ
PcRS3       1  --- MAPSVOEIRKAOR-AE GPATVLAIGTATPPNCIYQADYEDYYFRVTNSEHMTDLKE
consensus   1  masveeir aqr a gpatvlaigta p nciyqsdyadyyfrvtNSEHMTDLKK

```

```

VlSTS1      55  KENRICEKSMIKKRYIHLTEEMLEEHFNIGAYMAPSLNIRQEIITA EVPR LGRDAA LKAL
VrSTS1      55  KENRICEKSMIKKRYIHLTEEMLEEHFNIGAYMAPSLNIRQEIITA EVPR LGRDAA LKAL
VvSTS1      55  KENRICEKSMIKKRYIHLTEEMLEEHFNIGAYMAPSLNIRQEIITA EVPR LGRDAA LKAL
VvSTS2      55  KENRICEKSMIKKRYIHLTEEMLEEHFNIGAYMAPSLNIRQEIITA EVPR LGRDAA LKAL
SbSTS1      59  KFKRICEKSMIKRKYMHLETEILEENPNMSYWAPSLDARQDILLIQEIPKLGAEAAEKAL
AsRS        55  KFORICERTQIKNRHMYLTHEEILKENPNICAYKAPSLDAREDDMIREVPRV GKEAA TKAI
AhRS3       55  KFORICERTQIKNRHMYLTHEEILKENPNICAYKAPSLDAREDDMIREVPRV GKEAA TKAI
AhSTS1      55  KFORICERTQIKNRHMYLTHEEILKENPNICAYKAPSLDAREDDMIREVPRV GKEAA TKAI
AhRS1       55  KFORICERTQIKNRHMYLTHEEILKENPNMCAYKAPSLDAREDDMIREVPRV GKEAA TKAI
AhSTS2      1  -----LKENPNMCAYKAPSLDAREDDMIREVPRV GKEAA TKAI
RtSTS       55  KFKRICEKSMIEKRYLHLTEEILKENPNIA SFEAPSLDVRHNIQVKEVVLGKEAA TKAI
RpBAS       48  KFKRMCENSRIEKRYLHVTEEILKENPNIA AYEATSLNVRHKMQVKGVAELGKEAA TKAI
PcRS3       56  KERRMCDKSMIEKRYLHLTEEILKENQNMAYMSSLDSRQDMVSVPRV LGRDAA OKAI
consensus   61  kfnriceksmikkr yi hlteei lkenpni ay ApSLd R dmiirevpr lGkeAA KAI

```

```

VlSTS1      115  KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLETSVRRVVMLYHQGCYAGGTVLRRA
VrSTS1      115  KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLETSVRRVVMLYHQGCYAGGTVLRRA
VvSTS1      115  KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLETSVRRVVMLYHQGCYAGGTVLRRA
VvSTS2      115  KEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLETSVRRVVMLYHQGCYAGGTVLRRA
SbSTS1      119  KEWGQPKSRITHLVFCTTSGVEMPGADYQLIKLLGLCPVNRAMMYHQGCYAGGTVLRRA
AsRS        115  KEWGRPMSIETHLIFCTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPSVKRYMMYHQGCYAGGTVLRRA
AhRS3       115  KEWGRPMSIETHLIFCTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPSVKRYMMYHQGCYAGGTVLRRA
AhSTS1      115  KEWGQPKSKITHLIFCTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPSVKRYMMYHQGCYAGGTVLRRA
AhRS1       115  KEWGQPKSKITHLIFCTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPSVKRYMMYHQGCYAGGTVLRRA
AhSTS2      39  KEWGQPKSKITHLIFCTTSGVALPGVDYELIVLLGLDPSVKRYMMYHQGCYAGGTVLRRA
RtSTS       115  NEWGQPKSKITRILIVCCIAGVMPGADYQLTKLLGLQLSVKREMFYHLGCYAGGTVLRRA
RpBAS       108  KEWGQPKSKITHLIVCCLAGVMPGADYQLTKLLGLDPSVKREMFYHLGCYAGGTVLRRA
PcRS3       116  KEWGHPKSKITHLIVMCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKREMFMYQGCYAGGTVLRRA
consensus   121  kEWGqPKSKIThli fCttsgVemPGaDY L LLGLepsvkryMmyhqGCYAGGTVLRRA

```

```

VlSTS1      175  KDLAENNA GARVLVVCSEITVVTFRGPSEDA LDSL VGQALFGDGSSAVIVGSDPDVSIER
VrSTS1      175  KDLAENNA GARVLVVCSEITVVTFRGPSEDA LDSL VGQALFGDGSSAVIVGSDPDVSIER
VvSTS1      175  KDLAENNA GARVLVVCSEITVVTFRGPSEDA LDSL VGQALFGDGSSAVIVGSDPDVSIER
VvSTS2      175  KDLAENNA GARVLVVCSEITVVTFRGPSEDA LDSL VGQALFGDGSSAAVIVGSDPDI SIER
SbSTS1      179  KDLAENNK GARVLVVCSEITVVTFRGPSESHLDSL VGQALFGDGA AA VIGADPSEPAER
AsRS        175  KDLAENNK DARVLIVCSENTSITFRGPSETDMDSL VGQALFADGAAATITGSDPVPEVEK
AhRS3       175  KDLAENNK DARVLIVCSENTSITFRGPSETDMDSL VGQALFADGAAATITGSDPVPEVEK
AhSTS1      175  KDLAENNK DARVLIVCSENTAVTFRGPSETDMDSL VGQALFADGAAATITGSDPVPEVEK
AhRS1       175  KDLAENNK DARVLIVCSENTAVTFRGPNETDMDSL VGQALFADGAAATITGSDPVPEVEN
AhSTS2      99  KDLAENNK DARVLIVCSENTAVTFRGPSETDMDSL VGQALFADGAAATITGSDPVPEVEN
RtSTS       175  KDLAENNK EARVLIVRSEMTPICFRGPSETHIDSMVGOALIFGDGAAAVIGANPDL SIER
RpBAS       168  KDLAENNK GARVLIVCSEMTTTCFRGPSETHLDSMVGQALIFGDGAAAVIGADPDLTV ER
PcRS3       176  KDLAENTKGARELVVCSAIRAICFRGPSETHLDSMVGQALIFGDGAGAVITGADPDL SIER
consensus   181  KDLAENnk gARvLiVcSeit vtFRGPset lDSLvGQAlfgDGaaAvIvGsdPdvsiEr

```

