



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS E
GENÔMICAS PARA INTROGRESSÃO DE GENES SILVESTRES NO
AMENDOIM CULTIVADO**

RODRIGO FURTADO DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA – DF
JUNHO, 2010

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS E GENÔMICAS PARA
INTROGRESSÃO DE GENES SILVESTRES NO AMENDOIM CULTIVADO**

RODRIGO FURTADO DOS SANTOS

**ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT SOLON DE PONTES
CO-ORIENTADOR: MÁRCIO DE CARVALHO MORETZSOHN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 005/2010

**BRASÍLIA – DF
JUNHO, 2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS E GENÔMICAS PARA
INTROGRESSÃO DE GENES SILVESTRES NO AMENDOIM CULTIVADO**

RODRIGO FURTADO DOS SANTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
AGRONOMIA.**

Márcio de Carvalho Moretzsohn, Dr. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(Co-orientador) CPF: 463.097.306-06
e-mail: marciocm@cenargen.embrapa.br

APROVADA POR:

Rose G. Monnerat S. de Pontes, Dr^a. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(Orientadora) CPF: 512.803.701-06
e-mail: rose@cenargen.embrapa.br

José Ricardo Peixoto, Dr. (Universidade de Brasília)
(Examinador interno) CPF: 354.356.236-34
e-mail: peixoto@unb.br

Gláucia Salles Cortopassi Buso, Dr^a. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(Examinadora externa) CPF: 227.342.011-00
e-mail: buso@cenargen.embrapa.br

Brasília/DF, 30 de junho de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Rodrigo Furtado dos

Desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas para introgressão de genes silvestres no amendoim cultivado. / Rodrigo Furtado dos Santos; Orientação de Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes – Brasília, 2010.

44p.:il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010.

1. *Arachis hypogaea* 2. espécies silvestres 3. mapeamento genético 4. SSR 5. linhagens de introgressão. I. Pontes, R. G. M. S. II. Título. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Santos, R. F. **Desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas para introgressão de genes silvestres no amendoim cultivado.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 44p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Rodrigo Furtado dos Santos

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas para introgressão de genes silvestres no amendoim cultivado.

GRAU: Mestre Ano: 2010

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Rodrigo Furtado dos Santos

CPF: 900.785.601-44

QNA 15 casa 12, Taguatinga Norte

Brasília – Distrito Federal

Cep: 72110-150

Telefone: (61) 3351-1969

rodrigofurtado@gmail.com

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

Agradecimentos

À Deus, pelas oportunidades que tem me oferecido

À minha família e amigos que têm me ajudado a aproveitá-las

A citar:

Meus pais e irmãos que nem sempre entenderam a importância do trabalho, mas me apoiaram incondicionalmente

Ediene, namorada-amiga-ajudante-colega-chefe-conselheira, por todo amparo e carinho que me dedica

Rose Monnerat pela orientação e apoio inestimáveis

Meu co-orientador, colega e amigo Márcio Moretzsohn por ter me dado a oportunidade de trabalhar com projeto que tanto admiro, por toda paciência e exemplo como profissional

Colegas de bancada e do grupo de pesquisa em *Arachis*: Flávia, Selma, Rafaela, Uriele, Maíra e Aline, Soraya, David, Bruna, Daiane e Andressa

Colegas do Laboratório de Genética Vegetal: Gláucia, Zilneide, Vânia, Peter, Marco Antônio “Marcão”, Marília, Ana Ciampi, Bruna, Thaísa, Túlio, Marco, Camila, Carla, Patrícia, Dani, Natália, Mariana, Dione, Pedro e Sandra

Colegas da Embrapa Agroenergia: Bruno, Betânia, Leonardo, Sílvia, Dílcio, Simone, Bárbara, André e Betúlia

Colegas do laboratório de biotecnologia da UCB: Nídia, Jéssica, Shelly, Virgílio, Lucas, Raquel, Ciro, Bárbara, Samuel, Ohana e Idacuí.

Agradeço à Embrapa Recursos Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília e Embrapa Agroenergia pelo suporte físico, técnico e financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. A cultura do amendoim | 1 |
| 1.2. O gênero <i>Arachis</i> | 3 |
| 1.3. Recursos genéticos e o melhoramento de plantas | 4 |
| 1.4. Melhoramento genético do amendoim | 5 |
| 1.5. Melhoramento molecular de plantas | 6 |
| 1.6. Mapeamento genético..... | 8 |
| 1.7. Linhagens de introgressão | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Construção do mapa de ligação | 17 |
| 3.1.1. Material vegetal | 17 |
| 3.1.2. Extração de DNA..... | 17 |
| 3.1.3. PCR e análise dos locos microssatélites..... | 18 |
| 3.1.4. Construção do mapa de ligação | 19 |
| 3.2. Desenvolvimento de linhagens de introgressão..... | 19 |
| 3.2.1. Material vegetal e hibridações | 19 |
| 3.2.2. Identificação de híbridos..... | 20 |
| 3.2.3. Genotipagem das linhagens de introgressão | 21 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 4.1. Construção do mapa de ligação | 23 |
| 4.2. Desenvolvimento e caracterização de linhagens de introgressão | 30 |
| 5. CONCLUSÕES | 34 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| 7. FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO | 44 |

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS E GENÔMICAS PARA INTROGRESSÃO DE GENES SILVESTRES NO AMENDOIM CULTIVADO

Resumo

O gênero *Arachis* possui 80 espécies descritas. A espécie cultivada comercialmente para a produção de grãos de amendoim (*A. hypogaea*) é dispersa e cultivada ao redor do mundo. Ferramentas genéticas e genômicas, como mapeamento genético e obtenção de populações de retrocruzamento, vêm sendo desenvolvidas visando auxiliar programas de melhoramento genético de amendoim, principalmente para introgressão de genes de resistência das espécies silvestres na espécie cultivada. Primeiramente um mapa genético de ligação foi construído em uma população F_2 resultante do cruzamento entre *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético obtido do cruzamento de duas espécies silvestres diplóides, cujos cromossomos foram duplicados com colchicina (Runner IAC 886 – genoma AB x [*A. duranensis* – genoma A x *A. ipaënsis* – genoma B]^c). Foram testados 636 marcadores microssatélites, dos quais 173 mostraram-se polimórficos. Desses 69% foram polimórficos para o genoma A e 31% polimórficos para o genoma B. Apenas 113 marcadores foram genotipados na população F_2 , dos quais apenas 6 desviaram da proporção 1:2:1 esperada ($p < 0,05$). Os marcadores não distorcidos foram utilizados para definição dos grupos de ligação, usando o LOD mínimo de 4 e fração de recombinação máxima de 0,35. O mapa gerado apresentou 74 locos mapeados no genoma A, distribuídos em 10 grupos de ligação e com tamanho total de 868,6 cM. No genoma B, 23 locos foram mapeados em 6 grupos de ligação, com distância total de 387,6 cM. O mapa apresentou grupos de ligação com tamanhos que variaram de 8,7 cM a 135,9 cM e os 16 grupos totalizaram um comprimento total de mapa de 1256,2 cM. Linhagens de introgressão foram desenvolvidas por gerações de retrocruzamentos a partir do híbrido F_1 (Runner IAC 886 x [*A. duranensis* x *A. ipaënsis*]^c) e caracterizadas geneticamente com marcadores microssatélites selecionados do mapa genético desenvolvido. Na geração RC_1 foram identificados 43 híbridos, e com o retrocruzamento desses com a cultivar Runner IAC 886, foram obtidos 38 híbridos na geração RC_2 . Para a caracterização genômica das linhagens de introgressão, foram utilizados 36 marcadores microssatélites, distribuídos em 11 grupos de ligação do mapa tetraplóide obtido. A análise de introgressão revelou que, na geração RC_1 , a porcentagem média dos segmentos genômicos heterozigotos foi

de 41,96%. Na geração RC₂, a porcentagem média diminuiu para 11,79%, variando entre 2,78% e 36,11% entre as 37 linhagens identificadas como híbridas. Observa-se, portanto, uma diminuição relativa entre as gerações de 71,9% do conteúdo genômico heterozigoto (doador). Nas gerações RC₁ e RC₂, foi observada, nos locos amostrados, a completa cobertura do genoma silvestre, distribuído no “background” da variedade elite Runner IAC 886. O desenvolvimento das linhagens de introgressão será de grande utilidade para o melhoramento da cultura, por possibilitar a descoberta, a localização e a avaliação de genes silvestres de interesse no background da variedade cultivada. A implementação de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento poderá acelerar consideravelmente, além de tornar mais eficiente, o processo de introgressão desses genes silvestres no amendoim cultivado.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea*, espécies silvestres, mapeamento genético, SSR, linhagens de introgressão.

DEVELOPMENT OF GENETICS AND GENOMICS TOOLS FOR WILD GENE INTROGRESSION IN THE CULTIVATED PEANUT

Abstract

The genus *Arachis* has 80 described species. The commercially cultivated species for peanut grain production (*A. hypogaea*) is dispersed and cultivated throughout the world. Genetic and genomic tools, such as genetic mapping and backcross populations, have been developed to assist peanut breeding programs, especially for introgression of resistance genes from wild species into the cultivated species. Firstly a genetic linkage map was constructed in an F₂ population resulting from a crossbetween *A. hypogaea* and a synthetic amphidiploid, obtained by crossing two wild diploid species whose chromosomes have been duplicated with colchicine (Runner IAC 886 - genome AB x [*A. duranensis* - genome A x *A. ipaënsis* - B genome][©]). A total of 636 microsatellite markers were tested, of which 173 showed polymorphism, being 69% for A genome and 31.2% polymorphic for the B genome. Only 113 markers were genotyped in the F₂ population, where only six deviated from the 1:2:1 expected proportion ($p < 0.05$). Non-distorted markers were used to establish the linkage groups using a minimum LOD score of 4 and maximum recombination fraction value of 0.35. This map had 74 loci mapped in the genome A, distributed in 10 linkage groups and total size of 868.6 cM. In the B genome, 23 loci were mapped into six linkage groups, with total distance of 387.6 cM. The map showed linkage groups ranging in size from 8.7 cM to 135.9 cM and 16 groups with a total map length of 1256.2 cM. Introgression lines were developed by backcrosses of the F₁ hybrid (Runner IAC 886 x [*A. duranensis* x *A. ipaënsis*][©]) and genetically characterized with microsatellite markers selected from the genetic map obtained. In the BC₁ generation 43 hybrids were identified, and with their backcross to the Runner IAC 886 cultivar, 38 hybrids were obtained in BC₂ generation. For genetic characterization of the introgression lines, 36 microsatellite markers were used, distributed through 11 linkage groups from the tetraploid F₂ map. Introgression analysis revealed that, in the BC₁ generation, the mean percentage of heterozygous genomic segments was 41.96%. In RC₂ generation, the mean percentage decreased to 11.79%, ranging from 2.78% to 36.11% among the 37 plants identified as hybrids. It was observed therefore a relative decrease of heterozygous (donor) genomic

content between generations of 71.9%. In the BC₁ and BC₂ generations a complete coverage of the wild genome distributed in the background of the Runner IAC 886 elite variety was obtained. The use of microsatellite markers allowed the construction of a genetic map for the *Arachis* tetraploid genome through an interspecific population. The development of introgression lines will be very useful for crop breeding, by enabling the discovery, location and evaluation of wild genes of interest in the cultivated variety background. The implementation of marker-assisted selection in breeding programs will accelerate considerably, and making more efficient, the process of introgression of wild genes into cultivated peanut.

Key words: *Arachis hypogaea*, wild species, genetic mapping, SSR, introgression lines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta cultivada cujas sementes, uma excelente fonte de proteína e óleo vegetal (Valls *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2001), vêm sendo consumidas cruas pelo homem desde a pré-história, quando ainda não conhecia a cerâmica nem dominava o fogo, necessários para o cozimento de alimentos. Trata-se de um dos alimentos humanos mais nutritivos e, ao mesmo tempo, de fácil digestão (Freitas *et al.*, 2003). É uma cultura importante internacionalmente, sendo cultivada em mais de 80 países nas Américas, na Ásia e na África (Freitas *et al.*, 2005).

Os grãos de amendoim contêm aproximadamente 20-25% de proteína e 45% de óleo (Godoy *et al.*, 1999). A produção mundial, no ano de 2008, foi de 38,2 milhões de toneladas de amendoim em casca, representando a sexta oleaginosa mais produzida no mundo. Amendoim, junto com dendê, soja, algodão, coco e canola somam 90,4% da produção mundial de oleaginosas e 5,8 milhões de toneladas de óleo. Os maiores produtores mundiais são: China, Índia e Nigéria, com 14,3 milhões, 7,3 milhões e 3,9 milhões de toneladas produzidas, respectivamente. O Brasil ocupa a 15ª posição entre os maiores produtores de amendoim em casca, no entanto avaliando-se a produtividade dentre estes maiores produtores, o Brasil tem a quarta maior produtividade, destacando seu potencial produtivo dentro do mercado mundial de amendoim (FAOSTAT, 2010).

No Brasil, na safra de 2007/2008, foram plantados 115,4 mil hectares com a cultura do amendoim, colhendo-se um total de 305,8 mil toneladas de grãos. Observou-se um aumento de 35,5% na produção, resultante do aumento de 12,5% na área plantada e 20,4% na produtividade em relação à safra anterior (Figura 1.1). Aumento também foi observado na produção em São Paulo, o maior estado produtor do país, onde nesta mesma safra foram plantados 81,3 mil hectares (70,45% da área total) e colhidas 236,4 mil toneladas de grãos (77,30% da produção total), atingindo a produtividade de 2,91 t/ha, superior à média nacional nesta safra, que foi de 2,65 t/ha (Conab, 2008).

A espécie *Arachis hypogaea* é dividida em duas subespécies e seis variedades botânicas, sendo elas: *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hirsuta*, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var.

fastigiata, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris*, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *aequatoriana*, e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *peruviana* (Krapovickas & Gregory, 1994).

