



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS – MEC
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Construção de mapas genéticos para os genomas A, B e tetraploide de *Arachis* spp.

Ediene Galdino de Gouvea

Brasília – DF

Março, 2012

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS – MEC
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

Construção de mapas genéticos para os genomas A, B e tetraploide
de *Arachis* spp.

Ediene Galdino de Gouvea

Orientador: David John Bertioli

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade de Brasília (UnB), como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Botânica.

Brasília – DF

Março, 2012

Construção de mapas genéticos para os genomas A, B e tetraploide de *Arachis* spp.

Ediene Galdino de Gouvea

Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 30 de Março de 2012.

Prof. Dr. David John Bertoli
Universidade de Brasília – UnB
Presidente da Banca de Defesa

Dra. Tatiana Barbosa Rosado
Embrapa Agroenergia

Dra. Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertoli
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília – DF
Março, 2012

*Dedico aos meus pais, **Osmerino e Guilhermina**, por todo amor, apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

À minha família e irmãs queridas, Etiene e Eliene, pelo carinho e apoio;

Ao Rodrigo, por ter sido companheiro todo esse tempo, apoio e força, por todo seu carinho, amor e atenção;

Ao meu maior “mestre”, Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn, por toda orientação, ensinamentos, confiança, paciência e amizade;

Ao Dr. David John Bertoli, pela orientação e confiança nesse trabalho;

À Dra. Tatiana Rosado e Dra. Soraya Cristina Leal-Bertoli por aceitarem contribuir com esse trabalho;

Ao Laboratório de Genética Vegetal juntamente com seus pesquisadores, por todo apoio técnico, financiamento e infraestrutura cedida. Em especial aos queridos amigos que apoiaram, acreditaram e ajudaram direta ou indiretamente: Carol Sansaloni, César Petrolí, Dione Mendes, Marília Pappas, Tatiana Rosado, Pedro Tanno, Bruna Jaqueline, Natália Lamas, Mariana Lira, Thaísa Lacerda, Daniele Paiva e Viviane;

À equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III;

À Universidade de Brasília. Ao professor e coordenador da pós-graduação de Botânica, Paulo Eduardo Câmara, por estar sempre disposto a ajudar. E a duas amigas especiais, Raissa Leite e Izabelly Sant’Ana;

Aos financiadores do projeto: Embrapa e o programa Generation Challenge Program;

E por fim a todos aqueles que acreditaram na realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
I INTRODUÇÃO.....	09
1.1 O amendoim	09
1.2 O gênero <i>Arachis</i>	11
1.3 Mapas genéticos	13
1.4 Marcadores Moleculares	21
1.4.1 Microssatélites	23
1.4.2 Marcadores SNP	25
1.4.3 Análogos a genes de resistência – RGA	26
II JUSTIFICATIVA	27
III OBJETIVOS	28
IV METODOLOGIA.....	28
4.1 Material vegetal	28
4.2 Extração de DNA	29
4.3 PCR e genotipagem.....	29
4.4 Construção do mapa.....	31
V RESULTADO E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Mapa diploide de genoma A	32
5.2 Mapa diploide de genoma B	37
5.3 Mapa tetraploide de genoma AB.....	40
5.4 Sintenia entre os mapas.....	47
VI CONCLUSÕES.....	61
VII BIBLIOGRAFIA	62
VIII FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO.....	76
IX ANEXOS.....	77

RESUMO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é um grão de grande importância econômica e nutricional, e um dos alimentos humanos mais nutritivos e de fácil digestão, por ter o grão rico em óleo e proteínas. Espécies silvestres de *Arachis* são importantes fontes de genes que controlam características de interesse para o amendoim. O mapeamento genético é de grande utilidade no auxílio a programas de melhoramento de plantas, possibilitando o mapeamento de locos que controlam características quantitativas, ou QTL's (*Quantitative Trait Loci*); também são usados em estudos de sintenia ou mapeamento comparativo e clonagem de genes. Nesse trabalho foram desenvolvidos três mapas genéticos baseados em populações RIL: um referente ao genoma A, um referente ao genoma B e por último um para o genoma tetraploide do amendoim. Para o mapa A foram utilizados diversos tipos de marcadores, como microsatélites, marcadores âncoras, SNPs e RGAs; já nos mapas B e tetraploide foram utilizados somente marcadores microsatélites. Em geral, os mapas obtidos apresentaram tamanhos e número de grupos de ligação semelhantes aos mapas já publicados. O mapa de genoma A apresentou comprimento total de 1036 cM com 870 marcadores distribuídos em 10 grupos de ligação. O mapa de genoma B teve comprimento total de 560,3 cM, 10 grupos de ligação e 147 marcadores mapeados e o mapa tetraploide 1066 cM, com 210 marcadores mapeados em 21 grupos de ligação. Muitos dos marcadores utilizados são gênicos e de cópias únicas e são de grande importância para estudos de genômica comparativa, e apresentam grande chance de estarem ligados a genes de interesse. Além disso, foi realizado um estudo de sintenia entre esses mapas, que evidenciou bastante semelhança entre eles. Os mapas genéticos moderadamente saturados representam um considerável aumento na capacidade de mapear genes úteis e utilizar a seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento do amendoim.

Palavras Chaves: amendoim, mapas genéticos, marcadores moleculares, sintenia.

ABSTRACT

The cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a grain of great nutritional and economic importance, and it is one of the most nutritious and digestible human food available, as it is rich in oil and protein. Wild species of *Arachis* are important sources of genes that control interesting traits for the cultivated peanut. Genetic mapping is a useful tool in plant breeding programs, enabling the mapping of loci controlling quantitative, polygenic or traits with complex inheritance, called QTL's (Quantitative Trait Loci); it is also used in studies of synteny or comparative mapping and gene cloning. In this work three genetic maps were developed based on RIL populations: one for the A genome, one for the B genome and one for the tetraploid peanut genome. For the A map we used different types of markers such as microsatellite, anchor, SNPs and RGA markers, whereas in the B and tetraploid maps only microsatellite markers were used. In general, the maps had size and number of linkage groups similar to already published maps. The A genome map showed a total size of 1036 cM, with 870 markers distributed into 10 linkage groups. The B genome map had a total size of 560,3 cM, 10 linkage groups and 147 markers mapped, while the map for tetraploid genome showed 1066 cM, with 210 markers mapped into 21 linkage groups. Many of the markers are single copy genes and of great importance to comparative genomics studies, and with a great chance of being linked to genes of interest. Furthermore, a synteny study between these maps showed a great similarity between them. The moderately saturated genetic maps represent a considerable increase in the ability to map useful genes and to use marker-assisted selection in peanut breeding programs.

Keywords: peanut, genetic maps, molecular markers, synteny.

I INTRODUÇÃO

1.1 O amendoim

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é um grão de grande importância econômica. É a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo, ocupando cerca de 24 milhões de hectares, com uma produção de aproximadamente 36,5 milhões de toneladas em 2009 (FAOSTAT, 2010). É cultivado em mais de 80 países, incluindo os continentes americano, africano e asiático. Os principais produtores mundiais são China, Índia, Nigéria e Estados Unidos, com aproximadamente 14,8 milhões, 5,5 milhões, 3 milhões e 1,7 milhões de toneladas de amendoim com casca produzidas em 2009, respectivamente (FAOSTAT, 2010).

Possui também grande importância nutricional, é consumido cru pelo homem desde a pré-história, antes mesmo da cerâmica e do fogo, necessários para o cozimento dos alimentos (Freitas et al., 2003). É um dos alimentos humanos mais nutritivos e de fácil digestão por ser o grão rico em óleo (aproximadamente 45%), proteínas (20 a 25%), além de vitaminas E e do complexo B (Godoy et al., 1999; Freitas et al., 2003; Santos et al., 2005). É utilizado como principal fonte proteica e calórica alimentar de populações mais pobres da África e Ásia (Nogueira & Távora, 2005). Nos Estados Unidos, 500 mil toneladas/ano destinam-se à fabricação de pasta de amendoim. No Brasil o cultivo de amendoim é pequeno, representando menos de 1% da produção mundial. Apesar disso, a produção nacional tem aumentado nos últimos anos e a estimativa da safra 2011/2012 indica uma produção de 259 mil toneladas em 97 mil ha, cuja destinação atende ao mercado alimentício na forma *in natura* ou para confecção de doces, confeitos, petiscos ou pastas (Santos et al., 2005; CONAB, 2011). Apesar da produção no Brasil ser baixa em relação aos maiores produtores, a produtividade tem aumentado nos últimos anos (CONAB, 2011) e isso tem sido relacionado a maiores investimentos em pesquisa e melhoramento do amendoim (Dwivedi et al., 2007).

Por ser bastante consumido, também na forma *in natura*, pesquisadores buscam conhecer sua composição e estabilidade. Sabe-se que alguns componentes podem trazer benefícios à saúde. O ácido oleico, por exemplo, por ser monoinsaturado, permite a diminuição de problemas cardíacos e diminuição dos níveis de colesterol (O'Byrne et al, 1997). Além do mais, a composição de ácidos graxos está relacionada à estabilidade oxidativa do óleo e durabilidade do produto.

Óleos com altas proporções de ácido oleico em relação ao linoleico (O/L) são menos suscetíveis à rancificação, o que resulta em maior vida de prateleira. Essas características são de grande interesse para indústrias que utilizam e armazenam o amendoim (Stalker et al., 1989; O’Keefe et al., 1993). Nos últimos anos os melhoristas vêm buscando e investindo na produção de grãos de amendoim chamados alto-oleicos, ou seja, um grão com altos níveis de ácido oleico (mais de 75%) e baixo nível de linoleico (menos de 5%) e relação O/L maior do que 10 (Moore & Knauft, 1989; Junget al., 2000).

Arachis hypogaea é dividida em duas subespécies (*fastigiata* e *hypogaea*), seis variedades botânicas e numerosos grupos de cultivares de acordo com características morfológicas e hábitos de crescimento da planta (Krapovickas & Gregory, 1994; Holbrook & Stalker, 2003). A subespécie *fastigiata* possui um ciclo de vida curto (90-100 dias), porte ereto, não apresenta dormência, não possui flores no eixo central e se divide nas variedades *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* e *peruviana*. A subespécie *hypogaea* apresenta ciclo de vida longo (120-140 dias), hábito rasteiro, sementes com dormência e flores no eixo central, sendo dividida nas variedades *hypogaea* e *hirsuta*. Com relação ao tipo agrícola, o amendoim tem sido classificado em diferentes grupos, e os principais são Valência, Spanish e Virgínia. Morfologicamente esses grupos são classificados da seguinte forma: Valência pertence à subespécie *fastigiata* variedade *fastigiata*; grupo Spanish como *fastigiata* variedade *vulgaris*; e por fim o Virgínia que pertence à subespécie *hypogaea* variedade *hypogaea* (Valls, 2005) (Figura 1).

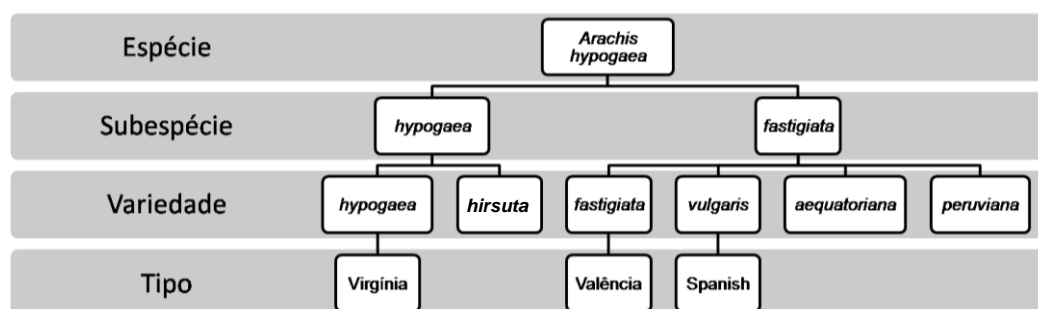


Figura 1. Subespécies, variedades e tipos agrônômicos da espécie *Arachis hypogaea* L. (Adaptado de Herselman, 2003).

Arachis hypogaea é uma espécie autógama, que por produzir frutos e sementes abaixo do solo possui uma dispersão natural limitada, resultando em populações com lenta expansão de perímetro e grande isolamento geográfico (Valls, 2000). É bastante susceptível a uma grande variedade de pragas e doenças, que podem causar grande impacto econômico. São doenças causadas por fungos, vírus, nematoides e bactérias. Entre as que causam maior impacto, no Brasil, estão às manchas fúngicas de parte aérea: mancha castanha causada pelo fungo *Cercospora arachidicola* Hori; mancha preta causada por *Cercosporidium personatum* (Berk. & Curtis) Deighton ou *Phaeosariopsis personata* (Berk. & Curt.) V. Arx.; e a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. (Pio-Ribeiro et al., 2005).

1.2 O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* é nativo da América do Sul (Krapovickas & Gregory, 1994). É uma leguminosa (Fabaceae) e distingue-se de outras plantas por produzir flores acima do solo e os frutos abaixo do solo (Holbrook & Stalker, 2003). Compreende 80 espécies descritas, sendo a maioria diploide ($2n=2x=20$ cromossomos); algumas aneuploides ($2n=2x=18$ cromossomos) e cinco espécies tetraploides ($2n=4x=40$ cromossomos), incluindo *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994; Lavia 1998; Valls & Simpson, 2005). É dividido em nove seções taxonômicas, com base em dados morfológicos, distribuição geográfica e compatibilidade de cruzamento, sendo elas: *Arachis*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Rhizomatosae*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Procumbentes* e *Trirectoides* (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 et al., 1995; Valls & Simpson, 2005).

A seção *Arachis* é o maior grupo do gênero, totalizando 31 espécies descritas até o momento (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005). Possui uma distribuição ampla, desde os Andes até áreas costeiras do Atlântico (Creste et al., 2005). Tem-se bastante interesse pelas espécies dessa seção, por incluir o amendoim cultivado e seus progenitores. Um dos critérios para classificação de espécies nessa seção é, em teoria, a possibilidade de cruzamento com *A. hypogaea*, independentemente do nível de fertilidade dos híbridos gerados

(Kochert et al., 1991; Krapovickas & Gregory, 1994; Creste et al., 2005; Tallury et al., 2005; Valls & Simpson, 2005).

Na seção *Arachis*, três tipos de genomas (A, B e D) têm sido tradicionalmente descritos para as espécies diploides com $x=10$, de acordo com dados citogenéticos e de viabilidade de cruzamentos (Smartt et al., 1978; Gregory & Gregory, 1979; Singh & Moss, 1982; 1984; Singh 1986; Stalker 1991; Fernández & Krapovickas, 1994; Peñaloza & Valls, 2005). As espécies caracterizadas com genoma A são aquelas que possuem um pequeno par de cromossomos, chamado par A, que apresenta menor condensação na eucromatina quando comparado aos outros cromossomos (Husted, 1936; Seijo et al., 2004). A maioria das espécies diploides dessa seção possui esse genoma, podendo ser perenes ou anuais, mas que cruzam facilmente entre si, produzindo híbridos férteis com viabilidade de pólen de média a alta (Gregory & Gregory, 1979; Krapovickas & Gregory, 1994; Fávero, 2004). O restante das espécies diploides dessa seção são todas anuais. As espécies diploides que não apresentam o par A, são consideradas mais associadas ao genoma B de *A. hypogaea*, com exceção de *A. glandulifera*, que possui o genoma chamado D, caracterizado pela presença de seis pares de cromossomos subtelocêntricos (Stalker, 1991; Fernandez & Krapovickas, 1994, Robledo & Seijo, 2008). *Arachis hypogaea* e *A. monticola* são espécies alotetraploides com genoma AB. Além disso, três espécies possuem $2n=18$ cromossomos (*A. decora*, *A. praecox* e *A. palustris*) (Peñaloza & Valls, 1997; Lavia, 1998).

Recentemente uma nova classificação foi feita por Robledo e Seijo (2010) baseada em FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) observando a presença e tamanho de bandas heterocromáticas, e algumas espécies antes classificadas como genoma B foram reclassificadas como sendo genoma F (*Arachis benensis* e *A. trinitensis*) e genoma K (*A. batizocoi*, *A. cruziana* e *A. krapovickasii*). Esses dois tipos de genomas possuem bandas centroméricas na maioria dos cromossomos, diferindo uma das outras na quantidade e distribuição da heterocromatina.

A origem do amendoim tem sido objeto de bastante debate. Por ser um alotetraploide, acredita-se que tenha surgido da hibridização entre duas espécies diploides. Diversas espécies têm sido sugeridas como as possíveis doadoras dos genomas A e B (Fávero et al., 2006). Com base em dados de marcadores moleculares, de distribuição geográfica e de FISH, acredita-se que o amendoim

seja resultante de um cruzamento entre *A. ipaënsis*, doadora do genoma B, e *A. duranensis*, doadora do genoma A (Kochert et al., 1991; 1996; Seijo et al., 2004). Recentemente, o amendoim ou *A. monticola*, considerado por alguns autores o ancestral silvestre do amendoim (Gregory & Gregory, 1976; Seijo et al., 2007) pôde ser “refeito” a partir do cruzamento entre essas duas espécies (Fávero et al., 2006). Assim, *A. ipaënsis*, usada como parental feminina foi cruzada com *A. duranensis*, usada como doadora de pólen. A planta F₁ resultante diploide e estéril foi duplicada com colchicina, obtendo-se uma planta tetraploide fértil AABB. Essa planta foi cruzada com *A. hypogaea*, gerando híbridos férteis e dando suporte à hipótese de que *A. duranensis* e *A. ipaënsis* são os prováveis doadores dos genomas A e B, respectivamente, para o amendoim.

O amendoim, portanto, deve ter-se originado da hibridização de duas espécies diploides, seguida de um evento de duplicação espontânea de cromossomos (Halward et al., 1991). A planta resultante devia apresentar vigor híbrido, por isso foi escolhida para cultivo; mas, por ser tetraploide, tornou-se isolada reprodutivamente de seus parentes silvestres. Como consequência, todas as raças locais de amendoim são, provavelmente, derivadas de uma ou poucas plantas. Esse fato levou a uma variabilidade genética reduzida, o que tem dificultado os avanços no melhoramento genético e molecular do amendoim. Por outro lado, espécies silvestres de *Arachis* possuem resistências a diferentes fatores bióticos e abióticos, que são de interesse para o melhoramento do amendoim (Dwivedi et al., 2003; 2007) e, acredita-se que apresentam maior variabilidade genética (Hilu & Stalker, 1995; Moretzsohn et al., 2004; Milla et al., 2005).

1.3 Mapas genéticos

Os trabalhos realizados por Bateson, Saunders e Punnet com ervilha em 1902, e com *Drosophila melanogaster* em 1910 por Morgan e colaboradores, forneceram a base para a teoria de que a segregação de alguns caracteres não ocorria independentemente, como proposto por Mendel, em 1866. Morgan e seus colegas sugeriram então a disposição linear dos genes em cada cromossomo, na teoria cromossômica de herança e, a partir daí, surgiram as primeiras ideias de mapeamento genético (Coelho & Silva, 2005). Em 1913, Stutervant, analisando

dados de segregação de genes ligados, propôs utilizar a frequência de recombinantes como uma medida da distância linear entre dois genes na construção de mapas genéticos (Carneiro & Vieira, 2002), definidos como uma sequência de elementos genéticos ordenados de acordo com seus padrões de segregação (Cheema & Dicks, 2009).

Apesar de essas informações serem de extrema importância em estudos genéticos, a quantidade de marcadores disponíveis era muito baixa, restringindo o uso dessa ferramenta no melhoramento de plantas. Os primeiros mapas foram construídos com marcadores morfológicos e citológicos, e mapas mais completos só eram permitidos para espécies muito estudadas geneticamente, como o milho (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho & Silva, 2005). Na década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, a construção de mapas genéticos tornou-se uma tarefa relativamente fácil, rápida e ilimitada para todas as espécies, permitindo a saturação de mapas já existentes e até mesmo a construção de mapas para espécies para as quais os estudos de herança eram restritos (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho & Silva, 2005; Pereira & Pereira, 2006). Marcadores moleculares têm a vantagem de não sofrerem influência ambiental em relação a marcadores morfológicos e citológicos e, frequentemente são seletivamente neutros, ou seja, não oferecem vantagem seletiva à planta, possibilitando a construção de mapas para espécies de interesse agrônomo e espécies que possuem ciclo de vida longo, como as florestais e frutíferas (Carneiro & Vieira, 2002).

O mapeamento genético é de grande utilidade no auxílio a programas de melhoramento de plantas, possibilitando o mapeamento de locos que controlam características quantitativas, poligênicas ou de herança complexa, chamados de QTL's (*Quantitative Trait Loci*); também são usados em estudos de sintenia ou mapeamento comparativo e clonagem de genes (Ferreira & Grattapaglia, 1998, Carneiro & Vieira, 2002). Os marcadores associados a QTL's, depois de mapeados, podem ser utilizados para seleção indireta (SAM- Seleção assistida por marcadores), tornando rápido e eficiente o processo de melhoramento (Moretzsohn, 2006).

Na área biotecnológica, o mapeamento serve de base para o isolamento de genes, também conhecido 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 Chromossomes) (Moretzsohn, 2006). Em *Arachis* bibliotecas de BACs têm sido construídas para a espécie cultivada (Yuksel & Paterson, 2005) e para duas espécies silvestres, uma de genoma A (*A. duranensis*) e uma de genoma B (*A. ipaënsis*) (Guimarães et al., 2008).

O uso de mapeamento para estudos comparativos ou de sintenia colabora com o entendimento sobre a evolução dos genomas, no qual se comparam as estruturas genômicas das diferentes espécies, observando a homologia dos genes, conservação da distância e a ordem de ligação nos cromossomos; é usado também como um meio de obtenção de mapa único de referência (Carneiro & Vieira, 2002). Uma revisão feita por Coelho & Silva (2005) revela uma alta taxa de homologia entre a estrutura genômica de diversas espécies, indicando que genes de interesse ou até mesmo QTL's são compartilhados por vários genomas diferentes.

Em *Arachis* alguns estudos de mapeamento comparativo já foram realizados. Moretzsohn et al. (2009) construíram um mapa de ligação do genoma B de *Arachis* e o compararam ao mapa já existente do genoma A (Leal-Bertioli et al., 2009), evidenciando a alta sintenia em todos os grupos de ligação. Em 2008, Hougaard e colaboradores utilizaram marcadores âncoras de leguminosas para verificar a sintenia entre *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* e *Arachis*. Os onze grupos de ligação formados em feijão foram sintênicos com *Medicago* e *Lotus* e dez, com *Arachis*. Bertioli e colaboradores (2009) também realizaram um estudo para verificar a sintenia de *Arachis* com *Lotus* e *Medicago*. Recentemente um mapa foi construído a partir de uma população de retrocruzamento entre *A. hypogaea* e um anfidiplóide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}, resultando em 21 grupos de ligação (sendo dez referentes ao genoma A e onze ao genoma B) (Foncéka et al., 2009). Esse estudo possibilitou a comparação entre os mapas diploides e tetraploides, mostrou a sintenia entre os genomas A e B de *Arachis* e evidenciou os rearranjos cromossômicos ocorridos nos dois genomas, antes e após a tetraploidização do amendoim.

Além de estudos comparativos, outros mapas já foram feitos em *Arachis*. O primeiro mapa publicado foi construído utilizando marcadores RFLPs em uma população F₂ do cruzamento entre duas espécies de genoma A (*A. stenosperma* x *A. cardenasii*), que resultou em 11 grupos de ligação (Halward et al., 1993). Outro

mapa foi feito com marcadores RFLPs, sendo o primeiro para o genoma tetraploide, em uma população de retrocruzamento entre um anfidiplóide sintético x *A. hypogaea*, que resultou em 23 grupos de ligação (Burow et al., 2001). O primeiro mapa baseado em marcadores microssatélites (Moretzsohn et al., 2005) foi obtido de uma população F₂ de genoma A de cruzamento interespecífico (*A. duranensis* x *A. stenosperma*), que apresentou 170 marcadores mapeados em 11 grupos de ligação. A esse mapa de Moretzsohn e colaboradores (2005) foram acrescentados novos marcadores como SSRs, AFLPs, marcadores âncoras, SNPs, RGAs e outros resultando 369 marcadores mapeados em 10 grupos de ligação (Leal-Bertioli et al., 2009). Em 2009, Moretzsohn e colaboradores fizeram um mapa para espécies de genoma B (*A. magna* x *A. ipaënsis*), em uma população F₂, também utilizando marcadores SSRs. Foncéka e colaboradores (2009) fizeram um mapa para o genoma tetraploide em uma população de retrocruzamento. Foram mapeados 298 marcadores microssatélites em 21 grupos de ligação. Mapas genéticos começaram a ser publicados para o amendoim cultivado, nos quatro últimos anos (Varshney et al., 2009; Hong et al., 2010), utilizando marcadores microssatélites.