```

VlSTS1      235  PLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTQAFDPLGISD
VrSTS1      235  PLRRLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTQAFDPLGISD
VvSTS1      235  PLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTQAFDPLGISD
VvSTS2      235  PLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTQAFDPLGISD
SbSTS1      239  PLRHVLSAASQTILPDSHGAIEGHLLREVGLTFHLLQDRVPLISMNIEERILEDFAFPLGISD
AsRS        235  PLFEIVSTDQKLVVPSHGAIAGGLLRREVGLTFYLNKSVDPDIISQNIINDALSKAFDPLGISD
AhRS3       235  PLFEIVSTDQKLVVPSHGAIAGGLLRREVGLTFYLNKSVDPDIISQNIINDALSKAFDPLGISD
AhSTS1      235  PLFEIVSTDQKLVVPSHGAIAGGLLRREVGLTFYLNKSVDPDIISQNIINDALSKAFDPLGISD
AhRS1       235  PLFEIVSTDQKLVVPSHGAIAGGLLRREVGLTFYLNKSVDPDIISQNIINDALSKAFDPLGISD
AhSTS2      159  PLFEIVSTDQKLVVPSHGAIAGGLLRREVGLTFYLNKSVDPDIISQNIINDALSKAFDPLGISD
RtSTS       235  PLFELVSTAQTIIPESDGAIEGHLLEVGLSFLYQYQTVPSLISNCIETCLSKAFPLNISD
RpBAS       228  PLFEIVSTAQTIVPESHGAIEGHLLLESGLSFHLYKTVPTLISNNIKTCLSDAFPLNISD
PcRS3       236  PLFEIVWTAQTILPDSHGAIAGGLLRREVGLTIHLLKDVPEGLISKNIKSLTEAFSPLNISD
consensus   241  PLFElvst QtiIPns GAiag LrEvGLtFhL ksVP lISqnIe Lt AFdPLGISD

VlSTS1      295  WNSLFWIAHP--GGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHLVLSSEYGNMSSACVLFILDEMRKR
VrSTS1      295  WNSLFWIAHP--GGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHLVLSSEYGNMSSACVLFILDEMRKR
VvSTS1      295  WNSLFWIAHP--GGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHLVLSSEYGNMSSACVLFILDEMRKR
VvSTS2      295  WNSLFWIAHP--GGPAILDAVEAKLNLDKKKLEATRHLVLSSEYGNMSSACVLFILDEMRKR
SbSTS1      299  WNSLFWIAHP--GGPAILNMVEAKVGLDKARMCATRHILAEYGNMSSVCFILDEMRNR
AsRS        295  YNSLFWIAHP--GGRAILDQVEQKVNLPKPKMKATRDLVLSNYGNMSSACVFFIMDLMRKR
AhRS3       295  YNSLFWIAHP--GGRAILDQVEQKVNLPKPKMKATRDLVLSNYGNMSSACVFFIMDLMRKR
AhSTS1      295  YNSLFWIAHP--GGRAILDQVEQKVNLPKPKMKATRDLVLSNYGNMSSACVFFIMDLMRKR
AhRS1       295  YNSLFWIAHL--GGRAILDQVEQKVNLPKPKMKATRDLVLSNYGNMSSACVFFIMDLMRKR
AhSTS2      219  YNSLFWIAHP--GGPAILDQVEQKVNLPKPKMNATRDLVLSNYGNMSSACVFFIMDLMRKR
RtSTS       295  WNSLFWIAHP--GGRAILDDEATVGLKKEKPKATRQVLDNDYGNMSSACVFFIMDLMRKR
RpBAS       288  WNSLFWIAHP--GGPAILDQVTAKVGLKEKPKKATRVQLKDYGNMSSAVVFFIMDLMRKR
PcRS3       296  WNSLFWIAHPGMSGPAITLDQVEAQLKKEKPKKATRQVLDNDYGNMSSACVLFIMDLMRKR
consensus   301  wNSlFWiAHP gGpAiLdqveakvNlKkekLkaTR vLseYGNMSSacvFFImDeMRkk

VlSTS1      353  SLKGENAT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S I P T V T N --
VrSTS1      353  SLKGENAT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S I P T I T N --
VvSTS1      353  SLKGEKAT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S V P T V T N --
VvSTS2      353  SLKGERAT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S I P M V T N --
SbSTS1      357  SAKDGH T TGE GME WGVLF GFGPGLT VETIVLH S V P I T V A A
AsRS        353  SLEAGLKT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S M A I - - - -
AhRS3       353  SLEGLKT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S V A I - - - -
AhSTS1      353  SLEGLKT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S V A I - - - -
AhRS1       353  SLETGLKT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S M A I - - - -
AhSTS2      277  SLEGLKT TGEGLDWGVLF GFGPGLT IETVVLH S V A I - - - -
RtSTS       353  SLANGQVT TGEGLK WGVLF GFGPGLT VETVVLH S V P L I T - - -
RpBAS       346  SLENGQAT TGEGL E WGVLF GFGPGLT VETVVLH S V P V I S - - -
PcRS3       356  SLENGHAT TGEGLD WGVLF GFGPGLA VETVVLH S V P V A H H - - -
consensus   361  Sle g T TGEGLdWGVLFgFGFPGLtiETvVLhSvpm t

```

Figura 4- Alinhamento múltiplo de AsRS e outras RS. O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o programa CLUSTAL W. Os resíduos de aminoácidos idênticos estão marcados na caixa preta. As RS utilizadas neste alinhamento e seu número de acesso no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) são: VlSTS1, *Vitis labrusca* (AB046374); VrSTS1, *V. riparia* (AB046373); VvSTS1, *V. vinifera* (P28343); VvSTS2, *V. vinifera* (P51070); SbSTS1, *Sorghum bicolor* (AY069951); AsRS, *Arachis stenosperma* (presente estudo); AhRS3, *A. hypogaea* (AAF71253); AhSTS1, *A. hypogaea* (AF227963); AhRS1, *A. hypogaea* (P20178); AhSTS2, *A. hypogaea* (P20077); RtSTS, *Rheum tataricum* (AF508150); RpBAS, *R. palmatum* (AF326911); PcRS3, *Polygonum cuspidatum* (EF090604).

Motivo 1

```

AsHP1          1 --MFQFAKFSKSKERRLAAKLGYGFPPIGDPWITDGISPWPFASESVLPSQCPGIHPLIIP-
ArthMp003     1 --MFQFAKFSKSKERRLATELGYGFPPIGDPWITDGISPWPFASESVLPSQCPGIHPMHSF
NitaMp027     1 --MFQFAKFSKSKERRLATELGYGFPPIGDPWITDGISPWPFASESVLPSQCPGIHPMHSF
MtrDRAFT_AC138017g30v2 1 MKAHQIGRLYVLQGSTVTGTAAVSSSMSS-FEVQVIGPWPFFASESVLPSQCPGIHPMHSF
consensus     1  mfQfakfskskerrelatelgygfpigdpwitdgIsPWPFASESVLPSQCPGIHPmhsf