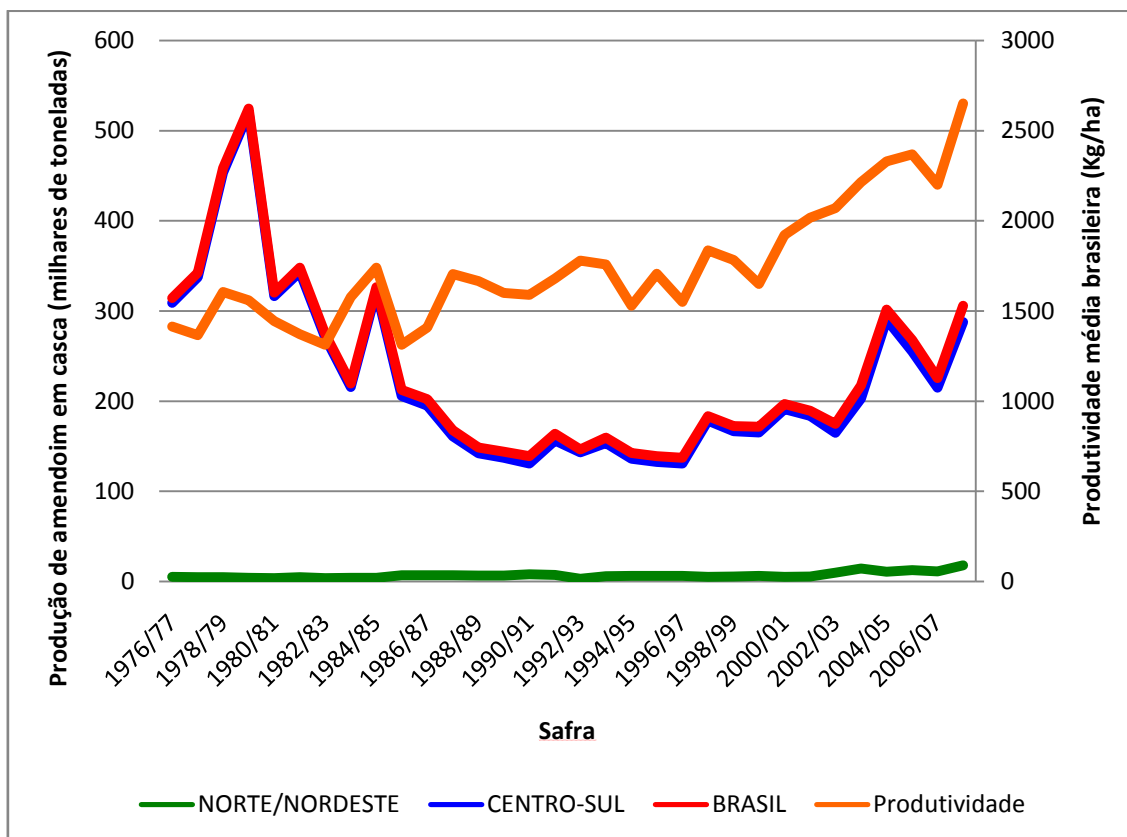


Figura 1.1 – Série histórica de produção brasileira de amendoim (Conab, 2008).

Há uma classificação agrônômica que utiliza uma nomenclatura para distinguir as cultivares, separando-as em três grupos morfológicos, com base em características vegetativas e reprodutivas. Assim, cultivares dos grupos Runner e Virgínia apresentam características morfológicas descritas para representantes da subespécie *hypogaea* var. *hypogaea*, como: hábito de crescimento rasteiro, semi-rasteiro e arbustivo, ramificação profusa (presença de ramos primários, secundários e terciários), ciclo longo, ausência de flores na haste principal e vagens com duas sementes. Na maioria dos acessos do grupo Virgínia, as sementes são de tamanho médio a grande, e consideravelmente menores no grupo Runner. Valência e Spanish referem-se aos grupos morfológicos associados à subespécie *fastigiata* (variedades *fastigiata* e *vulgaris*, respectivamente). Plantas dessa subespécie apresentam hábito de crescimento ereto ou semi-ereto, ramificação esparsa (poucos

ramos secundários e raros terciários), ciclo curto e haste principal com flores. As vagens do grupo Spanish apresentam duas sementes de tamanho pequeno a médio. As do grupo Valência podem apresentar proporções variáveis de duas a quatro sementes/vagem (Godoy *et al.*, 1999). Contudo, algumas cultivares podem ter características de tipos diversos, devido a cruzamentos entre variedades botânicas diferentes em sua origem.

1.2. O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* está dividido em nove seções taxonômicas, segundo a morfologia, a viabilidade de cruzamentos e a região de dispersão ao longo do continente sul-americano (Krapovickas & Gregory, 1994). Das 80 espécies descritas do gênero *Arachis*, nativas de cinco países sul-americanos, cerca de 60 espécies ocorrem no Brasil, 15 na Bolívia, 12 no Paraguai, sete na Argentina e duas no Uruguai (Valls, 1995; Valls & Simpson, 2005). Entretanto, a espécie cultivada comercialmente para a produção de grãos de amendoim (*A. hypogaea*) é dispersa e cultivada ao redor do mundo.

Sabe-se que a maioria das espécies silvestres é diplóide ($2n = 2x = 20$ cromossomos) e algumas espécies da seção *Arachis* possuem um par de cromossomos diferenciados denominado par "A"; enquanto a espécie cultivada é tetraplóide ($2n = 4x = 40$ cromossomos) e possui os genomas AB (Krapovickas & Gregory, 1994).

O gênero *Arachis* e, em especial a seção *Arachis* na qual é descrita *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994), têm sido intensamente estudados (Koppolu *et al.*, 2010; Bravo *et al.*, 2006; Milla *et al.*, 2005, Tallury *et al.*, 2005; Moretzsohn *et al.*, 2004; Fávero, 2004; Gimenes *et al.*, 2002a,b; Simpson, 2001; Valls, 2000; Stalker & Moss, 1987; Moraes & Salgado, 1979), devido ao alto potencial de resistência apresentado pelas espécies silvestres às principais doenças que atacam o amendoim, constituindo uma importante fonte de genes para várias das características de interesse para o melhoramento do amendoim cultivado (Fávero, 2004). A obtenção de genótipos anfidiplóides silvestres resistentes permite a utilização de germoplasma de espécies silvestres diplóides como genitores em trabalhos de melhoramento (Simpson, 2001). A obtenção dos anfidiplóides sintéticos é feita a partir do cruzamento entre espécies silvestres de genoma B com as de genoma A, gerando um descendente estéril AB com 20 cromossomos. O híbrido

estéril é então tratado com colchicina para a duplicação do material genético permitindo, dessa forma, o cruzamento com *A. hypogaea*.

1.3. Recursos genéticos e o melhoramento de plantas

O Brasil, ao lado de Colômbia, Venezuela, México, Equador e Peru são os países da América Latina detentores da maior biodiversidade, entendida como conjunto de plantas, animais e microorganismos em interação com o ambiente em que vivem. O Brasil possui cerca de 55 mil espécies de plantas superiores, correspondendo a cerca de 22% do total aproximado de 250 mil existentes no mundo (Valois, 1999).

Segundo Queiróz (1999), os recursos genéticos são definidos como a fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual e potencial. Os recursos fitogenéticos abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, espécies que são parentes silvestres das plantas cultivadas, raças locais de plantas, variedades de plantas, linhagens melhoradas e populações experimentais, linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais.

O manejo adequado dos recursos genéticos não se limita à conservação, mas também a várias etapas, desde a coleta ou introdução, multiplicação, avaliação, caracterização e à utilização desses em programas de melhoramento genético e/ou uso direto pelo homem.

Um grande desafio é o incremento do uso de germoplasma conservado, pois atualmente apenas cerca de 4% dos genótipos armazenados vêm sendo utilizados, mesmo a nível mundial (Valois, 1999).

O germoplasma disponível pode servir de fonte de genes específicos a serem introgridos em populações adaptadas ou materiais elite, e pode ser usado de uma forma geral para ampliar a base genética disponível de populações adaptadas em programas de melhoramento genético.

Atualmente o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) *Arachis*, mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, possui em seu acervo *ex situ* cerca de 1200 acessos de 78 espécies de *Arachis*, incluindo todas de ocorrência no Brasil (J. F. M. Valls, comunicação pessoal).

1.4. Melhoramento genético do amendoim

Dentre os objetivos do melhoramento genético do amendoim destaca-se a obtenção de cultivares com produções superiores e estáveis, resistentes a pragas e doenças e com larga adaptação ambiental (Santos, 1999). Os objetivos do melhoramento genético variam de importância, de acordo com a região produtora e sistemas de cultivo adotados. Para a região Sudeste, devido às condições climáticas favoráveis às doenças, a introdução de resistência às doenças é de grande importância. Os métodos de melhoramento genético de amendoim são os mesmos comumente usados para espécies autógamas, como seleção, melhoramento genealógico e retrocruzamento (Godoy *et al.*, 1999). Este último é indicado para a introgressão de caracteres em uma cultivar elite, sendo comumente usado para a hibridação com espécies silvestres, para a introgressão de genes exóticos a *A. hypogaea* (Fávero, 2004).

No Brasil, dentre os principais problemas da cultura, estão as doenças fúngicas de parte aérea como: mancha preta (causada por *Cercosporidium personatum* (Berk. & Curtis) Deighton), mancha-castanha (*Cercospora arachidicola* Hori), mancha barrenta (*Phoma arachidicola* Marasas *et al.*) e ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.) (Godoy *et al.*, 1999). *Arachis hypogaea* apresenta uma baixa variabilidade de genes de resistências a pragas, doenças e características de interesse agrônomo como resistência à restrição hídrica, típica do semi-árido brasileiro (Dwivedi *et al.*, 2003). No entanto, resistência a essas doenças tem sido encontrada em outras espécies de *Arachis* (Stalker & Simpson, 1995; Santos, 1999; Rao *et al.*, 2003; Dwivedi *et al.*, 2003; 2006). A transferência de genes de espécies silvestres para o amendoim cultivado tem sido bem sucedida, a partir de espécies da seção *Arachis*. Simpson e colaboradores (1993) apresentaram a linhagem TxAG6, um anfidiplóide tri-híbrido sintético {*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogeni*)}^c, que apresenta várias características desejáveis, já deu origem a uma cultivar de *A. hypogaea* resistente a nematóides. Garcia *et al.* (1995) selecionaram 73 marcadores RFLP, junto a 70 marcadores RAPD, para a análise de linhagens tetraplóides resultantes de um cruzamento entre *A. hypogaea* (AB), altamente suscetível, e *A. cardenasii* (A), resistente a *Meloidogyne arenaria*. Com isso, os autores detectaram a introgressão de regiões cromossômicas da espécie silvestre diplóide no amendoim cultivado e, posteriormente, identificaram dois genes dominantes que conferiam resistência a *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Garcia *et al.* 1996).

1.5. Melhoramento molecular de plantas

A metodologia clássica de melhoramento genético das principais culturas, baseada em princípios mendelianos associados à genética quantitativa e métodos estatísticos, tem permitido avanços genéticos cada vez menores (Dekkers, 2002). O uso de seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento pode acelerar consideravelmente, além de tornar mais eficiente, o processo de introgressão de genes desejados. Dentre as vantagens da seleção assistida podemos apontar que esta permite a seleção precoce e indireta de genótipos superiores, bem como aumenta a confiabilidade da seleção por não estar sujeita a efeitos ambientais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O melhoramento genético assistido por marcadores moleculares é baseado na associação entre características de interesse e variações alélicas de marcadores genéticos, e para tal são necessários a construção de mapas de ligação e o mapeamento dos genes de interesse. Em programas de melhoramento de plantas tradicionais, em que se utilizam espécies silvestres para a introdução de genes de resistência a estresses bióticos e abióticos, são comuns os esquemas de retrocruzamentos. Em cada geração de retrocruzamento com uma cultivar elite, são selecionadas as plantas que apresentam o fenótipo do alelo silvestre a ser introgridido e o fenótipo do parental elite recorrente para as outras características. Este processo resulta na introgressão de grande fração do genoma doador silvestre associado ao gene a ser selecionado (“linkage drag”) e, portanto, alelos indesejáveis do parental doador são introduzidos junto aos genes de interesse. Neste esquema, várias gerações de retrocruzamentos (6 a 8 gerações) são, em geral, necessárias para a eliminação de características indesejáveis transmitidas pelo parental doador, enquanto o genótipo do parental recorrente é mantido para os demais locos (Collard *et al.*, 2005).

Marcadores microssatélites são ideais para o desenvolvimento de mapas de ligação por serem codominantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e baseados em PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em estudos comparativos, em plantas, também foi mostrado que marcadores SSR são mais polimórficos do que outros tipos de marcadores moleculares (Powell *et al.*, 1996; Milbourne *et al.*, 1997; Bohn *et al.*, 1999). Uma vantagem adicional é que esses marcadores apresentam, em geral, alta taxa de transferência entre espécies

aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família (Choumane *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2005). A transferibilidade de SSR em *A. hypogaea* para espécies silvestres da seção *Arachis* tem sido relativamente alta, como foi mostrado por Moretzsohn *et al.* (2004) e Gimenes *et al.* (2007).

Marcadores microssatélites ou SSR (“simple sequence repeats”) são conjuntos de seqüências de um a seis nucleotídeos (“motif”) que se repetem em “tandem” em genomas eucariotos (Tautz & Renz, 1984; Litt & Luty, 1989). Com a utilização de um par de primers específicos, complementares às seqüências conservadas flangeadoras do loco SSR, a amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) permite a identificação de polimorfismo do loco, devido a diferenças no número de motifs entre os indivíduos analisados (Tautz, 1989; Weber & May 1989; Hancock, 1995). Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Figura 1.2).

As técnicas de genotipagem têm se tornado cada vez mais otimizadas, informativas e automatizadas, obtendo-se um custo eficaz. A detecção por fluorescência dos fragmentos de marcadores microssatélites, juntamente com a análise semi-automatizada, tem-se mostrado potente para atender a muitos desses critérios (Mitchell *et al.*, 1997). O uso dessa técnica tem uma grande vantagem em relação às técnicas de detecção por microssatélites radioativos e gel de prata, pois além de aumentar a eficiência e a precisão dos resultados, reduz consideravelmente o risco de exposição a radioisótopos e a íons de prata (Krishna *et al.*, 2004).