Apesar de já existir diversos trabalhos de mapeamento em espécies de *Arachis*, tem-se encontrado um baixo polimorfismo devido à baixa variabilidade genética e, conseqüentemente esses mapas com baixa resolução dificultam avanços no melhoramento genético do amendoim. Por isso, ainda há necessidade de se obter mapas saturados ou com maior resolução em *Arachis*, assim irá facilitar o mapeamento de QTLs e a utilização de seleção assistida por marcadores no melhoramento do amendoim (Guo et al., 2011; Qin et al., 2012).

Para obter um mapa genético é necessário: obter uma população de mapeamento, selecionar os marcadores, identificar o polimorfismo, realizar o teste de segregação, e analisar a ligação dos marcadores (Paterson, 1996; Collard et al., 2005).

A construção de mapas genéticos baseia-se na existência de desequilíbrio de ligação, que é definido como associação não aleatória entre diferentes locos, ou como desvios das frequências alélicas, em relação às frequências esperadas sob independência (Lu et al., 2002; Coelho & Silva, 2005). Fatores como: deriva genética, migração e seleção, causam desequilíbrio de ligação, pois alteram as

frequências gênicas ou alélicas. A fim de aumentar o desequilíbrio de ligação para o desenvolvimento de mapas e mapeamento de QTLs há a necessidade do desenvolvimento de uma população na qual o desequilíbrio seja causado apenas pela ligação física dos locos (Coelho & Silva, 2005). Para isso é fundamental que se tenha uma população segregante, a partir do cruzamento de progenitores contrastantes para as características desejadas, com distância genética suficiente para identificação de marcadores polimórficos (Moretzsohn, 2006).

Vários tipos de populações podem ser utilizados para construção de mapas genéticos (Figura 2), sendo as mais utilizadas populações obtidas por retrocruzamento, populações F_2 , linhagens puras recombinantes (RIL – *Recombinant Inbred Lines*), linhagens de duplo-haploides e cruzamento entre indivíduos heterozigotos para espécies com fecundação cruzada (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Coelho & Silva, 2005; Collard et al., 2005).

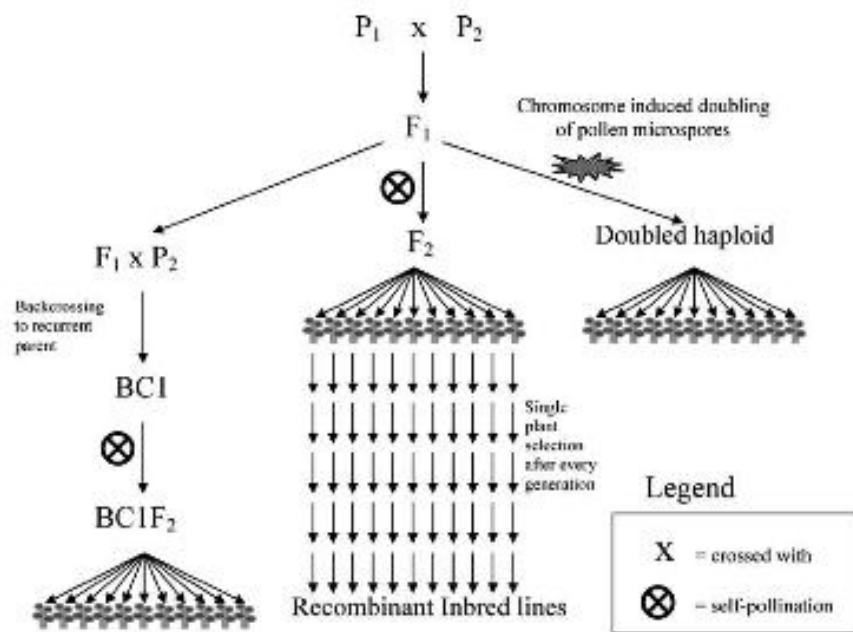


Figura 2 – Diagrama dos tipos de populações para mapeamento para espécies de auto-fecundação (Collard et al., 2005).

Populações F_2 e de retrocruzamento são os tipos mais simples de populações utilizadas para mapeamento. Essas duas possuem a vantagem de serem fáceis de construir e requerem pouco tempo para seu desenvolvimento. Apresentam como desvantagem produzirem indivíduos únicos dificultando a avaliação de uma

determinada característica em diferentes ambientes (Coelho & Silva, 2005; Collard et al., 2005).

Linhagens puras recombinantes ou RILs podem ser obtidas a partir do cruzamento de duas linhagens puras seguido de autofecundações sucessivas ou do cruzamento entre irmãos, gerando uma série de linhagens homozigotas, cada uma contendo uma combinação única de segmentos cromossômicos vindos dos progenitores (Figura 3) (Broman, 2004). A desvantagem desse tipo de delineamento é o longo tempo necessário para o desenvolvimento dessa população, sendo necessárias de seis a oito gerações (Coelho & Silva, 2005; Collard et al., 2005; Moretzsohn, 2006).

Linhagens duplo-haploides são formadas a partir da indução da duplicação dos cromossomos através dos grãos-de-pólen, sendo possível somente em espécies passíveis de cultura de tecido (Collard et al., 2005).

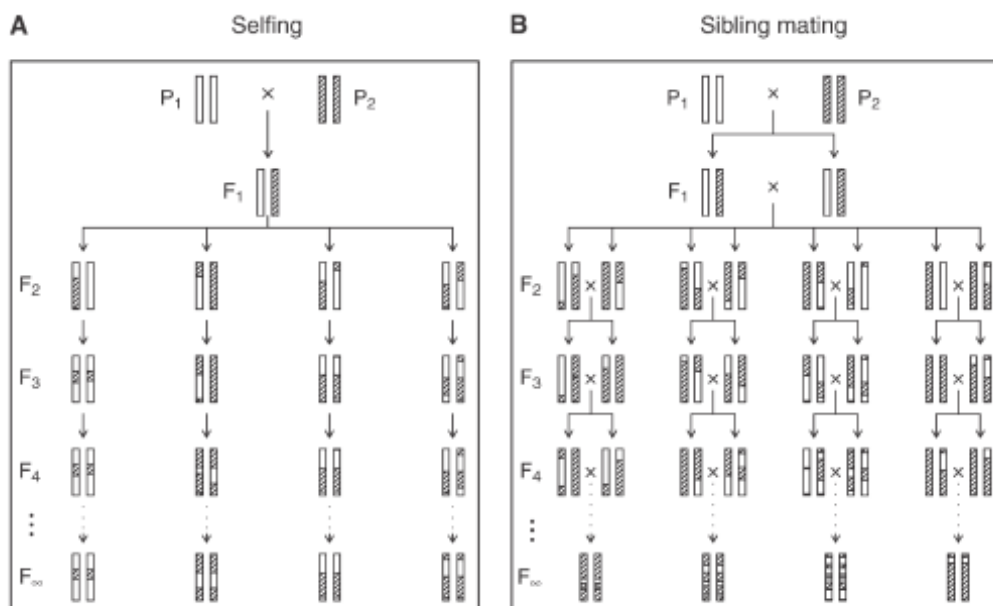


Figura 3 – Produção de linhagens puras recombinantes ou RILs por autofecundação (A) e cruzamento entre irmãos (B) (Broman, 2004).

Porém, como vantagem, populações RILs e duplo-haploides podem perpetuar seus genótipos, pois produzem homozigotos ou “linhagens-puras”, podendo então ser distribuídos para vários laboratórios em diversos locais, sendo possível o desenvolvimento de um mapa em parceria com outros grupos de

pesquisa (Broman 2004; Coelho & Silva, 2005; Collard et al., 2005). Além disso, as linhagens podem ser avaliadas em diversos anos e locais, permitindo uma avaliação mais segura, principalmente e no que diz respeito aos caracteres quantitativos, em outras palavras, representam um recurso “eterno” para mapeamento de QTLs (Collard et al., 2005).

Feita a escolha da população é necessário identificar a diferença entre os parentais através de marcadores moleculares. Populações de fecundação cruzada tendem a ter maior polimorfismo do que populações de autofecundação (Collard et al., 2005). Em espécies de autofecundação é necessária a seleção de parentais relativamente distantes, sendo possível selecionar a partir de estudos baseados na diversidade genética dos parentais (Collard et al., 2005; Moretzsohn, 2006). A escolha do marcador depende de sua adequação e disponibilidade para uma determinada espécie, suas vantagens e desvantagens, sendo importante considerar o conteúdo informativo de marcadores dominantes e codominantes (Tabela 1), e aspectos como infraestrutura laboratorial presente e treinamento do pessoal envolvido (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Joshi et al., 1999; Coelho & Silva, 2005; Collard et al., 2005; Moretzsohn, 2006).

Após a identificação dos marcadores polimórficos a serem utilizados, esses são genotipados em toda a população de mapeamento. O teste de segregação é feito, a fim de verificar se os padrões de segregação seguem os padrões mendelianos. Esse teste é feito utilizando o qui-quadrado (X^2), e a segregação esperada varia de acordo com o tipo de marcador e tipo de população (Shuster & Cruz, 2004; Collard et al., 2005; Moretzsohn, 2006).

Tabela 1–Segregação esperada dos marcadores em diferentes tipos de população (Collard, 2005).

Tipo de população	Marcadores Codominantes	Marcadores Dominantes
F₂	1:2:1 (AA:Aa:aa)	3:1 (B_:bb)
Retrocruzamento	1:1 (Cc:cc)	1:1 (Dd:dd)
RIL ou Duplo-haplóides	1:1 (EE: ee)	1:1 (FF:ff)

A detecção do desequilíbrio de ligação é feita através da razão de verossimilhança (LR), visando comparar as frequências alélicas esperadas e observadas sob a condição de segregação independente entre os locos, onde se tem uma hipótese alternativa de que há ligação e uma hipótese nula de que não há ligação (Lynch & Walsh, 1998; Shuster & Cruz, 2004). Para uma melhor interpretação, tem-se usado a estatística da razão da verossimilhança convertida para o logaritmo da base 10, também chamada de LOD (“Log of the odds”). Para construção de um mapa, geralmente usa-se LOD >3, isso significa que a hipótese alternativa é $10^3=1000$ vezes mais verossímil do que a hipótese nula de segregação independente (Lynch & Walsh, 1998).

Os marcadores são agrupados dentro de um “grupo de ligação”, que, do ponto de vista biológico, são grupos de genes (marcadores) cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo (Carneiro & Vieira, 2002; Collard et al., 2005). A distância entre os marcadores é medida pela frequência de recombinação, porém, essa é uma medida não aditiva, não permitindo a detecção de permutas duplas em segmentos adjacentes (Carneiro & Vieira, 2002). Com isso, ao incluir novos marcadores em um mapa é necessário que todas as distâncias já mapeadas sejam ajustadas. A fim de se evitar esse problema, e para estabelecer a relação entre a distância genética entre dois locos no mapa e a frequência de recombinantes, foram criadas funções de mapeamento, sendo as mais utilizadas em mapeamento vegetal as funções de Haldane e de Kosambi (Haldane, 1919; Kosambi, 1944). A função de Haldane assume que não há interferência entre permutas gênicas de segmentos adjacentes, enquanto a de Kosambi admite a interferência. Essas funções são expressas em centiMorgan (cM), equivalente a 0,01 Morgan, que é igual a

distância entre dois genes ao longo da qual se espera que ocorra um *crossing-over* por gameta por geração (Weir, 1996).

A ordenação dos marcadores é feita dentro de cada grupo de ligação, cujo processo visa minimizar o número de *crossing-overs* (Carneiro & Vieira, 2002). Existem vários métodos para que a melhor ordem dos marcadores seja estabelecida. O método da soma dos coeficientes de recombinação adjacentes (SAR) sugere a ordenação de três locos, propondo que a ordem correta entre os locos seja aquela que resulte em um mínimo valor de SAR, onde o valor de SAR sob a ordem incorreta será sempre maior que a correta. Porém esse método é impraticável quando muitos locos estão envolvidos, uma vez que o número de ordens possíveis para m locos é igual a $m!/2$, ou seja, para 30 locos teríamos $13,263 \times 10^{32}$ combinações possíveis. A fim de diminuir esse problema, alguns algoritmos têm sido utilizados como: seriação, anelamento simulado ou ramos e conexões. Anelamento simulado e seriação são algoritmos de aproximação e esses não garantem a melhor ordem. Já ramos e conexões garantem a melhor ordem, porém a análise é mais demorada quando se tem grupos com muitos marcadores (Carneiro & Vieira, 2002; Coelho e Silva, 2005). A acurácia da determinação da melhor ordem de marcadores em um grupo de ligação está diretamente relacionada ao número de indivíduos da população, quanto maior o número de indivíduos, maior será a acurácia do ordenamento (Liu, 1998; Lynch & Walsh, 1998; Moretzsohn, 2006).

1.4 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares ou de DNA revelam as diferenças genéticas entre indivíduos da mesma ou de diferentes espécies, e esses são chamados de polimórficos. Marcadores polimórficos, baseado em como serão mostrados os indivíduos heterozigotos e homozigotos, diferenciam-se em dominantes e codominantes. Marcadores codominantes apresentam as diferenças entre os tamanhos dos alelos podendo apresentar todos os alelos presentes em um determinado loco. Nesse tipo de marcador é possível identificar homozigotos e heterozigotos. Já os marcadores dominantes apresentam-se com presença ou ausência de alelo mostrando apenas um dos alelos em um determinado loco, não sendo possível a identificação de indivíduos heterozigotos (Collard et al., 2005).

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados para construção de mapas de ligação para diversas espécies de plantas (Collard et al., 2005). Em *Arachis*, diversos trabalhos foram realizados utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, visando a um melhor conhecimento da diversidade genética assim como para a construção de mapas genéticos, em estudos de mapeamento comparativo e para detecção de genes de interesse agrônômico. Entre os marcadores utilizados destacam-se: RAPD (Hilu & Stalker, 1995; Raina et al., 2001; Santos et al., 2003; Creste et al., 2005; Garcia et al., 2006), AFLP (Gimenes et al., 2002; Herselman, 2003; Milla et al., 2005; Tallury et al., 2005), RFLP (Kochert et al., 1991, Garcia et al., 1995; Burow et al., 2001), ISSR (Raina et al., 2001) e SSR (Hopkins et al., 1999; He et al., 2003; 2005; Ferguson et al., 2004; Krishna et al., 2004; Moretzsohn et al., 2004; 2005;2009; Gimenes et al., 2007; Varshney et al., 2009, Hong et al., 2010; Koppolu et al., 2010; Macedo et al., 2012). Cada marcador possui suas características, vantagens e desvantagens (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre os principais tipos de marcadores moleculares utilizados na construção de mapas de ligação em plantas (Carneiro e Vieira, 2002).

Características	RFLPs	RAPDs	SSRs	AFLPs
Tipo de Marcador	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
Número de alelos/loco	Multialélico	2	Multialélico	2
Nível de polimorfismo	Alto	Alto	Muito alto	Muito alto
Necessidade de procedimentos prévios	Construção de bibliotecas genômicas ou de cDNAs	Não há	Desenho de primers	Não há
Quantidade de DNA necessária	10 mg	25 ng	50 ng	500 ng
Marcação radioativa	Sim/Não	Não	Não	Sim/Não
Reprodutibilidade	Alta	Média	Alta	Média
Investimento	Alto	Médio	Alto	Médio

Marcadores RFLP são facilmente transferíveis entre populações e codominantes, porém necessitam de uma grande quantidade de DNA, requerem pessoal técnico habilitado para manipulação de DNA recombinante e material radioativo e é uma técnica laboriosa e de alto custo. RAPD, apesar de ser uma

técnica rápida e simples, apresenta problemas de reprodutibilidade. AFLP apresenta alto nível de polimorfismo, porém possui uma metodologia mais complexa para sua detecção. RAPD e AFLP são marcadores dominantes e conseqüentemente são pouco informativos. Portanto, esses três tipos de marcadores moleculares não são ideais para programas de seleção assistida por marcadores (Collard et al., 2005; Moretzsohn, 2006; Dwivedi et al., 2007).

1.4.1 Microssatélites

Sequências simples repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats), microssatélites ou sítios de microssatélites marcados por sequências (STMS – Sequence Tagged Microsatellite Sites) consistem de pequenas sequências repetidas (motifs) “in tandem” no genoma de eucariotos, de um a seis nucleotídeos de comprimento. Com a utilização de um par de primers específicos (20 a 25 bases) complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite, essas regiões podem ser amplificadas através de PCR. Cada microssatélite é um loco genético, independentemente do elemento repetido. Então, cada segmento amplificado do produto de PCR que tenha tamanho diferente, caracteriza um alelo diferente em um mesmo loco (Figura 4). Esses marcadores são altamente polimórficos, codominantes, multialélicos, distribuídos ao acaso no genoma, abundantes e informativos, o que permite maior compreensão do organismo estudado (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Krishna et al., 2004; Moretzsohn, 2006).

O uso de marcadores microssatélites, juntamente com a detecção dos fragmentos por fluorescência e a análise semi-automatizada, têm-se mostrado potente para diversos estudos como: mapeamentos genéticos e estudos de diversidade genética (Mitchell et al., 1997; Varshney et al., 2009; Nayak et al., 2010). Krishna e colaboradores (2004) ressaltam que o uso da técnica de microssatélites marcados com fluorescência e detecção dos alelos semi-automática possui uma vantagem significativa em relação ao uso de detecção por microssatélites radioativos e gel de prata; além de aumentar a eficiência e a precisão dos resultados, reduz o risco de exposição a radioisótopos e a íons de prata.

Além disso, os microssatélites possuem uma alta taxa de transferibilidade entre espécies aparentadas ou até mesmo entre gêneros da mesma família, pois, apesar das regiões microssatélites estarem sujeitas a altas taxas de mutação, as

regiões flanqueadoras são conservadas entre espécies ou gêneros próximos (Moretzsohn, 2006). Todas essas características permitem que esse tipo de marcador seja utilizado para diversos estudos, como mapeamento genético, genômica comparativa, análise da diversidade genética e outros. Como desvantagem, apresenta um alto custo inicial para seu desenvolvimento, necessitando do desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas contendo SSRs. Apesar de, atualmente, ter se tornado uma opção rápida, eficiente e de baixo custo para algumas espécies, devido a crescente disponibilidade de sequências transcritas (EST – “Expressed Sequence Tags”) e de outros dados de sequências de DNA (Moretzsohn, 2006).

Marcadores microssatélites obtidos a partir de ESTs, também chamados de EST-SSR, por serem desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma, podem aumentar a eficiência na seleção assistida por marcadores (SAM) (Caixeta et al., 2006). Ao contrário de microssatélites gerados de sequências de DNA genômico, que tendem a se agrupar próximos ao centrômero, os EST-SSR concentram-se em regiões ricas em genes, e por serem baseados em regiões codificadoras do genoma, espera-se que sejam mais conservados em diferentes espécies, permitindo assim o estudo comparativo e estudos de evolução (Varshney et al., 2005). Apesar dessas vantagens, os EST-SSRs apresentam-se com menor polimorfismo em relação aos SSRs derivados de bibliotecas genômicas, devido ao alto grau de conservação existente nas sequências de DNA em regiões transcritas (Moretzsohn et al., 2005).

distinção dos alelos pode ser automatizada. Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade que podem ser utilizados para saturar mapas genéticos. Considerando que muitos podem estar no interior de sequências gênicas, são potencialmente úteis para a associação de mapeamento de características interessantes, podendo reduzir o tempo e custos na obtenção de genes de interesse. Existem algumas metodologias para detecção de SNPs, entre elas podemos destacar microarranjos, espectrometria de massa, PCR em tempo real e minissequenciamento. A escolha do melhor método depende de fatores como custos, potencial para o processamento dos dados gerados, equipamentos necessários e a dificuldade para o desenvolvimento dos ensaios (Caixeta et al., 2006; Alves, 2008).

Nos estudos de genômica comparativa, a partir dessas bibliotecas ESTs, por serem de regiões mais conservadas, também é possível o desenvolvimento de marcadores universais (âncoras), que são marcadores gênicos e de cópia única, transferíveis entre espécies de uma mesma família. Esses marcadores podem apresentar polimorfismo de comprimento, mas a maioria apresenta polimorfismo de única base ou SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”), onde o produto da PCR é clivado com enzimas de restrição específica para cada marcador resultando em marcadores do tipo CAPS – “Cleaved Amplified Polimorphic Sequence” (Konieczny e Ausubel, 1993) ou dCAPS – “Derived CAPS” (Neff et al., 1998). No método CAPS o uso de primers específicos amplificam uma região do genoma em que o polimorfismo será detectado pela perda ou ganho de um sítio de reconhecimento de uma determinada enzima de restrição. Na técnica dCAPS o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição que inclui um SNP é introduzido no produto de PCR por um primer que contém uma ou mais bases não complementares ao DNA molde. A vantagem dessas técnicas é produzirem marcadores codominantes, serem baseadas em PCR e em eletroforese de agarose ou poliacrilamida (Moretzsohn, 2006).

1.4.3 Análogos a genes de resistência - RGA

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa para se protegerem contra doenças e parasitas. Um desses mecanismos de defesa envolve o reconhecimento específico de patógenos pela planta hospedeira, através de receptores proteicos codificados por genes de resistência ou genes R.

Esses reconhecem e se ligam a moléculas específicas derivadas dos patógenos, sendo manifestado como uma resposta de hipersensibilidade que envolve a morte programada no local da infecção (De Wit, 1995; Taiz & Zeiger, 2004). Ultimamente, em plantas, tem-se isolado um grande número de genes de resistência para diferentes patógenos (Dixon et al., 1998; Yoshimura et al., 1998; Wang et al., 1999; Wang et al., 2002).

Essas proteínas codificadas por genes-R apresentam regiões ou domínios conservados, e dentro desses domínios existem pequenos trechos conservados, chamados de motivos. Esses motivos têm sido bastante utilizados para desenhar primers degenerados que são capazes de amplificar em várias espécies (Kanazin et al., 1996; Leister et al., 1996; Yu et al., 1996). Os fragmentos amplificados são sequenciados e o produto de tradução putativo desses fragmentos tem indicado similaridade com genes de resistência conhecidos. Portanto, estes fragmentos são chamados análogos a genes de resistência (RGAs). Vários trabalhos têm mostrado que RGAs são frequentemente ligados a genes de resistência ou, mesmo, partes de genes de resistência funcionais (Kanazin et al., 1996; Aarts et al., 1998; Collins et al., 2001; Donald et al., 2002; McIntyre et al., 2005; Mammadov et al., 2006). Além disso, os RGAs podem ser utilizados como fonte de marcadores para explorar e mapear regiões nos cromossomos que controlam resistência (Alves, 2008).

Os RGAs foram utilizados com sucesso em *Arachis* (Bertioli et al., 2003; Yuksel et al., 2005). No trabalho de Bertioli et al. (2003), primers degenerados foram desenhados e usados para amplificação em *A. hypogaea* var. Tatu e quatro espécies silvestres (*A. duranensis*, *A. cardenasii*, *A. stenosperma* e *A. simpsonii*) que apresentam resistências a várias doenças que atacam o amendoim. No entanto, existe ainda a necessidade de se identificar novas fontes de resistência, especialmente para doenças de grande impacto para a cultura do amendoim no Brasil (Alves, 2008).

II JUSTIFICATIVA

Mapeamento genético é uma ferramenta de grande importância no melhoramento de plantas. A partir dele é possível identificar locos que controlam características de interesse, como resistência a pragas, teor de nutrientes da semente, produtividade e outros; e também é possível fazer estudos comparativos

ou de sintenia visando conhecer a complexidades e a evolução dos genomas. Uma vez que *A. hypogaea* possui uma base genética estreita, espécies silvestres de *Arachis* constituem uma importante fonte de genes que controlam características de interesse para o amendoim. A disponibilidade de mapas genéticos para os genomas A, B e tetraploide de *Arachis*, obtidos para populações RILs e baseados em marcadores codominantes, irá representar um considerável aumento na capacidade de mapear genes úteis e implementar a seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento do amendoim.

III OBJETIVOS

Construção de três mapas genéticos em *Arachis* utilizando marcadores moleculares:

→ Um mapa para uma população diploide F₅ possuidora do genoma A, obtida a partir do cruzamento entre *A. duranensis* (Acesso K7988) e *A. stenosperma* (Acesso V10309).