AsHP1          58 RP-----
ArthMp003     59 RSCTQGTNTTKISMKLTISDCGFEPLTEGFTVLHSTRATTTCYHFLFNS
NitaMp027     59 RSCTLCRTAKHRRHKRYTEHQPNLDEKKE--KQVHP-----
MtrDRAFT_AC138017g30v2 60 RDSHMSILFYCLCN-LFLHNRNKNETNFCYFNFNFI-----
consensus     61 Rsetl  l  ki  kltihq  n  ep  e  f  qlh

```

Figura 5 – Alinhamento das únicas seqüências que possuem identidade com AsHP1. Para o alinhamento foram utilizados os programas CLUSTAL W e BOXSHADE. O motivo 1 está presente em todas elas. As seqüências protéicas podem ser encontradas pelos números de acesso: AsHP1, *Arachis stenosperma*; ArthMp003, *Arabidopsis thaliana* (NP_085475); NitaMp027, *Nicotiana tabacum* (YP_173374); MtrDRAFT_AC138017g30v2, *Medicago truncatula* (ABO79948).

```

Os01g0652700 1 ----MAE--REGAVVKKGPDDEGMKMATALLEEFGLPLGLLPLAEVIEVGFVFRATGYMWIA
OsI_020349 1 ----MAE--REGAVVKKGPDDEGMKMATALLEEFGLPLGLLPLAEVIEVGFVFRATGYMWIA
OsI_003050 1 ----MAE--REGAVVKKGHDEGMKMATALLEEFGLPLGLLPLAEVIEVGFVFRATGYMWIA
AsHP2 1 ----MADNKEGGTVKGDDEGLKMAVSLIQEYELPAGLLPLQDVVEVGYVKSTGYMWIV
Os11g0683600 1 MALVIADDEIKAKAEVYYDDEICQQCTRLLLKEAGLPNGLLPLKDIMECGYVEETGFVWLK
Os12g0563600 1 MTLTI PDDVRAKAEVYVGEAAGQEKTRLLLEETGLPSGLLPLRDIIECGYVEETGFVWLK
consensus 1 mae regavvkkgddegmkmatalleefglplgllplaeveievgfvratgymwia

Os01g0652700 55 QRKKVEHQFKMVSQVSYDVEITGYVKAACIKKLGKVKAKEMLWPPVNEITVDNPPPTGK
OsI_020349 55 QRKKVEHQFKMVSQVSYDVEITGYVKAACIKKLGKVKAKEMLWPPVNEITVDNPPPTGK
OsI_003050 55 QRKKVEHQFKMVSQVSYDVEITGYVKAACIKKLGKVKAKEMLWPPVNEITVDNPPPTGK
AsHP2 56 QKKKVEHEFKMVKKTLSYDSEITGFISKKIKKLGKVKAKEMLWPPVSEISVDDPTGK
Os11g0683600 61 QKKRIDHVFQSLGRLVSYGTEITAFAEKGRIRKVKGTKTRELMVWVPVEEIALDEQKTGK
Os12g0563600 61 QRRKVDHFFAKAGRHSVYAAEVSVAEKGRLRKITGVKAKELLIWVTLHEIAVDDPTGK
consensus 61 QrkkveHqFkmvskqVSYdveitgyvka cikKlKgvKaKeLmLWppvneItvDnppTgK

Os01g0652700 115 IHFKSLAGVTKTFPVEAFAAVPR-----QHYMRRGLSKISYGSERGITRYL
OsI_020349 115 IHFKSLAGVTKTFPVEAFAAVPR-----QHYMRRGLSKISYGSERGITRYL
OsI_003050 115 IHFKSLAGVTKTFPVEAFAAGQ-----QHYMRRGLSKISYGSERGITRYL
AsHP2 116 IHFKSLAGITKTFPVEAFAAGQ-----QHYMRRGLSKISYGSERGITRYL
Os11g0683600 121 LICKSIAGITKTFPASAFOIP-----EKEEEKIT----CAI PKP
Os12g0563600 121 LTCKAIGGLSRSEPVDAFEAPP PPKNPSPAAGD TTKVDEEKKKEEVEAGDAAAAAIDEI
consensus 121 ihfKslaGvtktfPveAfaa p r r g gi l