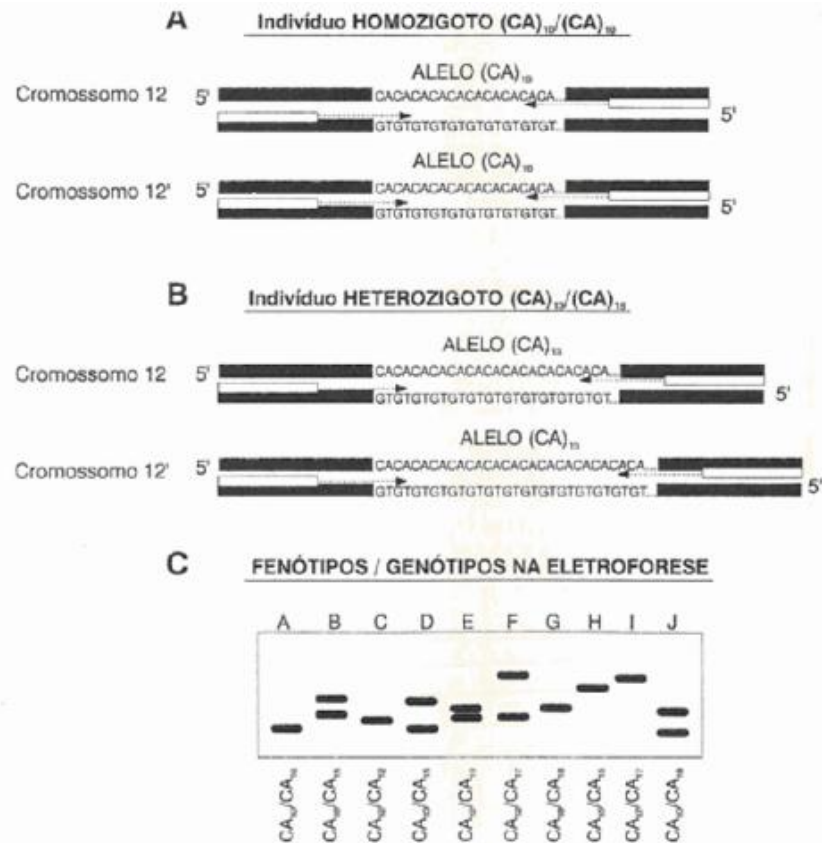


Figura 1.2 - Base genética e detecção de polimorfismos de microssatélites. Painéis A e B ilustram genótipos homocigoto (alelos iguais) e heterocigoto (alelos diferentes), respectivamente, para uma região genômica que compreende um microssatélite de elementos (CA)/(GT). O painel C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homocigotos (uma banda) e heterocigotos (duas bandas) em indivíduos diplóides (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

1.6. Mapeamento genético

Mapas genéticos vêm sendo propostos e desenvolvidos desde o início do século passado, baseados em marcadores morfológicos e citológicos. As primeiras idéias de mapeamento surgiram na primeira década de 1900, quando Morgan e colegas deram base para a teoria de que a segregação de alguns caracteres morfológicos não ocorria independentemente, e quando Stutervant sugeriu a utilização da frequência de recombinantes como uma medida de distância entre dois genes na construção de mapas genéticos, futuramente chamada de centiMorgan (cM). A quantidade desses caracteres é limitada e, somente na década de 1980, a construção de mapas tornou-se uma tarefa relativamente fácil, rápida e ilimitada para diversas espécies, devido ao surgimento dos marcadores moleculares, sendo possível estender essa ferramenta a várias espécies vegetais (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho & Silva, 2005). Atualmente é possível a construção de mapas de

ligação altamente saturados e ampla cobertura do genoma em um curto prazo (Pereira & Pereira, 2006).

Os mapas obtidos a partir de marcadores moleculares podem ser utilizados (1) na identificação e mapeamento de locos que controlam características monogênicas ou quantitativas, conhecidos também como QTL's ("Quantitative Trait Loci") (Ferreira & Grattapaglia, 1998), que após serem mapeados, podem ser utilizados para seleção indireta (ou seleção assistida por marcadores – SAM), ajudando nos programas de melhoramento tornando esse processo mais rápido e eficiente (Moretzsohn, 2006). (2) São utilizados em biotecnologia, servindo de base para isolamento de genes, técnica conhecida como clonagem baseada em mapeamento ou clonagem posicional, sendo necessária a construção de uma biblioteca que tenha grandes fragmentos de DNA genômico, como BACs – "bacterial artificial chromosomes" (Moretzsohn, 2006). (3) Também são usados para análise de sintenia ou estudos de mapeamento comparativo, colaborando na compreensão sobre a evolução dos genomas, comparando as estruturas genômicas de diferentes espécies, observando a conservação das distâncias e ordem nos cromossomos, podendo então ser usados como um meio de obtenção de mapa único de referência para as espécies vegetais cultivadas ao nível de famílias taxonômicas (Carneiro & Vieira, 2002). Coelho & Silva (2005) mostraram que existe uma alta homologia entre estruturas genômicas de diversas espécies, apontando que genes de interesse ou QTL's são compartilhados por diferentes genomas.

Para a construção de um mapa genético são necessárias três etapas principais: escolha da população de mapeamento, identificação de polimorfismos e análise de ligação entre os marcadores.

Para a construção do mapa de ligação é necessária uma população gerada a partir de genitores fenotipicamente contrastantes, preferencialmente para caracteres de interesse agrônomo/econômico, uma vez que a localização dos genes ou QTLs que controlam essas características são de grande interesse para o melhoramento de plantas (Carneiro & Vieira, 2002). Um mapa genético ou de ligação é construído a partir de um desequilíbrio de ligação, definido como desvios das frequências alélicas observadas em relação às esperadas sob independência. Esse desequilíbrio pode ser causado por fatores como deriva genética e seleção, sendo assim necessário o desenvolvimento de uma população de mapeamento, na qual o desequilíbrio é originado pela ligação física entre os locos (Coelho & Silva, 2005), ou seja, a

população deve ser segregante, com progenitores contrastantes para as características que se pretende estudar, e que possuam uma distância genética suficiente para identificação de marcadores polimórficos (Moretzsohn, 2006).

As populações mais utilizadas em mapas genéticos são as populações obtidas por retrocruzamento, populações F_2 , linhagens puras recombinantes (RIL – “Recombinant Inbred Lines”), linhagens de duplo-haplóides e cruzamento entre indivíduos heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Coelho & Silva, 2005). Uma progênie F_1 pode ser usada para a obtenção das populações de mapeamento dos tipos: F_2 duplos-haplóides, obtidos através da regeneração de plantas pela duplicação de pólen; retrocruzamento RC_1 , no qual a F_1 é retrocruzada com um dos parentais; F_2 segregante por autofecundação do híbrido F_1 ; e linhagens puras recombinantes (RILs) (Jones, 1997). Populações F_2 apresentam vantagens sobre os demais tipos, pois são de mais rápida obtenção e apresentam o máximo desequilíbrio de ligação, já que os indivíduos desta são portadores de dois gametas informativos (Coelho, 2000, citado por Carneiro & Vieira, 2002).

Para identificação dos marcadores polimórficos é necessário testar centenas de marcadores nas plantas progenitoras da população a ser utilizada, dependendo da distância genética existente entre elas. A seleção de qual marcador utilizar vai depender de suas características, como por exemplo, as vantagens e desvantagens, disponibilidade dos marcadores para a espécie, custo, entre outros. Então, após a seleção dos marcadores polimórficos, eles serão genotipados em toda a população de mapeamento e serão analisados os padrões de segregação, geralmente pelo teste de X^2 . Os padrões de segregação dependem do tipo da população e do marcador utilizado, podendo ser 1:2:1, 3:1 ou 1:1 (Moretzsohn, 2006).

Quanto à análise de ligação dos locos, três etapas são fundamentais: detectar a ligação entre os marcadores, determinar as distâncias genéticas e ordenar os marcadores nos grupos de ligação.

Observando as frequências alélicas observadas e esperadas sob independência, é possível verificar a existência de uma associação entre dois locos ou a ligação entre pares de marcadores. Essas frequências podem ser calculadas por modelos estatísticos como os testes de significância X^2 ou pela razão de verossimilhança (LR) (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho & Silva, 2005, Moretzsohn, 2006). Essa estatística permite avaliar a significância de dada hipótese pela razão da função de verossimilhança com valor estimado (onde há ligação entre os locos) e

outra com o valor fixado do parâmetro (H_0 – não há ligação). Esse teste possui uma distribuição aproximada de X^2 . Visando ajudar a interpretação desse modelo, tem-se usado bastante na construção de mapas genéticos a estatística do LOD score (“log of the odds”), que é o logaritmo na base 10 (log) da razão de verossimilhança. Normalmente os locos considerados como ligados apresentam valores de LOD superiores ou iguais a 3, já que esse indica uma hipótese alternativa de $10^3 = 1000$ vezes mais verossímil que a hipótese nula de segregação independente (Coelho & Silva, 2005; Cruz & Silva, 2006; Moretzsohn, 2006). Segundo Vieira e Carneiro (2002) para estabelecimento dos grupos de ligação, o LOD deve variar de 4 a 6, pois com grande quantidade de marcadores, LOD scores menores podem resultar em ligações ilegítimas e valores acima de 6 podem ocasionar a fragmentação dos grupos de ligação.

As distâncias genéticas (centiMorgan) são determinadas pela distância entre dois locos, de acordo com a frequência de recombinação ocorrida em cada geração ao longo dos cromossomos. Porém as frequências de recombinação não são aditivas, sendo inadequadas como medida direta de distância entre dois marcadores a serem mapeados, impedindo a adição de novos marcadores no mapa, sem que seja necessário ajustar as distâncias já estabelecidas. Para corrigir esse problema, foram criadas funções de mapeamento, sendo que as mais utilizadas em mapeamento genético vegetal têm sido as funções de Haldane (1919) e Kosambi (1944) (Liu, 1998; Coelho & Silva, 2005). A função de Haldane considera que a recombinação é independente (sem interferência), já a de Kosambi admite que as permutas próximas não são independentes, ou seja, leva em consideração a presença de interferência entre regiões relativamente próximas, decrescendo para locos mais distantes e igual a zero para locos independentes (Vieira & Carneiro, 2002, Coelho & Silva, 2005; Moretzsohn, 2006).

Pode-se definir grupo de ligação como sendo um grupo de genes localizados no mesmo cromossomo. Após o conhecimento das frequências de recombinação entre cada par de locos, identificam-se os grupos de ligação (Carneiro & Vieira, 2002). Programas utilizados para construção de mapas genéticos, como o Mapmaker (Lander *et al.*, 1987), possibilitam a detecção de ligação em um conjunto de centenas de marcadores pelo LOD score, além de permitir o ordenamento dos marcadores dentro dos grupos de ligação. Como passo seguinte, tem-se a determinação da melhor ordem dos marcadores que é um processo que tem como

objetivo minimizar a quantidade de permutas genéticas (Liu, 1998; Moretzsohn, 2006). Esse ordenamento pode ser realizado em grupos de três marcadores ou por marcadores múltiplos, e existem diversas técnicas que visam a otimização e confiabilidade na obtenção da ordem correta, apresentando, cada técnica, suas vantagens e desvantagens (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho & Silva, 2005; Moretzsohn, 2006; Cheema & Dicks, 2009). Moretzsohn (2006) ressalta, ainda, que a confiabilidade da determinação da melhor ordem dos marcadores no grupo de ligação relaciona-se diretamente com o número de indivíduos da população de mapeamento e, quanto maior o número de indivíduos, maior a confiabilidade.

O uso de diferentes marcadores moleculares, tais como RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNAs”) (Hilu & Stalker, 1995; Raina et al., 2001; Santos et al., 2003; Garcia et al., 2006), AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”) (Gimenes et al., 2002b; Herselman, 2003; Milla et al., 2005; Tallury et al., 2005), RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) (Kochert et al., 1991) e microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) (Hopkins et al., 1999; Ferguson et al., 2004; Krishna et al., 2004; Moretzsohn et al., 2004; 2005; Gimenes et al., 2007) tem demonstrado que o amendoim possui uma estreita base genética e como alternativa, espécies silvestres têm sido utilizadas para a construção de mapas genéticos em *Arachis*.

O primeiro mapa de ligação desenvolvido para o gênero *Arachis* foi obtido a partir de uma população derivada do cruzamento entre duas espécies diplóides de genoma A: *A. stenosperma* e *A. cardenasii* (Halward et al., 1993). Os marcadores mapeados foram utilizados por Garcia et al. (1996) para acompanhar a introgressão de segmentos genômicos da espécie *A. cardenasii*, portadores genes de resistência à *Meloidogyne arenaria*, em linhagens de introgressão com o genoma recorrente de *A. hypogaea*.

Devido ao baixo polimorfismo de marcadores moleculares detectado em *A. hypogaea*, tem sido proposta a obtenção de populações de mapeamento por hibridações de anfidiplóides sintéticos e *A. hypogaea*. Burow e colaboradores (1996) utilizaram uma população de retrocruzamento (RC₄F₂) entre *A. hypogaea* e uma planta anfidiplóide sintética (TxAG-6), obtida a partir de cruzamentos entre três espécies silvestres diplóides {*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoii*)^c}, junto à técnica de BSA (“Bulked Segregant Analysis”), para a identificação de marcadores RAPD associados a genes de resistência a nematóides (*M. arenaria*).

Posteriormente marcadores RFLP associados à esses genes (Choi *et al.*, 1999) foram utilizados na seleção assistida (Church *et al.*, 2000) e indivíduos homozigotos para resistência a *M. arenaria* puderam ser identificados precocemente ainda em viveiro, resultando em grande economia de tempo e espaço.

Moretzsohn *et al.*, 2005 publicaram o primeiro mapa de ligação de *Arachis* baseado em marcadores microssatélites, desenvolvidos a partir de bibliotecas de cDNA e de bibliotecas genômicas. Foi utilizada uma população F₂, resultante do cruzamento de duas espécies diplóides com genoma A (*A. duranensis* x *A. stenosperma*). Ao todo foram mapeados 170 locos distribuídos em 11 grupos de ligação, gerando um mapa de 1645,1 cM. Posteriormente, a inclusão de novos marcadores resultou em um mapa com 188 microssatélites, 80 marcadores gênicos, de cópias únicas (âncoras) e 35 análogos a genes de resistência (RGAs), além de alguns SNPs e AFLPs, distribuídos em 10 grupos de ligação, como esperado para espécies diplóides de *Arachis* (Leal-Bertioli *et al.*, 2009). Complementarmente, construiu-se de um mapa para o genoma B, desenvolvido com base em uma população F₂ diplóide, resultante do cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. magna* (Moretzsohn *et al.*, 2009). Foram mapeados 149 marcadores codominantes, principalmente microssatélites, em 10 grupos de ligação, cobrindo uma distância de 1294,4 cM. Com esse mapa 51 marcadores em comum com o mapa disponível para o genoma A, mapearam de forma colinear nos dois mapas, evidenciando a sintonia entre os genomas A e B.