→ Um mapa para população diploide F₆ possuidora do genoma B, obtida a partir do cruzamento entre *A. ipaënsis* (Acesso K30076) e *A. magna* (Acesso K30097).

→ Um mapa para população tetraploide F₆ com genoma AB, obtida do cruzamento entre *A. hypogaea* – Runner IAC 886 e uma planta anfidiplóide sintética (*A. ipaënsis* - K30076 x *A. duranensis* – V14167)^{4x}.

IV METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

Foram utilizados 93 indivíduos de cada população de linhagens puras recombinantes (RILs) e seus respectivos parentais. As populações foram obtidas pelo método SSD (*Single Seed Descent* ou Descendente de uma Única Semente), que consiste em avançar as gerações, após cruzamentos, coletando-se uma semente por planta, sem efetuar seleção nas gerações iniciais de autofecundação. Dessa forma, cada planta F₂ foi avançada até F₅/F₆. As plantas foram mantidas em casas de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - DF), sendo: uma população diploide F₅ possuidora do genoma A obtida a partir do cruzamento de *A. duranensis* x *A. stenosperma*; e duas populações F₆, sendo uma

diploide de genoma B cujo cruzamento se deu a partir de *A. magna* x *A. ipaënsis*; e uma população tetraploide de genoma AB, obtida do cruzamento de *A. hypogaea* cv. Runner IAC 886 x (*A. duranensis* x *A. ipaensis*)^{4x}.

4.2 Extração de DNA

DNA genômico total foi extraído de folíolos jovens, no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de acordo com o método descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com pequenas modificações. A concentração de DNA de cada amostra foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda, e adicionalmente foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3 PCR e genotipagem

Foram utilizados marcadores já desenvolvidos e publicados por diferentes autores e alguns ainda não publicados (Tabela 3).

Na população A-F₅, foram testados nos parentais 684 marcadores SSRs, RGAs e Legs. Dois chips de marcadores SNPs foram desenvolvidos, sendo 384 marcadores SNPs desenvolvidos por D. Cook – Universidade da Califórnia (dados não publicados) e 1536 desenvolvidos por P. Ozias-Akins – Universidade da Geórgia (dados não publicados). Os marcadores âncoras ou Legs e 79 SSRs foram genotipados no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os outros marcadores SSRs e RGAs foram genotipados comercialmente pelo ICRISAT, e os SNPs foram genotipados pelas Universidades da Califórnia e da Geórgia.

Para população B-F₆, foram testados 850 marcadores SSRs nos parentais. Os marcadores polimórficos foram utilizados para genotipar toda população. A genotipagem dos SSRs foi feita comercialmente pelo ICRISAT.

Na população de genoma AB-F₆, foram testados 1521 marcadores microsstélites, sendo 151 similares a genes de resistência. A genotipagem foi feita comercialmente pelo ICRISAT. Os marcadores que falharam na

genotipagem comercial e os marcadores SSRs similares a genes de resistência polimórficos, foram genotipados no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Microssatélites, marcadores âncoras e RGAs

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 13 µL, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH8,3, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM), 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1 ng/µL de BSA (“Bovine Serum Albumin”) purificado (New England Biolabs, MA, EUA), 3µM de cada primer e 10 ng de DNA genômico. As amplificações ocorreram em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems, CA, EUA), com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 min, temperatura de anelamento já otimizada para cada primer entre 48-64°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos); e uma extensão final a 72°C por 7 minutos (1 ciclo).

Os marcadores microssatélites foram visualizados em géis de poliacrilamida 5% e coloração com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Creste e colaboradores (2001). Para os marcadores âncoras, foram adicionadas enzimas de restrição aos produtos de PCR e incubados em temperatura e tempo sugeridos pelo fabricante. Em seguida, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3,5% de concentração.

Microssatélites e RGAs marcados com fluorescência

As PCRs foram realizadas em volumes de 5 µL, utilizando o Kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen) constituído por Master Mix (*Taq* DNA Polimerase, tampão de PCR e dNTPs), Solução Q (5x) e água destilada ultra pura; primers marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela); e 1 µL de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94°C por 15 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 min, 52-60°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos); e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (1 ciclo).

Para genotipagem de marcadores fluorescentes, foram adicionados a 1µL 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. Essas

amostras foram submetidas a eletroforese em sequenciador automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados e planilhas com os genótipos foram geradas pelo programa GeneMapper (Applied Biosystems).

Tabela 3 – Lista dos tipos de marcadores utilizados para construção dos mapas. (Adaptado de Varshney et al., 2009).

Fonte	Nome dos marcadores	Tipos dos marcadores utilizados				
		SSR - Genômico	EST-SSR	Âncoras	RGAs	SNP
ICRISAT						
Ferguson et al. (2004)	pPGPseq, pPGSseq	X				
Cuc et al. (2008)	IPAHM	X				
Embrapa/UCB						
Moretzsohn et al. (2004, 2005, 2009)	Ah, TC, AC gi, RN, ML, RI	X				
Proite et al. (2007)	RM, RN		X			
Macedo et al. (2012)	TC	X				
Leal-Bertioli et al. (2009)	RGA				X	
Uni Tuskegee						
He et al. (2003, 2005)	PM	X				
Uni Georgia						
S J Knapp (Não publicados)	GM	X				
Ozias-Akins (Não publicado)	DS					X
Outros						
Hopkins et al. (1999)	Ah, Lec-1	X				
Palmieri et al. (2002, 2005)	Ap	X				
Gimenes et al. (2007)	Ah, Ag	X				
Fredslund et al. (2006)	Leg			X		
Uni Califórnia						
Cook (Não publicado)	TOG					X

4.4 Construção do mapa

Para construção dos três mapas, foi utilizado um LOD escore mínimo de 3,0 e uma fração de recombinação máxima de 0,35.

Foi realizado o teste do qui-quadrado (X^2) a fim de testar a segregação 1:1 de todos os marcadores. Os marcadores que não apresentaram distorções da

proporção esperada, a um limite de significância de 5%, foram utilizados inicialmente para construção dos mapas. As análises de ligação foram feitas pelo programa Mapmaker, versão 2.0 (Lander et al., 1987).

Um LOD score mínimo de 3 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” ou por permutações de todas as trincas de marcadores adjacentes (função “ripple”). Em seguida, os marcadores distorcidos foram incluídos, usando a função “group”. O comando “try” foi então usado para determinar a posição exata dos novos marcadores dentro de cada grupo. 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, que leva em consideração a interferência (I).

Por fim, foi realizado um estudo sintênico entre os mapas obtidos através do programa MapChart, versão 2.2 (Voorrips, 2002)

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mapa para população diploide de genoma A

Do total de 2640 marcadores 908 foram polimórficos, sendo que 870 foram mapeados em 10 grupos de ligação para a população RIL-F₅ diploide de genoma A. A formação dos 10 grupos de ligação esperado, uma vez que *A. duranensis* e *A. stenosperma* são espécies diploides com $2n=20$ cromossomos. Os grupos de ligação foram definidos por comparação aos mapas diploides de genoma A já publicados (Moretzsohn et al., 2005; Leal-Bertioli et al., 2009). Dos 870 marcadores mapeados, apenas 462 são apresentados na Figura 5. Os demais 408 mostraram-se iguais a pelo menos um dos marcadores mapeados, ou seja, com distância zero a um ou a um grupo de marcadores (Anexo 1). Portanto, blocos genômicos não estão sofrendo permuta gênica. Essa supressão de recombinação não possui razão aparente, uma vez que não foi detectada na

geração F₂, também usada para construção de mapas genéticos (Moretzsohn et al., 2005; Leal-Bertioli et al., 2009).

Primeiramente foram mapeados os marcadores que seguiram a proporção de segregação 1:1, e após a obtenção dos grupos, os marcadores distorcidos que desviaram da proporção esperada foram incluídos. Considerando o mapa total, 526 marcadores (57,9%) mostraram-se distorcidos ($p > 0,05$), sendo que 116 (12,8%) desses foram altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30. O comprimento total do mapa obtido nessa população foi de 1036 cM; os grupos variaram de 78,9 cM (A2 com 36 marcadores) a 144,0 cM (A6 com 53 marcadores), com uma distância média entre os marcadores adjacentes de 2,24 cM. Foi mapeado um gene ligado à característica alto oleico, 18 marcadores RGAs, 153 microssatélites, 78 marcadores âncoras, e 620 marcadores do tipo SNP.

Moretzsohn e colaboradores (2005) mapearam 170 marcadores em 11 grupos de ligação, em uma população F₂ derivada do mesmo cruzamento de espécies silvestres de genoma A, e o comprimento total foi de 1230,89 cM e 51% dos marcadores mapeados apresentaram distorções de segregação. Em 2009, Leal-Bertioli et al. acrescentaram marcadores a esse mesmo mapa, resultando em com 369 marcadores mapeados em dez grupos de ligação, com tamanho total de 2532,3 cM, sendo que 38,4% dos marcadores apresentaram distorção de segregação. Halward e colaboradores (1993) obtiveram um mapa de comprimento total equivalente a 1063 cM em uma população diplóide de genoma A F₂, resultante do cruzamento de *A. duranensis* x *A. cardenasii*.

O comprimento total obtido no mapa aqui descrito mostrou ser menor quando comparado a mapas já publicados em populações geradas do cruzamento de espécies silvestres de genoma A. Moretzsohn e colaboradores (2005) fizeram uma estimativa para o tamanho total do mapa para o genoma A, totalizando 1424,7 cM, apesar da grande quantidade de marcadores distorcidos que podem superestimar o comprimento de mapas genéticos. A inclusão de novos marcadores utilizados no presente estudo permitiu a maior e melhor cobertura do genoma e também melhor definição dos grupos de ligação. O menor

comprimento de mapa obtido pode ser explicado pela supressão de recombinação observada nessa população em várias regiões genômicas.

Dos 165 microssatélites mapeados, 23 são ESTs. Também foi mapeado no grupo de ligação A9, um marcador (FAD87_Dde). Acredita-se que a forma recessiva desse gene produz grãos alto oleicos (Jung et al., 2000). O mapeamento desse gene é de grande importância, uma vez que o ácido oleico está diretamente ligado a estabilidade e qualidade do óleo (Stalker et al.; 1989). Além disso, foram mapeados 78 marcadores âncoras (Leg), que são gênicos e de cópia única. Logo, 11,7% dos marcadores mapeados provavelmente representam genes. Também foram mapeados 16 RGAs, que são provavelmente, genes ou parte de genes de resistência.

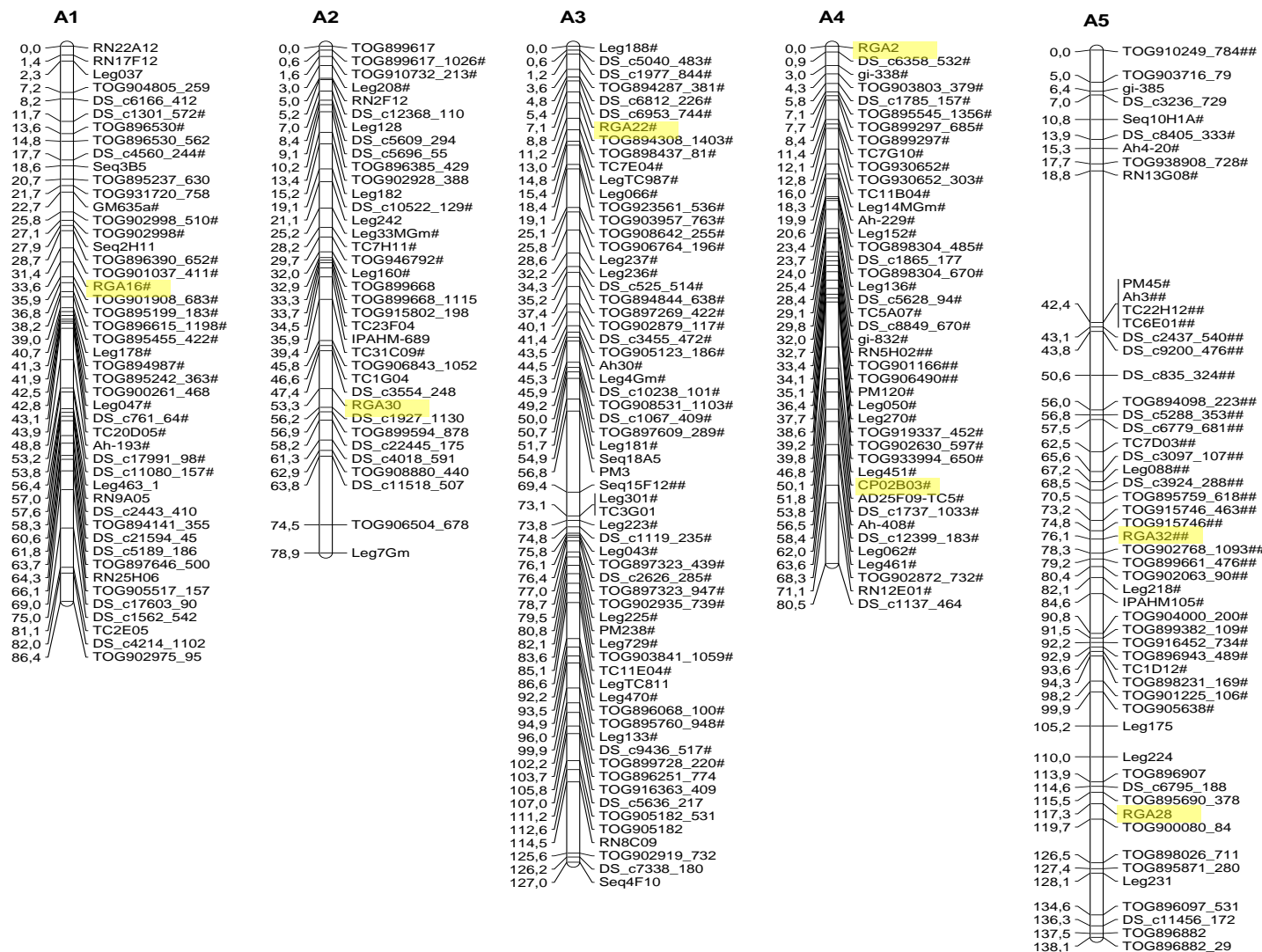


Figura 5 – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise feita em uma população F_5 de 93 indivíduos, resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres de genoma A: *A. duranensis* (K7988) x *A. stenosperma* (V10309), usando 462 marcadores moleculares. Foram obtidos 10 grupos de ligação e comprimento total igual a 1036 cM. Em amarelo marcadores RGAs e em azul o gene ligado à síntese de ácido oleico FAD. # - Marcadores distorcidos (5%) e ##, marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

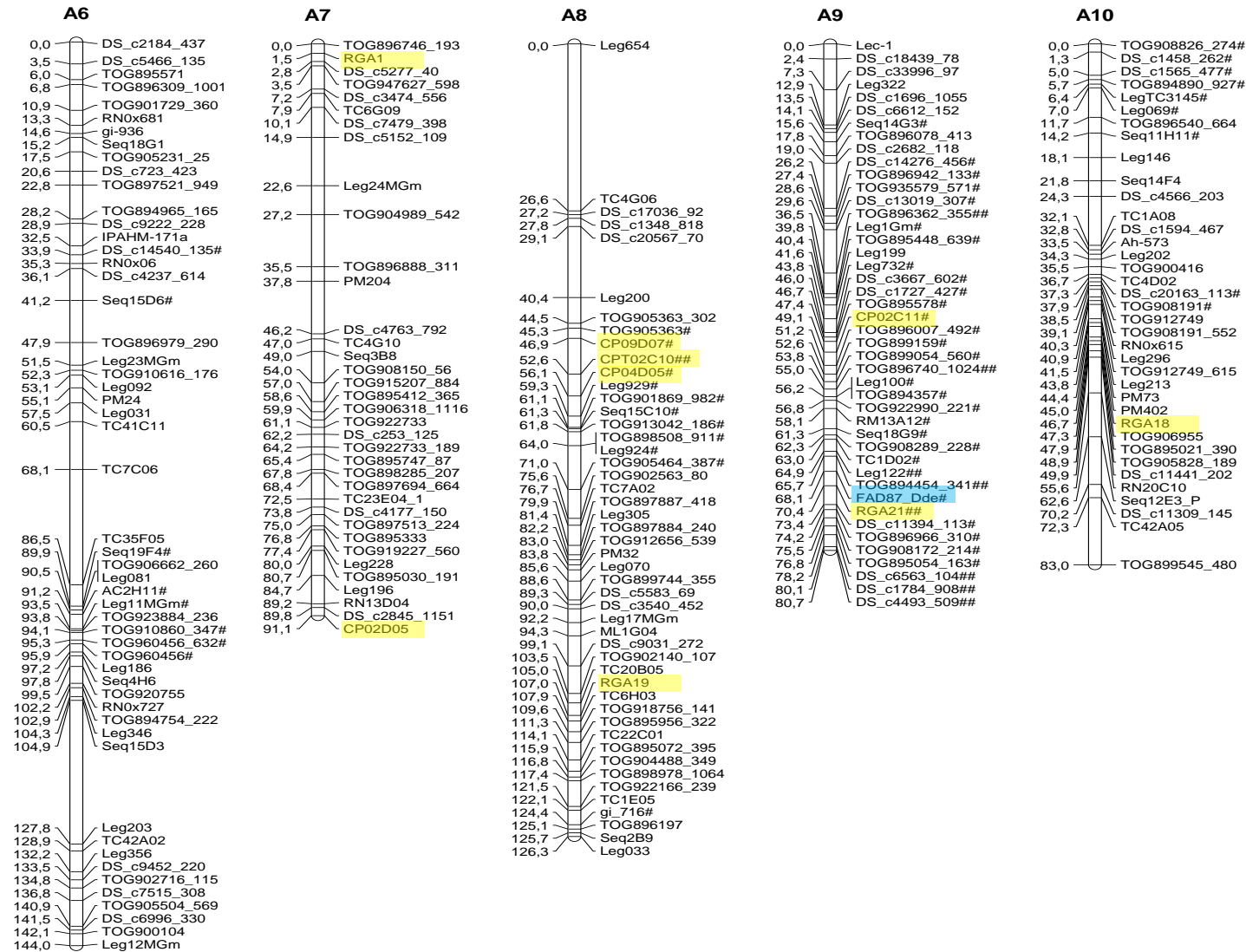


Figura 5 (cont.) – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise feita em uma população F_5 de 93 indivíduos, resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres de genoma A: *A. duranensis* (K7988) x *A. stenosperma* (V10309), usando 462 marcadores moleculares. Foram obtidos 10 grupos de ligação e comprimento total igual a 1036 cM. Em amarelo marcadores RGAs e em azul o gene ligado à síntese de ácido oleico FAD. # - Marcadores distorcidos (5%) e ##, marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

5.2 Mapa para população diploide de genoma B

Dos 850 marcadores testados, apenas 159 mostraram-se polimórficos, e desses, 147 mapearam em 10 grupos de ligação, também já esperados por serem espécies diploides com $2n=20$ cromossomos. Os grupos de ligação foram definidos baseados no mapa diploide de genoma B já publicado (Moretzsohn et al., 2009). Primeiramente foram mapeados os marcadores que seguiram a proporção de segregação 1:1, e após a obtenção dos grupos, os marcadores distorcidos que desviaram da proporção esperada foram incluídos. Um total de 29 marcadores (19,72%) apresentou desvio da segregação esperada 1:1. Esses marcadores distorcidos estão distribuídos em oito grupos de ligação, e somente nos grupos B5 e B8 não foram mapeados marcadores com distorção. A cobertura total do mapa foi de 560,3 cM, e os grupos variaram de 28,6 cM no grupo B7, com 10 marcadores, a 84,6 cM no grupo B3 com 31 marcadores. A distância média entre os marcadores adjacentes foi de 3,81 cM (Figura 6).

Um mapa para uma população diploide F_2 foi desenvolvido por Moretzsohn et al. (2009), utilizando o cruzamento entre essas mesmas espécies silvestres de genoma B, *A. ipaënsis* x *A. magna*. Esse mapa obteve uma maior cobertura (1294,4 cM), com 149 marcadores mapeados em 10 grupos de ligação, e 32 marcadores distorcidos (21,5%), também distribuídos em oito grupos de ligação, resultado esse semelhante ao encontrado no presente estudo. Provavelmente parte do genoma não foi coberto pelo mapa desse estudo, sendo então necessário acrescentar mais marcadores a esse mapa.

Dos 147 microssatélites mapeados, 18 são EST-SSR, e são marcadores similares a genes que possuem funções conhecidas, como os envolvidos no processo de fotossíntese ou em respostas a estresses bióticos (Moretzsohn et al., 2009). Um marcador que representa um gene ligado à produção de ácido oleico (FAD87_Kpn) foi mapeado no grupo de ligação B9. Mapas que contém marcadores gênicos facilitam a busca de genes de interesse, por exemplo, ESTs mapeados em regiões com QTLs são ótimos candidatos a estarem envolvidos no controle de tal característica sendo uma alternativa para clonagem posicional de genes (Flandez-Galvez et al., 2003; Zheng et al., 2003).