Os01g0652700 160 EPGVKSVLALPLFVGFKYWK----
OsI_020349 160 EPGVKSVLALPLFVGFKYWKA----
OsI_003050 -----
AsHP2 -----
Os11g0683600 155 VVLMER-----AHQVIKNN
Os12g0563600 181 EGKMKEMNSKEVQVQAEGVAAKN
consensus 181 e vk v

```

Figura 6 – Alinhamento das seqüências protéicas previstas que possuem identidade com AsHP2. Para o alinhamento foram utilizados os programas CLUSTAL W e BOXSHADE. As seqüências protéicas podem ser encontradas pelos números de acesso: AsHP2, *Arachis stenosperma*; OsI_003050, *Oryza sativa* (EAY75203); Os01g0652700, *O. sativa* (NP_001043739); OsI_020349, *O. sativa* (EAY99116); Os11g0683600, *O. sativa* (NP_001068462); Os12g0563600, *O. sativa* (NP_001067038)

ANEXO V

(Artigo em preparação)

BAC libraries from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut.

P. M. Guimarães^{1*}, K. Proite^{1,2}, O. Gausmer³, A. D'Hont³, S. C. M. Leal-Bertioli¹, and D. J. Bertioli⁴

¹Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, C.P. 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF, Brazil; ²Cellular Biology Department, IB-University of Brasília (UnB), Campus Universitário, CEP 70.910-900, Brasília, DF, Brazil; ³CIRAD Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR 1096, Avenue Agropólis, TA40/03, 34398 Montpellier Cedex, 5 France. ⁴Catholic University of Brasília, Campus II, SGAN 916, CEP 70.790-160, Brasília, DF, Brazil;

*E-mail: messenbe@cenargen.embrapa.br

Tel.: +55 61 3448 4787

Fax: +55 61 3340 3624

Abstract

Cultivated peanut, *Arachis hypogaea* is an allotetraploid of recent origin, with an AABB-type genome. In common with many other polyploids, it seems that a severe genetic bottle-neck was imposed at the species origin, via hybridisation of two wild species and spontaneous chromosome duplication. Therefore, the study of the genome of peanut is hampered both by the crop's low genetic diversity and its polyploidy. In contrast to cultivated peanut, most wild *Arachis* species are diploid with high genetic diversity. The study of diploid *Arachis* genomes is therefore attractive, both to simplify the construction of genetic and physical maps, and for the isolation and characterization of wild alleles. The most probable wild ancestors of cultivated peanut are *A. duranensis* Krapov. & WC Gregory and *A. ipaënsis* Krapov. & WC Gregory, with genome types AA and BB respectively. Therefore, we constructed and characterized two large-insert libraries in Bacterial Artificial Chromosome (BAC) vector, one for each of the diploid species. The libraries are respectively c. 7.4 and c. 5.3 genome

equivalents with low organelle contamination and average insert sizes of 106 kb. Both libraries were used for the isolation of clones containing genetically mapped legume anchor markers (single copy genes), and resistance gene analogues.

Introduction

Cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) is the second-most important grain legume crop worldwide after soybean, with a production of 33 million tons in 2003/04 (USDA-FAS 2006). Peanut is produced throughout the tropics and warmer regions of the subtropics, but is particularly important in Africa, Asia and in the United States (FAO, 2003). It is an allotetraploid (AABB) with a very narrow genetic base due to an extreme genetic bottleneck at the origin of the species (Halward et al., 1991; Young et al., 1996). This low genetic diversity has led to lack of variability in some important traits, limited availability of allelic combinations and consequently restrictions in productivity. In addition, the very low levels of polymorphism in cultivated peanut has hampered genetic and genomic characterization. In contrast, peanut diploid wild relatives have high genetic diversity and have been selected during evolution by a range of environments and biotic stresses, constituting a rich source of allele diversity (Nelson et al., 1990).

Because of the difficulties of working with cultivated peanut, its genome has been relatively little studied. Only a few linkage maps have been published. All of them have used wild species to enable the generation of sufficient polymorphic markers. RFLP maps were developed by Halward et al. (1993) based on a cross of two AA genome species, *A. stenosperma* and *A. cardenasii*, and a tetraploid map based on a cross of TxAG-6 (a synthetic amphiploid) and *A. hypogaea* was published by Burow et al. 2001..Recently we developed an SSR-based map for the AA genome of *Arachis* based on a cross of *A. stenosperma* and *A. duranensis* (Moretzsohn et al., 2005) and a map of the BB genome, based on a cross of *A. ipaënsis* and *A. magna* (Gobbi et al., 2007 and unpublished data). For peanut there is also relatively little EST data publicly available with only 13525 ESTs for *A. hypogaea* in Genbank (Luo et. al. 2005a, b and c), and

recently 6264 for the wild AA genome *A. stenosperma*. (Proite et al., 2007; Martins et al., 2006).

In addition to genetic maps and ESTs, Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries are fundamental tools for genomic studies, being important for physical mapping, map-based gene cloning and analysis of gene structure and function. The easy handling and propagation of the clones, their relatively stability and low degree of chimerism compared with yeast artificial chromosome (YAC) vectors have made BAC vectors the cloning system of choice (Dvorak et al, 2004; Chalhoub et al, 2004). A number of strategies have been proposed for physical mapping with large-insert clones: hybridisation-based methods such as interactive hybridisation using individual cDNA or genomic clones as probes (Mozo et al., 1999), restriction-based fingerprinting methods (Hong, 1997), integrated BAC end sequencing, fingerprinting and genome sequencing methods (Mayer et al., 1999); or more recently, oligonucleotide-based “overgos” (Gardiner et al., 2004).