Para o genoma tetraplóide de *Arachis*, foi publicado um mapa obtido a partir da análise de 88 indivíduos de uma população RC₁F₁, resultante do cruzamento entre *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético [*A. ipaënsis* x *A. duranensis*]^c (Foncéka *et al.*, 2009). Foram mapeados, em 21 grupos de ligação, 298 marcadores microssatélites, cobrindo uma distância total de 1843,7 cM. A comparação desse mapa com o mapa diplóide do genoma A (Moretzsohn *et al.*, 2005) mostrou alta sintonia e evidenciou a ocorrência de um evento de translocação cromossômica ocorrido antes da tetraploidização do amendoim cultivado.

1.7. Linhagens de introgressão

Linhagens de introgressão (“introgression lines” ou ILs) são um conjunto de linhagens quase isogênicas desenvolvidas por sucessivos retrocruzamentos, em que

cada linhagem carrega um segmento cromossômico específico de um genoma divergente. Estas linhagens são ferramentas úteis para mapeamento preciso de QTLs e a avaliação da ação ou interação gênica em estudos teóricos. Uma população completa de ILs reconstitui o genoma doador parental pela sobreposição de segmentos cromossômicos e imortaliza este genoma, uma vez que estas linhagens podem ser mantidas por autopolinização. Tais populações são especialmente úteis na identificação de QTLs, pois a diferença fenotípica entre uma linhagem e o parental recorrente é atribuída aos genes localizados no segmento cromossômico introgrado (Lippman *et al.*, 2007).

Os princípios da abordagem de ILs foram primeiramente demonstrados em tomate (*Lycopersicon esculentum*) por Eshed & Zamir (1995). *Lycopersicon pennellii*, um parente distante do tomate cultivado, possuidor de adaptações únicas em termos morfológicos, reprodutivos, químicos e respostas a estresses bióticos e abióticos, foi hibridizado com *L. esculentum*, produzindo a primeira população de ILs usada para a identificação de QTLs interespecíficos. Nos últimos anos, ILs de tomate, portadoras de segmentos cromossômicos de espécies silvestres, demonstraram milhares de QTLs afetando características ligadas à adaptação das plantas, morfologia, produção, metabolismo e expressão gênica. QTLs para tamanho de fruto e composição de açúcar foram isolados por clonagem posicional, enquanto outros foram utilizados em programas de melhoramento assistido por marcadores (Lippman *et al.*, 2007).

Um conjunto de 159 ILs portadoras de segmentos cromossômicos de uma espécie selvagem de arroz (*Oryza rufipogon* Griff.) em um 'background' de uma cultivar Indica (*Oryza sativa* L.), foi desenvolvido usando 126 locos microssatélites (Tian *et al.*, 2006). Em conjunto, as 159 linhagens representavam 67,5% do genoma de *O. rufipogon*. A proporção média do genoma doador em linhas BC₄F₄ era de 2,2%, correspondendo a segmentos de menos de 10 cM. Análise de QTLs nessa população identificou 17 locos ligados a características de produção, com locos provenientes de *O. rufipogon* sendo associados ao incremento de produção, ainda que o fenótipo de *O. rufipogon* fosse inferior ao parental recorrente.

Com base no mapa publicado para o genoma tetraplóide de *Arachis* (Foncéka *et al.*, 2009), obtido a partir de uma população RC₁F₁, resultante do cruzamento entre *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético [*A. ipaënsis* x *A. duranensis*]^c foram selecionadas 115 marcadores, bem distribuídos pelos 21 grupos de ligação, para

análise de 123 indivíduos BC₂F₁. Em duas gerações de retrocruzamento, BC₁F₁ e BC₂F₁, foi possível obter um conjunto de linhagens, onde a média do conteúdo genômico doador foi de 49,8% e 22,2%, respectivamente. A seleção assistida em duas gerações de retrocruzamento possibilitou a obtenção de 59 linhagens portadoras de segmentos genômicos silvestres, com a recuperação média de 79% do genoma cultivado recorrente, e estas em conjunto apresentaram uma cobertura ótima do genoma silvestre. Este conjunto de linhagens facilitará o desenvolvimento de populações avançadas de retrocruzamento, para a utilização do valioso repositório de genes úteis presente nas espécies silvestres do gênero *Arachis*

2. OBJETIVOS

A construção de um mapa genético para o genoma tetraplóide de *Arachis*, usando marcadores microssatélites, desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas e de ESTs.

O desenvolvimento de linhagens de introgressão (ILs) por meio de hibridações interespecíficas e caracterização da introgressão dos segmentos genômicos do parental doador em *A. hypogaea*, por meio de marcadores microssatélites selecionados com base no mapa genético obtido para o genoma tetraplóide de *Arachis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi executado no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília.

3.1. Construção do mapa de ligação

3.1.1. Material vegetal

Uma população de mapeamento F₂ com 156 indivíduos foi desenvolvida a partir de autofecundação de um indivíduo F₁, resultante do cruzamento da cultivar Runner IAC 886 (*A. hypogaea*) e uma planta anfidiplóide sintética, originada do cruzamento entre duas espécies silvestres diplóides: *A. ipaënsis* KG 30076 (genoma B) e *A. duranensis* V14167 (genoma A), tratado com colchicina para a duplicação dos cromossomos (Figura 3.1).

Os acessos de espécies silvestres foram obtidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis*, mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Acessos de espécies de *Arachis* utilizadas. Código do acesso, nome da espécie, registro (código brasileiro de acesso – BRA ou registro nacional de cultivares – RNC), município de coleta, país de coleta, latitude, longitude e altitude.

| Acesso* | Espécie | Registro | Município | País | Lat (S) | Long (W) | Alt (m) |
|--------------------|--|------------|-----------|------|---------|----------|---------|
| VNvEv 14167 | <i>A. duranensis</i> Krapov. & W. C. Gregory | BRA 036200 | Salta | ARG | 24° 45' | 65° 26' | |
| cv. Runner IAC 886 | <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i> | RNC 11541 | | | | | |
| KGBPScS 30076 | <i>A. ipaënsis</i> Krapov. & W. C. Gregory | BRA 036234 | Ipa | BOL | 21° 00' | 63° 25' | 650 |

*Coletores: **B**= Banks, **Ev**= A. Echeverry, **G**= W. C. Gregory, **K**= A. Krapovickas, **Nv**= L. Novara, **P**= J. R. Pietralli, **S** = C. E. Simpson, **Sc**= A. Schinini, **V** = J. F. M. Valls.

3.1.2. Extração de DNA

Tecidos foliares jovens foram utilizados para a extração do DNA genômico total das plantas analisadas segundo o método CTAB 2% adaptado por Moretzsohn (2006). A quantificação de DNA extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose (1% de concentração massa/volume) corado com brometo de etídio, comparando-se a fluorescência com diferentes padrões de DNA fago λ. As amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de uso de 2,5ng/μl.

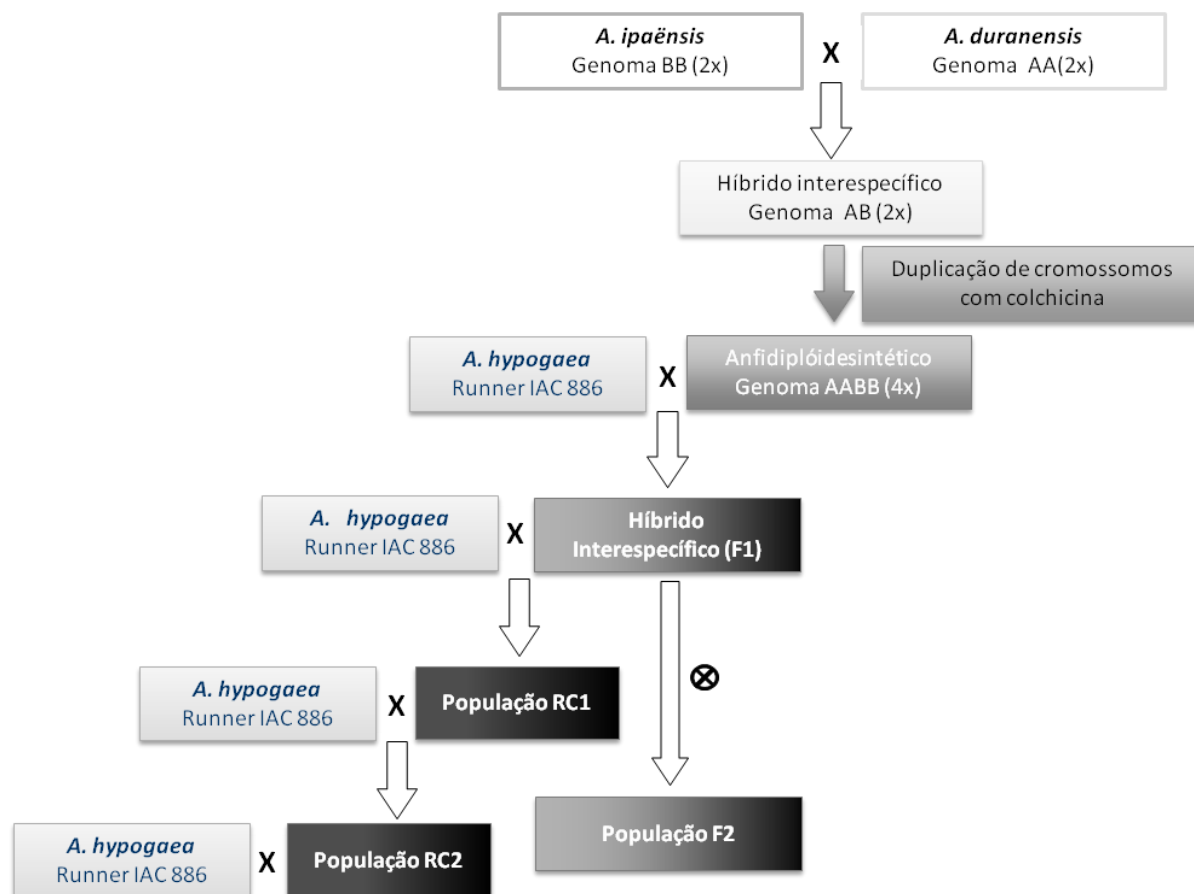


Figura 3.1 – Esquema de hibridações artificiais para desenvolvimento da população de mapeamento F₂ e de linhagens de introgressão (ILs) em *Arachis hypogaea*.

3.1.3. PCR e análise dos locos microssatélites

Um total de 636 marcadores microssatélites foi testado nas plantas progenitoras, para identificação de locos polimórficos. Para a análise dos locos por eletroforese em gel de poliacrilamida (5%), as PCRs foram realizadas em volumes de 13 μ L, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH8,3, KCl 50mM), MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA polimerase, 1 ng/ μ L de BSA purificado, 5 pmol de cada primer e 7,5 ng de DNA genômico. As amplificações ocorreram em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48-64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada par de primers teve sua temperatura de anelamento otimizada, visando à obtenção de melhor resolução e maior especificidade dos produtos de PCR.

Os produtos de PCR amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com solução de nitrato de prata 0,2%, adaptado de Creste *et al.* (2001). A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi feita por comparação com o marcador de peso molecular “10 pb DNA Ladder”.

3.1.4. Construção do mapa de ligação

Os locos identificados como polimórficos foram analisados nos 156 indivíduos da população de mapeamento F₂. O teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar a hipótese nula de segregação 1:2:1 ou 3:1 dos marcadores, a uma probabilidade de $p > 0,05$. Para a construção do mapa de ligação foi utilizado o programa Mapmaker Macintosh v2.0 (Lander *et al.*, 1987) e a metodologia descrita a seguir, segundo Moretzsohn (2006). Um LOD score mínimo de 4 e uma fração de recombinação máxima (θ) de 0,35 foram utilizados como parâmetros para estabelecimento dos grupos de ligação, usando a função “group”. A ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação foi estimada usando a função “first order”. As ordens dos marcadores foram confirmadas por comparações das verossimilhanças (LOD scores) de todas as possíveis ordens usando o comando “compare” e por permutações de todas as trincas de marcadores adjacentes (função “ripple”). Em uma segunda etapa, o LOD score foi reduzido até 3, para possibilitar a inclusão de novos marcadores nos grupos. O comando “try” foi então usado para determinar a posição exata dos novos marcadores dentro de cada grupo. Em seguida, os marcadores distorcidos e os marcadores dominantes (microsatélites segregando 3:1, ou seja, presentes em um dos progenitores e ausentes no outro) foram incluídos, usando a função “group”. As novas ordens obtidas foram novamente confirmadas com os comandos “first order”, “compare” e/ou “ripple”. As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, em centimorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi.

3.2. Desenvolvimento de linhagens de introgressão

3.2.1. Material vegetal e hibridações

Para o desenvolvimento das linhagens de introgressão (ILs), uma planta da progênie F₁ resultante da hibridação artificial entre a cultivar Runner IAC 886 e o

anfidiplóide sintético, resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres diplóides: *A. ipaënsis* KG 30076 (genoma BB) e *A. duranensis* V14167 (genoma AA), tratado com colchicina para a duplicação dos cromossomos (Fávero *et al.*, 2006), foi retrocruzada com a cultivar Runner IAC 886 na estação de cruzamentos de 2006/2007, gerando a progênie RC₁ (Figura 3.1). No âmbito desse projeto foi produzida a população RC₂ no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília (estação de cruzamentos 2007/08).

Os cruzamentos foram realizados fazendo-se a emasculação dos botões florais das plantas utilizadas como genitor feminino no período da tarde, em que os grãos de pólen ainda estão imaturos, impedindo que ocorra a autopolinização. Na manhã do dia seguinte, fez-se a polinização com auxílio de uma pinça utilizando-se pólen dos respectivos genitores masculinos (Figura 3.2). Todas as polinizações foram contadas e listadas.



Figura 3.2 – Plantas híbridas RC₁ mantidas em telado para estação de cruzamentos 2007/08.

3.2.2. Identificação de híbridos

As sementes das progênies foram colocadas para germinar e plantas híbridas foram identificadas por meio de caracterização molecular com onze marcadores microsatélites (Tabela 3.2). A extração de DNA, a PCR e análise dos locos microsatélites foram feitas como descrito anteriormente nos itens 3.1.2 e 3.1.3. Os produtos de PCR amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corados com solução de nitrato de prata 0,2%, adaptado de Creste *et al.* (2001).