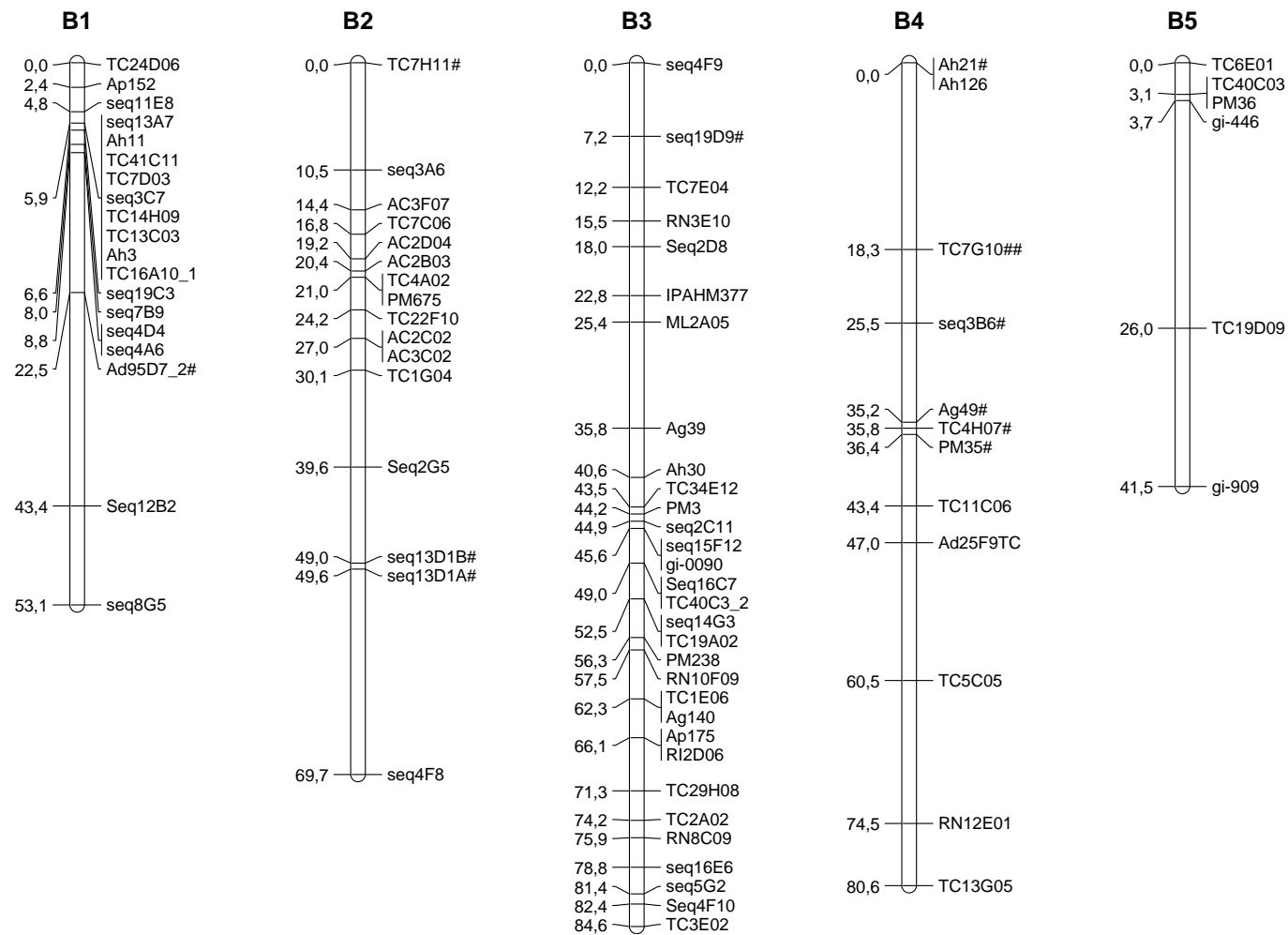


Figura 6 – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população F_6 de 94 indivíduos, resultante do cruzamento de duas espécies silvestres de genoma B: *A. ipaënsis* (K30076) x *A. magna* (K30097), usando marcadores microssatélites. Foram obtidos 10 grupos de ligação e comprimento total igual a 560,3 cM. Em azul o gene ligado à síntese de ácido oleico FAD. # - Marcadores distorcidos (5%) e ##, marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

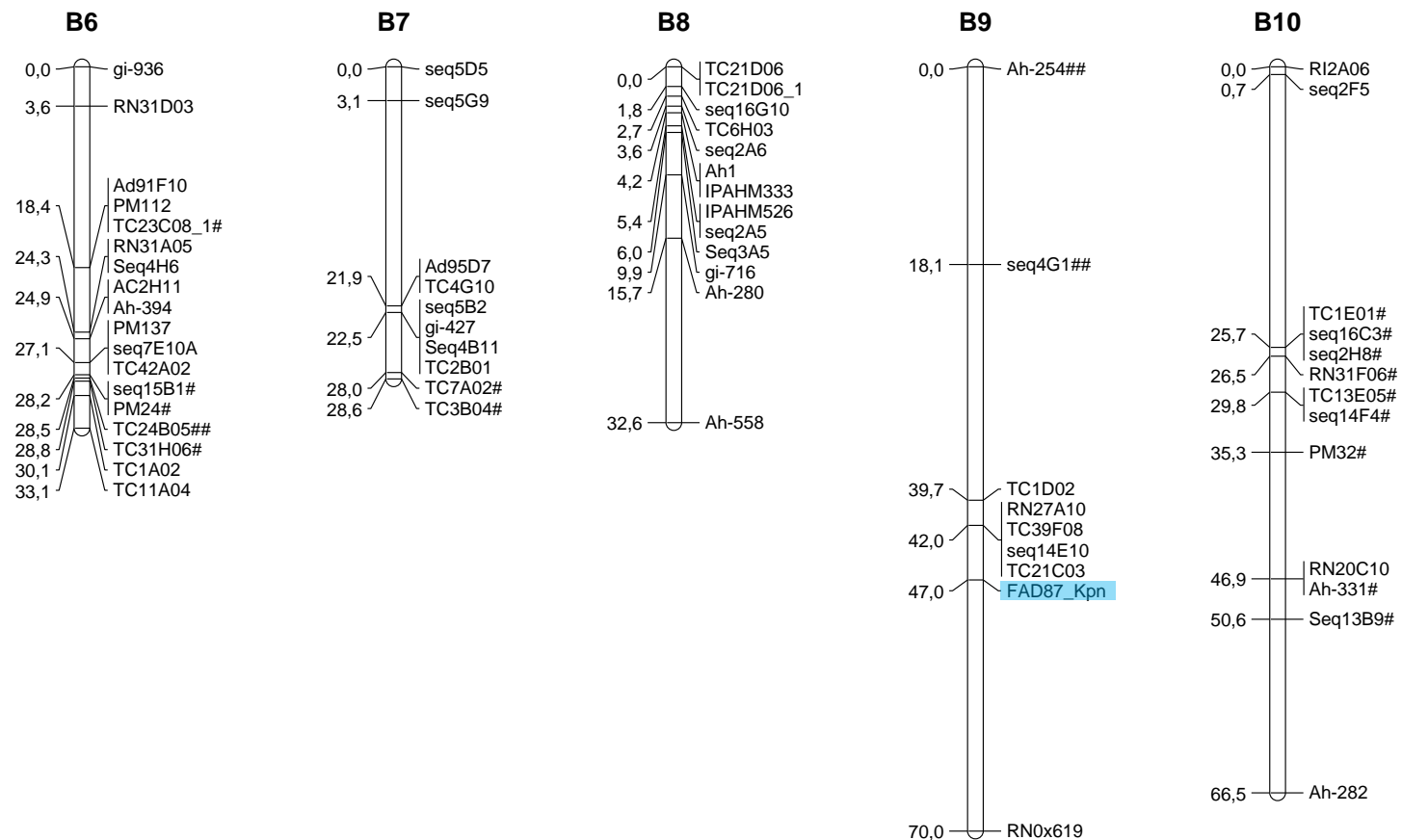


Figura 6 (cont.) – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população F_6 de 94 indivíduos, resultante do cruzamento de duas espécies silvestres de genoma B: *A. ipaënsis* (K30076) x *A.magna* (K30097), usando marcadores microssatélites. Foram obtidos 10 grupos de ligação e comprimento total igual a 560,3 cM. Em azul o gene ligado à síntese de ácido oleico FAD. # - Marcadores distorcidos (5%) e ##, marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

5.3 Mapa para população tetraploide de genoma AB

De 1521 marcadores testados 251 foram polimórficos, 203 microssatélites e sete SSRs similares a genes de resistência mapearam em 21 grupos de ligação (10 para o genoma A e 11 para o genoma B) (Figura 7). A cobertura total do mapa foi de 1066,0 cM, com uma variação entre os grupos de 8,2 cM, com apenas quatro marcadores (grupo B6), a 116,3 cM com 23 marcadores mapeados (grupo A3). A distância média entre os marcadores adjacentes foi de 5,08 cM. Nos grupos de ligação relativos aos genomas A e B mapearam 144 marcadores, com cobertura total de 714,5 cM, e 66 marcadores mapeados com um comprimento total do mapa de 351,5 cM, respectivamente. Primeiramente foram mapeados os marcadores que seguiram a proporção de segregação 1:1, e após a obtenção dos grupos, os marcadores distorcidos que desviaram da proporção esperada foram incluídos. Dos 210 marcadores mapeados, 9,04% (19 marcadores) desviaram da proporção 1:1 esperada. Esses marcadores distorcidos estão distribuídos em 13 grupos de ligação, sendo sete grupos do genoma A e seis grupos do genoma B. Os grupos A2, A3, A5, B1, B2, B4, B6, B10 não apresentaram marcadores distorcidos.

Os tamanhos obtidos nesse mapa relacionado ao genoma A e genoma B, foram menores do que os tamanhos obtidos, nesse estudo, nas populações diploides representando os mesmos genomas. O genoma B ficou representado em 11 grupos de ligação, e provavelmente o acréscimo de novos marcadores ligaria o grupo B3 ao B3a, identificados como sendo do grupo 3 pois quando comparados a mapas já publicados apresentaram marcadores em comum. A definição dos grupos de ligação foi feita baseada em mapas do genoma A e genoma B, publicados anteriormente (Moretzsohn et al., 2005, 2009; Leal-Bertioli et al., 2009).

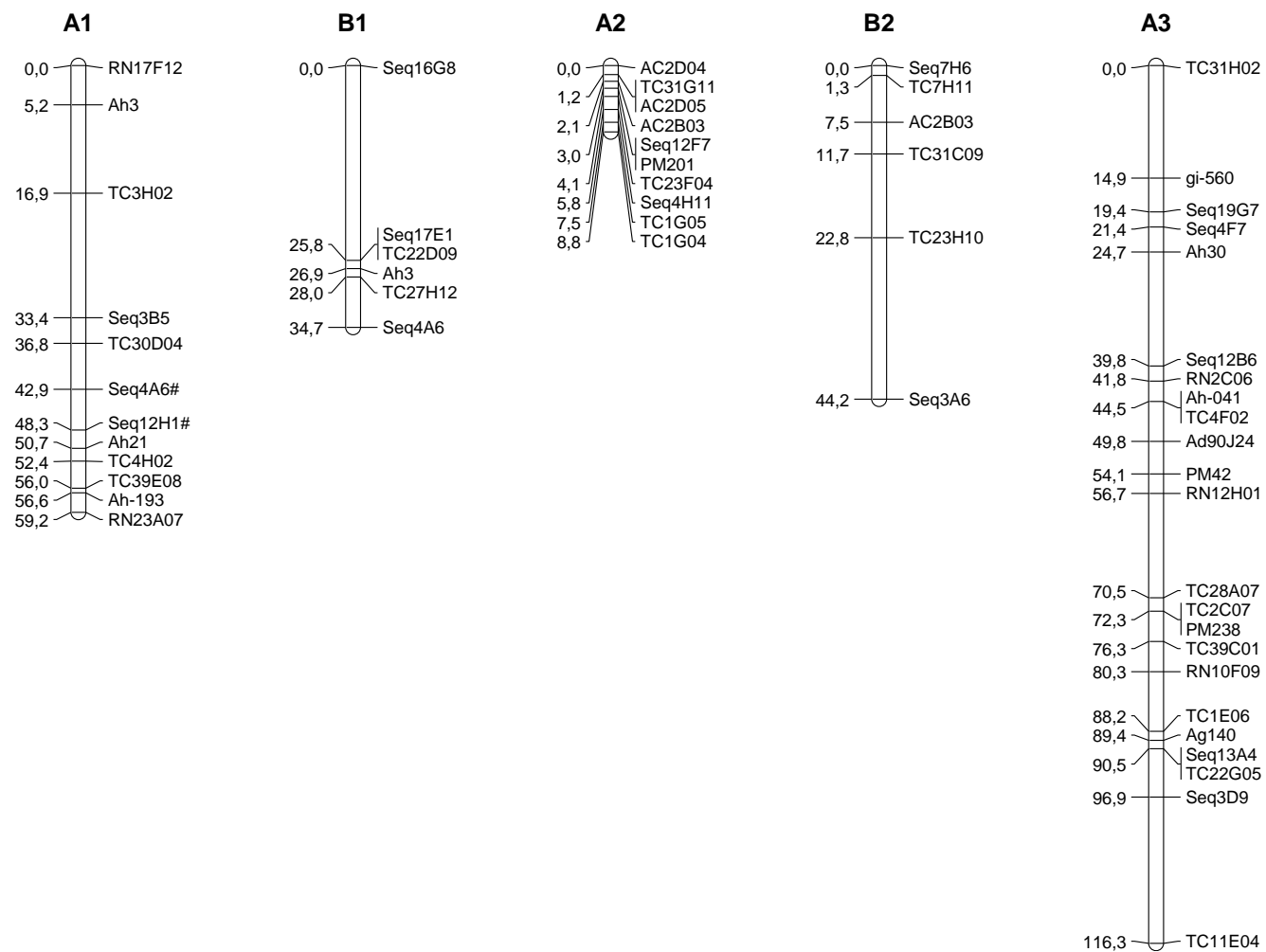


Figura 7 – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população tetraploide de 89 indivíduos F_6 , resultante do cruzamento de Runner IAC 886 x (*A. ipaënsis* K30076 x *A. duranensis* V14167)^{4x}, usando um total de 258 marcadores (microsatélites e RGAs). Foram obtidos 21 grupos de ligação e comprimento total igual a 1066 cM. Em amarelo marcadores RGAs. (#) - Marcadores distorcidos (5%) e (##), marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

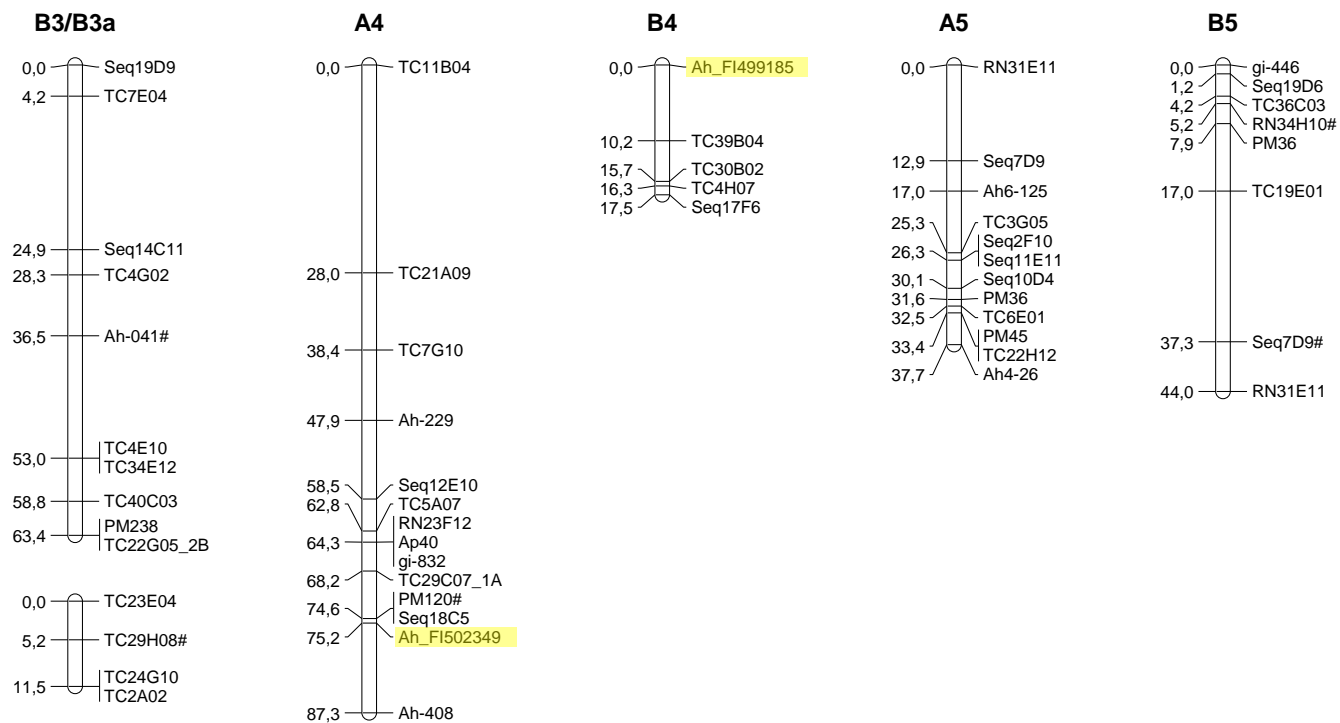


Figura 7 (cont.) – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população tetraploide de 89 indivíduos F₆, resultante do cruzamento de Runner IAC 886 x (*A. ipaënsis* K30076 x *A. duranensis* V14167)^{4x}, usando um total de 258 marcadores (microssatélites e RGAs). Foram obtidos 21 grupos de ligação e comprimento total igual a 1066 cM. Em amarelo marcadores RGAs. (#) - Marcadores distorcidos (5%) e (##), marcadores altamente distorcidos, com valores de X² superiores a 30.

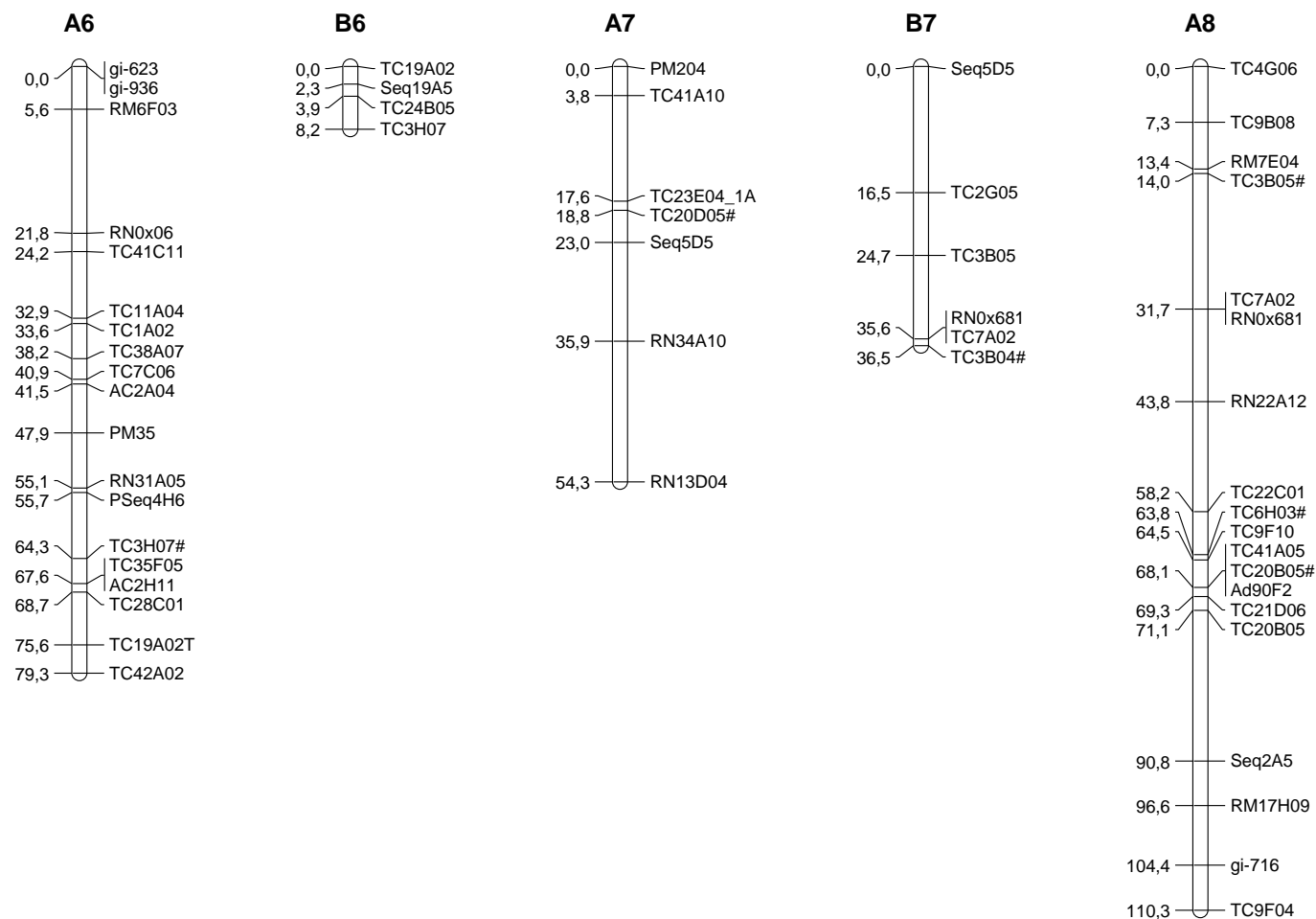


Figura 7 (cont.) – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população tetraploide de 89 indivíduos F₆, resultante do cruzamento de Runner IAC 886 x (*A. ipaënsis* K30076 x *A. duranensis* V14167)^{4x}, usando um total de 258 marcadores (microssatélites e RGAs). Foram obtidos 21 grupos de ligação e comprimento total igual a 1066 cM. Em amarelo marcadores RGAs. (#) - Marcadores distorcidos (5%) e (##), marcadores altamente distorcidos, com valores de X² superiores a 30.

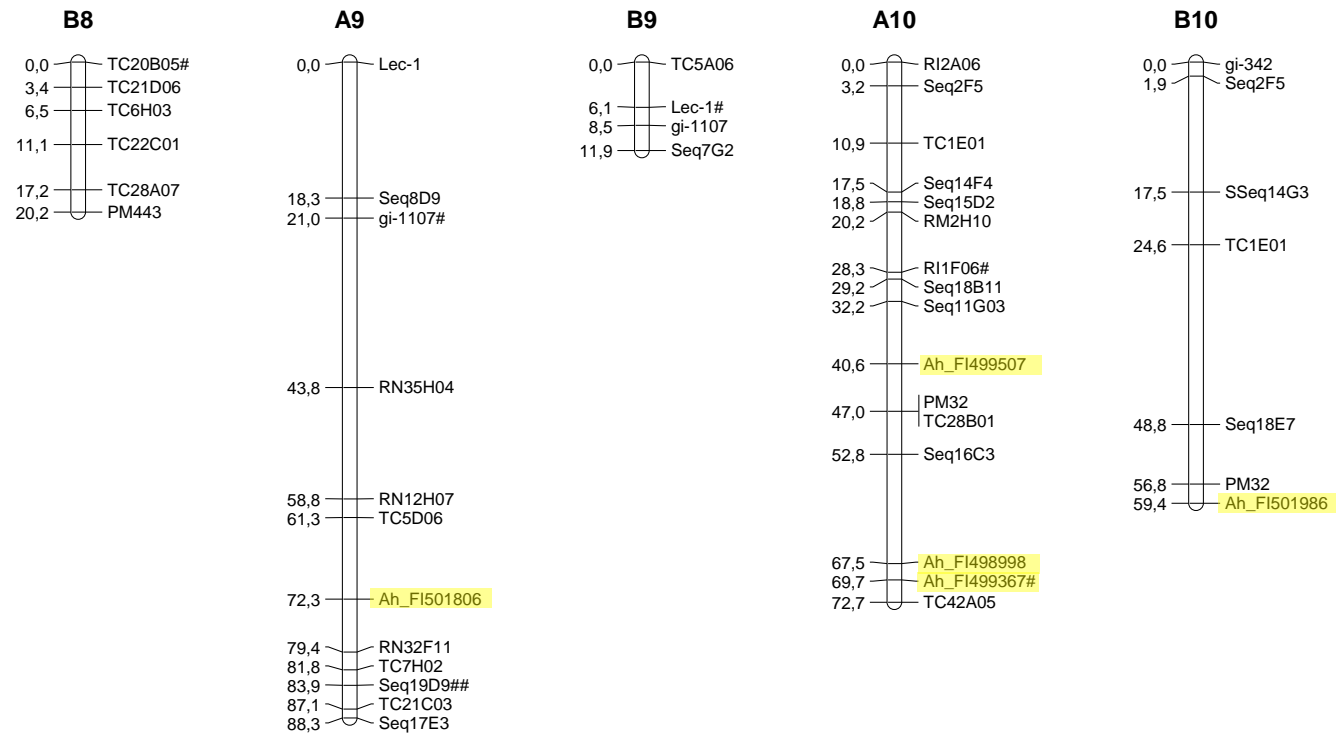


Figura 7 (cont.) – Mapa de ligação obtido utilizando LOD score mínimo de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,35. Análise de uma população tetraploide de 89 indivíduos F_6 , resultante do cruzamento de Runner IAC 886 x (*A. ipaënsis* K30076 x *A. duranensis* V14167)^{4x}, usando um total de 258 marcadores (microssatélites e RGAs). Foram obtidos 21 grupos de ligação e comprimento total igual a 1066 cM. Em amarelo marcadores RGAs. (#) - Marcadores distorcidos (5%) e (##), marcadores altamente distorcidos, com valores de X^2 superiores a 30.

No primeiro mapa de *A. hypogaea* publicado baseado em microssatélites, para uma população RIL-F₈/F₉ resultante do cruzamento entre as cultivares ICGV 86031 x TAG 24 (Vashney et al., 2009), foram mapeados 135 locos em 22 grupos de ligação; resultando em um comprimento total de 1270,5 cM em que 37,8% dos marcadores mapeados desviaram da proporção 1:1. Esse mapa foi enriquecido, acrescentando 56 locos microssatélites, resultando em 191 marcadores mapeados com comprimento total de 1785,4 cM (Ravi et al., 2011). Gautami e colaboradores (2011) publicaram recentemente, dois mapas feitos em populações RIL (RIL-2 e RIL-3) construídas a partir de cruzamentos entre cultivares contrastantes para características relacionadas à tolerância à seca. Na população denominada RIL-2, 119 marcadores microssatélites foram mapeados em 20 grupos de ligação, totalizando 2208,2 cM. Já na RIL-3 apenas 82 marcadores foram mapeados, formando 15 grupos de ligação e com comprimento total de 831,4 cM. Esses dois mapas juntamente com o mapa de Ravi et al. (2011), foram utilizados para a construção de um mapa consenso, que, a princípio, resultou em 293 marcadores microssatélites mapeados em 20 grupos de ligação, totalizando um comprimento de 2840,8 cM (Gautami et al., 2011). Esse mapa consenso está sendo melhorado, utilizando também os mapas resultantes desse trabalho (dados não publicados). Hong e colaboradores (2010) desenvolveram três mapas em amendoim cultivado, também baseados em populações RIL. O comprimento total e a formação dos grupos de ligação em cada um desses mapas foram menores do que o encontrado por esse estudo, sendo de 684,9 cM com 19 grupos de ligação, 540,69 cM com 21 grupos de ligação e 401,7 cM com 13 grupos de ligação. Qin et al. (2012) também desenvolveram dois mapas, chamados de T e S, baseados em duas populações RILs F_{5/6} obtidas do cruzamento de cultivares. O mapa T apresentou 239 marcadores em 26 grupos de ligação, 29,6% dos marcadores apresentaram distorção de segregação, e o comprimento total foi de 1213,4 cM. No mapa S foram formados 22 grupos de ligação, com 172 marcadores mapeados, sendo 46 (28,8%) distorcidos, resultando em um comprimento total de 920,7 cM.