BAC libraries have now been constructed for many of the world’s most important crops and are now being developed for crops of lesser economic importance, such as melon (Luo et al., 2001), mungbean (Miyagi et al., 2004), sugar-beet (Gaafar et al., 2005), cucumber (Nam et al., 2005), sunflower (Bouzidi et al., 2006) and quinoa (Stevens et al., 2006). Within the Leguminosae, BAC libraries are available for *Phaseolus vulgaris* (Vanhouten & MacKensie, 1999), *Vigna radiata* (Liu et al., 2004), *Glycine max* (Danesh et al., 1988), *Trifolium pretense* (Sato et al 2005) and the model legumes *Lotus japonicus* (Kawasaki & Murakami, 2000) and *Medicago trunculata* (Meksem et al, 2000). Within the genus *Arachis*, one BAC library for cultivated peanut has been developed (Yuksel & Paterson, 2005). As a complement to this resource, here we describe the production of diploid BAC libraries for wild AA and BB genomes of *Arachis*. Two diploid wild species *A. duranensis* Krapov. & WC Gregory (AA genome) and *A. ipaënsis* Krapov. & WC Gregory. (BB genome) have been identified as the most probable ancestors of peanut (Kochert et al, 1996), and therefore we chose these species for BAC construction. These diploid BACs will enable, for instance, the isolation of wild alleles conferring strong disease resistance, and will facilitate the construction of a physical map. The wild and cultivated BAC libraries together

would also allow some fascinating comparisons between wild and cultivated genomes and perhaps insights into the evolution of polyploid genomes.

Materials and Methods

Plant Material

Seeds were obtained from the *Arachis* germplasm collection, maintained at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology — CENARGEN (Brasília-DF, Brazil). For HMW DNA isolation, *A. duranensis* V14167 (genome AA) and *A. ipaënsis* KG30076 (genome BB) were grown under greenhouse conditions. Young leaves were collected in liquid nitrogen then stored at -80 °C.

HMW DNA isolation

Nuclei were isolated from leaves according to Zhang et al., (1995) with some modifications. In brief, 50 g of young leaves were ground in liquid nitrogen and nuclei were liberated by incubating with agitation the cell extract at 4°C in HB 1X buffer, plus 0,2% of PVP 40. Polyvinylpyrrolidone was added to the extraction washing buffer to reduce the production of oxidized polyphenolics in the leaf homogenate. To eliminate cell debris, the leaf homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and two layers of Miracloth (250 µm), (Calbiochem, UK). Centrifugation at 850G for 8 min at 4°C was followed by a Percoll gradient (37.5%) to separate nuclei from the pectin matrix (Peterson et al.,2000). The nuclei were resuspended in HB 1X extraction buffer without β-mercaptoethanol and Triton-100X, centrifuged as before and the pellet resuspended to a final volume of 1ml of filtered HB 1X. The nuclei suspension was then embedded in 1,2% low-melting-point agarose plugs (InCert Agarose , Cambrex-Bioscience, Rockland, Inc.). An aliquot of the nuclei extraction was evaluated under a microscope using DAPI staining to observe the integrity of the nuclei and the purity of the preparation in terms of organelle contamination. Agarose plugs containing HMW DNA were incubated for 16 h at 50°C in lysis buffer (5% Sodium Lauryl Sarcosyl, 0.625M EDTA pH 9.0, 50 mg proteinase K), washed for 1 h at 4°C in inactivation solution (0.5M EDTA, pH 8.0, 0. 1µM PMSF), four times for 30 min in TE 10/10, four times for 30 min in TE 10/1 and finally stored in TE 10/10 at 4°C. An extra HMW DNA purification step was conducted between the two wash steps, which consisted of a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using a CHEF Mapper™ XA apparatus (Bio-Rad, U.K.) at 6 V/cm, with 3 s of switch time,

and an angle of 120° for 40 min aiming to eliminate impurities and low size fragments.

BAC library construction

Agarose plugs containing HMW DNA were chopped into small pieces and incubated on ice, with agitation, three times in 1X *Hind*III restriction buffer (Gibco BRL, USA), with buffer exchange every 30 min. Seven units of *Hind*III was added to each chopped plug and allowed to diffuse for 4 hours on ice. For partial digestions, the reactions were incubated for 15 min at 37°C and then stopped by adding one-tenth of the total volume of 0,5 M EDTA, pH 8,0 and placing on ice. Partially digested HMW DNA was size-selected in 1% GTG SEAKEM agarose gels in two steps at 14°C in 0,5X TBE buffer: first –sizing by PFGE at 6 V/cm, with 1 s to 50 s of switch-time, and an angle of 120° for 20 h; second-sizing by selecting two regions TOP (150 -250 Kb) and BOTTOM (80-150 Kb) from the above gel and running the excised agarose plugs at 6 V/cm, with 3 s of switch time, and an angle of 120° for 20 h. The regions of TOP and BOTTOM corresponding to 100 kb were then cut out from the latter gel and the DNA recovered through electro-elution (BIO-RAD/electro-eluter, UK). The DNA concentration was estimated in 1% agarose gel in 1X TAE and a number of ligation reactions containing different ratios of vector to insert (V/I) were tested. A constant 30 ng of the commercial vector “pIndigo BAC-5 *Hind*III-Cloning Ready” (Epicentre, USA) was used, and varying amounts of insert ranging from 100 to 900 ng of HMW DNA were used in 70 µL reactions. Competent *E.coli* cells (ElectroMAX DH10B) (Invitrogen) were transformed by electroporation and transformants were selected on a 2YT-X-gal-IPTG plates containing 12.5 µg/mL chloramphenicol. White colonies were picked using a Q-bot 2XY Genetix colony picker robot (Genetix) and transferred to 384 well-plates containing 80 µL of 2YT and 7% glycerol. The plates were incubated for 18-20 h at 37 °C and stored at -80 °C.

BAC library screening and DNA isolation

For estimation of BAC clone insert sizes, random individual clones were grown in 100µL pre-innoculum and then in 3 mL 2YT liquid medium containing

chloramphenicol (12,5 µg/mL). BAC DNA was isolated using a QIAGEN BIO-ROBOT 9600 (Qiagen GmbH, Germany). BAC DNA was digested with *NotI* to release the inserts. The digested clones were separated by PFGE at 14°C in 0,5X TBE buffer, 6 V/cm, a switch time from 5 to 15 s, an angle of 120° and run for 15 h. High-density filters were made using a Q-bot 2XY Genetix Robot (Genetix). Each high-density filter contained 18,432 double-spotted clones. Hybridisations were performed as described in the Clemson BAC protocols (<http://www.genome.clemson.edu/protocols>). Filters were exposed for 1 day on Fuji Medical X-Film (Super RX-100 NIF).

Genomic probes

Estimation of organelle contamination in both libraries was evaluated by using a spinach chloroplast gene, the large Rubisco subunit (1.5 kb) and a wheat mitochondrial gene of cytochrome oxidase *cox I* (1.3 kb) (Vilarinhos et al., 2003). BAC libraries were also hybridized to probes from single-copy genes that have been defined as legume anchor markers (Fredslund et al 2006) and the *Arachis* resistance gene analogue S1_A_36 (Genbank accession AY157808, Bertoli et al 2003). This RGA was isolated from the AA genome species *A. stenosperma* and has been found to co-localize with a QTL for resistance to the late-leaf spot *Cercosporidium personatum* (Moretzsohn, 2006 and unpublished data).