Tabela 3.2 – Marcadores microssatélites usados na genotipagem das linhagens de introgressão. Pares de primers marcados com asterisco amplificaram dois locos, em negrito marcadores microssatélites utilizados na identificação de híbridos nas progênes RC₁ e RC₂.

| Par de primers SSR | Referência | Primer direto (5'-3') | Primer inverso (5'-3') | Motif / SSR |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|--|
| AC2A04 | Moretzsohn et al., 2005 | gatcactccagataatcac | aaggttatcactcacgctc | (TG) ₁₅ |
| Ah2 | Gimenes et al. 2007 | ttcacacgtagccatttcc | ccaaaccacaattcagtagcaa | (AC) ₁₀ |
| gi-623 | Moretzsohn et al., 2005 | ggggaggattacatagtagagttg | cacagatccatatactttaacatagca | (CT) ₁₂ |
| Lec-1 | Hopkins et al. 1999 | caagcatcaacaacaacga | gtcccaccacatacaagagtt | (AT) ₁₈ |
| PM120 | He et. al. 2003 | tgtgtgaatgtggaggatgaa | atggatccaacggttaccaa | (GA) ₆ (GT) ₅ , (GA) ₆ , (GA) ₆ |
| PM24 | He et. al. 2003 | cggaagcggaagttagtgtt | ccgaaaggtatgagacccaat | (GA) ₁₅ |
| PM32 * | He et. al. 2003 | agtgttgggtgtgaaagtgg | gggactcggaacagtgttatc | (CT) ₁₅ |
| PM45 | He et. al. 2003 | tgagttgtgacgcttgtgt | gatgcatgttagcacactga | (GA) ₁₆ |
| RI2A06 * | Moretzsohn et al., 2005 | ttcctaaactggaagcgtgttc | caagagctttcttctgccattc | (GA) ₁₄ |
| RM6F03 | Proite et al., 2007 | catcgtctctgctatctcctg | gaaatctgacgcaatgtcaag | (CT) ₇ |
| RM7E04 | Proite et al., 2007 | caatgaaatggagtgcatttt | ttggcataaagatgcatctaa | (GA) ₁₂ |
| RN10F09 | Moretzsohn et al., 2005 | ccatccagaaaagcgaaatc | caatgaagaagaatccgaaacc | (TTA) ₄ + (AGT) ₈ |
| RN22A12 * | Moretzsohn et al., 2005 | cacgagaagcagaggaagaaga | gcagcaacaactcaggaagt | (CAG) ₆ + (CAA) ₅ |
| RN23A07 | Proite et al., 2007 | tgatctatcatctttaatctca | accatacattcaaaactcaaaa | (TC) ₈ |
| RN31E11 * | Proite et al., 2007 | ttctctctctaaatcggttcg | aagcctctggaaggtggag | (AG) ₉ |
| RN34H10 | Proite et al., 2007 | cacctcaaaagcgaagattgt | ggataataatagctaggagcctgtg | (TA) ₁₁ |
| RN35H04 | Proite et al., 2007 | catcaaaagtgtttctgtgttg | aaagtgaattacaagtcaagagg | (TA) ₉ |
| RN5H02 | Moretzsohn et al., 2005 | tatgaggttcaaggatggtg | cccacacagcaagaactgatt | (AT) ₁₁ |
| seq2F5 * | Ferguson et al. 2004 | tgaccaaagtgatgaagggga | aagttgtttgacatctgtcatcg | (taa) ₁₇ |
| seq3D9 | Ferguson et al. 2004 | ttcaccgtacaaccagtg | cctcggcagatctggagtaa | (ga/gt) ₁₉ |
| TC2C07 | Moretzsohn et al., 2005 | caccacactccaaggtttt | tcaagaacggctccagagtt | (CT) ₂₃ |
| TC3B04 | Moretzsohn et al., 2005 | gaagaagaagtcactgcggc | aagctagtttctgattaaagcacca | (TC) ₂₃ |
| TC3B05 | Moretzsohn et al., 2005 | ggagaaaacgcattggaact | ttgtcccgtgggaatagt | (AG) ₂₅ |
| TC3E02 | Moretzsohn et al., 2005 | tgaaagataggtttcggtgga | caaaccgaaggaggaacttg | (CT) ₂₆ + (CA) ₇ + (CA) ₅ |
| TC3G05 | Moretzsohn et al., 2005 | gatccaagtctccagagga | aacaacaaggaggcagagga | (GAG) ₄ + (CTT) ₁₅ + (TC) ₂₃ |
| TC3H07 | Moretzsohn et al., 2005 | caatgggaggcaaatcaagt | gccaaatggttcctctcaa | (GA) ₂₀ + (TTC) ₄ |
| TC4E10 | Moretzsohn et al., 2005 | acgtcatctccctcctct | ccattttctctgaaccaa | (CCT) ₄ + (T) ₁₂ + (CT) ₁₄ |
| TC4G02 * | Moretzsohn et al., 2005 | gatccaactgtgaattgggc | cacaccagcaacaaggaatc | (TC) ₂₇ |
| TC4H02 | Moretzsohn et al., 2005 | accgcaaactcatcatctc | gatagcgtcagaggcagagg | (TC) ₁₆ + (CT) ₅ |
| TC5D06 | Moretzsohn et al., 2005 | gaaattttagtttcagcacagca | ttttcccctctaaatttctcg | (AG) ₂₁ |

3.2.3. Genotipagem das linhagens de introgressão

O acompanhamento da introgressão de segmentos genômicos do parental doador (anfidiplóide silvestre) no background genômico das linhagens de introgressão nas gerações RC₁ (38 indivíduos) e RC₂ (68 indivíduos), foi feito com base em 36 locos mapeados em 11 grupos de ligação do mapa genético construído com a população F₂ do presente trabalho.

Nessa genotipagem, foram utilizados primers microssatélites marcados com fluorescência e eletroforese capilar em seqüenciador automático de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems, CA, EUA). As PCRs foram realizadas em volumes de 5 µL, usando o kit Qiagen[®] Multiplex PCR Kit que contém Master Mix (*Taq* DNA polimerase, tampão de PCR e dNTPs), Solução Q e água destilada ultra pura, 1 pmol de cada primer marcado com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela) e 2,5 ng de DNA genômico. Para eletroforese, foram adicionados a 1 µL do DNA amplificado, 8,5 µL de Hi-Di formamida e 0,5 µL do padrão com comprimentos de fragmentos conhecidos, marcado com fluorescência ROX (vermelha).

As ampliações ocorreram em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48-64°C por 1,5 minuto, 72°C por 1,5 minuto; e uma extensão final a 72°C por 30 minutos. Cada par de primers teve sua temperatura de anelamento otimizada, visando à obtenção de melhor resolução e maior especificidade dos produtos de PCR.

Os dados obtidos após eletroforese foram analisados usando os programas GeneScan[®] e Genotyper[®] (Applied Biosystems, CA, EUA). Para a análise da introgressão e construção do genótipo gráfico de cada linhagem foi utilizado o software CSSL Finder versão 0.9a14 (2008-2010, Mathias Lorieux). Foi observada a porcentagem de genoma silvestre introgridido em cada linhagem nas gerações RC₁ e RC₂.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção do mapa de ligação

O DNA extraído do material vegetal visualizado após eletroforese em gel de agarose mostrou uma quantidade e qualidade satisfatórias para a execução das análises moleculares (Figura 4.1).

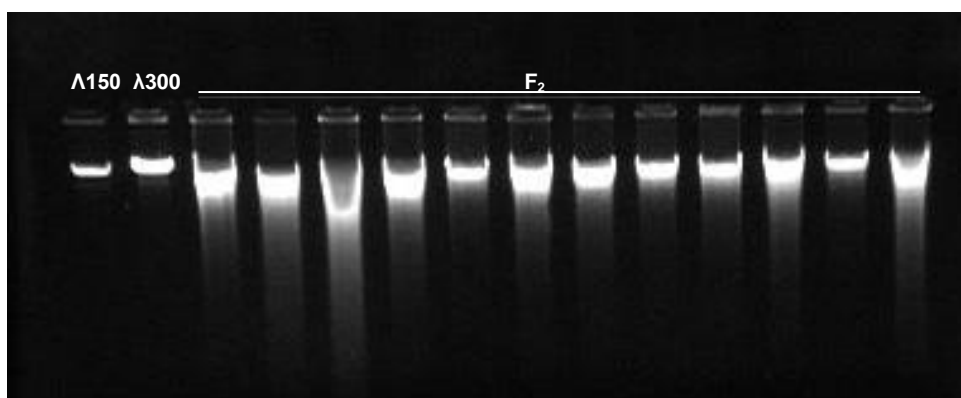


Figura 4.1 – Amostras de DNA extraído de indivíduos da população F_2 após eletroforese em gel de agarose 1,0%. Padrões de DNA com concentrações conhecidas: $\lambda 150$: λ DNA 150ng; $\lambda 300$: λ DNA 300ng.

Dos 636 marcadores testados, 173 (27,2%) mostraram-se polimórficos entre os indivíduos parentais analisados (Figura 4.2). Desses 173 marcadores, 119 (68,8%) foram polimórficos para locos no genoma A e 54 (31,2%) no genoma B, identificados pela inclusão de amostras das espécies diplóides: *A. ipaënsis* (KG30076) e *A. duranensis* (V14167) envolvidas no cruzamento (Figura 4.3). O nível de polimorfismo encontrado entre o parental Runner IAC 886 e o anfidiplóide [*Ai* x *Ad*]^C (27,2%) é menor do que os 59,6% encontrados entre a variedade Fleur11 (*A. hypogaea*) e o mesmo anfidiplóide sintético [*Ai* x *Ad*]^C (Foncéka *et al.*, 2009), e maior do que os 15,64% encontrados por Hong *et al.* (2008) em uma população de mapeamento de RILs em F_6 entre variedades de *A. hypogaea*. Outro mapa para o amendoim cultivado obtido a partir de uma população de 318 plantas F_8/F_9 , confirmou a baixa variabilidade genética do amendoim, onde de 1145 marcadores microssatélites testados, apenas 135 marcadores microssatélites, foram mapeados em 22 grupos de ligação (Varshney *et al.*, 2009) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Quadro comparativo entre mapas genéticos de *Arachis*, desenvolvidos com uso de marcadores moleculares.

| | <i>presente trabalho</i> | Foncéca <i>et al.</i> , 2009 | Moretzsohn <i>et al.</i> , 2005 | Moretzsohn <i>et al.</i> , 2009 | Varshney <i>et al.</i> , 2009 | Hong <i>et al.</i> , 2010 |
|--------------------------------------|--|--|--|--|--|---|
| Marcadores moleculares | SSR | SSR | SSR | SSR, STS & SNP | SSR | SSR |
| População | IAC 886 x [A.ixA.d] ^c (F ₂) | Fleur11 x [A.ixA.d] ^c (BC ₁ F ₁) | <i>A. duranensis</i> x <i>A. stenosperma</i> (F ₂) | <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> (F ₂) | <i>A. hypogaea</i> ICGV86031 x TAG24 (RIL F ₈ /F ₉) | Composto: <i>A. hypogaea</i> x Yueyou13 (RIL F _{4:6}) |
| Número de indivíduos | 156 | 88 | 93 | 93 | 318 | 142, 84 & 136 |
| Grupos de ligação | 16 | 21 | 11 | 10 | 22 | 22 |
| <i>genoma A</i> | 10 | 10 | 11 | - | | |
| <i>genoma B</i> | 6 | 11 | - | 10 | | |
| Tamanho Total | 1256,5 cM | 1843,7 cM | 1230,9 cM | 1294,4 cM | 1270,5 cM | 885,4 cM |
| <i>genoma A</i> | 868,6 cM | 1005,2 cM | 1230,9 cM | - | | |
| <i>genoma B</i> | 387,6 cM | 838,5 cM | - | 1294,4 cM | | |
| Locos mapeados (polimórficos) | 119* (173) | 298 (333) | 170 (204) | 149 (166) | 135 (150) | 175 (146,124 & 64) |
| <i>genoma A</i> | 74 | 181 | 170 | - | | |
| <i>genoma B</i> | 23 | 117 | - | 149 | | |
| Marcadores testados | 636 | 558 | 433 | 745 SSR, 19 STS & 11 SNP | 1145 | 1044 |
| Distorção dos marcadores | 6,2% | 4% | 51,0% | 21,5% | 35,56% | 23%, 13,5% & 7,8% |

[A.ixA.d]^c: anfidiplóide sintético [*A. ipaënsis* KG30076 x *A. duranensis* V14167]^c

O baixo nível de polimorfismo encontrado nesta população pode ser resultado da estreita relação de ancestralidade entre os progenitores silvestres diplóides *A. ipaënsis* (genoma B) e *A. duranensis* (genoma A), usados no desenvolvimento desta população e *A. hypogaea*. Evidências citogenéticas e moleculares reforçam a teoria de que o surgimento da espécie tetraplóide *A. hypogaea* tenha ocorrido pelo cruzamento destas duas espécies silvestres, dando origem a uma ou mais populações de plantas alotetraplóides, por evento de poliploidização natural (Seijo *et al.*, 2007).

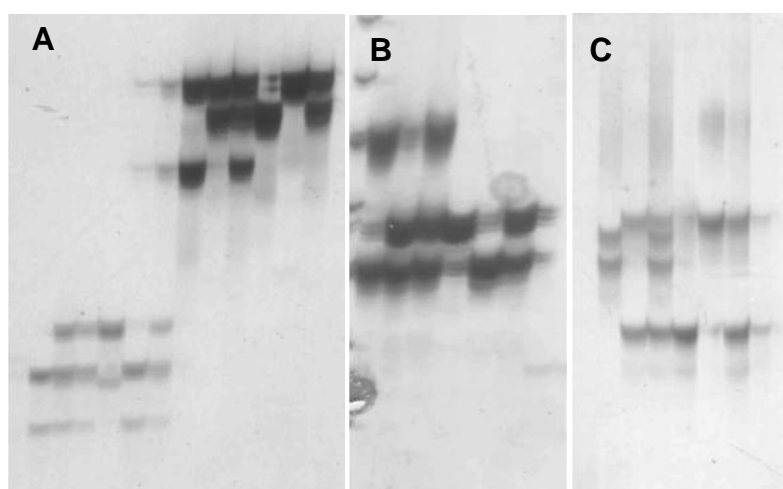


Figura 4.2 – Perfil de bandas amplificadas por PCR com os parentais Runner IAC 886, anfidiplóide sintético [*Ai* x *Ad*]^C, F₁, *A. ipaënsis* KG30076, *A. duranensis* V14167 e anfidiplóide sintético com os pares de *primers*: **A** Seq4G02 e Seq5D05; **B** XIP 468; **C** TC7E02 por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%.