Como observado, existe uma variação em relação ao tamanho dos mapas e ao número de grupos de ligação formados nos mapas publicados e no mapa aqui apresentado. Isso ocorre, provavelmente, devido à diferença no número de

marcadores polimórficos encontrados em cada população. Em geral, a obtenção de mapas saturados em amendoim tem sido dificultada pelo baixo polimorfismo (Moretzsohn et al., 2005, 2009; Varshney et al., 2009; Hong et al., 2010; Gautami et al., 2011; Ravi et al., 2011). Isso tem sido atribuído à origem do amendoim e ao provável único evento de poliploidização ocorrido recentemente seguido de autofecundações (Halward et al., 1991), e também aos marcadores microssatélites ESTs que são de regiões altamente conservadas e bastante utilizados na construção desses mapas (Varshney et al., 2005). Geralmente é encontrado menor polimorfismo no genoma B, isso é atribuído ao fato de *A. ipaënsis* se apresentar muito próximo geneticamente de *A. hypogaea*, um estudo de diversidade feito recentemente com a maioria das espécies da seção *Arachis* mostra isso claramente (dados não publicados). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novos marcadores para saturação desses mapas (Varshney et al., 2009). Isso vem sendo feito, e novos marcadores microssatélites e SNPs foram e estão sendo desenvolvidos por algumas instituições (Universidade da Califórnia e Universidade da Geórgia – EUA).

Distorção de segregação

Como foi observado, todos os mapas desenvolvidos para *Arachis* apresentam distorção de segregação e isso têm sido descrito para a grande maioria dos mapas genéticos publicados para diversas espécies. Isso tem sido atribuído a diferentes causas, tais como alelos recessivos deletérios (Berry et al., 1995), alelos auto-incompatíveis (Barzen et al., 1995), re-arranjos estruturais nos cromossomos (Quillet et al., 1995), seleção pré ou pós zigótica de combinações alélicas ou mesmo ao tamanho diferente entre os genomas dos progenitores, levando a um pareamento atípico dos cromossomos (Jenczewski et al., 1997). Nos três mapas construídos nesse estudo é possível observar que houve formação de blocos com marcadores distorcidos em que os valores do qui-quadrado foram maiores que 4,5 (Anexo 2). A causa provável para a formação desses blocos é a ocorrência de seleção zigótica ou gamética, na qual a distorção não se manifesta apenas para o loco afetado por seleção, mas também para os que estão ligados a ele (Frisch et al., 2004). Dessa forma, os casos em que a distorção de segregação é detectada em muitos locos ligados, poderão ser interpretados como uma indicação de seleção zigótica (Frisch et al., 2004).

Além disso, erros de genotipagem também podem causar desvios das proporções esperadas. Mapas com grande número de marcadores distorcidos causam implicações quando usados em programas de seleção assistida por marcadores (SAM). Marcadores distorcidos são mapeados com menor confiança. Além disso, os modelos estatísticos usados no mapeamento de QTLs são baseados em segregações normais. Por isso, o mapeamento de QTLs também pode ser menos preciso quando há distorção de segregação (Moretzsohn, 2006).

5.4 Sintenia entre os mapas

Sintenia entre os mapas diploides

A análise de sintenia entre os mapas A-F₅ e B-F₆ diploides mostrou 26 marcadores em comum mapeados e distribuídos em dez grupos de ligação dos dois mapas (Figura 8). Nove grupos de ligação do mapa diploide B-F₆ (B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 e B10) mostraram correspondentes diretos com nove grupos do mapa A-F₅. Os únicos grupos de ligação que não mostraram marcadores em comum foram o A1 com o B1. Dos grupos em comum, oito apresentaram os marcadores na mesma ordem. Foram identificados grupos com apenas um marcador em comum (B5, B7 e B9) até sete marcadores colineares (B3). Os grupos de ligação B1 e B2 mostraram um loco, TC41C11 e TC7C06 respectivamente, sintênicos com o grupo A6. Houve uma inversão de ordem entre marcadores comuns do grupo B6/A6. Os marcadores que são genes já caracterizados para produção de ácido oleico foram mapeados no mesmo grupo de ligação (A9 – FAD87_Kpn e B9 – FAD87_Dde).

Moretzsohn et al. (2009) realizaram análise de sintenia semelhante a essa, e os mapas estudados foram feitos em populações de F₂, de genoma A e genoma B, derivadas dos mesmos cruzamentos realizados nas populações deste estudo. Foram mapeados, em comum, 51 marcadores nos dez grupos de ligação no genoma A e B. Sete grupos de ligação mostraram-se sintênicos, o grupo B10 mostrou marcadores em comum com o grupo A2, e os grupos B6 e B7 mostraram marcadores em comum com dois grupos do genoma A (A6 e A10;

A7 e A8 respectivamente). Também foi relatada uma inversão de segmento nos grupos B6/A6. O grupo B2 mostrou cinco marcadores colineares com a região superior do grupo A2, e o grupo B10 apresentou marcadores em comum com a região inferior do grupo A2. Esse último caso pode ser explicado pelo fato de no mapa A, o antigo grupo A2 (Moretzsohn, 2005; Leal Bertioli, 2009) foi dividido em dois e um deles foi reunido ao antigo A10, sendo mantido o nome A10, mas com um grande pedaço do antigo A2.

Apesar do baixo número de marcadores em comum, foi possível observar alto nível de sintonia entre os mapas, que se torna consistente quando comparada ao estudo de sintonia de Moretzsohn et al. (2009), no qual o número de grupos de ligação com marcadores diretamente sintênicos aumentou para nove e inversão de segmento foi encontrada em apenas um grupo.

Essa integração de mapas com genomas homeólogos em *Arachis* aumenta as informações contidas em ambos os mapas. Algumas informações já existem para os mapas de genoma A, como genes candidatos, QTLs para resistência a doença, e alinhamento de genoma com leguminosas modelos (*Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*) e feijão (Hougaard, 2008; Bertioli et al., 2009; Leal-Bertioli, 2009). Muitas dessas informações podem ser transferidas para o mapa de genoma B.

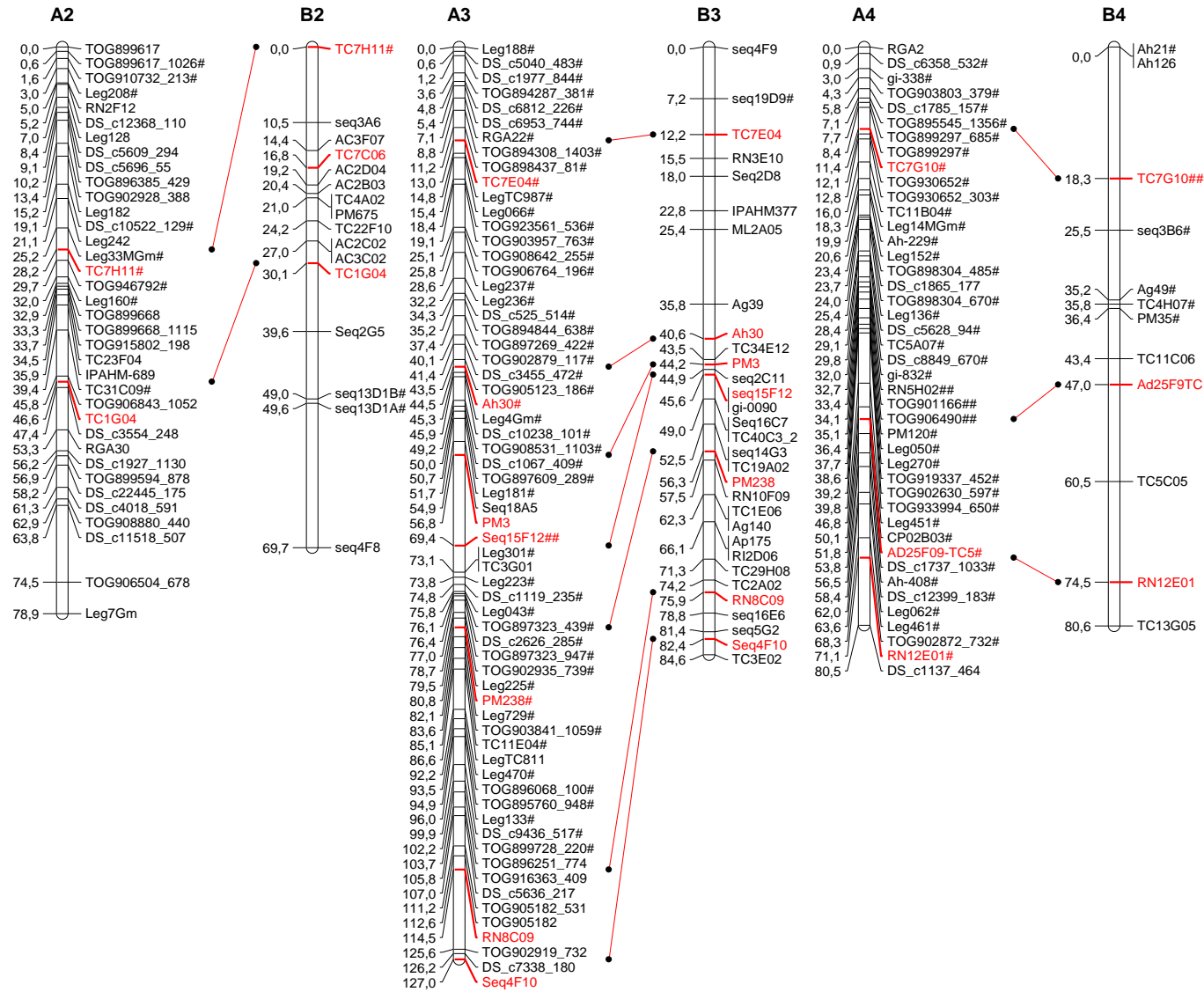


Figura 8 – Análise de sintenia realizada entre os mapas diploides de genomas A e B. As linhas indicam os marcadores em comum, que aparecem em vermelho.

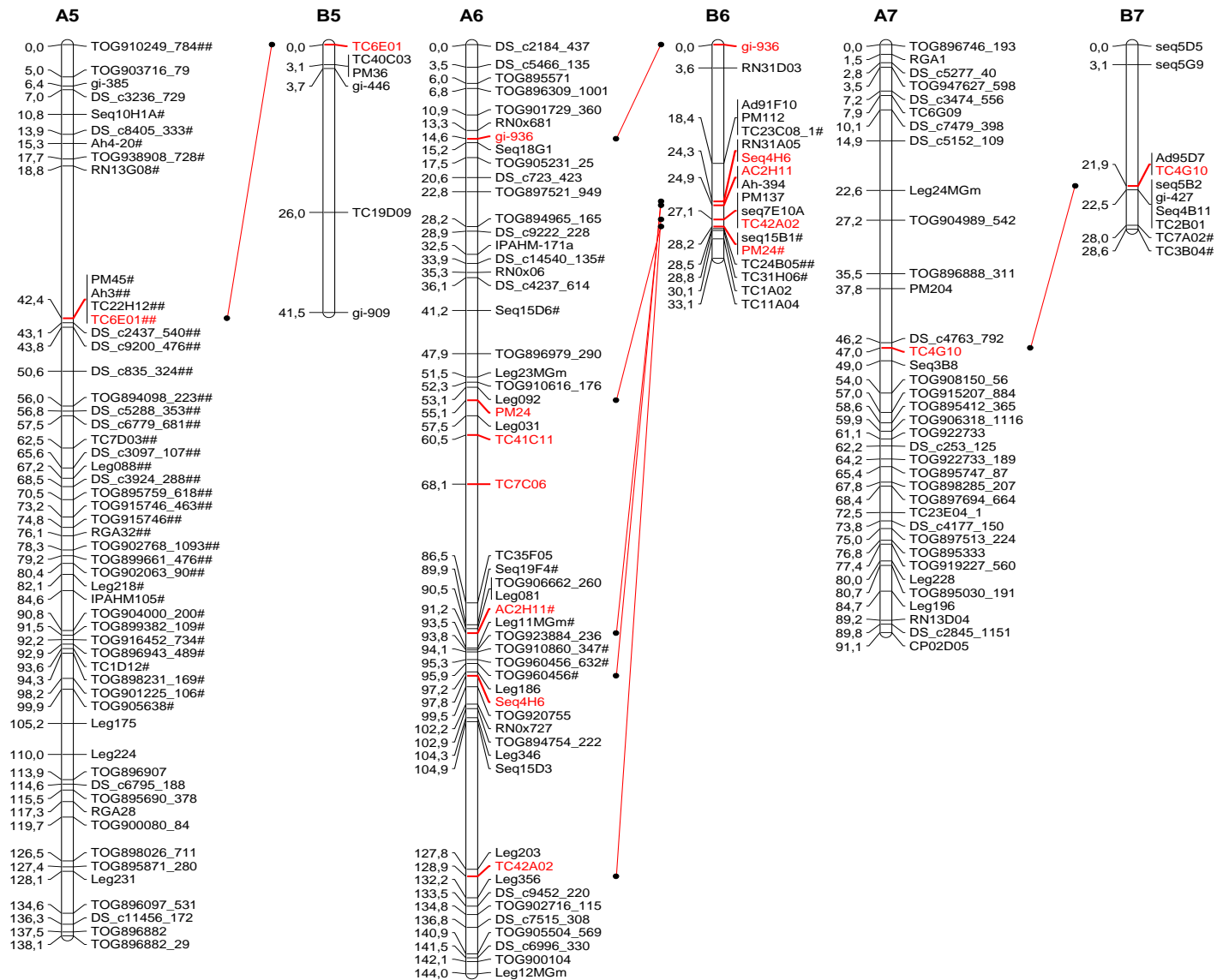


Figura 8 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre os mapas diploides de genomas A e B. As linhas indicam os marcadores em comum, que aparecem em vermelho.

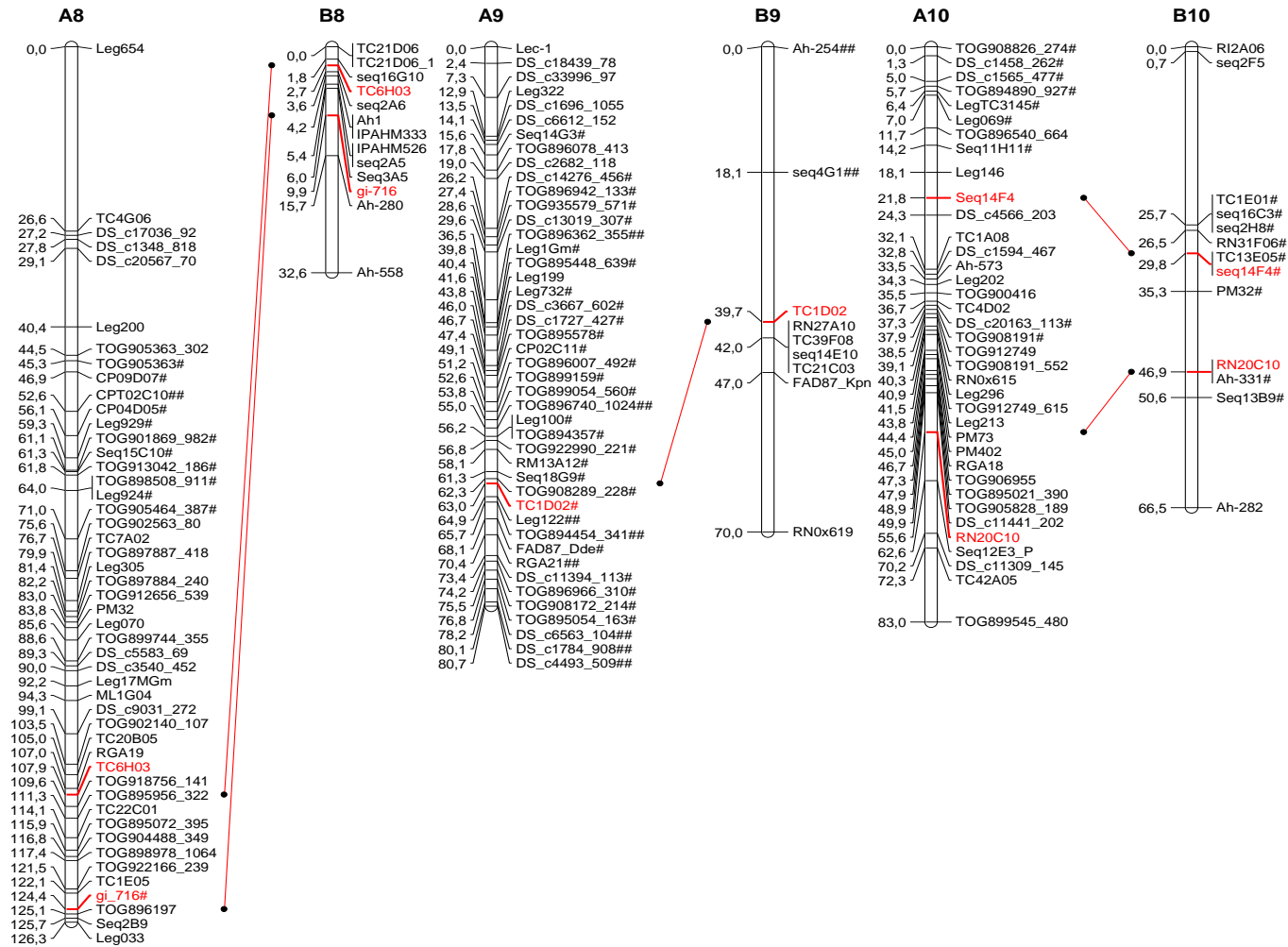


Figura 8 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre os mapas diploides de genomas A e B. As linhas indicam os marcadores em comum, que aparecem em vermelho.

Sintenia entre os genomas homeólogos do mapa tetraploide com os mapas diploides

Foi realizada uma análise de sintenia entre genomas homeólogos do mapa tetraploide T-F₆ com os mapas diploides de genoma A e B apresentados nesse trabalho.

Foram mapeados 39 marcadores em comum entre o genoma A do mapa T-F₆ (AA) e o mapa A-F₅ (A), distribuídos nos dez grupos de ligação (Figura 9). Os dez grupos de ligação do mapa T apresentaram marcadores que correspondem diretamente com os dez grupos do mapa A. Oito desses grupos (AA1, AA2, AA3, AA4, AA6, AA7, AA9 e AA10) apresentaram os marcadores em comum na mesma ordem. Foi encontrado um grupo com apenas um marcador em comum (A9/AA9) e o grupo com o maior número de marcadores colineares foi o A6/AA6, com sete locos. Os grupos AA7 e AA10 apresentaram um marcador sintênico em diferentes grupos no mapa diploide, sendo o TC20D05 comum no grupo A1 e PM32 comum no grupo A8, respectivamente. No grupo AA8 dois marcadores, RN22A12 e RN0x681, foram sintênicos com os grupos A1 e A6 respectivamente. Foi encontrada inversão da ordem dos marcadores nos grupos AA5 e AA8.

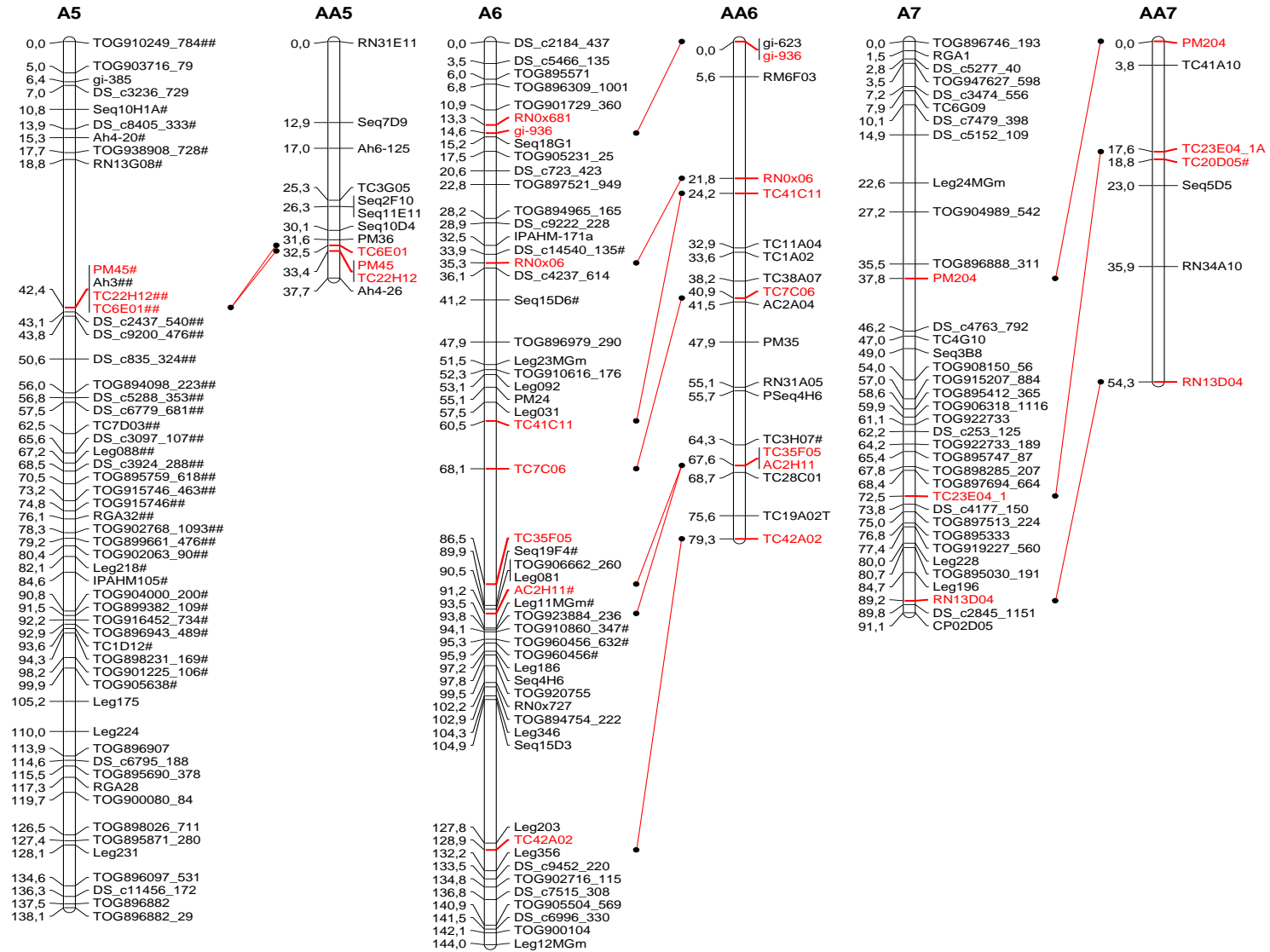


Figura 9 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre o mapa diploide A e o genoma A do mapa tetraploide. As linhas indicam os marcadores em comum, que aparecem em vermelho.