Results

HMW DNA isolation

In order to eliminate high levels of carbohydrate and polyphenols present in both *A. duranensis* and *A. ipaënsis* leaves, a modified nuclei isolation protocol including a combination of PVP-40 buffer, filtration in Miracloth and centrifugation through Percoll gradient (37.5%) was used. The inclusion of an extra purification step, consisting of PFGE of agarose plugs for 40 min before digestion, enabled the purging of smaller fragments and eliminated impurities, increasing cloning efficiency. The analysis of the extracts by DAPI-staining microscopy enabled the correct evaluation of the amount and quality of the nuclei preparation.

BAC libraries

The double size selection used produced satisfactory DNA insert sizes ranging from 100-120 kb, for both libraries, whilst a 1/4 Vector/Insert ratio in ligation reactions showed the greatest number of transformants. The BAC library for the AA genome (*A. duranensis*) contained 84,096 clones from five different ligations, whilst the BB genome library (*A. ipaënsis*) consisted of 75,648 clones originated from five ligations (Tab. 1). A random sample of each library was analyzed by *NotI* digestion, and the average insert size was 112 and 100 kb for *A. duranensis* and *A. ipaënsis* respectively (Fig.1 a and b).

The organelle contamination in the BAC libraries was evaluated by screening the high-density filters with mitochondrial and chloroplast specific probes. For *A. duranensis*, the contamination of BAC clones with chloroplast sequences was of 0.363% and mitochondrial sequences of 0.016 %. For *A. ipaënsis* 0.081 % was contaminated with chloroplast sequences and 0.21% of the clones with mitochondrial DNA. These values, together with the microscopic DAPI-staining observations, reflect the high level of purification of the *Arachis* nuclei obtained with the modified protocol.

Based on the library average insert size and *A. duranensis* haploid genome, equivalent to 1260 Mb (Temsch & Greillhuber, 2001), the estimated coverage of the AA genome BAC library is of 7.4 haploid genome equivalents. However, for *A. ipaënsis*, the DNA-content determination is controversial. It is possible that the haploid genome equivalent of 2,830 Mb reported by Singh et al, 1996 is a 2.0 fold overestimate because of measurement inconsistencies, as already described for other *Arachis* species (Temsch & Greillhuber, 2001; Temsch & Greillhuber, 2000). Considering this aspect, the BB genome BAC library for *A. ipaënsis* represents from 2.7 to 5.3 the haploid genome equivalents of the species. To experimentally confirm the theoretical estimate of nuclear genome coverage in both libraries, high-density filters were screened with probes corresponding to genic single copy legume anchor markers that have been placed on the *Arachis* AA genetic map (unpublished data). An average of 5.6 clones per probe was identified in the AA genome and 4.5 in the BB (Table 2). The hybridization of both BAC libraries with an *Arachis* RGA S1_A_36 identified two clones in the AA genome but none in the BB genome (Fig. 2).

Discussion

Cultivated peanut is an allotetraploid with two cytoplasmic genomic components, AA and BB. Although it is generally agreed that these component genomes are derived from diploid wild ancestors, the exact species involved has been a matter of some research. Although the evidence is not completely clear cut, analysis of data from molecular markers, cytogenetics, morphology and geographical distributions support that *A. duranensis* and *A. ipaënsis* are the direct ancestors of cultivated peanut (Kochert et al. 1996; Seijo et al., 2004).

The study of peanut's diploid wild relatives is therefore attractive in a number of ways: it avoids the complexities of a tetraploid genome, provides a route to the isolation of wild alleles conferring, for instance, disease resistance and will facilitate the study of the distinct repetitive elements, and evolution of the AA and BB genomes. In this work, two BAC libraries representing the most probable diploid ancestors of peanut, *A. duranensis* and *A. ipaënsis* were successfully constructed. In addition to being ancestral, the species harbor resistances to nematode and fungal diseases (Subrahmanyam et al., 1983). The AA genome representative, *A. duranensis*, is of the same species as the parent of the mapping population used for the construction of the *Arachis* SSR-based map (Moretzsohn et al., 2005) and, *A. ipaënsis* is a parent of the BB mapping population (Oliveira et al., 2007). This will facilitate the development of a marker-based physical map and the integration of genetic and physical maps.

A number of steps needed to be added to the standard protocols of nuclei extraction in order obtain HMW DNA without contamination from polyphenols and carbohydrates which are abundant in *Arachis* leaves. Among them, the addition of PVP-40 to the extraction buffer, the centrifugation of the leaf homogenate through Percoll gradient (37.5%), purging the agarose plugs from impurities by PFGE and extending the time of incubation with the enzyme buffer prior to digestion were the most relevant. Screening with chloroplast and mitochondrial probes showed that organelle DNA contamination was very low and comparable to other BAC libraries constructed from plant leaves (Akhunov et al., 2005; Nam et al., 2005; Ming et al., 2001).

The genome coverage of the AA genome BAC library was theoretically 7,4 haploid genome equivalents. In order to test the genome coverage further, we used “anchor” markers: gene-based sequences that define unique loci in the genetic linkage maps of multiple species (Fredslund et al 2006). The probes used were PCR amplified from *Arachis* DNA and have been mapped to different linkage groups in the AA genetic map (unpublished data). The number of clones identified by the four anchor markers used as probes in the AA library was 5,6, somewhat lower than expected from the theoretical genome coverage. According to Wu and Zhang (2001) in some cases the actual coverage of a large-insert BAC library is lower than its theoretical genome coverage due to particularly high or low density of restriction sites in certain genome regions or difficulties in cloning too large or too small fragments. On the other hand, it is largely accepted that 99% coverage is equivalent to 4,7X haploid genomes (Zhang et al., 2001). Therefore, the *A. duranensis* genome is well represented and the library will be suitable for many applications.