Foram utilizados 113 marcadores para genotipagem da população F₂, dos quais apenas 6 (6,2%) apresentaram desvio da proporção 1:2:1 esperada ($p < 0,05$). Os locos não distorcidos foram utilizados para a definição dos grupos de ligação, usando o LOD score mínimo de 4 e fração de recombinação máxima de 0,35. Em seguida, os marcadores distorcidos foram incluídos no mapa usando um LOD score mínimo de 3. O mapa gerado apresentou 74 locos mapeados no genoma A, distribuídos em 10 grupos de ligação, com uma média de 7,4 locos por grupo. O tamanho médio dos grupos de ligação no genoma A foi de 86,7 cM e o tamanho total foi de 868,6 cM. No genoma B, 23 locos foram mapeados em 6 grupos de ligação, com uma média de 3,8 marcadores por grupo. A distância total dos grupos de ligação no genoma B foi 387,6 cM, com uma média de 64,6 cM por grupo de ligação

(Figura 4.4). Os 16 locos restantes não foram mapeados em nenhum grupo de ligação. O amendoim é uma planta dissômica alotetraplóide ($2n=4x=40$) e, portanto 20 grupos de ligação eram esperados, como encontrado no mapa de uma população tetraplóide intra-específica de *A. hypogaea* (Hong *et al.*, 2008). Em outro mapa para o amendoim cultivado, obtido a partir de uma população de 318 plantas F_8/F_9 , foram identificados 22 grupos de ligação (Varshney *et al.*, 2009). Trabalhos de mapeamento em *Arachis* com populações tetraplóides interespecíficas também não identificaram os 20 grupos esperados. Foram obtidos 23 grupos de ligação a partir de uma população de retrocruzamento (RC_1), obtida do cruzamento entre a planta anfidiplóide TxAG-6, usada como parental doador, e *A. hypogaea* cv. Florunner, usada como parental recorrente (Burow *et al.*, 2001) e 21 grupos de ligação, a partir de uma população RC_1F_1 , resultante do cruzamento entre *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético $[Ai \times Ad]^C$ (Foncéka *et al.*, 2009). A identificação de novos marcadores polimórficos, especialmente para o genoma B, deverá possibilitar a inclusão dos 16 locos não mapeados e a identificação dos outros quatro grupos de ligação esperados.

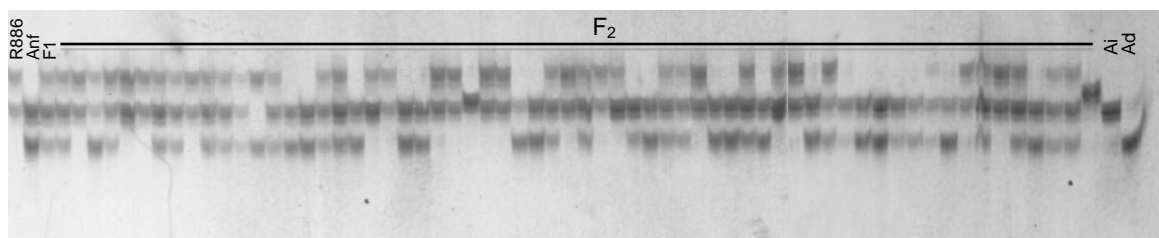


Figura 4.3 – Perfil de bandas amplificadas por PCR com o par de *primers* RN10F09 na população F_2 e nos parentais: Runner IAC 886 (**R886**), anfidiplóide sintético (**Anf**), F_1 (**F1**), *A. ipaënsis* (**Ai**), *A. duranensis* (**Ad**), após eletroforese em gel de poli-acrilamida 5%.

O mapa apresenta grupos de ligação com tamanhos que variam de 8,7 cM (grupo B9) a 135,9 cM (grupo A1) e os 16 grupos totalizam 1256,2 cM. Os grupos B5 e B9 apresentam apenas dois locos mapeados, enquanto o grupo A6 apresenta onze locos, sendo o maior número de locos mapeados em um grupo. A maior distância entre locos adjacentes foi de 59,4 cM e a menor, de 0,3 cM, com distância média entre os locos de 12,9 cM. O menor polimorfismo encontrado no genoma B teve efeito no número e tamanho dos grupos de ligação mapeados para esse genoma.

Cinco locos com desvio da proporção esperada (RI2A06, Seq2F05, Ag39, RI2A06 e TC3E02) apresentaram distorção em favor do alelo do genitor feminino (Runner IAC 886) e um (Lec1) do parental masculino (anfidiplóide [$A_i \times A_d$]^C). Dois locos distorcidos foram mapeados no grupo A2 (RI2A06 e Seq2F05), dois no grupo B2 (Ag39 e RI2A06), um no A9 (Lec1) e apenas um não foi inserido em algum grupo de ligação (TC3E02). O nível de locos distorcidos encontrado (5,3%) é abaixo dos 10,7%, encontrado no mapa tetraplóide interespecífico de Foncéka *et al.* (2009).

A comparação do mapa obtido no presente trabalho com os mapas diplóides já desenvolvidos em *Arachis* para os genomas A (Leal-Bertioli *et al.*, 2009) e B (Moretzsohn *et al.*, 2009), baseados em marcadores microssatélites, mostrou 37 marcadores em comum com o mapa de genoma A e 9 marcadores com o mapa de genoma B. Os grupos com maiores números de marcadores em comum nos três mapas são apresentados na Figura 4.4. Os mapas diplóides A e B têm, aparentemente, altos níveis de sintenia, uma vez que todos os grupos de ligação, menos um do mapa B, apresentaram um único grupo correspondente no mapa A (Moretzsohn *et al.*, 2009). O alinhamento deste mapa com os mapas diplóides permite a comparação indireta com mapas genéticos de referência de leguminosas como *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*. Varshney e colaboradores (2009) compararam dois grupos de ligação do mapa por eles desenvolvido com o mapa diplóide de genoma A. Com o uso de marcadores âncora esses mapas puderam ser alinhados com os mapas de *Lotus* e *Medicago* (Bertioli *et al.*, 2009) possibilitando o uso de sequências de genomas-modelo para o melhor entendimento genômico da espécie, bem como informações sobre QTLs e genes candidatos.

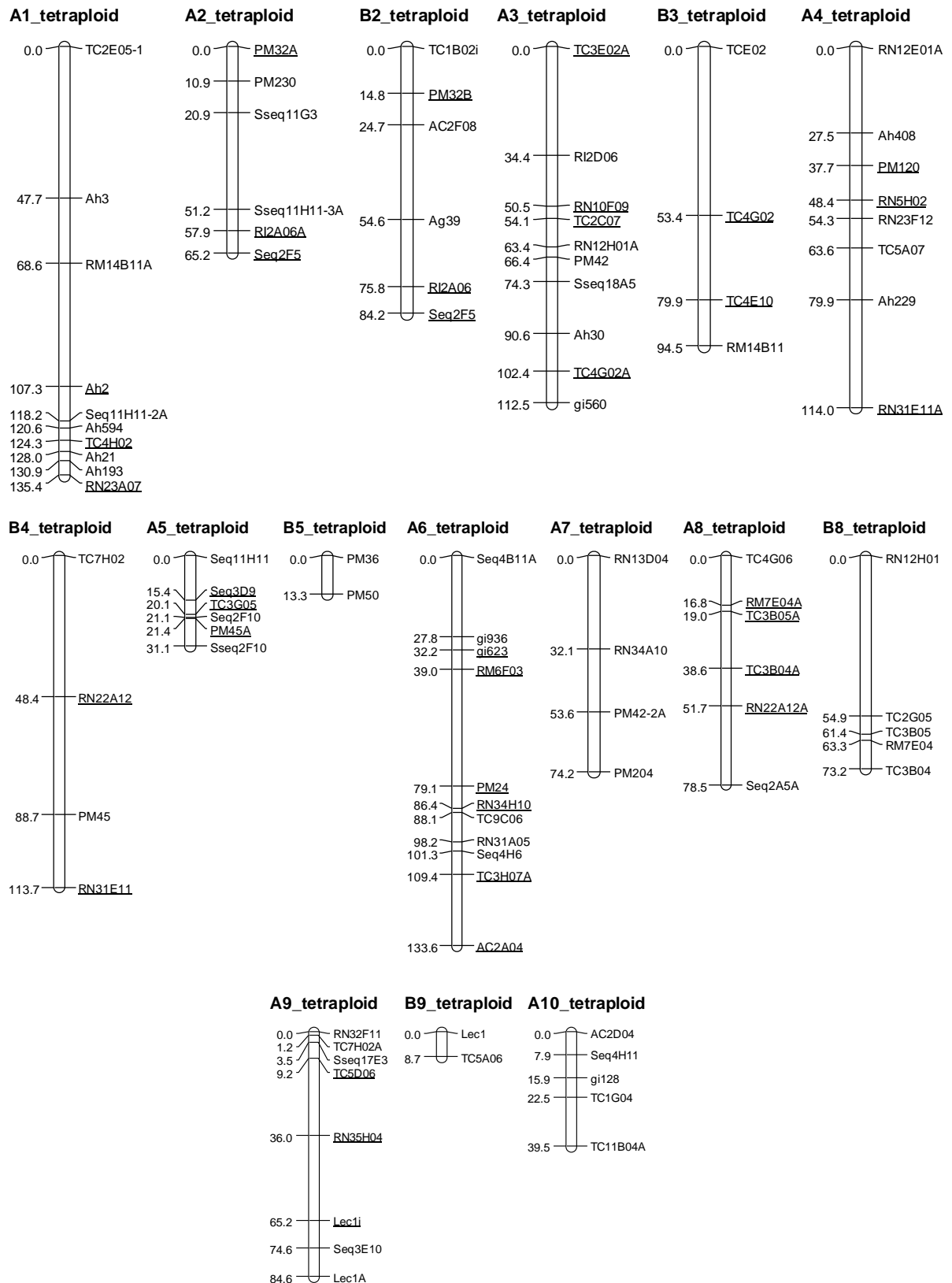


Figura 4.4 – Mapa genético construído usando-se uma população F₂, com 156 indivíduos, obtidos do cruzamento entre *A. hypogaea* (cv. Runner IAC 886) e uma planta anfidiplóide resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres diplóides (*A. duranensis*– genoma A X *A. ipaënsis* – genoma B) tratada com colchicina. Marcadores sublinhados foram utilizados para genotipagem das linhagens de introgressão.

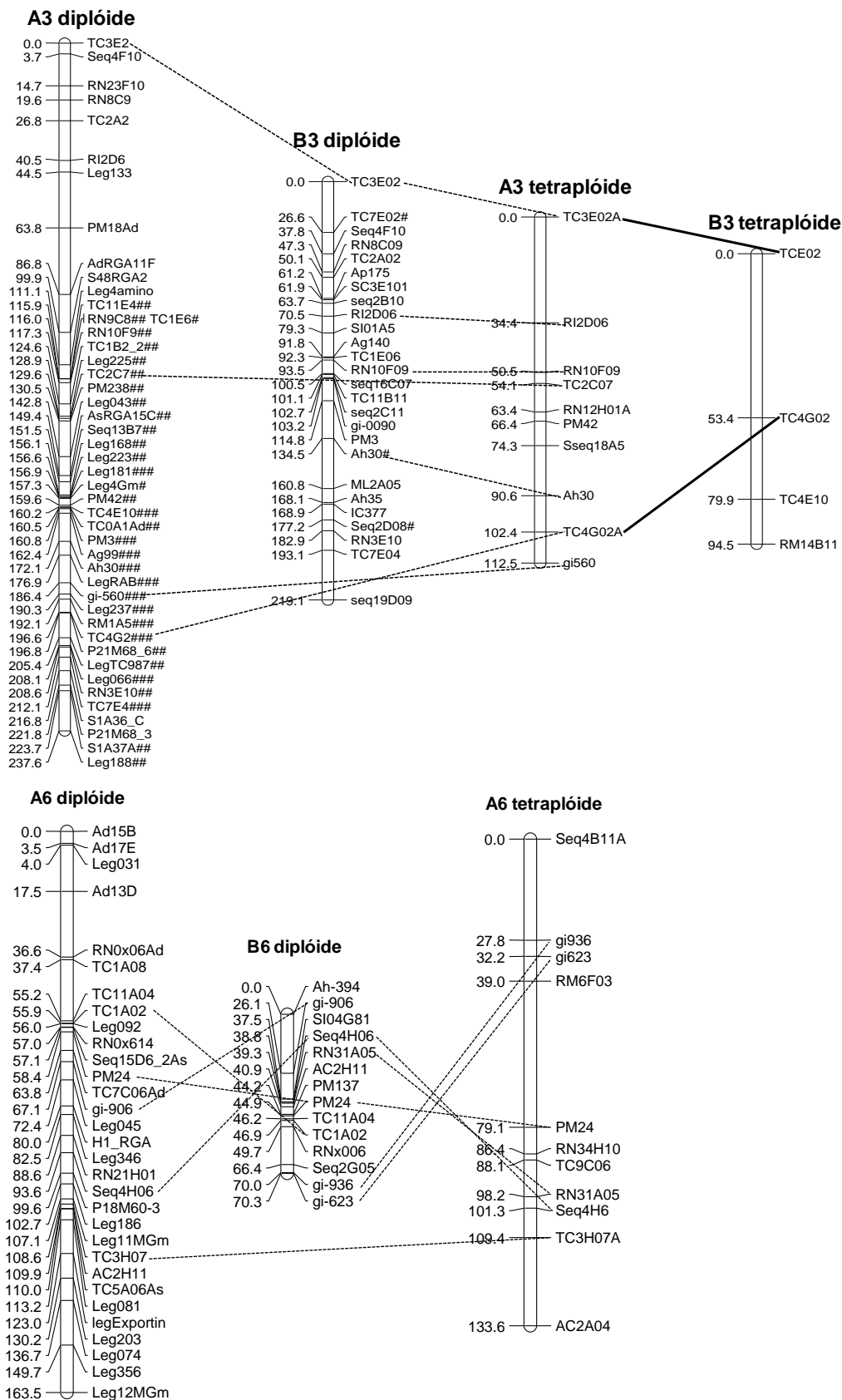


Figura 4.4 – Alinhamento de mapas genéticos de *Arachis* de genoma A e B diplóides e o mapa tetraplóide interespecífico. Os grupos de ligação denominados A3/A6/A8 diplóide pertencem ao mapa diplóide A (Leal-Bertioli *et al.*, 2009), os denominados B3/B6/B8 diplóide pertencem ao mapa diplóide B (Moretzsohn *et al.*, 2009) e os demais grupos pertencem ao mapa desenvolvido no presente trabalho.