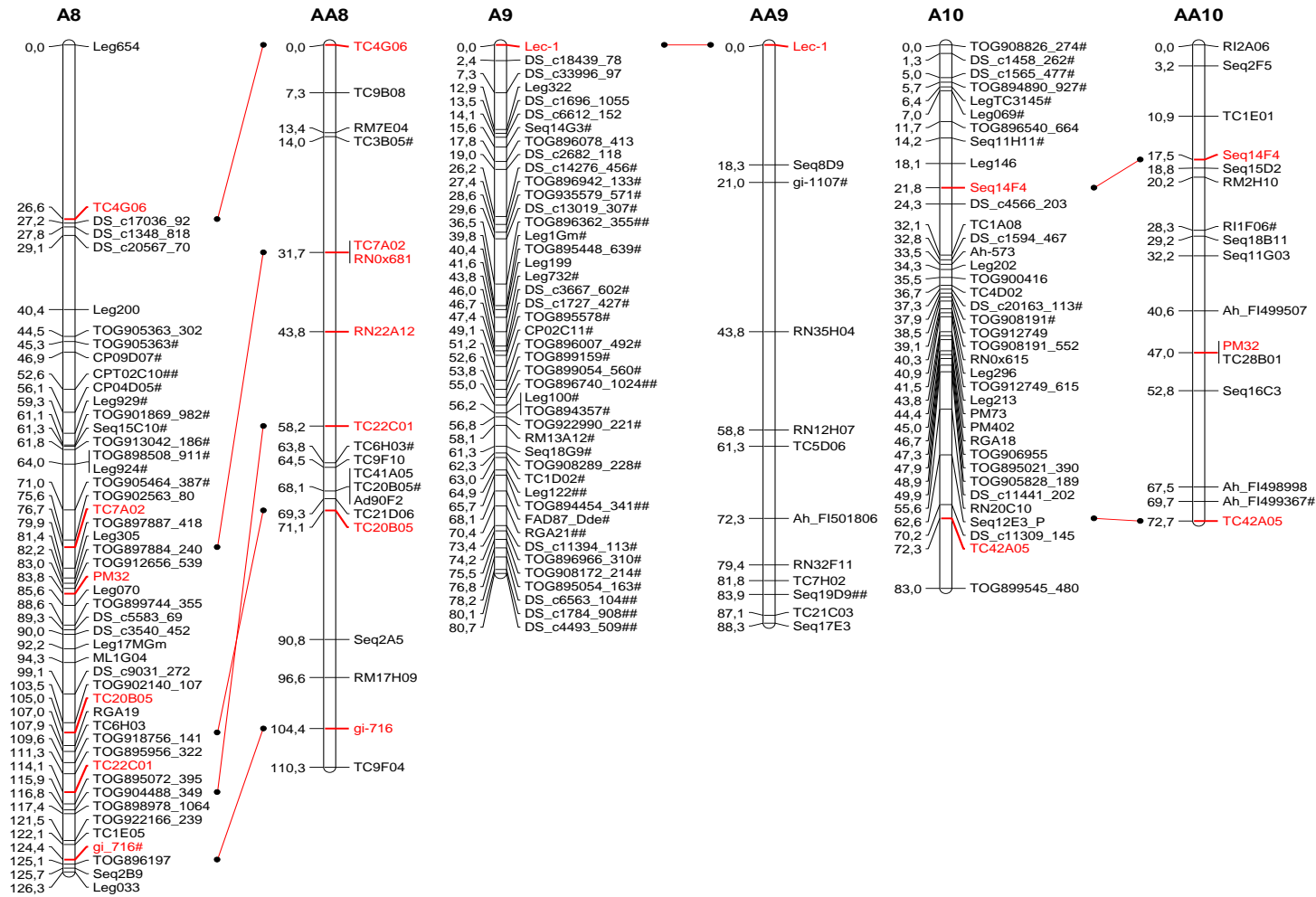


Figura 9 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre o mapa diploide A e o genoma A do mapa tetraploide. As linhas indicam os marcadores em comum, que aparecem em vermelho.

Já na comparação feita entre o genoma B do mapa T-F₆ (BB) e o mapa B-F₆ (B), apenas 25 marcadores foram comuns e estão distribuídos em dez grupos de ligação (Figura 10). Os dez grupos do mapa T-F₆ apresentaram marcadores que correspondem diretamente com nove grupos do mapa B-F₆. O único grupo que não mostrou nenhum marcador sintênico foi o BB9/B9. Os grupos que apresentaram os locos em comum na mesma ordem foram o BB1, BB3, BB3a, BB4, BB6, BB7, BB8, BB10. Os grupos BB4/B4 e BB6/B6 apresentaram apenas um marcador em comum, enquanto que o grupo BB3/B3 apresentou o maior número de marcadores sintênicos, totalizando quatro marcadores. Um marcador nos grupos BB3 (TC40C03) e um no BB6 (TC19A02) foi comum nos grupos B5 e B3, respectivamente. Os grupos BB2 e BB5 apresentaram marcadores com ordem invertida. O grupo B3 do mapa diploide foi sintênico com dois grupos (BB3 e BB3a) do mapa tetraploide, aparentemente esses dois grupos representam apenas um, e o acréscimo de novos marcadores provavelmente irá ordenar esses marcadores em apenas um grupo de ligação.

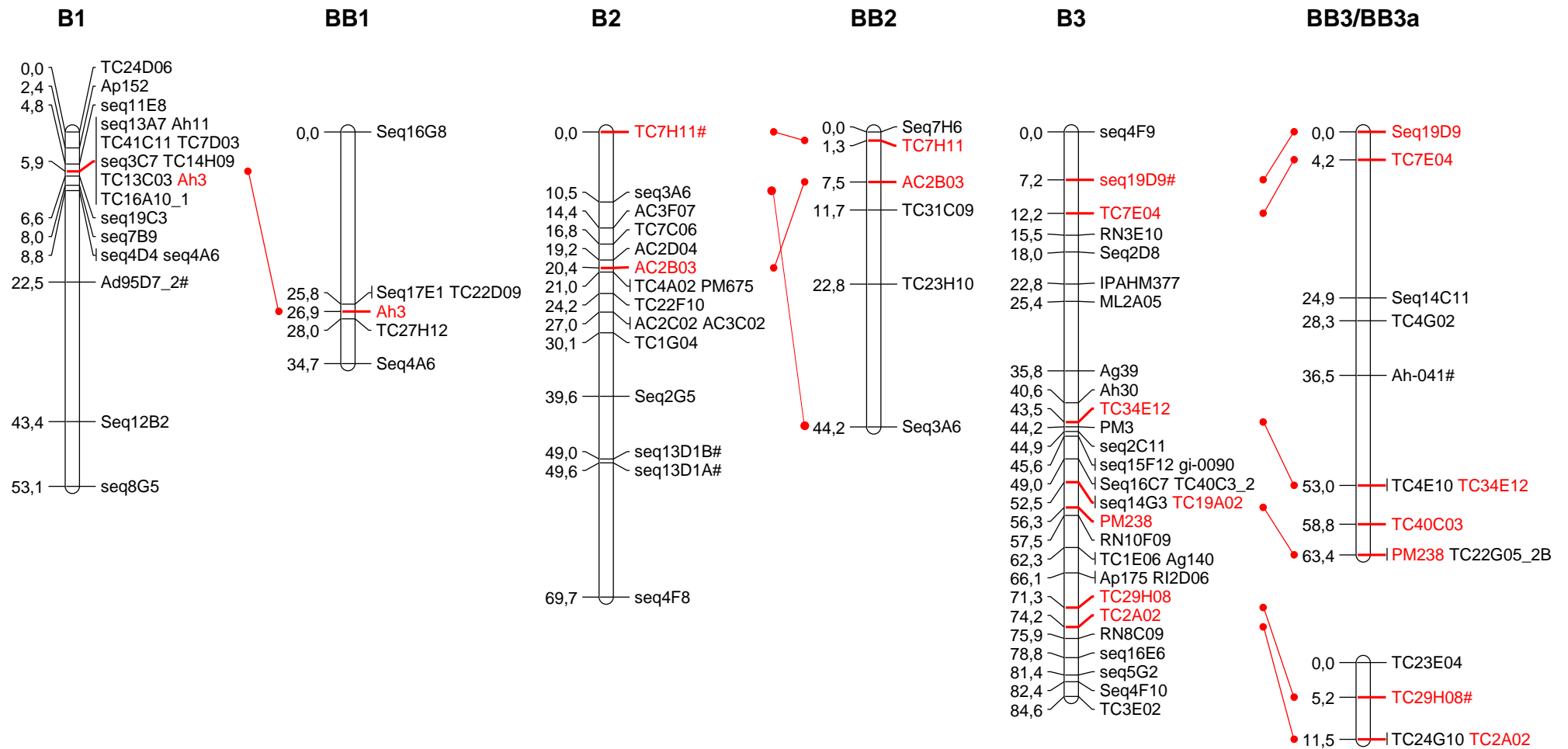


Figura 10 – Análise de sintonia realizada entre o mapa diploide B e o genoma B do mapa tetraploide. As linhas indicam os marcadores em comum, que são mostrados em vermelho.

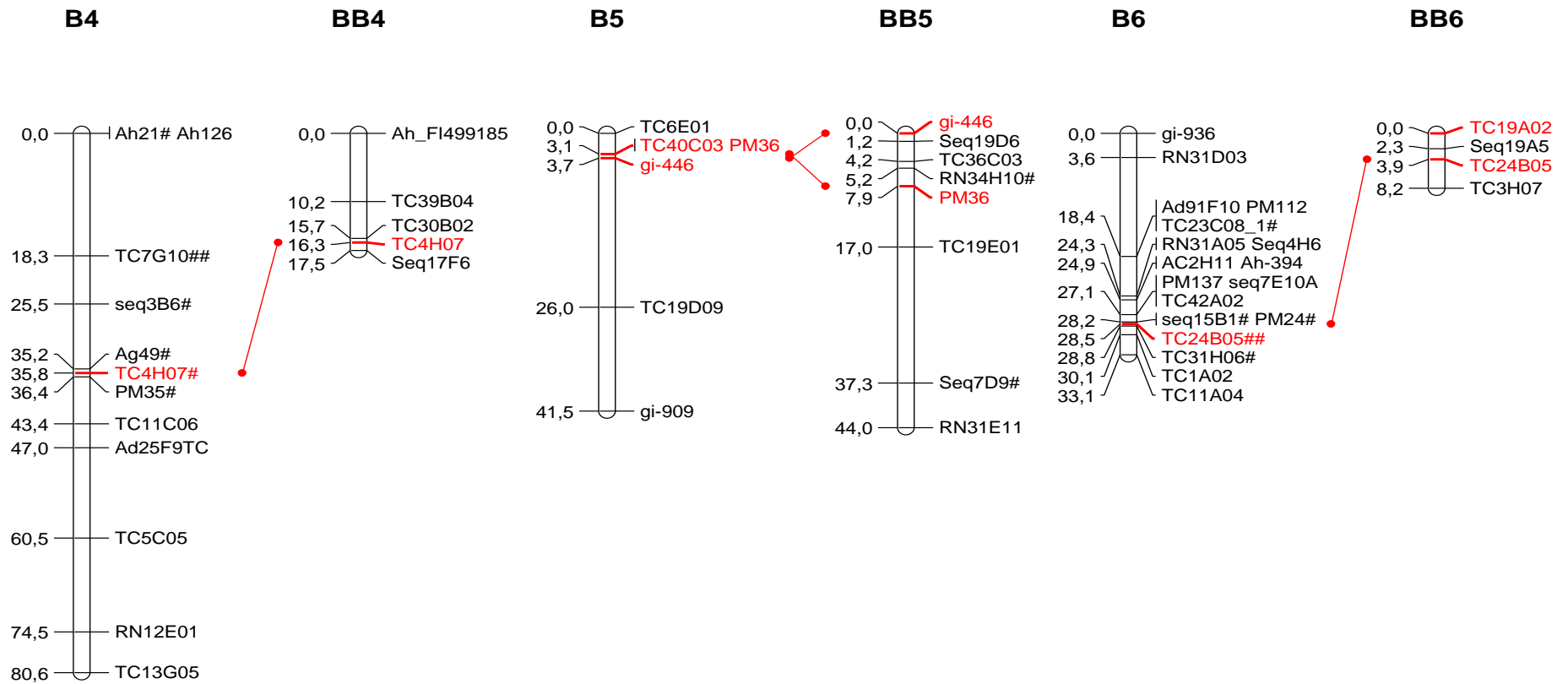


Figura 10 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre o mapa diploide B e o genoma B do mapa tetraploide. As linhas indicam os marcadores em comum, que são mostrados em vermelho.

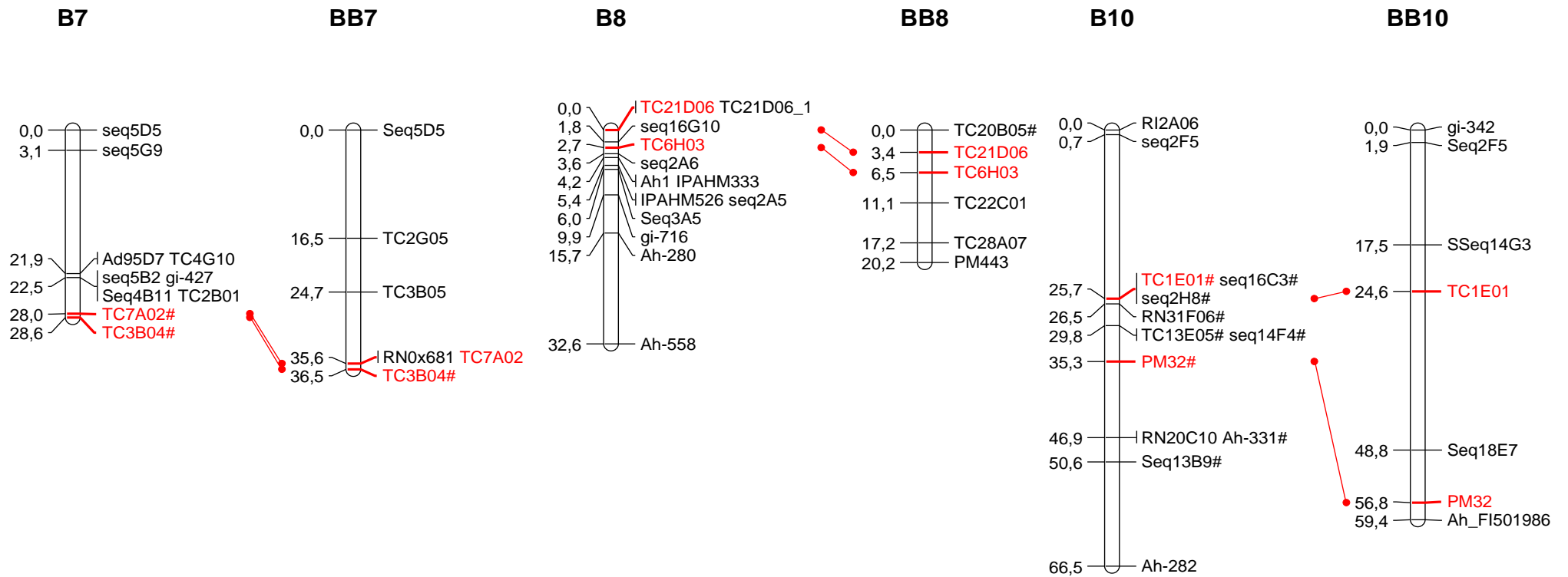


Figura 10 (cont.) – Análise de sintenia realizada entre o mapa diploide B e o genoma B do mapa tetraploide. As linhas indicam os marcadores em comum, que são mostrados em vermelho.

Como observado, ambos os genomas A e B do mapa tetraploide apresentaram boa sintenia entre os mapas diploides dos seus respectivos genomas. Isso é de extrema importância, pois como já dito, é possível inferir que as informações geradas em outros mapas também podem ser utilizadas nessas populações devido às semelhanças existentes entre os genomas. Além do mais, é possível fazer o alinhamento do mapa do amendoim com os mapas dos seus progenitores.

VI CONCLUSÕES

Os mapas genéticos obtidos nesse estudo mostraram-se moderadamente saturados, aumentando a capacidade de mapear genes úteis. Houve uma boa definição dos grupos de ligação, que auxiliará a identificação dos grupos de ligação nos mapas feitos em populações de *A. hypogaea*. Esses mapas poderão auxiliar a transferência de genes de interesse existentes nas espécies silvestres para o amendoim, pelo uso de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento do amendoim.

Através do estudo de sintenia foi possível observar que existe grande similaridade entre os genomas. Esses mapas poderão ser utilizados para outros estudos de genômica comparativa entre populações de cruzamento intra ou interespecífico, entre leguminosas e para construção de um mapa de referência em amendoim.

O tipo de população (RILs) utilizada para o desenvolvimento desse trabalho foi bastante útil, pois permitirá que mais marcadores sejam acrescentados por outros grupos de pesquisa, resultando em mapas mais saturados. Além do mais, foram e poderão ainda ser avaliadas características de interesse em diferentes ambientes e períodos.

Através de todo esse trabalho, tem-se como perspectiva: o mapeamento de QTLs para componentes de produtividade e para resistência às doenças que atacam o amendoim; e o auxílio na montagem do genoma do amendoim que está sendo sequenciado através do alinhamento do mapa físico com os mapas genéticos.

VII BIBLIOGRAFIA

- AARTS, M.G., TE LINTEL HEKKERT, B.; HOLUB, E.B.; BEYNON, J.L.; STIEKEMA W.J.; PEREIRA, A. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.251-258, 1998.
- ALVES, D.M. Uso de marcadores SNPs em *Arachis* para mapeamento de genes candidatos e análise de sintenia genômica. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília – Brasília, 2008. 81p.
- BARZEN, E.; MECHELKE, W.; RITTER, E.; SCHULTE-KAPPERT, E.; SALAMINI, F. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RFLP loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.189-193, 1995.
- BERRY, S.T.; LEON, A.J.; HANFREY, C.C.; CHALLIS, P.; BURKHOLZ, A.; BARNES, S.R.; RUFENER, G.K.; LEE, M.; CALIGARI, P.D.S. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L.: 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.195-199, 1995.
- BERTIOLI, D.J.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; LION, M.B.; SANTOS, V.L.; PAPPAS Jr, G.; CANNON, S.B.; GUIMARÃES, P.M. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.270, p.34-45, 2003.
- BERTIOLI, D.J.; MORETZSOHN, M.C.; MADSEN, L.H.; SANDAL, N.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; HOUGAARD, B.K.; FREDSLUND, J.; SCHAUSER, L.; NIELSEN, A.M.; SATO, S.; TABATA, S.; CANNON, S.B.; STOUGAARD, J. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. **BMC genomics**, v.10:45, p.1-11, 2009.
- BROMAN, K.W. The genomes of recombinant inbred lines. **Genetics**, v.169, p.1133-1146, 2004.
- 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.

- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**, Viçosa, MG; 2006. p.85-106. p.9-78.
- 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.
- 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, Londrina – PR, 2005. 93p. (apostila)
- 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.
- COLLINS, N.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J.; PRYOR, A.J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, v.44, p.375-381, 2001.
- CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento, 2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 20 fev 2012.
- CRESTE, S.; TULMAN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamyde sequence gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- CRESTE, S.; TSAI, S.M.; VALLS, J.F.M.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from section *Arachis* and *Heteranthae* using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.52, p.1079-1086, 2005.
- CUC, L.M.; MACE, E.S.; CROUCH, J.H.; QUANG, V.D.; LONG, T.D.; VARSHNEY, R.K. Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, v.8:55, p.1-11, 2008.

- De WIT, P.L.G.M. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. **Advances in Botanical Research**, v.21, p.147-185, 1995.
- DIXON, M.S.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, D.A.; HARRISON, K.; JONES, J.D. The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. **Plant Cell**, v.10, p.1915-1925, 1998.
- DONALD, T.M.; PELLERONE, F.; ADAM-BLONDON, A.F.; BOUQUET, A. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.610-618, 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. In: KOLE, C. (Ed.). **Oilseeds**. Series: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol. 2, Springer, 2007. P115-151.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 08 jun2011.
- FÁVERO, A.P. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 165 p.
- 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.
- 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.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1064-1070, 2004.

- FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromossomas y evolucion en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.187-220, 1994.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FLANDEZ-GALVEZ, H.; FORD, R.; PANG, E.C.; TAYLOR P.W. An intraspecific linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on sequence tagged microsatellite site and resistance gene analog markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106:8, p.1447-1456, 2003.
- FONCÉKA, D.; HODO-ABALO, T.; RIVALLAN, R.; FAYE, I.; SALL, M.; NDOYE, O.; FAVERO, A.P.; BERTIOLI, D.J.; GLASZMANN, J.; 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.9:103, p.1-13, 2009.
- FREDSLUND, J.; MADSEN, L.H.; HOUGAARD, B.K.; NIELSEN, A.M.; BERTIOLI, D.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHAUSER, L.A. A general pipeline for the development of anchor markers for comparative genomics in plants. **BMC Genomics**, v.7:207, 2006.
- FREITAS, F.O.; PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. O amendoim contador de história. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. **Documentos**, n.107. 2003. 12p.
- FRISCH, M.; QUINT, M.; LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E. Duplicate marker loci can result in incorrect locus orders on linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.305-316, 2004.
- 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.; TALLURY, S.P.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. Molecular analysis of *Arachis* interspecific hybrids. **Theor Appl Genet**, v.112, p.1342-1348, 2006.
- GAUTAMI, B.; PANDEY, M.K.; VADEZ, V.; NIGAM, S.N.; RATNAKUMAR, P.; KRISHNAMURTHY, L.; RADHAKRISHNAN, T.; GOWDA, M.V.C.; NARASU, M.L.; HOISINGTON, D.A.; KNAPP, S.J.; VARSHNEY, R.K. Quantitative trait locus analysis and construction of

- consensus genetic map for drought tolerance traits based on three recombinant inbred line populations in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Molecular Breeding**, p.1-16, 2011.
- 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, 2002.
- 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.7:9, 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.
- GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. Groundnut. In: SIMMONDS, N.W. (Ed.) **Evolution of Crop Plants**. London, Longman; 1976.p.151-154.
- GREGORY, M.P.; GREGORY, W.C. Exotic germplasm of *Arachis* L. interspecific hybrids.**Journal of Heredity**, v.70, p.185-193, 1979.
- GUIMARÃES, P.M.; GARSMEUR, O.; PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; SEIJO, G.; CHAINE, C.; BERTIOLI, D.J.; D'HONT, A. BAC libraries construction from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut. **BMC Plant Biology**, v.8:14, p.1-8, 2008.
- GUO BZ, CHEN XP, HONG YB, LIANG XQ, DANG P, BRENNEMAN T, HOLBROOK CC, CULBREATH A. Analysis of gene expression profiles in leaf tissues of cultivated peanuts and development of EST-SSR markers and gene discovery. **Intl J Plant Genomics**, v.1, 14p., 2009.
- HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. **J. Genet.**, v.8, p.299-309, 1919.
- HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, v.34, p.1013-1020, 1991.
- 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.

- HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; GAO, G.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*A. hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, v.3:3, p.1-6, 2003.
- HE, G.; MENG, R.; GAO, H.; GUO, B.; GAO, G.; NEWMAN, M.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v.142, p.131–136, 2005.
- HERSELMAN L. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*A. 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.
- HOLBROOK, C.C.; STALKER, H.T. Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews*, v.22, p.297-356, 2003.
- 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.10:17, p.1-13, 2010.
- HOPKINS, M.S.; CASA, A.M.; WANG, T.; MITCHELL, S.E.; DEAN, R.; KOCHERT, G.D.; KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic Simple Sequence Repeats (SSRs) in peanut. **Crop Science**, v.39, p.1243-1247, 1999.
- HOUGAARD, B.K.; MADSEN, L.H.; SANDAL, N.; MORETZSOHN, M.C.; FREDSLUND, J.; SCHAUSER, L.; NIELSEN, A.N.; ROHDE, T.; SATO, S.; TABATA, S.; BERTIOLI, D.J.; STOUGAARD, J. Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicas*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. **Genetics**, v.179, p.2299-2312, 2008.
- HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, v.7, p.396-422, 1936.
- JENCZEWSKI, E.; GHÉRARDI, M.; BONNIN, I.; PROSPERI, J.M.; OLIVIERI, I.; HUGUET, T. Insight on segregation distortions in two

- intraspecific crosses between annual species of *Medicago* (Leguminosae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.682–691, 1997.
- JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, v.77, n.2, p.230-240, 1999.
- JUNG, S.; POWELL, G.; MOORE, K.; ABBOTT, A. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). II. Molecular basis and genetics of the trait. **Mol. Gen. Genet.**, v.263, p.806-811, 2000.
- KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.21, p.11746-11750, 1996.
- 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.
- KOCHERT, G.; STALKER, H.T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, C.R.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.83, p.1282-1291, 1996.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M.A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific markers. **The Plant Journal**, v.4, p.403-410, 1993.
- 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**, v.10:15, p.1-34, 2010.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann Eugen**, v.12, p.172-175, 1944.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, 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.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.
- LAVIA, G.I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x = 9$. **Cytologia**, v.63, p.177-181, 1998.
- 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**, v.9:112, p.1-12, 2009.
- LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C.A. PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics**, v.14, n.4, p.421-429, 1996.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 980p, 1998.
- LIU, B.H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. CRC Press, Boca Raton, 611 p, 1998.
- LU, H.; ROMERO-SEVERSON, J.; BERNARDO, R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.622-628, 2002.
- MACEDO, S.E.; MORETZSOHN, M.C.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; ALVES, D.M.T.; GOUVEA, E.G.; AZEVEDO, V.C.R.; BERTIOLI, D.J. Development and characterization of highly polymorphic long TC repeat microsatellite markers for genetic analysis of peanut. **BMC Research Notes**, v.5:86, 2012.
- MAMMADOV, J.A.; LIU, Z.; BIYASHEV, R.M.; MUEHLBAUER, G.J.; SAGHAI MAROOF, M.A. Cloning, genetic and physical mapping of resistance gene analogs in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Breeding**, v.125, p.32-42, 2006.