The coverage for the BB genome library is more difficult to estimate. According to Singh et al. (1996), the 2C DNA mean values (genome size) for *A. ipaënsis* is 5,6 pg (Feulgen densitometry). The same study indicated 2C values for *A. duranensis*, *A. hypogaeae* and *A. monticola* from 1.7 to 2.0-fold higher than data obtained utilizing flow cytometry (Temsch & Greillhuber, 2001). As new data on flow cytometry for *A. ipaënsis* is not yet available, we have considered the C value for the species between 2,8 to 5,6 pg, and therefore, the BAC genomic library covering from 2,7 to 5,3 haploid genome equivalents. The number of clones in the BB library identified by two anchor markers used as probes identified an average of 4,5 clones, and this result seems to support a coverage at the higher end of the estimated range. Because anchor markers are single copy, the BACs identified will enable comparisons of orthologous regions of different genomes, AA and BB of *Arachis* and other legume genomes such as *Lotus* and *Medicago*.

The two BAC libraries were also probed with S1_A_36, an RGA that co-segregates to a QTL for resistance to *C. personatum* (Moretzohn, 2006 and unpublished data). Two hybridizing clones were found in the *A. duranensis* library, but none in the *A. ipaënsis* library. This single comparison may indicate the presence of genome-specific alleles, although more work is needed to

confirm this. Sequencing of the RGA containing BAC clones should enable the identification of microsatellites tightly linked to the RGA of interest, thus providing more convenient markers for tracking the QTL in segregating populations.

In summary, here we describe the production of BAC libraries for the AA and BB genomes of *Arachis*, the libraries will be a useful resource for, the isolation of genes, the construction and correlation of physical and genetic maps, the isolation of probes for cytogenetic analysis, the study of the evolution of the two genome types, and by comparison with the allotetraploid genome of cultivated peanut, for the study of the evolution of polyploidy genomes.

Acknowledgments

This work was funded by the CGP Challenge program and host institutions. Karina Proite had a doctoral fellowship granted by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES).

The authors would like to thank Dr. José.F.M.Valls for his valuable advice and for providing seeds from EMBRAPA's Germplasm Bank, also thanks are due to Xavier Sabau for robotic technical assistance.

Table 1: Characteristics of the *A. duranensis* and *A. ipaënsis* BAC libraries derived from randomly picked colonies.

Species	Ligations (no.)	Genome size (Mb)	Clones (no.)	Average insert size (kb)	MtDNA(%)	cpDNA(%)	Estimated genome coverage
<i>B. duranensis</i>	5	1260 ^a	84,096	112	0.21	0.016	7.4x
<i>B. ipaënsis</i>	5	1415-2830 ^b	75,648	100	0.081	0.363	5.3-2.7 ^b x

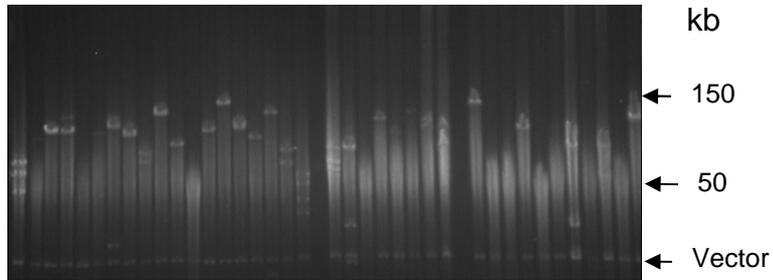
^a Temsch & Greilhuber, 2001

^b Singh *et al*, 1996

Table 2: Clones used for DNA hybridisation with BAC high-density screening membranes, and number of positive colonies.

Probe	Number of clones hybridizing in BAC library	
	<i>A. duranensis</i>	<i>A. ipaënsis</i>
RGA S1_A_36	2	0
Leg083	2	5
Leg128	4	4
Leg092, Leg149, Leg178 (mixed)	19	Not tested

A



B

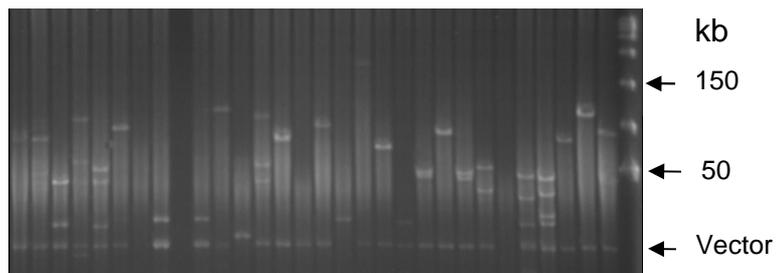


Fig. 1: Pulsed Field Gel Electrophoresis of randomly selected clones from the *A. duranensis* (a) and *A. ipaënsis* (b) *Hind*III libraries. The inserts were released from the plasmid pIndigo BAC-5 *Hind*III-Cloning Ready by digestion with *Not* I. The size of the marker Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs) are given in kilobase (kb).

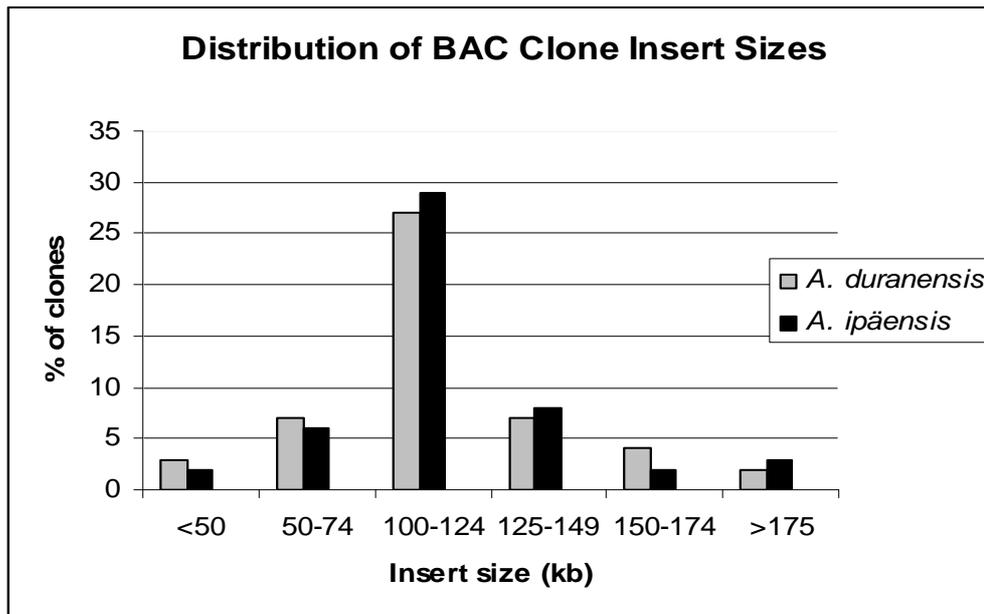


Fig.2 Distribution of insert sizes from randomly selected BAC clones from the *A. duranensis* and *A. ipaënsis* libraries. Inserts were excised by digestion with *NotI*.

References

- Akhunov ED, Akhunova AR, Dvorak J (2005) BAC libraries of *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* and *Ae. tauschii*, the diploid ancestors of polyploidy wheat. *Theor Appl Genet* 111:1617-1622
- Asnaghi C, Paulet F, Kaye C, Grivet L, Deu M, Glaszmann JC, D'Hont A (2000) Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene. *Theor Appl Genet* 101:962-969
- Bertioli DJ, Leal-Bertioli SCM, Lion MB, Santos VL, Pappas Jr.G, Cannon SB, Guimarães PM (2003) A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol Gen Genomics* 270:34-45
- Bouzidi MF, Franchel J, Tao Q, Storno K, Mraz A, Nicolas P, Mouzeyar S (2006) A sunflower BAC library suitable for PCR screening and physical mapping of targeted genomic regions. *Theor Appl Genet* 113:81-89
- Burow MD, Simpson CE, Starr JL, Paterson AH (2001) Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics* 159:823–837
- Chalhoub B, Belcram H, Caboche M (2004) Efficient cloning of plant genomes into bacterial artificial chromosome (BAC) libraries with large and more uniform insert size. *Plant Biotech J* 2:181-188
- Danesh D, Peñuela S, Mudge J, Denny RL, Nordstrom H, Martinez JP, Young ND (1998) A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor Appl Genet* 96:196-202
- Dvorak J, Yang ZL, You FM, Luo MC (2004) Deletion polymorphism in wheat chromosome regions with contrasting recombination rates. *Genetics* 168:1665-1675
- Food and Agriculture Organization (2003) FAOSTAT Agriculture.
- Fredslund J, Madsen LH, Hougaard BK, Nielsen AM, Bertioli D, Sandal N, Stougaard J, Schauser L. (2006) A general pipeline for the development of anchor markers for comparative genomics in plants *BMC Genomics* 2006, 7:207
- Gaafar RM, Hohmann U, Jung C (2005) Bacterial artificial chromosome-derived molecular markers for early bolting in sugar beet. *Theor Appl Genet* 110:1027-1037
- Gardiner, J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M., Landewe, T., Fengler, K., Useche, F., Hanafey, M., Tingey, S., Chou, H., Wing, R., Soderlund, C., Coe, E.H.Jr. Anchoring 9,371 maize expressed sequence Tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome

- contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiology* 134:1317-1326.