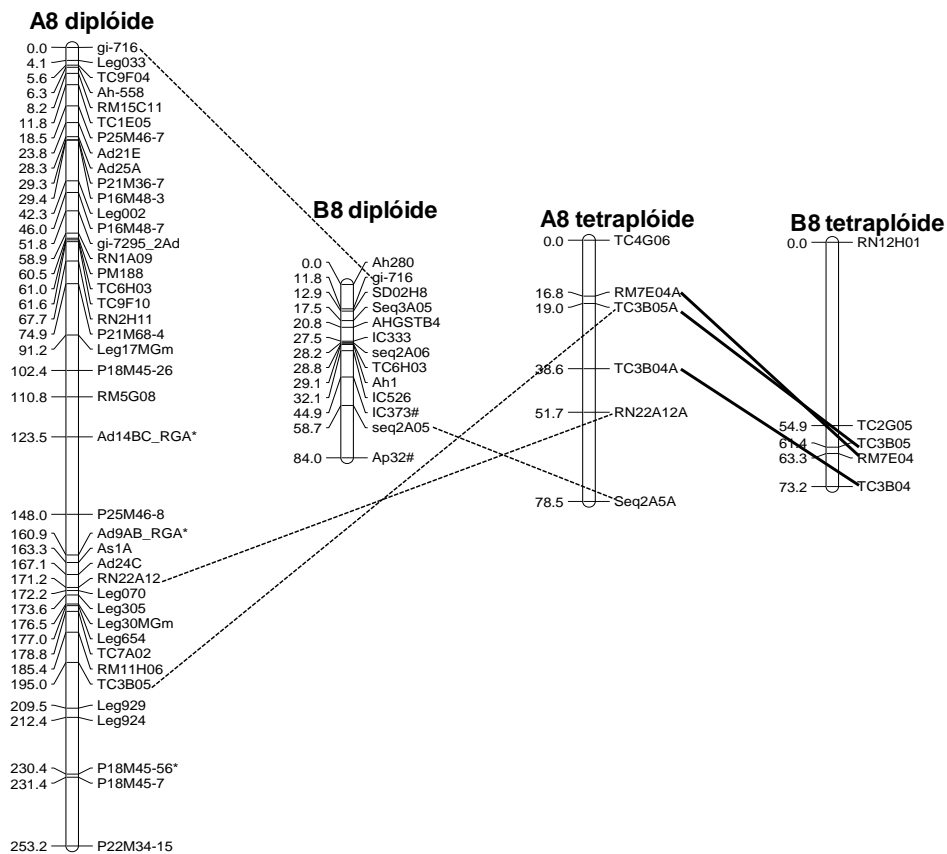


Figura 4.4 (continuação) – Alinhamento de mapas genéticos de *Arachis* de genoma A e B diplóides e o mapa tetraplóide interespecífico. Os grupos de ligação denominados A3/A6/A8 diplóide pertencem ao mapa diplóide A (Leal-Bertioli *et al.*, 2009), os denominados B3/B6/B8 diplóide pertencem ao mapa diplóide B (Moretzsohn *et al.*, 2009) e os demais grupos pertencem ao mapa desenvolvido no presente trabalho.

4.2. Desenvolvimento e caracterização de linhagens de introgressão

A partir do cruzamento de plantas de *A. hypogaea* da variedade elite Runner IAC 886 com o anfidiplóide sintético [*A. ipaënsis* x *A. duranensis*]^C na estação de cruzamentos de 2006/07, 43 híbridos RC₁ foram identificados, pela genotipagem de onze marcadores microssatélites (Figura 4.5). Na estação de cruzamentos 2007/08 foram realizadas 2007 polinizações entre os 43 híbridos RC₁ e a cultivar Runner IAC 886 e, baseado na genotipagem de marcadores microssatélites, 38 híbridos RC₂ foram identificados. A taxa de sucesso de polinização, medida pela porcentagem de híbridos obtidos em relação ao número de polinizações efetuadas, foi de 1,84%, valor esse abaixo do encontrado por Fávero (2004), que obteve uma taxa de 12,33% para a combinação híbrida entre os mesmos parentais.

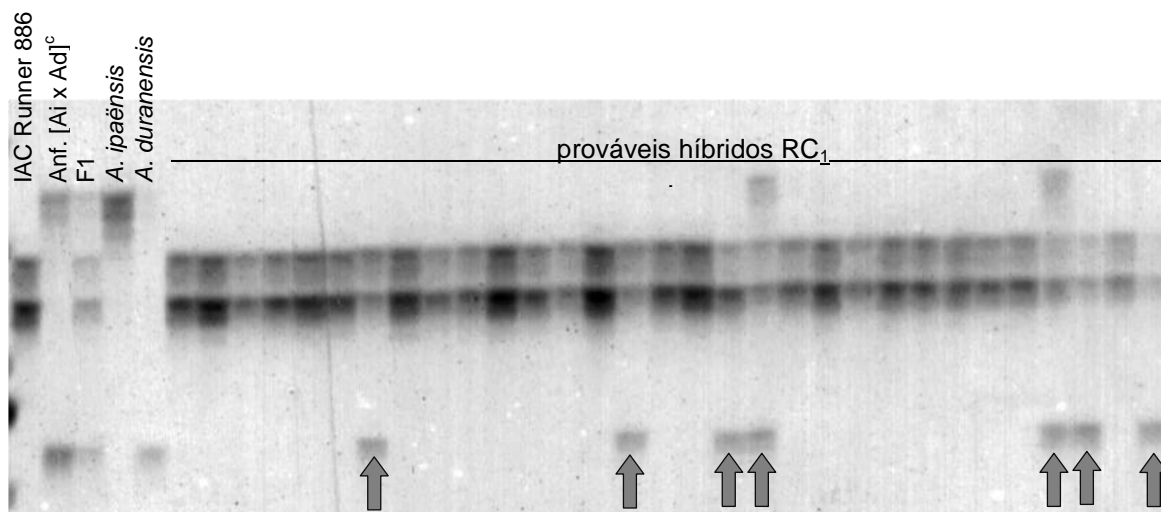


Figura 5.5 – Produtos de PCR amplificados com o par de primers PM32, visualizados em gel de poliacrilamida 5%. As setas indicam os indivíduos híbridos RC₁.

Para a caracterização genética das linhagens de introgressão foram genotipados 38 indivíduos da geração RC₁ e 68 indivíduos RC₂, incluindo-se plantas identificadas como de autofecundações do genitor feminino na genotipagem com os onze marcadores usados na identificação dos híbridos RC₁. A inclusão destas plantas se deu pela possibilidade de obtenção de falsos negativos na genotipagem prévia, uma vez que se espera que o conteúdo genômico do parental doador seja mais raro no background recorrente e conseqüentemente mais difícil de ser detectado. Foram utilizados 36 marcadores microssatélites, distribuídos em 11 grupos de ligação: A1, A2, B2, A3, B3, A4, B4, A5, A6, A8 e A9. Os eletroferogramas gerados de cada conjunto de primers foram analisados e o padrão de fragmentos amplificados foi comparado aos padrões dos indivíduos genitores (IAC Runner 886 e anfidiplóide sintético [Ai x Ad]^c) e progenitores (*A. ipaënsis* e *A. duranensis*) para determinação da origem genômica do alelo silvestre presente nas populações recorrentes (Figura 4.6).

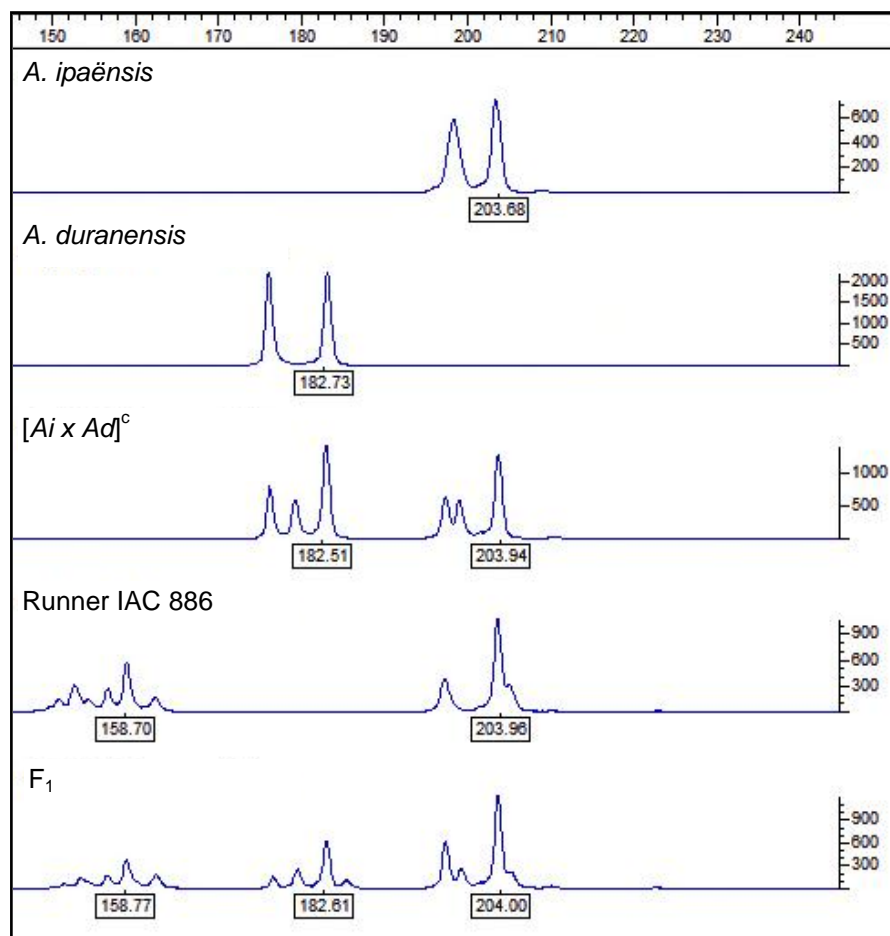


Figura 4.6 – Eletroferograma de produtos de PCR fluorescentes amplificados com o par de primers do loco TC2C07 nos indivíduos: *A. ipaënsis* (KG30076), *A. duranensis* (V14167), anfidiplóide sintético [*Ai x Ad*]^c, cv. Runner IAC 886 e híbrido F₁.

Através da genotipagem de 36 locos microssatélites foi possível a identificação de 37 indivíduos com pelo menos um loco heterozigoto, portanto plantas híbridas na geração RC₂. Este fato evidencia a necessidade de uma cobertura genômica mais ampla na identificação de híbridos em populações avançadas de retrocruzamento, a fim de minimizar a eliminação de indivíduos com alta recuperação do genoma recorrente.

A análise de introgressão revelou que, na geração RC₁, a porcentagem média dos segmentos genômicos heterozigotos foi de 41,96%, variando de 19,44% a 72,22% entre as 38 linhagens amostradas. Na geração RC₂, a porcentagem média diminuiu para 11,79%, variando entre 2,78% e 36,11% entre as 37 linhagens identificadas. Observa-se, portanto, uma diminuição relativa entre as gerações de 71,9% do conteúdo genômico heterozigoto (doador). Foncéka e colaboradores (2009) observaram uma redução em torno de 50% de alelos silvestres na

constituição genotípica entre indivíduos BC_1F_1 e BC_2F_1 , pela amostragem de 21 grupos de ligação com 115 marcadores microssatélites.

Nas gerações de retrocruzamento RC_1 e RC_2 , observa-se, nos locos amostrados, a completa cobertura do genoma recorrente silvestre, distribuído no “background” da variedade elite Runner IAC 886. Foncéka e colaboradores (2009), através da seleção assistida em duas gerações de retrocruzamento, obtiveram 59 linhagens portadoras de segmentos genômicos silvestres, com a recuperação média de 79% do genoma cultivado recorrente, e estas em conjunto apresentaram uma cobertura ótima do genoma silvestre (Figura 4.7). Os segmentos introgrididos do anfidiplóide no amendoim identificados possibilitam o desenvolvimento de uma população de linhagens de introgressão, de grande utilidade para o melhoramento da cultura, por possibilitar a descoberta, a localização e a avaliação de genes silvestres de interesse no background da variedade cultivada genes de resistência a doenças e à seca estão sendo mapeados nessas populações, visando à implementação de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento, o que irá acelerar consideravelmente, além de tornar mais eficiente, o processo de introgressão desses genes no amendoim cultivado

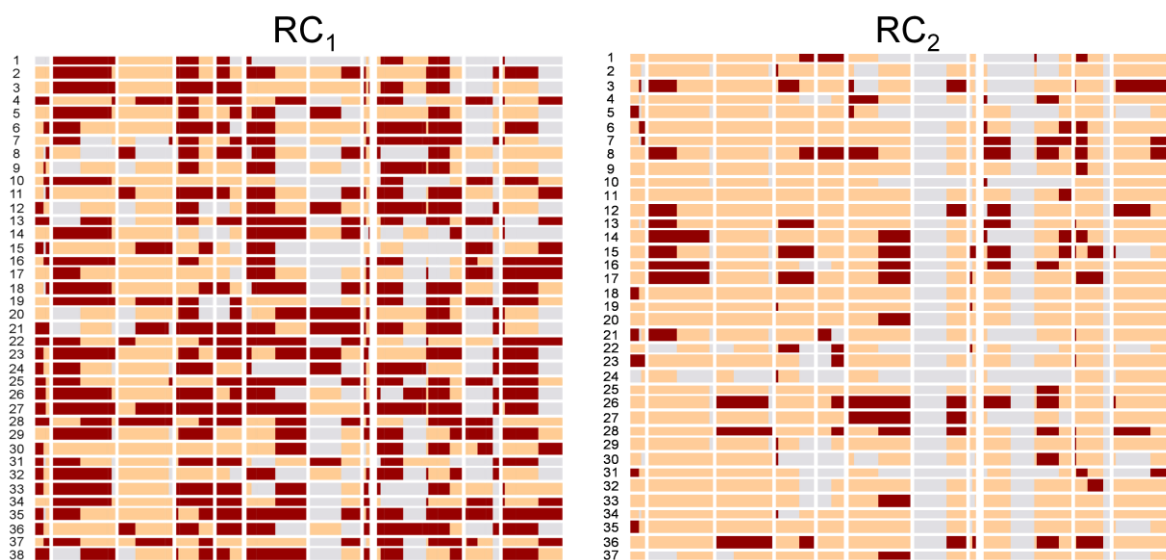


Figura 4.7 – Genótipo gráfico de linhagens RC_1 e RC_2 selecionadas. Cada coluna representa um grupo de ligação e cada linha representa uma linhagem selecionada. Os segmentos marcados em cor vermelha representam segmentos genômicos silvestre (doador), marcados em cor bege representam segmentos genômicos da variedade cultivada (recorrente) e segmentos marcados em cor cinza representam dados faltantes.