- McINTYRE, C.L.; CASU, R.E.; DRENTH, J.; KNIGHT, D.; WHAN, V.A.; CROFT, B.J.; JORDAN, D.R.; MANNERS, J.M. Resistance gene analogues in sugarcane and sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. **Genome**, v.48, p.391-400, 2005.
- 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.
- MOORE, K.M.; KNAUFT, D.A. The inheritance of high oleic acid in peanut. **J Hered**, v.80, p.252-253, 1989.
- 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 hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v.4:11, p.1-10, 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. Tese(Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasil. 2006. 134p.
- 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**, v.9:40, p.1-10, 2009.
- NAYAK, S.N.; ZHU, H.; VARGHESE, N.; DATTA, S.; CHOI, H.K.; HORRES, R.; JÜNGLING, R.; SINGH, J.; KISHOR, P.B.K.;

- SIVARAMAKRISHNAN, S.; HOISINGTON, D.A.; KAHL, G.; WINTER, P.; COOK, D.R.; VARSHNEY, R.K. Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. **Theor Appl Genet**, v.120, p.1415–1441, 2010.
- NEFF, M.M.; NEFF, J.D.; CHORY, J.; PEPPER, A.E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. **The Plant Journal**, v.14, p.387- 392, 1998.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; TÁVORA, F.J.A.F. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**, EMBRAPA Algodão, Paraíba; 2005.p.71-122.
- O'BYRNE, D.J.; KNAUFT, D.A.; SHIREMAN, R.B. Low fat-monounsaturated rich diets containing high-oleic peanuts improve serum lipoprotein profiles. **Lipids**, v.32, p.687-695, 1997.
- O'KEEFE, S.F.; WILEY, V.A.; KNAUFT, D.A. Comparison of oxidative stability of high- and normal-oleic peanut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.70; p.489-492, 1993.
- PALMIERI, D.A.; BECHARA, M.D.; CURI, R.A.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.77–79, 2005.
- PALMIERI, D.A.; HOSHINO, A.A.; BRAVO, J.P.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.551-553, 2002.
- PATERSON, A.H. **Genome Mapping in Plants**. San Diego – California: R. G. Landes Company; Austin – Texas: Academic Press, 1996. 330p.
- PEÑALOZA, A.D.P.S.; VALLS, J.F.M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: VEIGA, R.F.A.; BOVI, M.L.A.; BETTI, J.A.; VOLTAN, R.B.Q. (Eds.) SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. **Programas e Resumos**. Campinas: IAC/Embrapa-Cenargen, 1997. p.39.

- PEÑALOZA, A.; VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.14, p.65–72, 2005.
- PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. **Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas**. In BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores moleculares*, Viçosa, MG; 2006. p.85-106.
- PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; MORAES, S.A. Principais doenças do amendoim e seu controle. In SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**, EMBRAPA Algodão, Paraíba; 2005. p.263-338.
- PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.; BERTIOLI, D.J.; MORETZSOHN, M.C.; DA SILVA, F.R.; MARTINS, N.F.; GUIMARAES, P.M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v.7:7,2007.
- QIN, H.; FENG, S.; CHEN, C.; GUO, Y.; KNAPP, S.; CULBREATH, A.; HE, G.; WANG, M.; ZHANG, X.; HOLBROOK, C.C.; OZIAS-AKINS, P.; GUO, B. An integrated genetic linkage map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) constructed from two RIL populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.124:4, p.653-664, 2012.
- QUILLET, M.C.; MADJIDIAN, N.; GRIVEAU, Y.; SERIEYS, H.; TERSAC, M.; LORIEUX, M.; BERVILLÉ, A. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.1195-1202, 1995.
- 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.
- RAVI, K.; VADEZ, V.; ISOBE, S.; MIR, R.R.; GUO, Y.; NIGAM, S.N.; GOWDA, M.V.C.; RADHAKRISHNAN, T.; BERTIOLI, D.J.; KNAPP, S.J.; VARSHNEY, R.K. Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v.122, p.1119–1132, 2011.

- ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Characterization of the *Arachis*(Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.3, p.717-724, 2008.
- ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species(section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. **Theor Appl Genet**,v.121, p.1033–1046, 2010.
- 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.; GODOY, I.J.; FÁVERO, A.P. Melhoramento do amendoim. In SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**, EMBRAPA Algodão, Paraíba; 2005. p.123-192.
- SCHUSTER I. & CRUZ C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa-MG: Editora UFV, 2004. 585p.
- SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.91, p.1294-1303, 2004.
- 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.
- SINGH, A.K. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 8. Synthetic amphidiploids and their importance in interspecific breeding. **Theor Appl Genet**,v.72, p.433–439, 1986.
- SINGH, A.K.; MOSS, J.P. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 2. Chromosome complement of species of section *Arachis*. **Theor Appl Genet**,v.61, p.305–314, 1982.

- SINGH, A.K.; MOSS, J.P. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 5. Genome analysis in section *Arachis* and its implications in gene transfer. **Theor Appl Genet**, v.68, p.355–364, 1984.
- SMARTT, J.; GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. **Euphytica**, v.27, p.665–675, 1978.
- STALKER, H.T. A new species in section *Arachis* of peanut with a D genome. **Am J Bot**, v.78, p.630-637, 1991.
- STALKER, H.T.; YOUNG, C.T.; JONES, T.M. A survey of fatty acids content of forty peanut cultivars. *Oléagineux*, v.38:6, p. 419-424, 1989.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.719.
- 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. **Theor Appl Genet**, v.11, p.1229-1237, 2005.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E.; RAO, V.R. Collecting wild species of *Arachis*. In: GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Eds.). **Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines**. Wallingford: CabInt, 1995. 748 p.
- VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: BANDEL, G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; OLIVEIRA, G.C.X. (Ed.). 17o Encontro sobre temas de genética e melhoramento, “genômica: uma abordagem em plantas”, v.17. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, 2000, p.51.
- VALLS, J.F.M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In SANTOS, RC. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**, EMBRAPA Algodão, Paraíba; 2005.p.45-70.
- 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.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v.23, n.1, p.48-55, 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.). **Theor Appl Genet**, v.118, p.729-739, 2009.
- VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v.93:1, p.77-78, 2002.
- WANG, Z.X.; YANO, M.; YAMANOUCHI, U.; IWAMOTO, M.; MONNA, L.; HAYASAKA, H.; KATAYOSE, Y.; SASAKI, T. The *pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **The Plant Journal**, v.19, p.55-64, 1999.
- WANG, Y.-H.; CHOI, W.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. Cloning of disease-resistance homologues in end sequences of BAC clones linked to *Fom-2*, a gene conferring resistance to *Fusarium* wilt in melon (*Cucumis melo* L.). **Genome**, v. 45, p.473- 480, 2002.
- WEIR, B.S. Genetic Data Analysis II. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.
- YOSHIMURA, S.; YAMANOUCHI, U.; KATAYOSE, Y.; TOKI, S.; WANG, Z.X.; KONO, I.; KURATA, N.; YANO, M.; IWATA, N.; SASAKI, T. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.1663-1668, 1998.
- YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.21, p.11751-11756, 1996.
- YUKSEL, B.; PATERSON, A.H. Construction and characterization of a peanut HindIII BAC library. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.630-639, 2005.
- ZHENG, B.S.; YANG, L.; ZHANG, W.P.; MAO, C.Z.; WU, Y.R.; YI, K.K.; LIU, F.Y.; WU, P. Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107:8, p.1505-1515, 2003.

VIII FONTES FINANCIADORAS DO PROJETO

1. Projeto “Introgessão de genes úteis de espécies silvestres de *Arachis* no amendoim cultivado com auxílio 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.



IX ANEXOS

Anexo 1 – Marcadores que formaram blocos com distâncias iguais a zero.

GL	Marcador	Posição no mapa	Marcadores com distância igual
A1	RN22A12	0	RN22A12, TC14H09, TC23C08_1, TC16A10_1, TC16A10
	Leg037	2,3	Leg037, TOG895572_195, TC13C03
	DS_c6166_412	8,2	DS_c6166_412, TOG904805
	DS_c1301_572#	11,7	DS_c1301_572#, DS_c4065_840#
	DS_c4560_244#	17,7	DS_c4560_244#, TOG943467_311#
	Seq3B5	18,6	Seq3B5, TC27H12#, DS_c1206_610#
	TOG931720_758	21,7	TOG931720_758, TOG910796_419#, TOG910796_582#
	GM635a#	22,7	GM635a#, DS_c9674_219#
	Seq2H11	27,9	Seq2H11, TOG961504#, DS_c13239_201#, DS_c6084_79#
	TOG901037_411#	31,4	TOG901037_411#, DS_c5353_469#
	TOG895199_183#	36,8	TOG895199_183#, DS_c4584_63#, TOG899072_169#
	TOG896615_1198#	38,2	TOG896615_1198#, TOG896615_1035#
	TOG895455_422#	39	TOG895455_422#, TOG894747_278#
	Leg178#	40,7	Leg178#, Leg304#, Ah21#
	TOG895242_363#	41,9	TOG895242_363#, DS_c5807_604#, DS_c5813_1008#, DS_c2286_201#, TOG894987_466#, TOG897648_127#, TOG899544_615#, TOG901547_499#
	DS_c17991_98#	53,2	DS_c17991_98#, DS_c18644_173#
	DS_c11080_157#	53,8	DS_c11080_157#, DS_c19099_261#, DS_c1095_330#
	Leg463_1	56,4	Leg463_1, TOG899506_248
	RN9A05	57	RN9A05, RN23A07, Seq16G8, TOG897306, DS_c2532_722
	TOG897646_500	63,7	TOG897646_500, TOG897646, DS_c13546_273#
	DS_c4214_1102	82	DS_c4214_1102, DS_c1383_590, DS_c9263_191

A2

TOG899617	0	
TOG899617_1026#	0,6	TOG899617_1026, TOG898608_178#
Leg208#	3	Leg208#, DS_c5307_258
Leg128	7	TOG904027_265
TOG896385_429	10,2	TOG896385_429, TOG896385_87, TOG898116_259
Leg242	21,1	Leg242, TOG908343_347, TOG897933_871#, DS_c4580_1053#
TOG946792#	29,7	TOG946792#, DS_c2936_645#
Leg160#	32	Leg160#, Leg159#, TOG896702#, DS_c2104_122#, DS_c13985_140#, DS_c11859_201#, DS_c8466_362#, TOG900997_324, TOG896702_329#, TOG896702_337#, TOG899482_64#
TOG899668	32,9	TOG899668, TOG900140, DS_c14143_148#, DS_c3962_168#, TOG915802#
TOG899668_1115	33,3	TOG899668_1115, TOG901933_154, TOG897762_410, TOG900140_128, TOG903928_323, TOG908804_664#
TC23F04	34,5	TC23F04, Seq11D4, TC4A02#, TC11A02#
TC1G04	46,6	TC1G04, DS_c10074_141
DS_c3554_248	47,4	DS_c3554_248, DS_c3465_568
DS_c1927_1130	56,2	DS_c1927_1130, DS_c3137_141
TOG899594_878	56,9	TOG899594_878, DS_c1708_349, TOG899241_257

A3

Leg188#	0	Leg188#, TOG906575_304#
TOG894308_1403#	8,8	TOG894308_1403#, DS_c12903_140#, TOG896584#, TOG896584_674#
TOG898437_81#	11,2	TOG898437_81#, TOG900146#, DS_c454_491#, DS_c3639_1180#, DS_c9538_221#, TOG900146_296#
LegTC987#	14,8	LegTC987#, RN3E10#, DS_c7936_190#, DS_c22464_119#, DS_c3385_468#

TOG908642_255#	25,1	TOG908642_255#, TC4G02#, TOG894257_158#
TOG906764_196#	25,8	TOG898284_1080#, TOG906764_232#, TOG901133_147##
Leg237#	28,6	Leg237#, DS_c1813_430#, DS_c2678_792#
Leg236#	32,2	Leg236#, TOG916106_302#, TOG900220_441#, TOG916106_451#
TOG894844_638#	35,2	TOG894844_638#, TOG894844#, TOG894844_420#
TOG902879_117#	40,1	TOG902879_117#, TOG895781#, TOG901146_187#
Ah30#	44,5	Ah30#, TOG895173_675#, TOG895173_722#
Leg4Gm#	45,3	Leg4Gm#, DS_c15986_66#, TOG946941_815#, DS_c2349_532#
DS_c10238_101#	45,9	DS_c10238_101#, DS_c1695_200#
TOG897609_289#	50,7	TOG897609_289#, DS_c13100_68#
Leg301#	73,1	Leg301#, TOG896361#, TOG928631#, DS_c10697_244#, DS_c1226_235#, Leg024#, Leg168#, TOG896681_234#, TC4E10#, TOG896361_419#, TOG906822_493#, TOG928631_437#
TC3G01	73,1	TC3G01, TOG896361_703#
TOG897323_947#	77	TOG897323_947#, TOG896252_1129#
Leg225#	79,5	Leg225#, DS_c2026_739#
Leg729#	82,1	Leg729#, TOG897059#, TOG902901_113#, TOG908354_470##
LegTC811	86,6	LegTC811, TC1E06#
Leg470#	92,2	Leg470#, TOG906948_482#, TOG906924_458#, TOG924872_95#
TOG896068_100#	93,5	TOG896068_100#, TOG914210#, TOG901894#, TOG910831_313, TOG914210_63#, TOG901894_921#
TOG895760_948#	94,9	TOG895760_948#, DS_c2271_770#, TOG895760_1090#, TOG897973_670#
Leg133#	96	Leg133#, DS_c1970_159, DS_c3299_638
TOG905182_531	111,2	TOG905182_531, TOG900798_420, TOG896103_453#
Seq4F10	127	Seq4F10, TOG900871, TC3E02

A4

TOG903803_379#	4,3	TOG903803_379#, TOG919160_1171#
TOG895545_1356#	7,1	TOG895545_1356#, TOG895545_546#
TOG899297_685#	7,7	TOG899297_685#, TOG948068_413#
TOG930652#	12,1	TOG930652#, DS_c12179_148#
Leg14MGm#	18,3	Leg14MGm#, TOG898883_971#
DS_c5628_94#	28,4	DS_c5628_94#, DS_c10945_309#
gi-832#	32	gi-832#, Leg318#, TOG905303_802#, DS_c18568_145#, DS_c935_168##, TOG908483_1069#
RN5H02##	32,7	RN5H02##, DS_c3876_497##
TOG901166##	33,4	TOG901166##, DS_c14311_196##, DS_c2743_506##, DS_c7239_98##, DS_c17493_197##, DS_c8507_92##
TOG906490##	34,1	TOG906490##, DS_c16177_84##, DS_c3375_845#
PM120#	35,1	PM120#, TOG937303#
Leg270#	37,7	Leg270#, TOG909835#, TOG898975#, TOG917728#, DS_c12744_280#, DS_c8183_422#, DS_c3489_307##, RN9C02#, TOG898975_199#, TOG909835_533#
TOG933994_650#	39,8	TOG933994_650#, TOG901166_486#, TOG901166_207#, TOG897016_522##
Ah-408#	56,5	Ah-408#, Ah-569#
TOG902872_732#	68,3	TOG902872_732#, DS_c755_322#
RN12E01#	71,1	RN12E01#, TOG894192_568#, TOG894192#, TOG894192_485#

A5

gi-385	6,4	gi-385, TOG895467_59, GM625#, gi-620, TOG895467, TOG918200_556, TOG918200_813
DS_c3236_729	7	DS_c3236_729, DS_c4424_269
Seq10H1A#	10,8	Seq10H1A#, DS_c12649_619#, DS_c4656_360#, DS_c8078_215#, TOG910249#
PM45#	42,4	PM45#, PM179##, Seq10D4#, TC28A12##

TC6E01##	42,4	TC6E01##, Seq11E11##, DS_c5473_188##
DS_c2437_540##	43,1	DS_c2437_540##, DS_c4537_109##
DS_c5288_353##	56,8	DS_c5288_353##, DS_c3981_892##
TC7D03##	62,5	TC7D03##, Seq3E10##, TC7H02##, TC9B07##, TC5D06##, Ap40##, Seq18C5##, Seq13A10##, TC3G05##, Seq8H1##, GM630##, Seq19G7##, RN25B01##
Leg088##	67,2	Leg088##, Ah_275##, DS_c2498_472##
TOG895759_618##	70,5	TOG895759_618##, TOG912905_118##, TOG895492_357##
TOG899661_476##	79,2	TOG899661_476##, TOG901841_310##, TOG918275_467##, TOG898353_778##, TOG918275_612##, TOG915900_171##, TOG897209_401##, TOG899661_175##, TOG902910_542##
TOG902063_90##	80,4	TOG902063_90##, TOG914633_191##, TOG919655_468##, TOG897956_574##, TOG897680_156##, TOG919584_750##
Leg218#	82,1	Leg218#, TC2B01#, TOG919584##, PM65#
IPAHM105#	84,6	IPAHM105#, TOG918275##, TOG901841##, TOG899661##
TOG904000_200#	90,8	TOG904000_200#, TOG904000#
TOG899382_109#	91,5	TOG899382_109#, DS_c5394_367#
TOG916452_734#	92,2	TOG916452_734#, TOG916452#
TOG898231_169#	94,3	TOG898231_169#, TOG898018#, TOG898018_457#
Leg224	110	Leg224, TOG907321_698, CPI02C10
TOG895690_378	115,5	TOG895690_378, TOG895690_687
TOG900080_84	119,7	TOG900080_84, TOG896907_218
TOG898026_711	126,5	TOG898026_711, TOG898026, DS_c349_477

A6

TOG896309_1001	6,8	TOG896309_1001, TOG895571_409, TOG899713_397
RN0x681	13,3	RN0x681, TOG946905_682

gi-936	14,6	gi-936, RI2A06, TOG896050_514, TOG896050_512
Seq18G1	15,2	Seq18G1, TOG898376_102
DS_c723_423	20,6	DS_c723_423, DS_c11223_461
IPAHM-171a	32,5	IPAHM-171a, TOG906607_425
RN0x06	35,3	RN0x06, DS_c8608_327, TOG900398_642#, TOG894933_193#
Leg23MGm	51,5	Leg23MGm, TOG894064_409, TOG907173, TOG896202, DS_c10062_191, DS_c639_802, DS_c5136_346, TOG929069_215, TOG901858_1313, TOG908504_349, TOG898832_314, TOG907173_130, TOG898832_248, TOG896202_674
Leg092	53,1	Leg092, TOG894351_463, DS_c9060_110, LegTC1941
Leg031	57,5	Leg031, TC11A04
TOG906662_260	90,5	TOG906662_260, TOG897486#, TOG897486_953#
Leg11MGm#	93,5	Leg11MGm#, TC3H07#, DS_c5982_158#, DS_c9355_120#, DS_c6847_217
Seq4H6	97,8	Seq4H6, TOG903904_486
TOG894754_222	102,9	TOG894754_222, TOG910683_176, TOG914943_77
Seq15D3	104,9	Seq15D3, DS_c1800_406
TOG902716_115	134,8	TOG902716_115, TOG903911_345

A7

DS_c5277_40	2,8	DS_c5277_40, DS_c8859_42
TOG904989_542	27,2	TOG904989_542, TOG894619_653, TOG913150_569
Seq3B8	49	Seq3B8, TOG901977_400, DS_c6216_728, TOG897682_138
TOG908150_56	54	TOG908150_56, TOG915697, DS_c11702_280, TOG900787_305
TOG895412_365	58,6	TOG895412_365, TOG895412, DS_c18959_105, TOG913186_454#, TOG895412_176
TOG922733	61,1	TOG922733, DS_c3005_444#
TOG922733_189	64,2	TOG922733_189, TOG899447_539

TOG897513_224	75	TOG897513_224, TOG897513_276
TOG919227_560	77,4	TOG919227_560, TOG895333_20
Leg228	80	Leg228, TOG915502_1157, TOG915502, TOG894070, DS_c15029_164, DS_c7744_233
TOG895030_191	80,7	TOG895030_191, TOG895030_325, TOG898528_820#
DS_c2845_1151	89,8	DS_c2845_1151, DS_c5670_217

A8

TC4G06	26,6	TC4G06, TOG900942_375
DS_c20567_70	29,1	DS_c20567_70, DS_c5619_263
TOG905363_302	44,5	TOG905363_302, TOG900374_136
Leg924#	64	Leg924#, TC3B05#
TOG902563_80	75,6	TOG902563_80, DS_c1393_570
TC7A02	76,7	TC7A02, TC3B04
Leg305	81,4	Leg305, DS_c12692_326, DS_c1885_946
PM32	83,8	PM32, TOG920382_588
TOG899744_355	88,6	TOG899744_355, TOG899744
Leg17MGm	92,2	Leg17MGm, TOG899409_369
TOG902140_107	103,5	TOG902140_107, TOG902560_403#, TOG907934_403, TOG902560_539
TC20B05	105	TC20B05, DS_c3065_784, DS_c3555_139, Ad90F2
TC6H03	107,9	TC6H03, TC9F10
TOG895956_322	111,3	TOG895956_322, DS_c732_231
TC22C01	114,1	TC22C01, TOG918864
TC1E05	122,1	TC1E05, Seq2A5, DS_c1049_215, DS_c95_626

Leg033	126,3	Leg033, TC9F04, Ah-558, TOG902883_322, TOG915278, TOG895983, TOG902883, DS_c2379_440, DS_c8478_70, DS_c3821_347, TOG897350_694, TOG894669_322, TOG946813_294#, TOG915884_453#, TOG895983_308, TOG915278_171
--------	-------	---

A9

Lec-1	0	Lec-1, gi-1107
TOG896078_413	17,8	TOG896078_413, DS_c4860_235, TOG903757_1119#
Leg732#	43,8	Leg732#, TOG910718_524#, TOG898055#, TOG898055_155#, TOG924405_580#, TOG899697_808#, TOG910718_279#
TOG896007_492#	51,2	TOG896007_492#, TOG927609_649#
Leg100#	56,2	Leg100#, Seq9B4#, PM119#, TOG897003_356#
TOG894357#	56,2	TOG896345_927##, TOG896495_88#, TOG896911_311#, TOG898095_533##, TOG918299_648##
TOG908289_228#	62,3	TOG908289_228#, TOG894357_388#, TOG895877_60#, TOG895877_121#
TOG896966_310#	74,2	TOG896966_310#, TOG894927_236#, TOG896384_240#

A10

TOG908826_274#	0	TOG908826_274#, DS_c229_845##, TOG908826_519#
TOG894890_927#	5,7	TOG894890_927#, TOG894890#
Leg069#	7	Leg069#, gi_623#, Seq2F5#, TOG894171_695#, DS_c2408_432#, TOG901145_541#, TOG894171_538#
TOG896540_664	11,7	TOG896540_664, TOG896540
Leg146	18,1	Leg146, DS_c1614_886
TC1A08	32,1	TC1A08, RM2H1
DS_c1594_467	32,8	DS_c1594_467, DS_c14247_275
TC4D02	36,7	TC4D02, RI1F06, TOG940538_240, DS_c6230_149, TOG914910_1280
TOG908191#	37,9	TOG908191#, DS_c468_604#, DS_c6550_290#, TOG910323#, TOG894371#, TOG905480#

TOG908191_552	39,1	TOG908191_552, TOG898599_456#, TOG905480_1140#
Leg296	40,9	Leg296, DS_c16720_160
TOG906955	47,3	TOG906955, DS_c8644_136
TOG895021_390	47,9	TOG895021_390, TOG906955_159, TOG895021_303
TOG905828_189	48,9	TOG905828_189, TOG896305_233

Anexo 2 – Mapas das populações A, B e AB com os valores respectivos de qui-quadrado de cada marcador.