- Gobbi A, Teixeira C, Moretzohn M, Guimarães P, Leal-Bertioli S, Bertioli D, Lopes C R, Gimenes M (2006) Development of a linkage map to species of B genome related to the peanut (*Arachis hypogaea*–AABB) Plant and Animal Genome XIV Conference. 14-18 Jan. San Diego, California. Abstracts. P679
- Halward TM, Stalker HT, Larue EA, Kochert G (1991) Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome* 34: 1013-1020
- Halward T, Stalker HT, Kochert G (1993) Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species *Theoretical and Applied Genetics* 37:379-384
- Hong G., A rapid and accurate strategy for rice contig map construction by combination of fingerprinting and hybridization. *Plant Mol. Biol.* 35 (1997) 129-133.
- Kazazian HH. (2004) Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Kawasaki S, Murakami Y (2000) Genome Analysis of *Lotus japonicus*. *J Plant Res* 0918-9440
- Kochert G, Stalker HT, Gimenes M, Galgaro L, Lopes CR, Moore K (1996) RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Amer J Bot* 83:1282-11291
- Liu, C. J., Bateson, M., Ma, Z. Y., Miyagi, M., Lambrides, C. J., Humphry, M (2004) Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Theoretical and Applied Genetics* 110(1):151-156
- Luo M, Wang YH, Frisch D, Joobeur T, Wing RA, Dean RA (2001) Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom-2). *Genome* 44:154–162
- Luo M, Liang XQ, Dang P, Holbrook CC, Bausher MG, Lee RD, Guo BZ (2005a) Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Sci*, 169:695-703 (c).
- Luo M, Dang P, Bausher MG, Holbrook CC, Lee RD, Lynch RE, Guo BZ (2005b) Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytopathol*, 95: 381-387.

- Luo, M Dang, P Guo, BZ, He, G, Holbrook, C, Bausher, MG, Lee, RD (2005c) Generation of Expressed Sequenced tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut *Crop Sci* 2005, 45:346-353
- Martins W, Sousa D, Proite K, Guimarães PM, Moretzsohn M, Bertioli D (2006) New softwares for automated microsatellite marker development. *Nucleic Acid Res* 34(4): e31
- Meksem K, Zobrist K, Ruben E, Hyten D, Quanzhou T, Zhang HB (2000) Two large-insert soybean genomic libraries constructed in a binary vector: applications in chromosome walking and genome wide physical mapping. *Theor Appl Genet* 101:747-755
- Moretzsohn, M.C., Leoi, L., Proite, K., Guimarães, P.M., Leal- Bertioli,S.C.M., Gimenes, M.A., Martins, W.S., Grattapaglia, D., Bertioli, D.J. (2005) Microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 111:1060-1071.
- Moretzsohn MC (2006) Desenvolvimento e mapeamento de marcadores microssatélites e identificação de QTLs ligados à produtividade e à resistência à mancha preta em *Arachis* spp. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006. 142 p.
- Ming R, Moore PH, Zee F, Abbey CA, Ma H, Paterson AH (2001) Construction and characterization of a papaya BAC library as a foundation for molecular dissection of a tree fruit genome. *Theor Appl Genet* 102:892-899
- Mozo T., Dewar K., Dunn P., Ecker, J.R., Fischer S., Kloska S., Lehrach H., Marra M., Martienssen R., Meier-Ewert S., Altmann T., A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome, *Nature Genetics* 22 (1999) 271-275.
- Nam YW, Lee JR, Song KH, Lee MK, Robbins MD, Chung SM, Staub JE, Zhang HB (2005) Construction of two BAC libraries from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and identification of clones linked to yield component quantitative trait loci. *Theor Appl Genet* 111:150-161
- Nelson SC, Starr JL, Simpson CE (1990) Expression of resistance to *Meloydogine arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. *J Nematology* 22: 423-425
- Oliveira W, Gobbi A, Oliveira E, Moretzsohn MC, Lopes CR, Gimenes M. (2007) A Genetic Linkage Map of *Arachis* B Genome Using RAPD Markers Plant and Animal Genome XV Conference. 13-17 Jan. San Diego, Califórnia. Abstracts. P428
- Peterson DG, Tomkins JP, Frisch DA, Wing, RA, Paterson AH (2000) Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *J Agric Genomics* 5: <http://www.ncgr.org/research/jag>.

- Proite K, Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, Moretzsohn MC, da Silva FR, Martins N F, Guimarães PM (2007) ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology* 2007, 7:7 doi:10.1186/1471-2229-7-7
- Sato S, Isobe S, Asamizu E, Ohmido N, Kataoka R, Nakamura Y, Kaneko T, Sakurai N, Okumura K, Klimenko I, Sasamoto S, Wada T, Watanabe A, Kohara M, Fujishiro T, and Tabata S, (2005). Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) *DNA Research* 12, 301-364.
- Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas, A., Ducasse, D., Moscone, E.A. (2004) Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (leguminosae). *American Journal of Botany* 91:1294-1303.
- Singh KP, Raina SN, Singh AK (1996) Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Arachis* species. *Genome* 39:890-897.
- Stevens MR, Coleman CE, Parkinson SE, Maughan PJ, Zhang HB, Balzotti MR, Kooyman DL, Arumuganathan K, Bonifacio A, Fairbanks DJ, Jellen EN, Stevens JJ (2006) Construction of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAC library and its use in identifying genes encoding seed storage proteins. *Theor Appl Genetics* 12:1593-600
- Subrahmanyam P, McDonald D, Gibbons RW, Subba RPV (1983) Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. *Phytopathology* 73: 253-256
- Swift H. 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Genetics* 36: 643-654.
- Temsch EM, Greilhuber J (2000) Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. *Genome* 43:449-451
- Temsch EM, Greilhuber J (2001) Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. *Genome* 44:826-830
- USDA-FAS (2006) USDA Foreign Agricultural Service, Circular, WAP-05-06, May, 2006
- Vanhouten W, Mackensie S (1999) Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Mol Biol* 40:977-983
- Vilarinhos AD, Piffanelli P, Lagoda P, Thibivilliers S, Sabau X, Carreel F, D'Hont AD (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla) *Theor Appl Genet* 106:1102-1106

Young ND, Weeden NF, Kochert G (1996) Genome mapping in legumes (Family Fabaceae). In: AH Paterson (ed.). Genome mapping in plants. R.G. Landes, Austin, TX.

Yüksel B, Paterson AH (2005) Construction and characterization of a peanut *Hind*III BAC library. *Theor Appl Genet* 111:630-639

Zhang HB, Zhao X, Ding X, Paterson AH, Wing RA (1995) Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J* 7:175-184

Zhang HB, Wu C (2001) BAC as tools for genome sequencing. *Plant Physiol Biochem* 39:195-209