5. CONCLUSÕES

O uso de marcadores microssatélites permitiu a construção de um mapa genético para o genoma tetraplóide de *Arachis* através de uma população interespecífica. A saturação do mapa com novos marcadores moleculares deverá incluir quatro novos grupos de ligação para o genoma B, uma vez que o amendoim é uma planta dissômica alotetraplóide ($2n=4x=40$) e, portanto, 20 grupos de ligação são esperados.

Foram desenvolvidas 38 linhagens de introgressão (ILs) por meio de hibridações artificiais e com base no mapa genético desenvolvido foi possível monitorar a introgressão de segmentos genômicos do parental em *A. hypogaea*. Essas linhagens serão de grande utilidade para o melhoramento da cultura do amendoim, por possibilitar a descoberta, a localização e a avaliação de genes silvestres de interesse no background da variedade cultivada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOHN, M.; UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 228-237, 1999.
- BRAVO, J.P.; HOSHINO, A.A.; ANGELICI, C.M.L.C.D.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 516–524, 2006.
- BUROW, M.D.; SIMPSON, C.E.; PATERSON, A.H.; STARR, J.L. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode 88(*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. **Molecular Breeding**, v.2, p.369-379, 1996.
- BUROW, M.D.; SIMPSON, C.E.; STARR, J.L.; PATERSON, A.H. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. **Genetics**, v.159, p.823-837, 2001.
- CARNEIRO, M.S. & VIEIRA, M.L.C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.
- CHEEMA, J.; DICKS, J. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. **Briefings in bioinformatics**, v. 10, n. 6, p. 595-608, 2009.
- CHOI, K.; BUROW, M.D.; CHURCH, G.; BUROW, G.; PATERSON, A.H.; SIMPSON, C.E.; STARR, J.L. Genetics and mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut germplasm. **Journal of Nematology**, v.31, p.283-290, 1999.
- CHOUMANE, W.; WINTER, P.; BAUM, M.; KAHL, G. Conservation of microsatellite flanking sequences in different taxa of Leguminosae. **Euphytica**, v.138, p.239-245, 2004.

- CHURCH, G.; SIMPSON, C.E.; BUROW, M.D.; PATERSON, A.H.; STARR, J.L. Use of RFLP markers for identification of individuals homozygous for resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Nematology**, v.2, p.575-580, 2000.
- COELHO, A.S.G.; SILVA, H.D. Métodos biométricos aplicados a análise de QTL's. 11º Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica & 50ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. **Anais**. Paraná: Londrina, p. 93, .2005.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira : grãos** : décimo segundo levantamento, setembro 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> . Acesso em: 04 junho 2009.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in their provement of agricultural populations. **Nature reviews genetics**, v. 3, n. 1, p. 22-32, 2002.
- DWIVEDI, S.L.; CROUCH, J.H.; NIGAM, S.N.; FERGUSON, M.E.; PATERSON, A.H. Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: opportunities and challenges. **Advances in Agronomy**, v. 80, p. 153–221, 2003.
- DWIVEDI, S.L.; BERTIOLI, D.J.; CROUCH, J.H.; VALLS, J.F.M.; UPADHYAYA, H.D.; FÁVERO, A.P.; MORETZSOHN, M.C.; PATERSON, A.H. Peanut Genetics and Genomics: Toward Marker-assisted Genetic Enhancement in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In KOLE, C. (Ed.). **Oilseeds. Series: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. Berlim: Springer, 2006, 302 p.
- ESHED, Y. & ZAMIR, D. Introgression Line Population of *Lycopersicon pennellii* in the Cultivated Tomato Enables the Identification and Fine Mapping of Yield-Associated QTL. **Genetics**, v.141, p. 1147-1162, 1995.

- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Levantamento da produção mundial de amendoim e de óleo: relatório do ano de 2008.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 05 junho 2010.
- FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.** 2004. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP, Piracicaba.
- FÁVERO, A.P.; SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F.M.; VELLO, N.A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *A. ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, v. 46, p. 1546-1552, 2006.
- FÁVERO, A.P.; SUASSUNA, T.F. **Obtenção de três eventos-elite através da hibridação entre *A. hypogaea* e anfidiplóides sintéticos e sua inserção no programa de melhoramento da Embrapa.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, comunicado técnico, n. 165, p. 6, 2007.
- FERGUSON, M.E.; BUROW, M.D.; SCHULZE, S.R.; BRAMEL, P.J.; PATERSON, A.H.; KRESOVICH, S.; MITCHELL, S. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v. 108, p. 1064-1070, 2004.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p., 1998.
- FONCÉKA, D.; HODO-ABALO, T.; RIVALLAN, R.; FAYE, I.; SALL, M.N.; NDOYE, O.; FÁVERO, A.P.; BERTIOLI, D.J.; GLASZMANN, J.C.; COURTOIS, B.; RAMI, J.F. Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. **BMC plant biology**, v. 9, n. 103, p. 1-13, 2009.
- FREITAS, F.O.; PEÑALOZA, A.P.P.S.; VALLS, J.F.M. **O amendoim contador de história.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, documentos, n. 107, 12 p., 2003.
- FREITAS, S.M.; MARTINS, S.S.; NOMI, A.K.; CAMPOS, A.F. Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, RC. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil.** Paraíba: EMBRAPA Algodão, 2005, p. 15-44.
- GARCIA, G.M.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. **Genome**, v.38, p.166-176, 1995.

- GARCIA, G.M.; STALKER, H.T.; SHROEDER, E.; KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* in to *Arachis hypogaea*. **Genome**, v.39, p.836-845, 1996.
- GARCIA, G.M.; TALLURY, S.P.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. Molecular analysis of *Arachis* interspecific hybrids. **Theor Appl Genet**, v. 112, p. 1342-1348, 2006.
- GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; GALGARO, L.M.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. RFLP analysis of genetic variation in species of section *Arachis*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, v.123, n.3, p. 421-429, 2002a.
- GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; VALLS, J.F.M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.349-353, 2002b.
- GIMENES, M.A.; HOSHINO, A.A.; BARBOSA, A.V.G.; PALMIERI, D.A.; LOPES, C.R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biol**, v. 7, n. 9, 2007.
- GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 51-94.
- GUTIERREZ, M.V.; VAZ PATTO, M.C.; HUGHET, T.; CUBERO, J.I.; MORENO, M.T.; TORRES, A.M. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1210-1217, 2005.
- HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.379-384, 1993.
- HANCOCK, J.M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.1038–1047, 1995.
- HERSELMAN, L. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. **Euphytica**, v. 133, p. 319-327, 2003.
- HILU, K.W.; STALKER, H.T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v. 198, p. 167-178, 1995.

- HONG, Y.; LIANG, X.; CHEN, X.; LIU, H.; ZHOU, G.; LI, S.; WEN, S. Construction of genetic linkage map based on SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Agricultural Sciences in China**, v. 7, p. 915-921, 2008.
- HONG, Y.; CHEN, X.; LIANG, X.; LIU, H.; ZHOU, G.; LI, S.; WEN, S.; HOLBROOK, C.C.; GUO, B. A SSR-based composite genetic linkage map for the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genome. **BMC Plant Biology**, v. 10, n.17, 2010.
- HOPKINS, M.S.; CASA, A.M.; WANG, T.; MITCHELL, S.E.; DEAN, R.E.; KOCHERT, G., KOCHERT, G.D.; KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Science**, v. 39, p. 1243-1247, 1999.
- JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H. Markers and mapping: we are all geneticists now. **New Phytol.**, v. 137, p. 165-177, 1997.
- KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W.D.; SIMPSON, C.E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 565-570, 1991.
- KOPPOLU, R.; UPADHYAYA, H.D.; DWIVEDI, S.L.; HOISINGTON, D.A.; VARSHNEY, R.K. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. **BMC Plant Biology**, n. 15, v. 10, 2010.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, n.1-4, p.1-186, 1994.
- KRISHNA, G.K.; ZHANG, J.; BUROW, M.; PITTMAN, R.N.; DELIKOSTADINOV, S.G.; LU, Y.; PUPPALA, N. Genetic diversity analysis in Valencia peanut (*Arachis hypogaea* L.) using microsatellite markers. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 685-697, 2004.
- LANDER, E.S.; et al. MAPMAKER: na interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; JOSÉ, A.C.V.F.; ALVES-FREITAS, D.M.T.; MORETZSOHN, M.C.; GUIMARÃES, P.M.; NIELEN, S.; VIDIGAL, B.S.; PEREIRA, R.W.; PIKE, J.; FÁVERO, A.P.; PARNISKE, M.; VARSHNEY, R.K.; BERTIOLI, D.J. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. **BMC plant biology**, vol. 9, no. 112, p. 1-12, 2009.

- LIPPMAN, Z.B.; SEMEL, Y.; ZAMIR, D. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17(6), p. 545-552, 2007.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in-vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.397-401, 1989.
- LIU, B.H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. CRC Press, Boca Raton, 1998. 611 p.
- MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J.E.; BAIRD, E.; BONAR, N.; PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 2, p. 127-136, 1997.
- MILLA, S.R.; ISLEIB, T.G.; STALKER, H.T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v. 48, p. 1–11, 2005.
- MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; HERNANDEZ, C.J.; SZEWC-MCFADDEN, A.K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, v. 37, p.617-624, 1997.
- MORAES, S.A.; SALGADO, C.L. Avaliação da resistência a *Cercospora arachidicola* Hori em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Fitopatologia**, v. 14, n. 2, p.65-72, 1979.
- MORETZSOHN, M.C.; VALLS, J.F.M. **Análise da variabilidade genética da coleção brasileira de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) por meio de marcadores microssatélites**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 13, 27 p., 2001.
- MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hyper variable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 11, 2004.
- MORETZSOHN, M.C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P.M.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GIMENES, M.A.; MARTINS, W.S.; VALLS, J.F.M.; GRATTAPAGLIA, D.;

- BERTIOLI, D.J. A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theor. Appl. Genet.**, v. 111, p. 1060-1071, 2005.
- MORETZSOHN, M.C. **Desenvolvimento e mapeamento de marcadores microssatélites e identificação de QTLs ligados à produtividade e à resistência à mancha preta em *Arachis* spp.** 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasil.
- MORETZSOHN, M.C.; BARBOSA, A.V.G.; ALVES-FREITAS, D.M.T; TEIXEIRA, C.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; PEREIRA, R.W.; LOPES, C.R.; CAVALLARI, M.M.; VALLS, J.F.M.; BERTIOLI, D.J.; GIMENES, M.A. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. **BMC plant biology**, vol. 9, no. 40, p. 1-10, 2009
- PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006, p. 85-106.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-228, 1996.
- QUEIRÓZ, M.A. Os recursos genéticos vegetais e os melhoristas de plantas. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. (online). Versão 1.0**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 25 fev. 2010.
- RAINA, S.N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K.P.; DEVARUMATH, R.M. RAPD and ISSR fingerprinting as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, v. 44, p. 763-772, 2001.
- RAO, N.K.; REDDY, L.J.; BRAMEL, P.J. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 707–721, 2003.

- SANTOS, V.S.E.; GIMENES, M.A.; VALLS, J.F.M.; LOPES, C.R. Genetic variation within and among species of five sections of the genus *Arachis* L. (Leguminosae) using RAPDs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 841-848, 2003.
- SANTOS, R.C. Utilização de recursos genéticos e melhoramento de *Arachis hypogaea* L. no nordeste brasileiro. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. (online). Versão 1.0.** Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 25 fev. 2010.
- SEIJO, G.; LAVIA, G.I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.A.; BERTIOLI, D.J.; MOSCONE, E.A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**, v. 94, n.12, p. 1963-1971, 2007.
- SIMPSON, C.E., J.L. STARR, S.C. NELSON, K.E. WOODARD, AND O.D. SMITH. Registration of 'TxAG-6' and 'TxAG-7' peanut germplasm. **Crop Science**, v. 33, p. 1418, 1993.
- SIMPSON, C.E. Use of wild *Arachis* species introgression of genes into *A. hypogaea*. **Peanut Science**, v. 28, n. 2, p. 114-116, 2001.
- STALKER, H.T.; MOSS, J.P. Speciation, cytogenetics and utilization of *Arachis* species. **Advances in Agronomy**, v. 41, p. 1-40, 1987.
- STALKER, H.T.; SIMPSON, C.E. Germplasm resources in *Arachis*. In: PATTEE, H.E.; STALKER, H.T. (Eds). **Advances in Peanut Science**. Oklahoma: Stillwater. Cap. 2, p. 14-53, 1995.
- TALLURY, S.P.; HILU, K.W.; MILLA, S.R.; FRIEND, S.A.; ALSAGHIR, M.; STALKER, H.T.; QUANDT, D. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1229–1237, 2005.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4127–4138, 1984.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.6463–6471, 1989.
- TIAN, F.; LI, D.J.; FU, Q.; ZHU, Z.F.; FU, Y.C.; WANG, X.K.; SUN, C.Q. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in

- cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. **Theoretical Applied Genetics**, v. 112, p. 570–580, 2006.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E.; RAO, V. Ramanatha. Collecting wild species of *Arachis*. In: GUARINO, L.; RAO, V. R.; REID, R. (Eds.). **Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines**. Wallingford: CabInt, 748 p., 1995.
- 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. (Eds.) Encontro sobre temas de genética e melhoramento, 17, 2000, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ/Depto. de Genética, p.19-33, 2000.
- VALLS, J.F.M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*, In: SANTOS, RC. (ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Paraíba: EMBRAPA Algodão, p. 45-70, 2005.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v. 14, p. 35-64, 2005.
- VARSHNEY, R.K.; BERTIOLI, D.J.; MORETZSOHN, M.C.; VADEZ, V.; KRISHNAMURTHY, L.; ARUNA, R.; NIGAM, S.N.; MOSS, B.J.; SEETHA, K.; RAVI, K; HE, G.; KNAPP, S.J.; HOISINGTON, D.A. The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 729-739, 2009.
- VALOIS, A.C.C. A biodiversidade e os recursos genéticos In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. (online). Versão 1.0**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 25 fev. 2010.
- WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.388-396, 1989.

7. FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO

1. Projeto “Transferência da diversidade genética de espécies silvestres de *Arachis* ao amendoim pelo desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas”, financiado pelo projeto Macroprograma 2, da Embrapa.



2. Projeto “*Unlocking the genetic diversity in peanut's wild relatives with genomic and genetic tools*”, financiado pelo programa Generation Challenge Program e Fundação Bill & Mellinda Gates.