Mapa A		
GL	Marcadores	Valor X ²
A1		
	RN22A12	3,75
	RN17F12	1,35
	Leg037	2,58
	TOG904805_259	1,95
	DS_c6166_412	3,00
	DS_c1301_572#	6,05
	TOG896530#	7,72
	TOG896530_562#	5,73
	DS_c4560_244#	8,12
	Seq3B5	4,55
	TOG895237_630#	5,26
	TOG931720_758#	5,08
	GM635a#	5,56
	TOG902998_510#	9,14
	TOG902998#	19,44
	Seq2H11	4,27
	TOG896390_652#	9,39
	TOG901037_411#	9,39
	RGA16#	6,70
	TOG901908_683#	6,04
	TOG895199_183#	9,47
	TOG896615_1198#	7,58
	TOG895455_422#	8,89
	Leg178#	9,56
	TOG894987#	9,23
	TOG895242_363#	6,87
	TOG900261_468#	5,73
	Leg047#	7,02
	DS_c761_64#	10,05
	TC20D05#	8,56
	Ah-193#	5,88
	DS_c17991_98#	8,45
	DS_c11080_157#	6,70
	Leg463_1	1,71
	RN9A05	0,01
	DS_c2443_410	1,25
	TOG894141_355	0,05
	DS_c21594_45	2,14
	DS_c5189_186	0,78
	TOG897646_500	0,64
	RN25H06	0,69
	TOG905517_157	1,05
	DS_c17603_90	0,01

	DS_c1562_542	0,82
	TC2E05	1,49
	DS_c4214_1102	1,05
	TOG902975_95	0,65
A2		
	TOG899617	4,46
	TOG899617_1026#	6,87
	TOG910732_213#	6,04
	Leg208#	9,47
	RN2F12	2,38
	DS_c12368_110	4,46
	Leg128	1,03
	DS_c5609_294	3,48
	DS_c5696_55	2,39
	TOG896385_429	3,00
	TOG902928_388#	4,81
	Leg182	0,98
	DS_c10522_129#	19,00
	Leg242	3,66
	Leg33MGm#	7,20
	TC7H11#	10,65
	TOG946792#	8,33
	Leg160#	4,81
	TOG899668	3,76
	TOG899668_1115	3,66
	TOG915802_198#	5,41
	TC23F04	4,15
	IPAHM-689	4,38
	TC31C09#	5,00
	TOG906843_1052	3,56
	TC1G04	3,17
	DS_c3554_248	3,85
	RGA30	1,57
	DS_c1927_1130	0,01
	TOG899594_878	0,00
	DS_c22445_175	0,32
	DS_c4018_591	2,68
	TOG908880_440	0,35
	DS_c11518_507	0,30
	TOG906504_678	0,01
	Leg7Gm	1,39
A3		
	Leg188#	7,02
	DS_c5040_483#	8,91
	DS_c1977_844#	10,23
	TOG894287_381#	18,78

DS_c6812_226#	16,41
DS_c6953_744#	20,51
RGA22#	21,00
TOG894308_1403#	17,33
TOG898437_81#	22,05
TC7E04#	19,05
LegTC987#	13,14
Leg066#	13,12
TOG923561_536#	19,75
TOG903957_763#	23,21
TOG908642_255#	22,62
TOG906764_196#	20,51
Leg237#	17,78
Leg236#	25,80
DS_c525_514#	24,40
TOG894844_638#	24,01
TOG897269_422#	26,45
TOG902879_117#	19,00
DS_c3455_472#	15,12
TOG905123_186#	17,05
Ah30#	11,31
Leg4Gm#	8,78
DS_c10238_101#	10,65
TOG908531_1103#	20,28
DS_c1067_409#	15,12
TOG897609_289#	20,06
Leg181#	12,86
Seq18A5	1,47
PM3	2,71
Seq15F12##	38,22
Leg301#	14,10
TC3G01	4,25
Leg223#	13,76
DS_c1119_235#	14,10
Leg043#	9,89
TOG897323_439#	11,84
DS_c2626_285#	12,81
TOG897323_947#	12,48
TOG902935_739#	10,32
Leg225#	10,13
PM238#	11,25
Leg729#	13,76
TOG903841_1059#	11,84
TC11E04#	10,05
LegTC811	4,44
Leg470#	5,58

TOG896068_100#	7,78
TOG895760_948#	7,05
Leg133#	5,13
DS_c9436_517#	4,57
TOG899728_220#	6,87
TOG896251_774	4,15
TOG916363_409	4,26
DS_c5636_217	1,08
TOG905182_531	3,66
TOG905182	0,62
RN8C09	0,59
TOG902919_732	1,57
DS_c7338_180	1,25
Seq4F10	0,06
A4	
RGA2	0,71
DS_c6358_532#	10,05
gi-338#	9,72
TOG903803_379#	9,39
DS_c1785_157#	9,23
TOG895545_1356#	7,05
TOG899297_685#	8,33
TOG899297#	10,38
TC7G10#	8,67
TOG930652#	12,80
TOG930652_303#	13,13
TC11B04#	11,36
Leg14MGm#	7,58
Ah-229#	6,86
Leg152#	6,53
TOG898304_485#	10,27
DS_c1865_177	1,10
TOG898304_670#	13,54
Leg136#	13,78
DS_c5628_94#	16,07
TC5A07#	24,20
DS_c8849_670#	21,83
gi-832#	27,84
RN5H02##	32,05
TOG901166##	32,01
TOG906490##	30,49
PM120#	19,51
Leg050#	27,43
Leg270#	21,75
TOG919337_452#	27,27
TOG902630_597#	28,80

	TOG933994_650#	27,13
	Leg451#	10,47
	CP02B03#	9,78
	AD25F09-TC5#	17,78
	DS_c1737_1033#	26,45
	Ah-408#	10,23
	DS_c12399_183#	25,47
	Leg062#	19,51
	Leg461#	14,76
	TOG902872_732#	17,78
	RN12E01#	7,67
	DS_c1137_464	1,03
A5		
	TOG910249_784##	30,39
	TOG903716_79#	5,13
	gi-385	2,71
	DS_c3236_729	3,57
	Seq10H1A#	10,13
	DS_c8405_333#	15,51
	Ah4-20#	23,21
	TOG938908_728#	32,01
	RN13G08#	13,71
	PM45#	33,80
	Ah3##	37,35
	TC22H12##	38,22
	TC6E01##	39,11
	DS_c2437_540##	43,90
	DS_c9200_476##	48,76
	DS_c835_324##	85,04
	TOG894098_223##	48,32
	DS_c5288_353##	43,90
	DS_c6779_681##	36,21
	TC7D03##	41,00
	DS_c3097_107##	70,44
	Leg088##	62,69
	DS_c3924_288##	71,43
	TOG895759_618##	66,46
	TOG915746_463##	55,42
	TOG915746##	56,01
	RGA32##	44,70
	TOG902768_1093##	48,76
	TOG899661_476##	41,02
	TOG902063_90##	34,68
	Leg218#	28,10
	IPAHM105#	29,45
	TOG904000_200#	22,05

TOG899382_109#	20,75
TOG916452_734#	14,14
TOG896943_489#	22,83
TC1D12#	15,12
TOG898231_169#	17,33
TOG901225_106#	15,51
TOG905638#	14,14
Leg175	0,93
Leg224	2,19
TOG896907	1,05
DS_c6795_188	0,64
TOG895690_378	0,71
RGA28	1,05
TOG900080_84	1,47
TOG898026_711	0,84
TOG895871_280	0,01
Leg231	0,29
TOG896097_531	0,21
DS_c11456_172	0,19
TOG896882	0,01
TOG896882_29	0,05

A6

DS_c2184_437	0,30
DS_c5466_135	1,70
TOG895571	2,06
TOG896309_1001	1,75
TOG901729_360	0,24
RN0x681	0,86
gi-936	0,47
Seq18G1	1,35
TOG905231_25	0,35
DS_c723_423	1,32
TOG897521_949	4,19
TOG894965_165	3,00
DS_c9222_228	3,00
IPAHM-171a	3,28
DS_c14540_135#	9,33
RN0x06	4,13
DS_c4237_614	2,72
Seq15D6#	11,76
TOG896979_290	0,69
Leg23MGm	3,66
TOG910616_176	2,45
Leg092	2,58
PM24	0,21
Leg031	0,30

TC41C11	0,19
TC7C06	0,10
TC35F05	2,09
Seq19F4#	5,90
TOG906662_260	4,12
Leg081	3,60
AC2H11#	11,25
Leg11MGm#	9,56
TOG923884_236	0,68
TOG910860_347#	10,89
TOG960456_632#	7,78
TOG960456#	7,02
Leg186	3,40
Seq4H6	3,86
TOG920755	2,51
RN0x727	2,78
TOG894754_222	2,00
Leg346	0,28
Seq15D3	0,71
Leg203	1,11
TC42A02	1,11
Leg356	0,21
DS_c9452_220	0,00
TOG902716_115	0,00
DS_c7515_308	0,01
TOG905504_569	0,49
DS_c6996_330	0,00
TOG900104	1,75
Leg12MGm	0,20
A7	
TOG896746_193	1,39
RGA1	2,95
DS_c5277_40	0,05
TOG947627_598	0,71
DS_c3474_556	0,05
TC6G09	0,44
DS_c7479_398	0,05
DS_c5152_109	0,32
Leg24MGm	0,00
TOG904989_542	0,00
TOG896888_311#	5,23
PM204	0,06
DS_c4763_792	0,32
TC4G10	0,34
Seq3B8	3,36
TOG908150_56	0,13

	TOG915207_884	0,22
	TOG895412_365	0,01
	TOG906318_1116	0,01
	TOG922733	2,68
	DS_c253_125	0,20
	TOG922733_189	0,01
	TOG895747_87	1,32
	TOG898285_207	4,69
	TOG897694_664	3,57
	TC23E04_1	0,58
	DS_c4177_150	0,44
	TOG897513_224	0,80
	TOG895333	1,22
	TOG919227_560	1,28
	Leg228	2,65
	TOG895030_191	3,46
	Leg196	0,91
	RN13D04	1,46
	DS_c2845_1151	0,44
	CP02D05	2,39
A8		#N/A
	Leg654	0,42
	TC4G06	1,85
	DS_c17036_92	1,53
	DS_c1348_818	2,14
	DS_c20567_70	1,00
	Leg200	1,94
	TOG905363_302	3,75
	TOG905363#	5,00
	CP09D07#	6,05
	CPT02C10##	36,63
	CP04D05#	11,86
	Leg929#	6,54
	TOG901869_982#	9,14
	Seq15C10#	12,07
	TOG913042_186#	6,54
	TOG898508_911#	8,00
	Leg924#	9,47
	TOG905464_387#	10,27
	TOG902563_80	2,32
	TC7A02	2,65
	TOG897887_418	0,49
	Leg305	0,05
	TOG897884_240	1,66
	TOG912656_539	0,34
	PM32	1,61

Leg070	0,05
TOG899744_355	0,34
DS_c5583_69	0,32
DS_c3540_452	1,25
Leg17MGm	3,12
ML1G04	0,01
DS_c9031_272	0,64
TOG902140_107	0,01
TC20B05	0,06
RGA19	0,05
TC6H03	0,00
TOG918756_141	0,22
TOG895956_322	0,00
TC22C01	0,01
TOG895072_395	0,01
TOG904488_349	0,05
TOG898978_1064	0,00
TOG922166_239	0,32
TC1E05	2,51
gi_716#	5,73
TOG896197	0,59
Seq2B9	0,10
Leg033	0,29

A9

Lec-1	0,18
DS_c18439_78	1,00
DS_c33996_97	3,12
Leg322	1,39
DS_c1696_1055	2,33
DS_c6612_152	3,05
Seq14G3#	10,59
TOG896078_413	3,95
DS_c2682_118	2,91
DS_c14276_456#	11,05
TOG896942_133#	12,80
TOG935579_571#	10,38
DS_c13019_307#	23,68
TOG896362_355##	33,98
Leg1Gm#	7,72
TOG895448_639#	9,47
Leg199	4,55
Leg732#	6,86
DS_c3667_602#	13,44
DS_c1727_427#	15,07
TOG895578#	16,79
CP02C11#	19,51

TOG896007_492#	16,33
TOG899159#	23,82
TOG899054_560#	26,45
TOG896740_1024##	33,84
Leg100#	25,80
TOG894357#	27,56
TOG922990_221#	24,82
RM13A12#	24,40
Seq18G9#	6,48
TOG908289_228#	29,45
TC1D02#	28,93
Leg122##	27,60
TOG894454_341##	32,11
FAD87_Dde#	23,05
RGA21##	67,06
DS_c11394_113#	26,61
TOG896966_310#	27,13
TOG908172_214#	27,96
TOG895054_163#	30,49
DS_c6563_104##	38,24
DS_c1784_908##	34,68
DS_c4493_509##	38,24
A10	
TOG908826_274#	26,30
DS_c1458_262#	28,69
DS_c1565_477#	7,12
TOG894890_927#	9,47
LegTC3145#	10,98
Leg069#	8,78
TOG896540_664	3,56
Seq11H11#	6,82
Leg146	1,47
Seq14F4	0,80
DS_c4566_203	0,21
TC1A08	0,80
DS_c1594_467	2,14
Ah-573	0,05
Leg202	0,42
TOG900416	2,51
TC4D02	2,71
DS_c20163_113#	5,44
TOG908191#	5,90
TOG912749	4,46
TOG908191_552#	5,88
RN0x615	4,05
Leg296	3,77

TOG912749_615	3,37
Leg213	0,98
PM73	0,29
PM402	0,98
RGA18	0,22
TOG906955	0,36
TOG895021_390	0,05
TOG905828_189	0,01
DS_c11441_202	0,05
RN20C10	0,19
Seq12E3_P	2,09
DS_c11309_145	0,78
TC42A05	0,01
TOG899545_480	0,21

Mapa B		
GL	Marcadores	Valor X ²
B1	TC24D06	2,59
	Ap152	3,86
	seq11E8	2,23
	seq13A7	4,35
	Ah11	1,94
	TC41C11	1,94
	TC7D03	1,94
	seq3C7	2,23
	TC14H09	2,23
	TC13C03	2,28
	Ah3	2,33
	TC16A10_1	3,86
	seq19C3	2,67
	seq7B9	2,65
	seq4D4	0,74
	seq4A6	0,93
	Ad95D7_2#	11,71
	Seq12B2	1,16
	seq8G5	3,36
B2	TC7H11#	12,81
	seq3A6	1,25
	AC3F07	0,04
	TC7C06	0,11
	AC2D04	0,17
	AC2B03	0,10
	TC4A02	0,01
	PM675	0,01
	TC22F10	0,53
	AC2C02	0,17
	AC3C02	0,32
	TC1G04	0,55
	Seq2G5	0,41
	seq13D1B#	6,55
	seq13D1A#	8,71
	seq4F8	3,46
B3	seq4F9	0,29
	seq19D9#	4,65
	TC7E04	3,32
	RN3E10	2,23
	Seq2D8	1,36
	IPAHM377	0,74
	ML2A05	0,18

	Ag39	1,30
	Ah30	1,00
	TC34E12	2,18
	PM3	0,40
	seq2C11	0,40
	seq15F12	0,04
	gi0090	0,40
	Seq16C7	1,39
	TC40C3_2	0,98
	seq14G3	0,91
	TC19A02	0,91
	PM238	0,93
	RN10F09	0,73
	TC1E06	0,11
	Ag140	0,00
	Ap175	0,18
	RI2D06	0,05
	TC29H08	1,36
	TC2A02	0,41
	RN8C09	0,56
	seq16E6	0,01
	seq5G2	0,56
	Seq4F10	0,73
	TC3E02	0,00
B4		
	Ah21#	5,26
	Ah126	2,85
	TC7G10##	30,60
	seq3B6#	23,61
	Ag49	6,08
	TC4H07#	7,02
	PM35#	5,38
	TC11C06	1,36
	Ad25F9TC	0,17
	TC5C05	0,56
	RN12E01	0,01
	TC13G05	0,40
B5		
	TC6E01	0,56
	TC40C03	0,98
	PM36	0,19
	gi446	0,55
	TC19D09	1,64
	gi909	2,33
B6		
	gi936	0,55

	RN31D03	0,00
	Ad91F10	3,60
	PM112	2,77
	TC23C08_1	5,50
	RN31A05	4,06
	Seq4H6	3,60
	AC2H11	1,90
	Ah394	0,05
	PM137	2,59
	seq7E10A	4,55
	TC42A02	3,97
	seq15B1#	6,40
	PM24#	6,40
	TC24B05##	30,22
	TC31H06#	7,51
	TC1A02	2,78
	TC11A04	0,01
B7		
	seq5D5	0,91
	seq5G9	0,70
	Ad95D7	4,44
	TC4G10	3,97
	seq5B2	3,52
	gi427	3,18
	Seq4B11	3,11
	TC2B01	2,84
	TC7A02#	4,96
	TC3B04#	5,76
B8		
	TC21D06	1,14
	TC21D06_1	1,14
	seq16G10	1,64
	TC6H03	0,42
	seq2A6	0,91
	Ah1	0,56
	IPAHM333	0,55
	IPAHM526	0,04
	seq2A5	0,00
	Seq3A5	0,05
	gi716	0,30
	Ah280	1,86
	Ah558	1,11
B9		
	Ah254##	49,59
	seq4G1##	30,73
	TC1D02	0,05

	RN27A10	0,00
	TC39F08	0,11
	seq14E10	0,19
	TC21C03	0,10
	FAD87_Kpn	-
	RN0x619	0,56
B10		
	RI2A06	0,73
	seq2F5	0,05
	TC1E01#	18,47
	seq16C3#	14,08
	seq2H8#	19,60
	RN31F06#	22,75
	TC13E05#	22,25
	seq14F4#	21,25
	PM32#	13,44
	RN20C10	4,55
	Ah331#	5,07
	Seq13B9#	10,08
	Ah282	2,78

Mapa AB		
GL	Marcadores	Valores X ²
AA1	RN17F12_A	0,73
	Ah3	1,14
	TC3H02_A	1,36
	Pseq3B5_A	0,80
	TC30D04_A	0,93
	Pseq4A6#	8,07
	Sseq12H1_A#	5,63
	Ah21_A	2,65
	TC4H02_AB	0,28
	TC39E08_A	1,42
	Ah_193_B	2,53
	RN23A07_A	1,00
	AA2	AC2D04_A
TC31G11_A		0,41
AC2D05_A		0,29
AC2B03		0,05
Sseq12F7_A		0,10
PM201_A		0,05
TC23F04		0,10
Pseq4H11_A		0,05
TC1G05_A		0,18
TC1G04_A		0,78
AA3		TC31H02_A
	gi_560_A	0,95
	Sseq19G7_A	0,05
	Pseq4F7_A	0,98
	Ah30_A	1,14
	Sseq12B6_AB	3,32
	RN2C06_AB	1,39
	Ah_041	3,68
	TC4F02_A	2,33
	Ad90J24_A	0,73
	PM42_B	0,01
	RN12H01_B	1,14
	TC28A07	1,42
	TC2C07_A	0,05
	PM238	0,01
	TC39C01_A	0,56
	RN10F09_B	0,11
	TC1E06_A	2,23
	Ag140_A	0,30

	Sseq13A4_A	0,28
	TC22G05_A	0,41
	Pseq3D9_A	0,18
	TC11E04_A	1,36
AA4		
	TC11B04_A	1,23
	TC21A09_A	2,58
	TC7G10_A	0,20
	Ah_229_AB	1,99
	Sseq12E10_A	2,23
	TC5A07_AB	0,10
	RN23F12_AB	1,42
	Ap40_A	0,60
	gi832_A	1,19
	TC29C07_1A	2,59
	PM120_AB#	5,76
	Sseq18C5_A	3,68
	502349_A	1,42
	Ah_408_B	0,18
AA5		
	RN31E11	0,10
	Pseq7D9	0,62
	Ah6_125_A	0,44
	TC3G05_AB	0,82
	Seq2F10_A	0,11
	Seq11E11_A	0,05
	Sseq10D4_A	0,05
	PM36	0,20
	TC6E01_A	0,20
	PM45_A	0,01
	TC22H12_A	0,29
	Ah4_26_A	0,28
	RN31A05_A	0,19
	PSeq4H6_A	0,11
	TC3H07#	6,25
	TC35F05	0,19
	AC2H11_A	0,20
	TC28C01_AB	0,05
	TC19A02_AT	0,20
	TC42A02_A	0,01
AA6		
	gi_623_A	0,45
	gi936_A	0,02
	RM6F03_AB	0,65
	RNOx06_A	2,52
	TC41C11_A	0,64

	TC11A04_A	0,00
	TC1A02_A	0,46
	TC38A07_A	0,00
	TC7C06_B	0,10
	AC2A04_A	0,41
	PM35_A	0,05
	RN31A05_A	0,19
	PSeq4H6_A	0,11
	TC3H07#	6,25
	TC35F05	0,19
	AC2H11_A	0,20
	TC28C01_AB	0,05
	TC19A02_AT	0,20
	TC42A02_A	0,01
AA7		
	PM204_A	1,64
	TC41A10_A	1,52
	TC23E04_1A	1,49
	TC20D05_A	0,19
	Pseq5D5#	4,91
	RN34A10_A	0,00
	RN13D04_A	0,78
AA8		
	TC4G06_A	0,30
	TC9B08_A	0,19
	RM7E04_A	4,15
	TC3B05_A#	7,58
	TC7A02	0,76
	RN0x681	0,98
	RN22A12	0,58
	TC22C01	0,58
	TC6H03#	5,92
	TC9F10_A	0,58
	TC41A05_A	0,56
	TC20B05_AB	3,76
	Ad90F2_A	0,28
	TC21D06	0,43
	TC20B05_A#	7,68
	Pseq2A5_A	0,10
	RM17H09	4,31
	gi_716_A	0,20
	TC9F04_AB	0,55
AA9		
	Lec_1	0,95
	Pseq8D9_A	3,12
	gi_1107_A#	6,70

	RN35H04_A	3,86
	RN12H07_A	2,53
	TC5D06_A	2,59
	501806_A	0,01
	RN32F11_B	0,19
	TC7H02	0,05
	Sseq19D9##	13,35
	TC21C03_A	4,06
	Sseq17E3_A	2,23
AA10		
	RI2A06_A	1,64
	Pseq2F5	0,11
	TC1E01	4,13
	Sseq14F4_A	0,21
	Sseq15D2_A	0,60
	RM2H10_A	0,05
	RI1F06_AB#	7,78
	Sseq18B11_A	0,11
	Seq11G03_A	1,25
	499507_A	1,14
	PM32	0,47
	TC28B01_A	0,93
	Sseq16C3_B	0,93
	498998_A	2,85
	499367_A#	5,92
	TC42A05_A	0,78
BB1		
	Sseq16G8_B	0,56
	Sseq17E1_B	0,44
	TC22D09_B	0,01
	Ah3_B	0,01
	TC27H12_B	0,01
	Pseq4A6_B	1,42
BB2		
	Pseq7H6_A	1,36
	TC7H11_B	1,14
	AC2B03_B	0,29
	TC31C09_B	1,39
	TC23H10_B	0,56
	Pseq3A6_A	3,36
BB3		
	Sseq19D9_B	3,28
	TC7E04_B	2,78
	Sseq14C11_AB	0,11
	TC4G02_B	2,19
	Ah_041_B#	5,56

	TC4E10_B	0,56
	TC34E12_B	0,74
	TC40C03_A	0,09
	PM238_B	1,46
	TC22G05_2B	1,05
BB3a		
	TC23E04_B	0,73
	TC29H08_A#	6,06
	TC24G10_B	0,95
	TC2A02_B	1,39
BB4		
	499185_B	0,05
	TC39B04_B	0,18
	TC30B02_B	0,01
	TC4H07_B	0,01
	Sseq17F6_B	0,29
BB5		
	gi446_B	3,68
	Sseq19D6_AB	2,59
	TC36C03_B	1,14
	RN34H10_B#	8,40
	PM36_B	1,14
	TC19E01_B	0,76
	Pseq7D9_B#	5,23
	RN31E11_B	1,42
BB6		
	TC19A02_B	3,69
	Sseq19A5_B	0,74
	TC24B05_B	1,00
	TC3H07_B	0,58
BB7		
	Pseq5D5_B	0,56
	TC2G05_B	0,28
	TC3B05_B	0,20
	RN0x681_B	0,30
	TC7A02_B	0,19
	TC3B04_B#	10,90
BB8		
	TC20B05_B#	9,38
	TC21D06_B	0,05
	TC6H03_B	0,01
	TC22C01_B	0,42
	TC28A07_B	0,42
	PM443_B	1,64
BB9		
	TC5A06_B	3,68

	Lec_1_B#	8,24
	gi_1107_B	3,12
	Pseq7G2_B	4,15
BB10		
	gi342_B	0,05
	Pseq2F5_B	0,56
	SSeq14G3_B	0,20
	TC1E01_B	0,01
	Sseq18E7_B	0,19
	PM32_B	0,01
	501986_AB	0,11
